

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



## LÍVIA FRANCYNE GOMES CHAVES

**Espécies de begomovírus infectando** *Cnidoscolus urens* **e estudo da transmissão de** *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* **por sementes.** 

Rio Largo - AL 2022

## LÍVIA FRANCYNE GOMES CHAVES

**Espécies de begomovírus infectando** *Cnidoscolus urens* **e estudo da transmissão de** *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* **por sementes.** 

> Tese apresentada à Universidade Federal de Alagoas como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas para a obtenção do título de Doutor (a) em Proteção de Plantas.

> Orientador: Prof. Dra. Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva Coorientadora: Dra. Mayra Machado Medeiros Ferro

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

#### C512e Chaves, Lívia Francyne Gomes

Espécies de begomovírus infectando *Cnidoscolus urens* e estudos da transmissão de *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* por sementes. / Lívia Francyne Gomes Chaves – 2022. 65 f.; il.

Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias. Rio Largo, 2022.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sarah Jacqueline Cavalcante da Silva

Inclui bibliografia

1. Plantas daninha. 2. Euphorbiaceae . 3. Begomovírus I. Título.

CDU 632.5

## LÍVIA FRANCYNE GOMES CHAVES

Espécies de begomovírus infectando Cnidoscolus urens e estudo da transmissão de Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus por semente

> Tese submetida à banca avaliadora como requisito para conclusão de Doutorado em Proteção de Plantas, aprovada no dia 26 de agosto de 2022.

Prof.ª Dr.ª Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva – Universidade Federal de Alagoas Orientadora

Banca Examinadora:

Prof.ª Dr.ª Maria de Fátima Silva Muniz Universidade Federal de Alagoas

João Gomes da Costa - EMBRAPA

Prof. Dr. Roberto Ramos Sobrinho - Universidade Federal de Alagoas

RIO LARGO – AL 2022

## DEDICATÓRIA

A Deus, meu amado pai dos céus que amo. Pois a Ele, é dada toda honra, glória e poder. Amém!

#### AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por permitir fazer pós-graduação, pelo seu amor, cuidado, proteção e força, durante esse período.

À Universidade Federal de Alagoas – UFAL, e ao Campus de Engenharia e Ciências Agrárias (CECA) pela oportunidade de execução de toda trajetória acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas – FAPEAL, pela concessão da bolsa de estudo.

À minha orientadora Prof. Dr. Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva, pela oportunidade que me foi dada no Laboratório, pela orientação, paciência e auxílio por todas as vezes que foi solicitada.

À Mayra Machado Medeiros Ferro pela coorientação neste trabalho, além da amizade que foi formada, companheirismo, além disso, demonstrando sua alta capacidade como pesquisadora.

Aos Professores Iraildes Assunção e Gaus Silvestre, pela oportunidade e confiança depositada.

Aos Professores do Campus Rio-Largo, por todo conhecimento, dedicação, esforço e aprendizado concedido.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de participar da avaliação deste trabalho.

Aos meus pais, Marcos Francisco dos Santos Chaves e Sônia Maria Gomes de Lima, meu irmão, Lívio Filipe Gomes Chaves por toda palavra dita, oração, carinho, compreensão e contribuição durante o dia a dia.

Ao meu noivo, Luiz Carlos Tenório de Holanda Junior pelo apoio, paciência companheirismo e incontestável dedicação sempre que solicitado.

Aos companheiros do Laboratório de Fitopatologia e Virologia, pelo empenho na elaboração deste trabalho, experiências compartilhadas e orações em especial Geórgia Peixinho, Mayara Lima e Yolanda Melo.

#### **RESUMO**

Espécies do gênero Begomovirus (família Geminiviridae) ocasionam prejuízos em culturas de importância econômica ao redor do mundo. No entanto, hospedeiros nãocultivados desempenham um papel epidemiológico relevante, atuando como reservatório viral. Estes vírus são transmitidos por um complexo de espécies crípticas da moscabranca Bemisia tabaci, com casos raros de transmissão via sementes. Curiosamente, plantas de Cnidoscolus urens exibindo sintomas típicos de infecção por begomovírus são frequentemente observadas em condições de campo mesmo na aparente ausência do inseto vetor. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar molecularmente as espécies de begomovírus infectando C. urens, bem como avaliar a possível transmissão desses vírus via sementes. Amostras foliares de C. urens apresentando sintomas indicativos de infecção por begomovírus foram coletadas nos estados de Pernambuco (PE) e Rio Grande do Norte (RN) entre 2019 e 2020. O DNA total foi extraído a partir do tecido foliar e, posteriormente, utilizado como molde para amplificação do genoma viral por rolling circle amplification (RCA), seguida de digestão enzimática, clonagem e sequenciamento por primer walking. Amostras de folhas foram coletadas em sete municípios do estado de Alagoas. Enquanto as amostras de flores e sementes também foram coletads a partir de plantas sintomáticas de C. urens em Paripueira-AL. Para os testes de transmissão, plântulas foram obtidas a partir de sementes coletadas de plantas sintomáticas e positivas, via PCR, para cnidoscolus mosaic leaf deformation virus (CnMLDV). Amostas foliares foram coletadas a partir das plantas de C. urens 60 dias após germinação (dag), e infecção por CnMLDV foi avaliada, via PCR, utilizando primers espécie-específicos. Um total de seis clones do componente genômico DNA-A e três clones do DNA-B foram obtidos. O DNA-A do isolado de Paulista (PE) compartilhou maior porcentagem de identidade de nucleotídeos (79,9%) com tomato common mosaic virus (ToCmMV; número de acesso KC706579), enquanto o DNA-A do isolado de Cabo de Santo Agostinho (PE) mostrou maior porcentagem de identidade de nucleotídeos (88,9%) com CnMLDV (NC\_038982). O componente DNA-A do isolado de Goianinha (RN) também compartilhou maior porcentagem de identidade nucleotídica (82,8%) com CnMLDV (NC038982). Com base nos critérios de demarcação de espécies para o gênero Begomovirus, três possíveis novas espécies foram caracterizadas infectando C. urens, e, adotando o sistema binominal, os seguintes nomes são propostos, Begomovirus paulitiensis, Begomovirus caboniensis e Begomovirus goianiensis, respectivamente. Os resultados de detecção de CnMLDV em diferentes tecidos de plantas sintomáticas de C. urens revelaram que 62% das sépalas, 79% do androceu e 83% das flores, pétalas e gineceu estavam infectados. Mais de 90% das sementes coletadas a partir de C. urens sintomáticas, e infectadas com CnMLDV, testaram positivo via PCR. CnMLDV também foi detectado a partir de tegumento, endosperma e embrião. No entanto, as plântulas de C. urens não apresentaram sintomas típicos de infecção viral 60 dag, e foram PCR negativas para CnMLDV. Estes resultados sugerem que CnMLDV não é transmitido por sementes em C. urens.

Palavras-chave: plantas invasoras; Euphorbiaceae; transmissibilidade.

#### ABSTRACT

Species of the genus Begomovirus (family Geminiviridae) cause damage to crops of economic importance around the world. However, non-cultured hosts play a relevant epidemiological role, acting as a viral reservoir. These viruses are transmitted by a complex of cryptic species of the whitefly *Bemisia tabaci*, with rare cases of transmission via seeds. Interestingly, Cnidoscolus urens plants exhibiting typical symptoms of begomovirus infection are often observed under field conditions even in the apparent absence of the insect vector. In this context, the objective of the present study was to molecularly characterize the begomovirus species infecting C. urens, as well as to evaluate the possible transmission of these viruses via seeds. Leaf samples of C. urens showing symptoms indicative of begomovirus infection were collected in the states of Pernambuco (PE) and Rio Grande do Norte (RN) between 2019 and 2020. Total DNA was extracted from the leaf tissue and subsequently used as a template for viral genome amplification by rolling circle amplification (RCA), followed by enzymatic digestion, cloning and primer walking sequencing. Samples of leaves, flowers and seeds were also collected from symptomatic plants of C. urens in Paripueira, state of Alagoas (AL). For transmission tests, seedlings were obtained from seeds collected from symptomatic plants and positive, via PCR, for cnidoscolus mosaic leaf deformation virus (CnMLDV). Leaf samples were collected from C. urens plants 60 days after germination (dag), and CnMLDV infection was evaluated, via PCR, using species-specific primers. A total of six clones of the DNA-A genomic component and two clones of the DNA-B were obtained. DNA-A from the isolate from Paulista (PE) shared a higher percentage of nucleotide identity (79,9%) with tomato common mosaic virus (ToCmMV; accession number KC706579), while DNA-A from the isolate from Cabo de Santo Agostinho (PE) showed a higher percentage of nucleotide identity (88,9%) with CnMLDV (NC 038982). The DNA-A component of the isolate from Goianinha (RN) also shared a higher percentage of nucleotide identity (82,8%) with CnMLDV (NC038982). Based on the species demarcation criteria for the genus Begomovirus, three possible new species were characterized infecting C. urens, and, adopting the binomial system, the following names are proposed, Begomovirus paulitiensis, Begomovirus caboniensis and Begomovirus goianiensis, respectively. The results of CnMLDV detection in different tissues of symptomatic plants of C. urens revealed that 62% of the sepals, 79% of the androecium and 83% of the flowers, petals and gynoecium were infected. More than 90% of seeds collected from symptomatic C. urens infected with CnMLDV tested positive via PCR. CnMLDV was also detected from tegument, endosperm and embryo. However, C. urens seedlings did not show typical symptoms of viral infection 60 dag, and were PCR negative for CnMLDV. These results suggest that CnMLDV is not seed-transmitted in C. urens.

Keywords: no-cultivated plants; Euphorbiaceae; transmissibility.

### LISTA DE TABELAS

#### Capítulo 1

#### Manuscrito

#### Capítulo 2

## LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura	
Figura 1. Organização genômica dos begomovirus	16
Capitulo I	
Figura 1. Sintomas em <i>Cnidoscolus urens</i> infectadas por begomovírus	obtidos neste
estudo	
Figura 2. Identidades de sequência de nucleotídeos em pares do DNA-A c	ompleto de <i>B</i> .

**Figura 5.** Árvore filogenética do componente DNA-B dos isolados obtidos neste estudo (destacado em vermelho e azul) e os begomovírus mais estreitamente relacionados. Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) foi usado como um grupo externo. As árvores filogenéticas foram construídas usando o método de inferência Bayesiana......29

## Manuscrito

**Supplementary Figure S1**. Alignment of the common region (CR) of DNA-A and DNA-B sequences of *B. caboniensis*. The TATA-box and nonanucleotide sequence are identified in the figure. Horizontal arrows indicate the iterated sequence and its position.

## Capítulo 2

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Cnidoscolus urens (L). Arthur	11
2.2 Família <i>Geminiviridae</i>	13
2.2.1 Gênero Begomovirus	
2.3 Begomovírus em plantas invasoras da família Euphobiaceae	
2.4 Transmissão de begomovírus por mosca-branca	19
2.5 Transmissão de begomovírus via semente	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Coleta do Material Vegetal	
3.2 Clonagem e sequenciamento do genoma viral	22
3.3 Análise de sequências e demarcação de espécies	22
3.4 Análise filogenética	
3.5 Análise de recombinação	
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 Análises de sequências e demarcação de espécie	
4.2 Análise Filogenética	
4.3 Análise de Recombinação	
5 CONCLUSÃO	31
6 REFERÊNCIAS	
7 CAPÍTULO I	45
8 CAPÍTULO II	54
Introduction	55
Material and methods	56
Results	58
Discussion	60
Conclusions	62
References	62

#### 1 INTRODUÇÃO GERAL

A família *Geminiviridae* engloba vírus que possuem genoma de DNA fita simples (ssDNA) circular, encapsidados em partículas quasi-icosaédricas geminadas (ZERBINI et al., 2017). A família é constituída por 14 gêneros, *Becurtovirus, Begomovirus, Capulovirus, Citlodovirus, Curtovirus, Eragrovirus, Grablovirus, Maldovirus, Mastrevirus, Mulcrilevirus, Topilevirus, Topocuvirus, Turncurtovirus* e *Opunvirus* definidos com base no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização genômica e relacionamento filogenético (VARSANI et al., 2017; ZERBINI et al., 2017; FONTENELE et al., 2021). O gênero *Begomovirus* possui 445 espécies atualmente reconhecidas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* – ICTV (https://talk.ictvonline.org/taxonomy/). Nos últimos anos, o número de espécies descritas vem crescendo e ocasionando prejuízos em culturas de importância econômica ao redor do mundo (GILBERTSON et al., 2015; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016).

Atuam infectando uma ampla gama de hospedeiros cultivados e não-cultivados, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (NAVAS-CASTILLO; FIALLO-OLIVÉ; SÁNCHEZ-CAMPOS, 2011; BROWN et al., 2015).). Diferentes espécies de begomovírus têm sido relatadas em plantas invasoras pertencentes à família Euphorbiaceae: euphorbia mosaic virus (EuMV) (HERNÁNDEZ-ZEPEDA et al., 2007), croton yellow vein virus (CYVV) (HUSSAIN et al., 2011), euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV) (FERNANDES et al., 2011), dalechampia chlorotic mosaic virus (DCMV) (FIALLO-OLIVÉ et al., 2013), jatropha mosaic virus (JMV) (SIMMONDS-GORDON et al., 2014), jatropha mosaic India virus (JMIV) (SRIVASTAVA et al., 2015), jatropha mosaic Nigeria virus (JMNV) (KASHINA et al., 2013), cnidoscolus mosaic leaf deformation virus (CnMLDV) (MELO et al., 2016), croton yellow vein virus (CrYVV) (HUSSAIN et al., 2011), croton golden mosaic virus (CroGMV) (VACA-VACA et al., 2018) e cnidoscolus blistering yellow mosaic virus (CnBYMV) (OLIVEIRA et al., 2021). Esses relatos reforçam o papel das plantas invasoras da família Euphorbiaceae como reservatório viral. Passos et al. (2017) relatam que a caracterização de espécies de begomovírus que infectam plantas invasoras pode contribuir para o esclarecimento da dinâmica evolutiva e ecológica desses vírus.

Vírus dentro do gênero *Begomovirus* são transmitidos por um complexo de espécies crípticas da mosca-branca *Bemisia tabaci*, com algumas poucas espécies também sendo transmitidas via sementes (ALBRECHTESEN, 2006; GILBERTSON et al., 2015). Os vírus transmissíveis por sementes são de grande importância, servindo como fonte inicial de inóculo para a transmissão por vetores, além de serem disseminados a longas distâncias e perpetuados

nas sementes (ALI; KOBAYASHI, 2010). Portanto, a caracterização de begomovírus transmitidos via sementes pode ser fundamental na adoção de medidas de controle da doença.

Plantas de *C. urens* exibindo sintomas como mosaico e deformação foliar são comumente encontradas crescendo em condições de campo, mesmo na aparente ausência do inseto vetor *B. tabaci*. Estas observações sugerem que estes vírus podem ser verticalmente transmitidos por sementes oriundas de plantas infectadas. Portanto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar molecularmente begomovírus infectando *C. urens*, bem como avaliar a possível transmissão de CnMLDV via sementes.

#### 2 REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1 Cnidoscolus urens (L). Arthur

*Cnidoscolus* Pohl é um gênero neotropical pertencente à família Euphorbiaceae, com mais de 50 espécies descritas (WEBSTER 1994; GOVAERTS et al., 2000). Essas plantas são endêmicas ao Novo Mundo, sendo principalmente relatadas no México e na região Nordeste do Brasil (WEBSTER, 1994; BURGER; HUFT, 1995; MELO; SALES, 2008). No Brasil, o gênero é constituído por 42 espécies com distribuição nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica e Caatinga (CORDEIRO; SECCO, 2014).

O nome *Cnidoscolus* (*knide* = urtiga, *skolos* = ponta) é de origem grega (SOUKUP, 1968) e faz referência à presença de tricomas urticantes encontrados nas partes vegetativas e florais da planta. Quando os tricomas entram em contato direto com o corpo, há liberação de substância que provoca fortes dores, urticárias, inchaços, palpitações e até desmaio. Também é reconhecida por apresentar folhas lobadas e possuir glândulas na união do pecíolo com as lâminas (LUTZ, 1914; GORDILLO et al., 2002; MELO, 2008).

O gênero *Cnidoscolus* atrai a população científica porque o extrato das plantas pode contribuir para o controle da hiperglicemia em pacientes diabéticos (VALENZUELA SOTO et al., 2015; JARAMILLO et al., 2015). Extratos botânicos da espécie *Cnidoscolus phyllacanthus* induzem alterações na ovoposição de insetos (CANDIDO; BEZERRA, 2015). Além disso, são utilizadas como forrageira (BEZERRA, 1972; PASSOS, 1993; LIMA, 1998), oleífera (BONDAR, 1942; SANTA ROSA, 1943; MORS; RIZZINI, 1966), laticífera (WILLIAMS, 1962) e ornamentais (INGRAM,1957; POTT; POTT, 1994). *Cnidoscolus urens* L., conhecida popularmente como urtiga cansanção, é uma herbácea muito comum na Caatinga (BURGER;

HUFT, 1995). As plantas geralmente são encontradas em clareiras nas florestas, estradas e campos abandonados (BAWA; WEBB; TUTTLE, 1982).

Plantas invasoras podem servir como reservatório natural de fitovírus, incluindo os begomovírus (SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; FERRO, et al., 2017). Assunção et al. (2006) relatou pela primeira vez infecção por begomovírus em *Cnidoscolus urens* e, nos últimos anos, o primeiro genoma completo de um begomovírus ocorrendo naturalmente neste hospedeiro foi relatado e identificado como CnMLDV (MELO, 2016). Oliveira et al. (2021) identificaram a segunda espécie nesta mesma invasora denominada como cnidoscolus blistering yellow mosaic virus (CnBYMV).

Em begomovírus a estrutura de população é influenciada por forças evolutivas como recombinação, deriva genética e mutação, além de interações entre hospedeiro, vetor e vírus (GARCIA-ARENAL; FRAILE; MALPICA. 2003; SEAL; VANDENBOSCH; JEGER, 2006; NAVAS-CASTILLO et al., 2011; ROCHA et al., 2013; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

O estudo da dinâmica populacional desses vírus é importante, pois podem contribuir como reservatório viral, e assim ocorrendo recombinação intraespecífica e pseudorrecombinação (BARRETO et al., 2013; ROCHA et al., 2013; SILVA et al., 2014).

Mendes et al. (2021) trabalhando com isolados de CnMLDV coletados na região norte e sul de Alagoas constataram que estão separados em dois agrupamentos de sequências divergentes, sugerindo estruturação populacional, e curiosamente a previsão de uma ORF putativa AC5 com potencial para codificar uma proteína de 105aa é encontrada apenas em isolados obtidos da subpopulação do Litoral Norte, e assim podendo ser considerada mais evidência de isolamento genético entre essas duas subpopulações. Ainda neste trabalho foram constatados sete eventos independentes de recombinação intraespécies entre isolados de CnMLDV, com *breakpoints* de recombinação localizados nos genes *CP*, *Rep* e na região comum (CR).

Estudos sobre a estrutura genética de populações de begomovírus que infectam *Euphorbia heterophylla* foi analisada em uma amostragem de larga escala, com isolados coletados em diferentes locais do Brasil, entre o período de 2009 e 2014, o resultado da dinâmica populacional compreendeu seis subpopulações conforme os locais de amostragem e análise filogenética (MAR et al., 2017). Os mesmo autores, constataram que não houve nenhum evento de recombinação no conjunto de dados de DNA-A intraespecífico. Por outro lado, foram

detectados cinco isolados recombinantes para o conjunto de dados de DNA-B intraespecífico, com breakpoints localizados dentro dos genes *NSP* e/ou *MP* e outros em regiões não codificantes.

#### 2.2 Família Geminiviridae

A família *Geminiviridae* é composta pelos gêneros *Becurtovirus, Begomovirus, Capulovirus, Citlodovirus, Curtovirus, Eragrovirus, Grablovirus, Maldovirus, Mastrevirus, Mulcrilevirus, Topilevirus, Topocuvirus, Turncurtovirus* e *Opunvirus*, os quais se distinguem pelo tipo de inseto vetor, gama de hospedeiro, organização genômica e relacionamento filogenético (VARSANI et al, 2014; 2017; ZERBINI et al., 2017; FONTENELE et al., 2020). Os vírus pertencentes a essa família possuem partículas de morfologia geminada quasiicosaédricas com aproximadamente 18 nm de diâmetro e 30 nm de comprimento. O genoma é de DNA circular de fita simples (ssDNA) com tamanho variando de 2,6 a 5,2 kilobases (kb), sendo a maioria dos gêneros 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 (ARGÜELLO-ASTORGA; RUIZ-MEDRANO, 2001; ROJAS et al., 2005; BROWN et al., 2015).

A transmissão de geminivírus ocorre por insetos vetores que se alimentam a partir do floema da planta hospedeira, compreendendo diferentes espécies de cigarrinhas, moscasbrancas que abrangem um complexo de espécies crípticas de *Bemisia tabaci*, membracídeos e afídeos (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). As plantas infectadas apresentam sintomas comuns do tipo deformação foliar, amarelecimento, mosaico e/ou estriações (VARSANI et al., 2017).

Os geminivírus são capazes de infectar mono e dicotiledôneas de grande importância econômica ao redor do mundo, ocasionando problemas na produção, além de plantas nãocultivdas e ornamentais (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013; INOUE-NAGATA, 2016). Esses fitovírus ocasionam problemas na agricultura, onde merecem destaque os begomovírus bean golden mosaic virus (BGMV) e bean golden yellow mosaic virus (BGYMV) infectando *Phaseolus* spp (feijões) nas Américas, tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) infectando *Solanum* spp (tomates) em todo o mundo, african cassava mosaic virus (ACMV) infectando *Manihot esculenta* (mandioca) na África, e cotton leaf curl virus (CLCuV) infectando *Gossypium* L.(algodão) na Ásia, o *Curtovirus* beet curly top virus (BCTV) infectando *Beta*  *vulgaris* L.(beterraba açucareira) na América do Norte e Oriente Médio, e o *Mastrevirus* maize streak virus (MSV) infectando *Zea mays* (milho) na África (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013; INOUENAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). Algumas dessas espécies são capazes de provocar perdas de até 100% (LEGG; FAUQUET, 2004; SHEPHERD et al., 2010; SATTAR et al., 2013).

#### 2.2.1 Gênero Begomovirus

Atualmente, o gênero Begomovirus inclui 445 espécies oficialmente reconhecidas pelo International ICTV Comitee on Taxonomy of Viruses (http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp) (VARSANI et al., 2014; BROW et al., 2015). Nos últimos 20 anos, foi possível observar uma rápida expansão e/ou disseminação de begomoviroses em todas as partes do mundo, sendo principalmente transmitida pelo inseto vetor B. tabaci Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), antigo biótipo B (NAVAS-CASTILLO; FIALLO-OLIVÉ; SÁNCHEZ-CAMPOS, 2011; GILBERTSON et al., 2015). A B. tabaci é um inseto sugador que, ao introduzir o estilete, absorvem a seiva a partir do floema, podendo adquirir partículas virais quando se alimentam em plantas infectadas. A partícula viral circula por todo corpo do inseto, passando do intestino para hemolinfa onde é conduzido, com o auxílio de proteínas denominadas GroEL (sintetizada por endossimbiontes no intestino das moscasbrancas vetoras), até a glândula salivar. Ao se alimentar de hospedeiras sadias, a mosca-branca virulífera deposita a saliva contendo partículas virais. O inseto vetor é polífago, possui vasta gama de hospedeiros, com capacidade se alimentar em mais de 1000 espécies de plantas, tornando-se um eficiente vetor na transmissão desses vírus (CHEN et al., 2016).

De acordo com a 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 presentes no VM apresentam um ou dois componentes genômicos e são frequentemente associados a alfa e betassatélites (FAUQUET; STANLEY, 2005; ZHOU et al., 2013; LOZANO et al., 2016; ROSARIO et al., 2016). Já os begomovírus do NM são quase que exclusivamente bipartidos, 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), tomato severe leaf curl virus (ToSLCV) (GILBERTSON et al., 2015), tomato twisted leaf virus (ToTLV) (ROMAY et al., 2019) e corchorus yellow vein Cuba virus

(CoYVCUV) (FIALLO-OLIVÉ; NAVAS-CASTILLO, 2020). O TYLCV, um begomovírus monopartido nativo do VM, foi introduzido na República Dominicana no início da década de 1990 e, atualmente, encontra-se presente em toda América Central, Caribe e Estados Unidos (NAHKLA et al., 1994; DUFFY; HOLMES, 2008).

Recentemente, o ICTV oficializou a criação de uma família de DNA satélites de fita simples associados a begomovírus, *Tolecusatellitidae*, a qual inclui os gêneros *Betasatellite* e *Deltasatellite* (ADAMS et al., 2017). O gênero *Betasatellite* inclui 61 espécies listadas, com cerca da metade do tamanho dos componentes do genoma dos begomovírus. Betasatélites codificam a proteína βC1 que tem papéis importantes na indução de sintomas e na supressão do silenciamento gênico transcricional e pós-transcricional (ZHOU, 2013). O gênero *Deltasatellite* possui cerca de um quarto do tamanho dos componentes genômicos dos begomovírus, possuindo 11 espécies descritas (FIALLO-OLIVÉ et al., 2012; LOZANO et al., 2016). O tomato leaf curl deltasatellite, anteriormente ToLCV-sat, foi o primeiro DNA satélite identificado em associação com um vírus de planta, o begomovírus monopartido do VM tomato leaf curl virus (ToLCV), originário da Austrália (DRY et al., 1997). Deltasatélites também foram encontrados associados a begomovírus bipartidos do NM que infectam plantas invasoras (família Malvaceae) e sweepovírus (FIALLO-OLIVÉ et al., 2012, 2016; LOZANO et al., 2016; FIALLO-OLIVÉ; NAVAS-CASTILLO, 2020).

No Brasil e na Venezuela, foram identificados alfassatélites associados aos begomovírus bipartidos cleome leaf crumple virus (ClLCrV), 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). Em 2016, 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).

O genoma dos begomovírus possui ORFs (*open reading frames*) que codificam proteínas multifuncionais (WALSH; MOHR, 2006). O componente DNA-A dos begomovírus bipartidos é homólogo ao dos monopartidos e compreende entre cinco e seis ORFs (Figura 1). No componente DNA-A, um gene é transcrito no sentido viral denominado CP (*Coat Protein*) que codifica para a proteína da capa proteica, e quatro no sentido complementar Rep, TrAP, Ren e C4, que codificam, respectivamente para a proteína associada à replicação (*Replication associated Protein* - Rep), a proteína da transcrição (*Trans-Acting Protein* - TrAP), uma proteína que aumenta a replicação do genoma viral (*Replication Enhancer* - REn) e uma

proteína envolvida na supressão do silenciamento gênico (C4) (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999; FARIA; ZERBINI, 2000).

**Figura 1.** Organização gerômica dos begomovirus LIR, região intergênica longa; SIR, região intergênicaa curta; CR, região comum; nsp (BV1), proteína de movimento nuclear; cp (V1/AV1), proteína capsidial; mp (V2/BC2), proteína de movimento; rep (C1), proteína associada a replicação; ren (C3/AC3), proteína potencializadora de replicação; trap (C2/AC2), proteína de transcrição/supressor de silenciamento gênico (modificada de VARSANI et al., 2017 e adaptada por autora, 2022).



Fonte: elaborada pela autora (2022).

O produto da ORF AV1/V1 é uma proteína multifuncional e estrutural (CP), sendo responsável pela proteção do material genético, e transmissão pelo inseto vetor (BRIDDON et al., 1990; AZZAM et al., 1994; FRISCHMUTH; STANLEY, 1998; HARRISON; SWANSON; FARGETTE, 2002). Uma outra proteína sintetizada no sentido viral é a AV2/V2A presente apenas em begomovírus monopartidos do VM, é denominada '*Pre-coat protein*' e relaciona-se ao movimento sistêmico mais eficiente do vírus na planta, além de atuar como anti-defesa inibindo silenciamento gênico (PADIDAM; BEACHY; FAUQUET, 1996; CHOWDA-REDDY et al., 2008; ZHANG et al., 2012).

No sentido complementar, ORF AC1/C1 codifica a proteína Rep, sendo uma proteína essencial para replicação viral. A Rep não possui atividade polimerase e depende exclusivamente das enzimas polimerases da planta hospedeira para facilitar a replicação do DNA viral (JESKE, 2009; BRIDDON, 2014). A Rep se liga a regiões intergênicas conhecidas como iterons e cliva a fita de DNA no nonanucleotídeo 5'-TAATATT|AC-3' dando início ao processo de replicação (FONTES; LUCKOW; HANLEYBOWDOIN, 1992; LAUFS et al., 1995). Além disso, a Rep é capaz de se autorregular, uma vez que sua ligação à origem de replicação reprime a expressão de genes no sentido complementar (incluindo sua própria expressão) (EAGLE et al., 1994), mas aparentemente não reprime a expressão de genes no sentido viral (SHIVAPRASAD et al., 2005).

A TraAP, produto da ORF AC2/C2, é uma proteína codificada pelo gene *trap* e é responsável por expressar as proteínas no sentido viral CP (AV1/V1) e NSP (*nuclear shuttle protein*; BV1), sendo assim, os transcritos relacionados a estes genes só são observados na célula após a expressão do gene *trap*. A TrAP ainda está envolvida na supressão de silenciamento gênico transcricional (TGS) e pós-transcricional (PTGS) (ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-ZAMBOLIN, 2002; VANITHARANI et al., 2004; WANG et al., 2005; RAJA et al, 2008).

A ORF AC3/C3 codifica a proteína Ren, que embora não seja essencial para ocorrência da replicação do DNA viral, na sua presença ocorre amplificação da replicação. A diminuição de sintomas ocasionados por begomoviroses podem estar associados a mutações na AC3 (SUNTER et al., 1990; SUNG; COUTTS, 1995).

A AC4/C4 é uma ORF que está inserida na ORF AC1, em uma fase de leitura diferente, com função variável entre os begomovírus do VM e NM. Nos begomovírus VM, a C4 atua na severidade dos sintomas e movimento viral (JUPIN et al., 1994), já nos do NM, atua na movimentação viral e não é necessária para que ocorra infecção (FONTENELLE et al., 2007). Quando ocorre rapidamente a presença de sintomas na planta, relaciona-se a supressão do sistema de defesa da planta, ocasionado pelo gene AC4 (VANITHARANI et al., 2004).

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

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

#### 2.4 Begomovírus em plantas invasoras da família Euphobiaceae

Nas últimas décadas, os begomovírus têm emergido como um dos principais patógenos de plantas, ocasionando perdas econômicas severas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (MORALES, 2010) em culturas como feijão (*Phaseolus vulgaris*), mandioca (*Manihot esculenta*), algodão (*Gossypium* sp.), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e tomate (GRAHAM; MARTIN; ROYE, 2010). Além disso, muitas espécies de plantas invasoras têm sido descritas como hospedeiras de begomovírus (CASTILLO-URQUIZA, 2008; SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Os primeiros relatos de infecção de hospedeiros silvestres por begomovírus ocorreram por volta de 1950 (COSTA; BENNETT, 1950; COSTA, 1955; COSTA, 1976), com destaque para aquelas pertencentes às famílias Malvaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae (MORALES; ANDERSON, 2001).

As plantas daninhas são consideradas agentes bióticos de grande importância em sistemas agrícolas, pois podem interferir negativamente no crescimento e produtividade de algumas culturas (AMARAL, 2006). Além disso, podem atuar como reservatório viral, servindo como fontes de inóculo para espécies vegetais cultivadas comercialmente (ROCHA et al., 2013; FERNANDES et al., 2014).

Plantas invasoras pertencentes à família Euphorbiaceae, como *Jatropha gossypifolia*, têm sido relatadas como hospedeiras naturais de begomovírus (COOK, 1931 apud SIMMONDS-GORDON, 2014). Duas décadas depois, Costa e Bennet (1950) observaram sintomas de mosaico em *Euphorbia heterophylla*, provavelmente causados por euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), o primeiro begomovírus de euforbiáceas completamente caracterizado no Brasil (FERNANDES et al., 2011). Adicionalmente, EuYMV tem sido encontrado infectando naturalmente outros hospedeiros como *Macroptilium artopurpureum*, *Sida santaremensis*, *Crotalaria juncea* e *Solanum lycopersicum* (SILVA et al., 2012; TAVARES et al., 2012; ROCHA et al., 2013; BARRETO et al., 2013; DUARTE et al., 2020). Desde então, diversas espécies têm sido descritas e caracterizadas incluindo euphorbia mosaic virus (EuMV) (HERNÁNDEZ-ZEPEDA et al., 2007), croton yellow vein virus (CrYVV) (HUSSAIN et al., 2011), dalechampia chlorotic mosaic virus, (DaCIMV) (FIALLO-OLIVÉ et al., 2013), jatropha mosaic virus (JMV) (SIMMONDS-GORDON et al., 2014), jatropha mosaic India virus (JMIV) (SRIVASTAVA et al., 2015), jatropha mosaic Nigeria virus (JMNV) (KASHINA et al., 2013) e croton golden mosaic virus (CroGMV) (VACA-VACA et al., 2018).

Em 2006, plantas de *C. urens* apresentando sintomas de mosaico e deformação foliar coletadas no estado de Alagoas testaram positivas, via PCR, para infecção por begomovírus (ASSUNÇÃO et al., 2006). Após 10 anos, foi caracterizado o genoma completo do uma nova

espécie de begomovírus nomeada como *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* (MELO et al., 2016), e, mais recentemente, foi descrito um novo begomovírus infectando *C. urens* no estado do Piauí, o qual foi nomeado cnidoscolus blistering yellow mosaic virus (CnBYMV; OLIVEIRA et al., 2021).

#### 2.5 Transmissão de begomovírus por mosca-branca

Os vírus de plantas podem ser disseminados de forma vertical, ou horizontalmente mediada por vetores (AMARAL, 2016). A mosca-branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) possui aparelho sugador e é considerada uma das pragas mais importantes no mundo, sendo cosmopolita e polífaga, e ocasionando enormes prejuízos a diversas culturas (LIMA et al., 2001; GILBERTSON et al., 2015). A espécie foi descrita pela primeira vez como *Aleyrodes tabaci* associada a cultura do fumo na Grécia em 1889 (GENNADIUS, 1889), sendo referida por quatro décadas por diferentes nomes, até ser finalmente classificada como *Bemisia tabaci* em 1957 (RUSSEL, 1957).

Inicialmente, acreditava-se na existência de uma única espécie de *B. tabaci* que era classificada em biótipos, porém, estudos moleculares utilizando o gene mitocondrial *citocromo oxidase I* (mtCOI) revelaram que *B. tabaci* é composta por um complexo de espécies e não por biótipos. Atualmente, pelo menos 39 espécies crípticas são reconhecidas (VYSKOČILOVÁ et al., 2018; DINSDALE et al., 2010; DE BARRO et al., 2011). Duas espécies são de especial importância econômica, atuando como pragas altamente invasivas: Mediterranean (MED) e Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), sendo a última predominantemente encontrada no Brasil (DE BARRO et al., 2011; ALEMANDRI et al., 2016).

A transmissão dos begomovírus por mosca-branca é de modo persistente-circulativa (GHANIM et al., 2007; GILBERTSON et al., 2015). O inseto, com auxílio do estilete, ingere as partículas virais presentes na seiva do floema, as quais são transportadas para esôfago e na câmara de filtro. Posteriormente, as partículas virais atravessam a parede do intestino para a hemolinfa, onde circulam até adentrarem à glândula salivar. Por fim, são transmitidas para novas plantas durante a alimentação do inseto (HUNTER et al., 1998; GHANIM et al., 2001; CZOSNEK et al., 2002; GHANIM et al., 2007).

#### 2.6 Transmissão de begomovírus via semente

Os begomovírus são comumente encontrados no tecido floemático das plantas infectadas, porém há espécies com capacidade de infectar tecidos mais externos como as células do mesófilo (NELSON; VAN BEL, 1997). Esta limitação ao floema leva a conclusão de que

os geminivírus, principalmente os begomovírus, podem não ser capazes de infectar as regiões internas da semente (HULL, 2002). No entanto, Bennett; Esau (1936) relataram infecção de tecidos, exceto embrião, da semente de beterraba pelo beet curly top virus (BCTV, gênero *Curtovirus*).

Até recentemente, acreditava-se que os begomovírus não eram transmitidos por sementes (GILBERTSON et al., 2015). No entanto, Kim et al. (2015) publicaram o primeiro relato da transmissão do sweet potato leaf curl virus (SPLCV) via sementes de *Ipomea batatas* (batata-doce). Quando as sementes foram germinadas na ausência do vetor (mosca-branca), plantas de batata-doce mostraram sintomas típicos de infecção por SPLCV e, 70% das sementes testaram positivas, via PCR, para o vírus. O nível de transmissão do SPLCV via sementes foi de até 15%. Os mesmos autores também constataram a presença do vírus em peças florais (pétalas, pistilo e estames) e sementes (tegumento, embrião e endosperma).

Em 2015, ocorreu o segundo relato de transmissão de begomovírus via semente em *Vigna mungo* (KOTHANDARAMAN et al., 2015). Plantas jovens com o primeiro trifólio, assim como vagens e sementes, já apresentavam sintomas de amarelecimento, sugerindo que o mung bean yellow mosaic virus (MgYMV) seria transmitido por sementes. Interessantemente, as plântulas advindas de sementes infectadas eram assintomáticas, no entanto, apresentaram uma taxa de infecção viral de 32% (KOTHANDARAMAN et al., 2015).

Kil et al. (2016) relataram a primeira ocorrência da transmissibilidade de tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) via sementes em tomateiro. Além disso, foi demonstrado que as sementes infectadas constituiam uma fonte de propagação mais crítica do que as moscasbrancas virulíferas. Os mesmos autores também concluíram que em tomateiro tolerante (cv. Bacchus), TYLCV foi transmitido para sementes e mudas, mas a carga viral foi menor quando comparada com tomateiros suscetíveis (cv. Seogwang). A transmissibilidade de TYLCV via sementes não se restringe à cultura do tomateiro, com ocorrência da transmissão dessa virose, via sementes, nas culturas da pimenta e soja (KIL et al. 2017; KIL et al., 2018).

A hipótese de transmissão do dolichos yellow mosaic virus (DoYMV), via sementes, surgiu durante uma pesquisa de campo nas regiões produtoras do *Dolichos lablab* (feijão lablab). Sementes coletadas de plantas infectadas foram dissecadas em tegumento, endosperma e embrião, e testaram positivo para DoYMV. No teste de transmissão, embora as plantas não apresentassem sintomas, a detecção do vírus foi de até 46 e 55%, por DAS-ELISA e PCR, confirmando a transmissibilidade do DoYMV via sementes (KOTHANDAN et al., 2018).

Um outro relato de transmissão de begomovírus via semente ocorreu entre 2016-2017 em *Momordica charantia* L. (melão-de-são-caetano) na Índia. O isolado do begomovírus *Bitter*  *gourd yellow mosaic virus* foi detectado em sementes de plantas infectadas (79,16%), e no teste de transmissão para mudas, foi observada uma taxa de transmissão de 32,05% (MANIVANNANA et al., 2018). Mais recentemente, diferentes estudos demonstraram a transmissibilidade do *Tomato leaf curl New Delhi virus* via sementes de *Cucurbita pepo* (abobrinha) e *Sechium edule* (chuchu) (SANGEETHA et al., 2018; KIL et al., 2020), constituindo o oitavo e nono relatos de transmissão, respectivamente. O décimo relato ocorreu na Indonésia em plantas de pimenta (*Capsicum annuum*) infectadas por pepper yellow leaf curl Indonesia vírus (PepYLCIV). Sementes de plantas sintomáticas foram coletadas em várias regiões da Indonésia e, após a germinação, foram analisadas as mudas, cotilédone, hipocótilo e radícula. O estudo mostrou que os componentes genômicos DNA-A e DNA-B de PepYLCIV foram detectados em sementes, embriões e órgãos separados de plântulas. Além disso, o vírus foi transmitido de sementes para novas mudas (FADHILA et al., 2020).

Ortega-Acosta et al. (2018) avaliaram a ocorrência e a transmissibilidade do okra yellow mosaic Mexico virus (OYMMV), begomovírus detectado em plantas de hibiscos, em diferentes espécies de plantas invasoras. Além de relatarem a ocorrência do OYMMV em *Sida agregata*, *S. acuta, S. collina, S. haenkeana*, e *Malachra fasciata*, os autores confirmaram a transmissibilidade do vírus via sementes em todas as espécies estudadas.

#### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### 3.1 Coleta do Material Vegetal

Amostras foliares de *C. urens* apresentando sintomas como mosaico, deformação foliar e nanismo (Figura 1), indicativos de infecção por begomovírus, foram coletadas nos municípios Cabo de Santo Agostinho e Paulista, pertencentes ao estado de Pernambuco (PE), e Goianinha, estado do Rio Grande do Norte (RN), entre 2019 e 2020. O material vegetal foi armazenado na forma de exsicatas e congelados em ultra freezer (-80°C) no Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas. **Figura 1.** Sintomas em *Cnidoscolus urens* infectadas por begomovírus obtidos neste estudo. **A.** Sintoma de mosaico leve causado por *Begomovirus caboniensis* **B.** Sintomas leves de bolhosidade e mosaico causados por *Begomovirus paulitiensis* **C.** Sintoma de mosaico amarelo causado por *Begomovirus goianiensis*.



Fonte: elabora pela autora (2022).

#### 3.2 Clonagem e sequenciamento do genoma viral

O DNA total foi extraído a partir das folhas de C. urens (DOYLE; DOYLE, 1987) e utilizado como molde para reações de amplificação dos genomas virais completos via rollingcircle amplification (RCA) (INOUE-NAGATA et al., 2004). Alíquotas (2 µL) das reações de amplificação foram submetidas a clivagens com as enzimas de restrição ClaI, ApaI e HindIII para linearizar o genoma. Os produtos das reações de clivagem enzimática foram analisados em gel de agarose a 0,8%, corados com brometo de etídio (5 µg/mL) e visualizados sob luz UV. Alíquotas das reações de clivagem contendo fragmentos de aproximadamente 2600 nucleotídeos (nt), correspondente a uma cópia de cada componente genômico, foram utilizadas para ligação no vetor pBluescript KS+ (Stratagene) previamente linearizado com a mesma enzima e defosforilado. O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação de células ultracompetentes de Escherichia coli estirpe DH10B pelo método de choque térmico (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Colônias contendo os possíveis plasmídeos recombinantes foram repicadas para meio LB líquido contendo ampicilina (Ampicilin, sodium salt USB<sup>©</sup>) e incubadas a 37 °C sob agitação orbital de 180 rpm por 16h. Após incubação, as culturas foram submetidas à extração de DNA plasmidial com KIT illustra<sup>TM</sup> plasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare). O DNA plasmidial foi então digerido com a mesma enzima utilizada para clonagem e o padrão de bandas em gel de agarose 0,8% foi utilizado para confirmação do processo de clonagem. Os clones confirmados via digestão com endonucleases foram completamente sequenciados por primer walking na Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul).

#### 3.3 Análise de sequências e demarcação de espécies

Sequências nucleotídicas completas correspondentes ao componente genômico do DNA-A foram montadas utilizando-se o programa *CodonCode Aligner* v. 4.1.1

(www.codoncode.com). As sequências obtidas foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLAST*n* (ALTSCHUL et al., 1990) e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para determinar as espécies virais com as quais compartilhavam maior porcentagem de identidade (Anexo I, p.72). Comparações de sequências nucleotídicas pareadas foram realizadas usando o programa SDT (*Sequence Demarcation Tool*) v.1.2 (MUHIRE et al., 2014).

#### 3.4 Análise filogenética

Alinhamentos múltiplos de sequências nucleotídicas dos isolados obtidos neste estudo foram preparados usando o algoritmo MUSCLE implementado no MEGA6 (TAMURA et al., 2011). As análises filogenéticas foram realizadas na *web portal* CIPRES (Miller et al., 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (Ronquist et al., 2012). O melhor modelo de substituição nucleotídica (GTR+I+G), determinado usando MrModeltest 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004) de acordo com o *Akaike Information Criterion* (AIC), foi usado para o conjunto de dados do componente DNA-A. As análises foram realizadas em 10 milhões de gerações usando quatro cadeias e amostrando a cada 1.000 gerações, para um total de 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas como uma fase de burn-in. As árvores foram visualizadas e editadas usando o software FigTree v. 1.4 (ztreebio.ed.acuk/software/figtree).

#### 3.5 Análise de recombinação

Análise de recombinação foi realizada com o componente genômico DNA-A dos isolados obtidos neste estudo e 25 sequências de diferentes espécies de begomovírus de plantas cultivadas e não cultivadas da América do Sul (Anexo I, p. 66). A determinação dos locais (*breakpoints*) de recombinação e identificação de prováveis sequências parentais foram realizadas utilizando os métodos RDP, Geneconv, Boot-scan, Maximum Chi Square, Chimaera, SisterScan e 3Seq implementados no pacote RDP v. 4.0 (MARTIN et al., 2015). Os alinhamentos foram analisados com configurações padrão para os diferentes métodos e a significância estatística foi inferida por um valor *P* menor que o valor de corte de Bonferroni corrigido de 0,05. Os eventos de recombinação que foram detectados por pelo menos quatro métodos foram considerados confiáveis.

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 4.1 Análises de sequências e demarcação de espécie

Foram obtidos seis clones correspondendo ao componente genômico DNA-A e três clones ao DNA-B. De acordo com o critério do *International Comitee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) para demarcação de espécies no gênero *Begomovirus* (BROWN et al., 2015) < 91% de identidade nucleotídica para sequências do DNA-A, três possíveis novas espécies são relatadas no presente trabalho. Os clones BR-Ca96-19A (número de acesso MZ465527), BR-Ca112-19A (MZ465586) e BR-Ca113-19A (MZ465587), obtidos de *C. urens* no município de Cabo de Santo Agostinho, PE, variaram em comprimento de 2657 a 2692 nt para os componentes do DNA-A e 2622 nt para o DNA-B (MZ465585). Esses novos componentes genômicos de DNA-A compartilharam porcentagem de indentidade nucleotídica de 98,4% entre si, e são mais proximamente relacionados ao CnMLDV (NC\_038982), com 88,9% de identidade (Figura 2). A nova espécie *Begomovirus caboniensis*, e o nome cnidoscolus mild mosaic virus (CnMMV), é proposta de acordo com o sistema de nomenclatura binomial recentemente estabelecido pelo ICTV (WALKER et al., 2021).

Uma segunda nova espécie é representada pelos clones de DNA-A BR-P141-19A (MZ465581) e BR-P142-19A (MZ465582) obtidos no município de Paulista, PE. Os clones apresentaram um comprimento de 2630 nt e compartilharam 98,9% de identidade nucleotídica entre si. Essse isolados apresentaram maior porcentagem de identidade nucleotídica (79,9%) com tomato commom mosaic virus (ToCmMV; KC706579), proveniente de *Solanum lycopersicum* (ROCHA et al., 2013). O clone de DNA-B BR-P144-22B apresentou um comprimento de 2613 nt. A nova espécie *Begomovirus paulistiniensis*, e o nome cnidoscolus severe mosaic virus (CnSMV), é proposta. O clone BR-GO3-20A (MZ465583), proveniente do município Goianinha, RN, também corresponde a uma nova espécie, compartilhando 82,8% de identidade nucleotidica com CnMLDV (NC\_038982), sendo proposta a nova espécie *Begomovirus goianiensis*, e o nome cnidoscolus golden mosaic virus (CnGMV) (Figura 2). Para confirmar a presença do componente DNA-B na última espécie, foram utilizados os primers PBL1v4020/PCRc154 (ROJAS et al., 1993). Os oligonucleotídeos direcionaram a amplificação de um fragmento de aproximadamente 500pb correspondendo ao DNA-B (Figura 3).

Os novos vírus relatados neste trabalho possuem organização genômica típica de begomovírus bissegmentados do Novo Mundo, com cinco ou seis ORFs no DNA-A (CP, Rep, TrAP, REn, AC4 e AC5), enquanto o DNA-B codifica duas proteínas (NSP e MP) (Tabela 1). Curiosamente, os clones correspondentes ao componente DNA-A de *B. paulitiensis* apresentaram as ORFs AC4 (121aa) e AC5 (78aa) com tamanhos diferentes do observado para as espécies *B. caboniensis* e *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* (AC4 = 87-97aa e AC5

= 102-105aa). Li et al. (2015) relatam que alguns begomovírus bipartidos do Novo Mundo codificam uma proteína AC5 de tamanho menor, sendo altamente divergentes e de comprimento variável. O tamanho médio da ORF AC4 varia de 85-97aa entre os vírus encontrados em C. urens no estado de Alagoas (MELO et al., 2016; MENDES, 2017). No entanto, a AC4 do Tomato severe leaf curl virus (ROJAS et al., 2005) apresenta tamanho correspondente ao encontrado no presente estudo (121aa), enquanto no Tomato twisted leaf virus (ROMAY et al., 2019) codifica uma proteína com o tamanho de 130aa.

A análise da região comum (RC) da espécie B. caboniensis mostrou o nonanucleotídeo conservado (5'-TAATATT//AC-3') e foram identificados três iterons (GGGT), sendo um deles invertido. A CR (200nt) dos componentes DNA-A e DNA-B compartilharam 96% de identidade de nucleotídeos, sugerindo que eles são um par cognato. Para B. paulistiensis foram identificados os iterons TTGG e um invertido e B. goianiensis foram identificados os iterons GGAG, porém não foi caracterizado o componente DNA-B.

Na região comum de todos os isolados foi detectada a sequência conserva em forma de grampo (struturally-conserved element - SCE) denominada nonanucleotídeo (5'-TAATATT//AC- 3'), na qual ocorre a clivagem realizada pela proteína Rep, que atua como uma endonuclease dando início ao processo de replicação por círculo rolante. A replicação ocorre da mesma forma para o DNA-B (LAUFS et al., 1995; FARIA; ZERBINI, 2000; STANLEY et al., 2005).

	Componentes do DNA-A e DNA-B número de aminoácidos (aa)								
Espécies/Clones									
	Rep	СР	Trap	Ren	AC4	AC5		MP	NSP
Begomovirus paulitiensis									
BR-P141-19A	356aa	261aa	129aa	132aa	121aa	78aa	BR-P14-22B	243aa	256aa
BR-P142-19A	356aa	261aa	129aa	132aa	121aa	78aa			
Begomovirus caboniensis									
BR-CA96-19A	357aa	255a	129aa	132aa	97aa	102aa			
BR-CA112-19A	357aa	255a	129aa	132aa	97aa	102aa	BR-CA111-19B	293aa	256aa
BR-CA113-19A	357aa	255a	129aa	132aa	97aa	102aa	BR-CA114-19B	293aa	256aa
Begomovirus goianiensis									
BR-GO3-20A	356aa	254aa	129aa	132aa	87aa	-			
Fonte: elabora pela autora (2022).									

Tabela 1. Open reading frames (ORFs), com seus respectivos números de aminoácidos (aa), encontradas nos componentes genômicos DNA-A e DNA-B dos begomovírus descritos neste estudo.

(-): Ausência da AC5.

Figura 2. Identidades de sequência de nucleotídeos em pares do DNA-A completo de Begomovirus caboniensis, Begomovirus goianiensis, Begomovirus paulitiensis e os begomovírus mais proximamente relacionados obtidos por análise BLASTn.

ToCmMV\_KC706573 ToCmMV\_KC706573 ToCmMV\_KC706579 CoMoV\_J0805781 ToCLCV\_MK558060 ToRYLCV\_JN381813 ToRYLCV\_JN381815 ToSLCV\_KT099119 DeLDV\_MF773880 Pel DV\_MF773888 DeLDV\_MF773888 Bpaulitiensis\_MZ465581 Bpaulitiensis\_MZ465582 COCSV0\_NC\_038794 Bcaboniensis\_MZ465527 Bcaboniensis\_MZ465586 Bcaboniensis\_MZ465587 CnMLDV\_NC\_038982 PSLDV\_FJ972767 PSLDV\_MF401391 Bgoianiensis\_MZ465583 CnBYMV\_MT553995 ToMoLCV\_JF803248 ToMoLVC\_JF803249 ToCMoV\_MT214086 ToCMoV\_MT215003 TICV\_JF803253 TICV\_NC\_038469 MaBYIV\_MN146017 JMV\_KJ174332 JMV\_KJ174331 ToLCNDV\_HM007113



Fonte: elaborarada pela autora (2022).

Figura 3. Detecção de DNA-B de begomovírus por PCR em folhas de C. urens. M = Marcador; 1 = Amostra da região Paulista-PE, 2= Amostra da região de Goianinha-RN, P= Controle Positivo e N=Controle Negativo.



Fonte: elaborarada pela autora (2022).

100 96 93

89

86

82

79

75 72 68

#### 4.2 Análise Filogenética

Para determinar o relacionamento filogenético dos begomovírus obtidos no presente trabalho e outros begomovírus de plantas cultivadas e invasoras da América do Sul, árvores baseadas nas sequências completas do DNA-A e DNA-B foram construídas utilizando Inferência Bayesiana (Figura 4 e 5).

A árvore filogenética obtida mostrou que os isolados de *B. caboniensis* e *B. goianiensis* agruparam com isolados de CnMLDV (NC\_038982) e CnBYMV (MT553995), ambos obtidos de *C. urens* provenientes da região Nordeste do Brasil (Figura 3). Este resultado reforça a relação filogenética entre os isolados obtidos dessa planta não-cultivada. O CnMLDV está proximamente relacionado aos isolados do *Passionfruit severe leaf distortion virus* (MF401391 e FJ972767) (FERREIRA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2019). Esta relação entre begomovírus de maracujá (*Passiflora edulis*) e *C. urens* foi demonstrada anteriormente por Melo et al. (2016). O DNA-A dos isolados de *B. paulitiensis* ficaram mais distante filogeneticamente dos demais isolados obtidos neste estudo. É possível observar que esse isolado tem estreita relação com *Cotton chlorotic spot virus* (NC\_038794) (ALMEIDA et al., 2013), e *Tomato common mosaic virus* (KC706573 e KC706579) (ROCHA et al., 2013), sendo agrupados no mesmo subclado (Figura 4).

Para o DNA-B os isolados de *B. caboniensis* (MZ465585 e MZ465526) e *B. paulitiensis* (sem número de acesso) obtidos de *C. urens* da região de Pernambuco se agruparam no mesmo clado que CnMLDV, o primeiro begomovírus obtido desta planta hospedeira, e esses ficaram filogeneticamente distante dos demais begomovírus. Mostrando que os vírus obtidos de *C. urens* estão estritamente relacionados (Figura 5).

**Figura 4.** Árvore filogenética do componente DNA-A dos isolados obtidos neste estudo (destacado em vermelho) e os begomovírus mais estreitamente relacionados. Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) foi usado como um grupo externo. As árvores filogenéticas foram construídas usando o método de inferência Bayesiana.



0.2

Fonte: elaborada pela autora (2022).

**Figura 5.** Árvore filogenética do componente DNA-B dos isolados obtidos neste estudo (destacado em vermelho e azul) e os begomovírus mais estreitamente relacionados. Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) foi usado como um grupo externo. As árvores filogenéticas foram construídas usando o método de inferência Bayesiana.



Fonte: elabora pela autora (2022)

#### 4.3 Análise de Recombinação

O conjunto de dados para componente genômico DNA-A, composto pelos isolados deste estudo e outros begomovírus da América do Sul, foi submetido à análise no pacote RDP4 para investigar os prováveis eventos de recombinação. Nenhum evento de recombinação foi constatado para os isolados de *B. caboniensis*. Para os isolados de Paulista e Goianinha, foram detectados pelo menos quatro eventos independentes de recombinação, com *breakpoints* ocorrendo na RC, CP e Rep (Tabela 2).

Eventos de recombinação foram detectados no isolado de *B. paulistiensis* (MZ465581), ocorrendo no gene *Rep* (breakpoint inicial no nucleotídeo 2035 e breakpoint final no 2606), com CnMLDV sendo identificado como provável maior parental (83,1% de similaridade) e menor parental desconhecido. No segundo isolado de *B. pauslistiensis* (MZ465582), eventos foram identificados no gene *CP* (breakpoint inicial no nucleotídeo 284 e final no 878). CnBYMV foi identificando o como maior parental (81% de similaridade) e *B. caboniensis* como menor parental (91% de similaridade) (Tabela 2). Para o isolado de *B. goianiensis* (MZ465583), foram preditos pelo menos dois eventos de recombinação, um ocorrendo na *Rep*, tendo MaBYIV (75,7% de similaridade) como maior parental, e outro ocorrendo na CP e RC, tendo *B. caboniensis* (88,2% de similaridade) como provável maior parental e CnBYMV como menor parental (87%) (Tabela 2).

Recombinação é um dos principais fatores atuando na evolução dos begomovírus, sendo imporante para amplificação da variabilidade genética (PRASANNA; RAI, 2007; MARTIN et al., 2011; SILVA et al., 2011; 2012; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; HOSSEINZADEH et al., 2014; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; VENKATARAVANAPPA et al., 2014), e levando ao surgimento de novas espécies e/ou variantes responsaveis por grandes prejuízos em culturas de importância econômica em todo o mundo (ZHOU et al., 1997; MONCI et al., 2002; IDRIS; BROWN, 2002; BRIDDON et al., 2014). No presente estudo, foi possível observar eventos de recombinação que provavelmente levaram ao surgimento de novas espécies virais infectando *C. urens*, tornando um potencial reservatório viral.

Como considerações finais, estudos futuros são necessários para ressaltar o verdadeiro potencial da planta *C. urens* como reservatório de begomovirus. Testes como gama de hospedeiros com plantas da diferentes famílias botânicas devem ser acrescentados e relatórios de medidas preventivas aos produtores de como realizar o manejo desta planta não-cultivada.

 Tabela 2. Eventos de recombinação putativos detectados em Begomovirus paulistiensis e Begomovirus goianiensis outros begomovírus na América do Sul, com base em sequências completas de DNA-A.

Evento	Breakp	oints	Recombinação*	Parentais		Métodos*	P-Value
	Começo	Fim		Menor	Maior		
			B. paulistiensis				1,319x10 <sup>-</sup>
1	2035	2606	(MZ465581)	Unknown	CnMLDV_NC038982	RGBMCS3S	28
			B. paulistiensis	B. goianiensis			1,865x10 <sup>-</sup>
2	284	878	(MZ465582)	(MZ465583)	CnBYMV_MT553995	RGBMC <mark>S</mark> 3S	11
			B. goianiensis				1,795x10 <sup>-</sup>
3	1948	2036	(MZ465583)	Unknown	MaBYIV_MN146017	RGBMCS3S	21

			B. goianiensis		B. caboniensis		
4	20	259	(MZ465583)	CnBYMV_MT553995	(MZ465527)	RGBC <mark>S</mark> 3S	6,386x10 <sup>10</sup>
]	Fonte: elal	bora pela	autora (2022).	· M. MayChi: C. Chimara: S	SiScop: 35, 3Sog		
C	CnMLDV,	Cnidosco	lus mosaic leaf de	formation virus	515call, 55, 55cq		
(	CnBYMV.	Cnidosco	lus blistering velle	ow mosaic virus			

MaBYIV, Macroptilium bright yellow interveinal virus

### **5 CONCLUSÃO**

No presente estudo, três possíveis novos membros desse gênero viral foram caracterizados infectando *C. urens* na região nordeste do Brasil, *B. caboniensis*, *B. paulistiensis* e *B. goianienses*, demonstrando o potencial de *C. urens* como reservatório natural de begomovírus.

### 6 REFERÊNCIAS

ALBRECHTSEN, S.E. Testing Methods for Seed-Transmitted Virus: Principles and Protocols. **Plant Pathology**, v.55, n. 3, p. 468-468, 2006.

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

ALEMANDRI, V. et al. Species within the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) complex in soybean and bean crops in Argentina. **Journal of Economic Entomology** v.105, n.1 p. 48-53, 2016.

ALI, A.; KOBAYASHI, M. Seed transmission of Cucumber mosaic virus in pepper. Journal of virological methods, v.163, n.2, p.234–237, 2010.

ALMEIDA, M. S. S. et al. Complete Sequence of a New Bipartite Begomovirus Infecting Cotton Plants in Brazil. **Genome Announcements**, v.1, n. 6, p.e00661-13, 2013.

ALTSCHUL SF et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, n.3, p.403-410, 1990.

AMARAL, A.L. Estudos genéticos e morfológicos de biótipos resistentes e susceptíveis de *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim-bravo) Jaboticabal. 2006. 51f. Dissertação (**Mestrado em Agronomia**) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

ARGUELLO-ASTORGA, G. R.; RUIZ-MEDRANO, R. An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: Identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. **Archives of Virology**, v. 146, n. 8, p. 1465–1485, 2001.

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.

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

BARRETO, S.S et al. A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato-infecting begomovirus in central Brazil. **Phytopathology**, v. 103, n.5, p. 436-444, 2013.

BAWA, K. S.; WEBB, C. J.; TUTTLE, A. F. The adaptive signicance of monoecism in *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linman Socieg**, v.8, n.4, p. 213-223,1982.

BENNETT C. W., ESAU K. Further studies on the relation of the curly-top virus to plant tissues. **Journal of Agricultural Research**, v.53, n.3 p.595-620, 1936.

BEZERRA, G.E. Favela - seu aproveitamento como forrageira. **Boletim Técnico**, v. 30, n.1, p. 71-87, 1972.

BONDAR, G. PENÃO - *Cnidoscolus marcgravii* Polh – novo recurso oleífero da Bahia. **Boletim do Instituto Central de Fomento Econômico da Bahia**, v. 12, p.1-16, 1942.

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

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

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

BURGER, W.; HUFT, M. Euphorbiaceae. In: \_\_\_\_\_. Flora costaricencis. Fieldiana, v. 36, p. 169, 1995.

CANDIDO, L.P., BESERRA, E.B.Repellent activity of *Cnidoscolus phyllacanthus* Mart. and *Ricinus communis* L. extracts against *Aedes aegypti* L. oviposition behavior. **Biotemas**, v. 28, n.4, p. 105-112, 2015.

CARD, S. D.; PEARSON, M. N.; CLOVER, G. R. G. Pollen transmission of plant pathogens. Australasian Plant Pathology, v. 36, n.5, p. 455–461, 2007.

CASTILLO-URQUIZA, G. P. et al. Six novel begomoviruses infecting tomato and associates weeds in Southeastern Brazil. Archives of Virology, v.153, n.10, p. 1985-1989, 2008.

CHEN, W. et al. The draft genome of whitefly Bemisia tabaci MEAM1, a global crop pest, provides novel insights into virus transmission, host adaptation, and insecticide resistance. BMC **Biology**, v.14, n.110, p.2-15, 2006.

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.

CORDEIRO, I.; SECCO, R. (2014) *Cnidoscolus* in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponivel em: <u>http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/F B1749</u>.

COSTA, A.S. Studies on Abutilon mosaic in Brazil. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 24, p. 97-112. 1955.

COSTA, A.S., BENNETT, C.W. Whitefly-transmitted mosaic of Euphorbia prunifolia. **Phytopathology**, v. 40, n.3, p. 266-283. 1950.

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

CZOSNEK et al. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci* - insights from studies with *Tomato yellow leaf curl virus* **Annals of Applied Biology**, v. 140, n.3, p. 215-231, 2002.

DE BARRO, P. J. et al. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. **Annual review of entomology**, v. 56, p. 1–19, 2011.

DINSDALE, A et al. Refined global analysis of Bemisia tabaci (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. **Annals of Entomological Society of America**, v. 103, n.2, p. 196–208, 2010.

DOYLE J.J.; DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n.1, p. 11-15, 1987.

DRY et al. A novel subviral agent associated with a geminivirus: The first report of a DNA satellite. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n.14, p. 7088-7093, 1997.

DUFFY, S.; HOLMES, E.C. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus Tomato yellow leaf curl virus. **Journal of Virology**, v. 82, n.2, p. 957-965, 2008.

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.

FADHILA, et al. The threat of seed-transmissible pepper yellow leaf curl Indonesia virus in chili pepper. **Microbial Pathogenesis**, v. 143, n.1, p. 1-8, 2020.

FARIA, J. C. E.; ZERBINI, F. M. Familia *Geminiviridade:* Taxonomia, replicação e movimento. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, n.1, p. 27-57, 2000.

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

FERNANDES, F. R. et al. Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting Euphorbia heterophylla plants. **Archives of Virology**, v. 156, n. 11, p. 2063-2069, 2011.

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

FERREIRA, S. S. et al. Characterization of Passionfruit severe leaf distortion virus, a novel begomovirus infecting passionfruit in Brazil, reveals a close relationship with tomato-infecting begomoviruses. **Plant Pathology**, v. 59, n. 2, p. 221-230, 2010.

FERRO, M. M. M. et al. Genetic structure of populations of the begomoviruses Tomato mottle leaf curl virus and Sida mottle Alagoas virus infecting tomato (Solanum lycopersicum) and Sida spp., respectively. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n.1, p. 39-45, 2017

FIALLO-OLIVÉ E, CHIRINOS DT, POUEY FG et al. Complete genome sequences of two begomoviruses infecting weeds in Venezuela. **Archives of Virology**, p.158, n.1, p.277–280, 2013.

FIALLO-OLIVÉ, E.J.; NAVAS-CASTILLO. Molecular and biological characterization of a New World mono-/bipartite begomovirus/deltasatellite complex Infecting *Corchorus siliquosus*. **Frontiers of Microbiology**, v.11, p. 1-14, 2020.

FONTENELE, R.S. et al. Identification of the Begomoviruses Squash Leaf Curl Virus and Watermelon Chlorotic Stunt Virus in Various Plant Samples in North America. **Viruses**, v.13, n.5, p. 1-17, 2021.

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

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

FRISCHMUTH, T.; STANLEY, J. Recombination between viral DNA and the transgenic coat protein gene of African cassava mosaic geminivirus. **Journal of General Virology**, v. 79, n.5, p. 1265–1271, 1998.

GARCÍA-ARENAL, F.; FRAILE, A.; MALPICA, J. M. Variation and evolution of plant virus populations. **International Microbiology**, v.6, n.4, p.225–232, 2003.

GENNADIUS, P. Disease of tobacco plantations in the Trikonia. The aleurodid of tobacco. **Ellenike Georgia**, v. 5, p. 1-3, 1889.

GHANIM, M.; MORIN, S.; CZOSNEK, H. Rate of Tomato yellow leaf curl virus translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly Bemisia tabaci. **Phytopathology**, v. 91, n.2, p. 188-196, 2001.

GHANIM, M.; SOBOL, I.; GHANIM, M.; CZOSNEK, H. Horizontal transmission of begomoviruses between Bemisia tabaci biotypes. **Arthropod-Plant Interactions**, v.1, p. 195-204, 2007.

GILBERTSON, R.L. et al. Role of the insect supervectors Bemisia tabaci and Frankliniella occidentalis in the emergence and global spread of plant viruses. **Annual Review of Virology**, v.2, n.1, p. 67-93, 2015.

GORDILLO, M.M et al. Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie **Botánica**, v. 73, n. 2, p. 155-281, 2002. GOVAERTS, R., FRODIN, D.G., RADCLIFFE-SMITH, A. World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae). Kew Publishing. p. 1-32, 2000.

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, n.2, 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.

HANLEY-BOWDOIN, L. et al. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n.1, p. 71-106, 1999.

HARRISON, B. D.; SWANSON, M. M.; FARGETTE, D. Begomovirus coat protein: Serology, variation and functions. Physiological and Molecular **Plant Pathology**, v. 60, n. 5, p. 257–271, 2002.

HERNANDEZ-ZEPEDA C. et al. Molecular characterization and experimental host range of Euphobia mosaic virus-Yucatan Peninsula a begomovirus species in the Squash leaf curl virus. **Plant Pathology**, v.56, n.5, p.763–770, 2007.

HULL, R. Matthew's Plant Virology. 4a ed. London, UK: Academic Press, 2002.

HUNTER, W.B.; HIEBERT, E.; WEBB, S.E.; TSAI, J.H.; POLSTON, J.E. Location of geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae). **Plant Disease**, v. 82, n.10, p. 1147-1151, 1998.

HUSSAIN K, et al. Complete nucleotide sequence of a begomovirus and associated betasatellite infecting croton (*Croton bonplandianus*) in Pakistan. Archives of Virology, v.156, n.6, p.1101-1105, 2011.

IDRIS, A.M.; BROWN, J.K. Molecular analysis of Cotton leaf curl virus-Sudan reveals an evolutionary history of recombination. **Virus Genes**, v. 24, n.3, p. 249-256, 2002.

INGRAM, J. Notes on the cultivated Euphorbiaceae. The flowers of the Euphorbiaceae 2. *Cnidoscolus* and *Jatropha* **Baileya**, v. 5, p. 107-117, 1957.

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

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. 116, n.2, p. 209-211, 2004.

HOSSEINZADEH, M. R. et al. Phylogenetic relationships, recombination analysis, and genetic variability among diverse variants of tomato yellow leaf curl virus in Iran and the

Arabian Peninsula: further support for a TYLCV center of diversity. **Archives of Virology**, v. 159, n.3, p. 485-497, 2014.

JARAMILLO et al. Fitoquímica preliminar, actividad antioxidante e hipoglucemiante de extractos de hojas de *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) IM Johnst (chaya). **Revista Cubana de Farmacia**, v. 49, n.3, p.543-556, 2015.

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

JOHANSEN, E.; EDWARDS, M. C.; HAMPTON, R. O. Seed transmission of viruses: current perspectives. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 363-386, 1994.

JUPIN, I., KOUCHOVSKY, F., JOUANNEAU, F., AND GRONENBORN, B. Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): Involvement of the protein encoded by ORF C4. **Virology**, v. 204, n.1, p. 82–90, 1994.

KASHINA B. D et al. Molecular identification of a new begomovirus associated with mosaic disease of *Jatropha curcas* L. in Nigeria. **Archives of Virology**, v. 158, n.2, p. 511–514, 2013.

KIL, E. J. et al. Seed Transmission of *Tomato Leaf Curl New Delhi Virus* from *Zuccini Squash* in Italy. **Plants**, v.9, n.563, p. 1-8, 2020.

KIL, E. J. et al. Seed transmission of Tomato yellow leaf curl virus in sweet pepper (*Capsicum annuum*). **Europen Journal Plant Pathology**, v.150, n.3, p.759-764, 2017b.

KIL, E. J.; PARK, J. CHOI, H. S.; KIM, C. S.; LEE, S. Seed Transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* in White Soybean (*Glycine max*). **Plant Pathology** J v.33, n.4, p. 424–428, 2017.

KIL, E., KIM, S., LEE, Y. et al. *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. **Scientific Report**, v. 6, n. 19013, p.1-10, 2016.

KIM, J. et al. Seed transmission of *Sweet potato leaf curl virus* in sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Plant Pathology**, v. 64, n.6, p.1284-1291, 2015.

KOTHANDAN, M et al. A new seedtransmissible begomovirus in bitter gourd (*Momordica charantia* L.), **Microbial Pathogenesis**, v.128, p.82-89, 2018.

KOTHANDARAMAN, S.V.; DEVADASON, A.; GANESAN, M.V. Seed-borne nature of a begomovirus, Mung bean yellow mosaic virus, in black gram. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, v.4, p. 1925-1933, 2015.

LAUFS, J. et al. In vitro cleavage and joining at the viral origino of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, n.9, p. 3879-3883, 1995.

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

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

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

LIMA, A.T.M. et al. Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivatedhosts. **Journal of General Virolog**y, v. 94, n.2, p. 418-431, 2013.

LIMA, C. S. A.; LARA, M. F.; DOS SANTOS, E. J. M. Morfologia da mosca branca, *Bemisia tabaci* biótipo "B" (Hemiptera: Aleyrodidae), encontrada em Jaboticabal, SP, com base em eletron-micrografías de varredura. **Boletin de Sanidade Vegetal Plagas**, v. 27, p. 315–322, 2001.

LIMA, J.A.A. et al. **Virologia essencial e viroses em culturas tropicais**. Edições UFC. Fortaleza, Ceará, 2015.

LIMA, J.L.S. **Plantas forrageiras das caatingas** - usos e potencialidades. Petrolina, EMBRAPA, 1998.

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, n.162, p,1–13, 2016.

LUTZ, O. The poisonous nature of the stinging hairs of Jatropha urens. **Science**, v. 40, n. 1034, p. 609-610, 1914.

MANIVANNANA, K et al. A new-seed transmissible begomovirus in bitter gourd (*Momordica charantia* L.). **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 82–89, 2018.

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, n.6, p.1537–1551, 2017.

MARTIN D. P. et al. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. **Virus Evolution**, v.1, n.1, p. vev003, 2015.

MARTIN, D. P. et al. Recombination in Eukaryotic Single Stranded DNA Viruses. **Viruses**, v. 3, n.9, p. 1699-1738, 2011.

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

MELO, A. L. D.; SALES, M. F. D. O gênero *Cnidoscolus* Pohl (Crotonoideae Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n.3, p. 806-827, 2008.

MELO, A. M. et al. *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus*: a novel begomovirus infecting euphorbiaceous plants in Brazil. **Archives of Virology**, v. 161, n.9, p. 2605-2608, 2016.

MENDES, A, L. S. F. Variabilidade e estrutura genética de populações do begomovírus *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* (CnMLDV) INFECTANDO *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur (cansanção). [**Dissertação**] Apresentada Universidade Federal de Alagoas, p.67, 2019.

MENDES, A.L.S.F., MELO, A.M., RAMOS-SOBRINHO, R. et al. High molecular diversity and divergent subpopulations of the begomovirus cnidoscolus mosaic leaf deformation virus associated with *Cnidoscolus urens*. Archives of Virology, v.166, p.3289–3299, 2021.

MILLER MA, et al. The CIPRES portals. CIPRES, 2010.

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), p. 283-318, 2010.

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

MONCI, F. et al. A natural recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. **Virology**, v. 303, n.2, p. 317-326, 2002.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T. Use full Plants of Brazil. London, Amsterdam, HoldenDay Inc, 1966.

MUHIRE BM, VARSANI A, MARTI DP. SDT: Uma ferramenta de classificação de vírus baseada no alinhamento de sequência de pares e cálculo de identidade. **PLoS One**, v. 9, n.9, p. e108277, 2014.

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

NELSON, R.S.; VAN BEL, A.J.E. The mystery of virus trafficking into, through and out of vascular tissue. **Progress in Botany**. v. 59, p. 477–533, 1997.

NOUEIRY, A. O.; LUCAS, W. J.; GILBERTSON, R. L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, v. 76, n. 5, p. 925–932, 1994.

OLIVEIRA M. H. C et al. *Cnidoscolus blistering yellow mosaic virus*: a new begomovirus isolated from *Cnidoscolus urens* in Brazil. **Comunicata Scitiae**, v.12, p.1-5, 2021.

ORTEGA-ACOSTA, D. L.; MARTÍNEZ O.; MORALES, J. H. Evaluation of seed transmission of begomoviruses in roselle and roselle-associated weeds. **Revista Mexicana de Fitopatología** v.37, n.1, p. 135-146, 2018.

PADIDAM, M.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. M. The role of AV2 ('precoat') and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. **Virology**, v. 224, n. 2, p. 390–404, 1996.

PAPROTKA T, METZLER V, JESKE H. The complete nucleotide sequence of a new bipartite begomovirus from Brazil infecting Abutilon. **Archives of Virology**, v.155, n.5, p.813-6, 2010.

PASSOS et al. Two new begomoviruses that infect non-cultivated malvaceae in Brazil. **Archives of Virology**, v.40, p.20-23, 2017.

PASSOS, R.A.M. Favela, determinações químicas e valor nutritivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 22, n.3, p.451-454, 1993.

PRASANNA, H. C.; RAI, M. Detection and frequency of recombination in tomato-infecting begomoviruses of South and Southeast Asia. **Virology Journal**, v. 4, n.111, p.1-10, 2007.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Tests. **Systematic Biology**, v. 53, n.5, p. 793–808, 2004.

POTT, A; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal** Corumbá, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, 1994.

RAJA P et al. Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. **Journal of Virology**, v.82, n.18, 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, n.11, p. 2540–2552, 2014.

ROCHA, C. S. et al. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. **Journal of Virology**, v. 87, n. 10, p. 5784-5799, 2013.

RODRIGUES et al. Etiology, occurrence and epidemiology of begomovirosis in passion fruit trees in southwestern Bahia. **Plant Pathology**, v.76, n. 4, 2019.

ROJAS MR, GILBERTSON RL, RUSSELL DR et al. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v. 77, p.340-347, 1993.

ROJAS, A. K. et al. Sequence characterization of *Tomato leaf curl Sinaloa virus* and *Tomato severe leaf curl virus*: Phylogeny of New World begomoviruses and detection of recombination. **Archives of virology**, v.150, n.7, p. 1281-99, 2005.

ROJAS, M. R. et al. Exploiting Chinks in the Plant's Armor: Evolution and Emergence of Geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, n. 1, p. 361–394, 2005.

ROMAY, G. et al. Tomato Twisted Leaf Virus: A novel Indigenous New World Monopartite Begomovirus Infecting Tomato in Venezuela. **Viruses**, v.327, n.11, p. 2-11, 2019.

RONQUIST F, TESLENKO M, VAN DER MARK P et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. **Systematic Biology**, v.61, n.3, p. 539-42, 2012.

ROSARIO et al. The Effect of Electronic Word of Mouth on Sales: A Meta-Analytic Review of Platform, Product, and Metric Factors. **Journal of Marketing Research**. v.53, n.3, p. 297-318, 2016.

RUSSELL, L. M. Synonyms of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). Bulletin of the Brooklyn Entomological Society, v. 52, n.5, p. 122-123, 1957.

SAMBROOK J.; RUSSEL D. Molecular Cloning -A Laboratory Manual (3<sup>a</sup> ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SÁNCHEZ-CAMPOS, S. et al. Fulfilling Koch's postulates confirms the monopartite nature of tomato leaf deformation virus: a begomovirus native to the New World. **Virus Research**, v. 173, n. 2, p. 286-293, 2013.

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

SANDERFOOT, A.A.; LAZAROWITZ, S.G. Cooperation in viral movement: the geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. **Plant Cell**, v.7, n.8, 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, v.9, p. 353-358, 1996.

SANGEETHA, B.; MALATHI, V.; ALICE, D.; SUGANTHY, M.; RENUKADEVI, P. Uma cepa distinta transmissível por sementes de tomate leaf curl New Delhi virus infecting Chayote in India. **Virus Res**, v. 258, p. 81–91, 2018.

SANTA ROSA, J. Óleo de Favela, nova riqueza da região das secas. Rio de Janeiro, Instituto Nacional de Tecnologia. 1943.

SATTAR M.N., KVARNHEDEN A., SAEED M., BRIDDON R.W. Cotton leaf curl disease - an emerging threat to cotton production worldwide. **The Journal of General Viroogy**, v. 94, n.4, p. 695–710, 2013.

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.

SHEPHERD D.N., MARTIN D.P., VAN DER WALT E., DENT K., VARSANI A., RYBICKI E.P. Maize streak virus: an old and complex 'emerging' pathogen. **Molecular Plant Pathoogy**. v. 11, n.1 p.1–12, 2010.

SILVA F. N. et al. Recombination and pseudorecombination driving the evolution of the begomoviruses Tomato severe rugose virus (ToSRV) and Tomato rugose mosaic virus (ToRMV): two recombinant DNA-A components sharing the same DNA-B. **Virology Journal**, v.11, n.6, p. ,2014.

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**, v.156, n.12, 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, n.3, p. 457-467, 2012.

SEAL, S.; VANDENBOSCH, F.; JEGER, M.Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. **Critical Reviews in Plant Science**, v.25, n.1, p. 23–46, 2006.

SIMMONDS-GORDON, R. N. et al. First report of a complete genome sequence for a begomovirus infecting Jatropha gossypifolia in the Americas. **Archives of Virology**, v. 159, n. 10, p. 2815-288, 2014.

SOUKUP, J. Las erythroxilaceas y las euphorbiaceas del Peru, sus génerus e lista de espécies. **Biota**, v.55, p. 113-149, 1968.

SRIVASTAVA A, KUMAR S, JAIDI M, et al. Molecular characterization of a new begomovirus associated with leaf yellow mosaic disease of *Jatropha curcas* in India. Arch Virol, v.160, p.1359-1362, 2015.

STANLEY, J. et al. Family Geminiviridae. In virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, p. 301-326, 2005.

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

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

TAMURA K et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, n.10, p.2731–2739, 2011.

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

VACA-VACA JC et al. Croton golden mosaic virus: a new bipartite begomovirus isolated from *Croton hirtus* in Colombia. **Archives of Virology**, v. 163, n.11, p. 3199–3202, 2018.

VALENZUELA SOTO, R et al. *Cnidoscolus chayamansa* organic hydroponic and its hypoglycemic capacity, nutraceutical quality and toxicity. **Revista Mexicana de Ciências Agrícolas**, v. 6, n.4, p. 815-825, 2015.

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

VARSANI, A. et al. *Capulavirus* and *Grablovirus*: two new genera in the famil *Geminiviridae*. Archives of Virology, v.162, p. 1-13, 2017.

VARSANI, A. et al. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. **Archives of Virology**, v. 159, n. 8, p. 2193–2203, 22 ago. 2014.

VENKATARAVANAPPA, V. et al. Evidence for two predominant viral lineages, recombination and subpopulation structure in begomoviruses associated with yellow vein mosaic disease of okra in India. **Plant Pathology**, v. 64, n. 3, p. 508-518, 2015.

VYSKOČILOVÁ S, TAY WT, VAN BRUNSCHOT S et al. An integrative approach to discovering cryptic species within the *Bemisia tabaci* whitefly species complex. **Scientif Reports**, v.8, n.1, p10886, 2018.

WALKER PJ, SIDDELL SG, LEFKOWITZ EJ et al. Changes to virus taxonomy and to the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratifed by the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, v.166, n.9. p.2633-2648, 2021.

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

WANG H. BUCKLEY K.J. YANG X. BUCHMANN R.C. BISARO D.M. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. **Journal Virology**, v. 79, n.12, p. 7410–7418, 2005.

WEBSTER, G. L. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. Annals of the Missouri Botanical Garden, v.81, p. 33-144, 1994.

WILLIAMS, L. Laticifers plants of Economic Importance II. Mexican chilte (Cnidoscolus): A source of gutta-like material. **Economic Botany**, v.16, n.2, p.53-70, 1962.

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

ZERBINI, F.M. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. Journal of General Virology, v. 98, n.2, p. 131-133, 2017.

ZERBINI, F.M. Transmissão e controle de vírus em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV-DFP, p.135-154, 2005.

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

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

ZHOU, X. et al. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. Journal of General. **Virology**, v. 78, n.8, p. 2101-2111, 1997.

## 7 CAPÍTULO I

Cnidoscolus mild mosaic virus: a new bipartite begomovirus isolated from Cnidoscolus urens

in Brazil.

## PUBLICADO: ARCHIVES OF VIROLOGY

Lívia F.G. Chaves<sup>1</sup>; Mayra M.M. Ferro<sup>1</sup>; Mayara O. de Lima<sup>1</sup>; Iraildes P. Assunção<sup>1</sup>; Gaus

S.A. Lima<sup>1</sup>; Sarah J.C. da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Setor de Fitossanidade/CECA, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, AL, 57100-000, Brazil.

#### Abstract

A novel bipartite begomovirus infecting *Cnidoscolus urens* (Euphorbiaceae) from Pernambuco State, Brazil has been characterized. The complete DNA-A (2657 nt) and DNA-B (2622 nt) components of the viral isolates showed a typical genome organization of New World bipartite begomoviruses. DNA-A of the isolates had the highest percentage of nucleotide identity (88.6– 88.9%) with the *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus*. Based on the current classification criteria for the genus *Begomovirus*, a new member infecting *C. urens* was reported, and the name Cnidoscolus mild mosaic virus was proposed for these viruses, and *Begomovirus caboniensis* to species.

The family *Geminiviridae* comprises viruses with a circular single-stranded DNA genome (2.6–5.2 kb) encapsulated in geminated quasi-icosahedral particles [1]. This family is divided into 14 genera based on their genome organization, type of vector, phylogenetic relationship, host range, and nucleotide sequence identity [1]. The genus *Begomovirus* have one or two genomic components known as DNA-A and DNA-B, are transmitted by whiteflies of the *Bemisia tabaci* complex [2,3], and infect a wide range of cultivated and non-cultivated plants, mainly in tropical and subtropical regions [4].

Several species of begomoviruses have been reported in non-cultivated plants in the family Euphorbiaceae [5,6,7,8,9,10,11]. In *Cnidoscolus urens*, a wild host largely found in northeastern Brazil, only two viruses were reported: *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* (CnMLDV) [12] and Cnidoscolus blistering yellow mosaic virus (CnBYMV) [13]. In this study, the molecular characterization of a new bipartite begomovirus infecting *C. urens* in Pernambuco, Brazil was described.

A sample of *C. urens*, showing mild mosaic and leaf deformation symptoms, was collected in 2019 in Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco State, Brazil (Figure 1). Total DNA was extracted using the CTAB method [14]. Complete viral genomes were amplified by rolling-

circle amplification (RCA) [15], cloned and sequenced commercially by primer walking (Macrogen Inc., South Korea).

The complete DNA-A and DNA-B genomic components were assembled using CodonCode Aligner v. 6.0.2 and initially analyzed using the BLASTn algorithm [16] to determine the viral species that shared the highest nucleotide identity. Pairwise sequence identity comparisons were performed using SDT 1.2 software [17].

Multiple sequence alignments were prepared using the MUSCLE algorithm implemented in MEGA6 [18]. Phylogenetic analyses were performed on the CIPRES Science Gateway [19] using MrBayes v.3.3.3 [20]. The best nucleotide substitution model (GTR+I+G) was used for the DNA-A and DNA-B component datasets. The analysis was carried out using two replicates with four chains each for 10 million generations and sampling every 1000 steps (a total of 10,000 trees). The first 2500 trees were discarded as a burn-in phase. Trees were viewed and edited using Figtree v.1.4

A total of five sequences were obtained: three for the DNA-A component and two for the DNA-B component. The sequences got 2657 nt in length for DNA-A (GenBank accession MZ465527, MZ465586, and MZ465587) and 2622 nt in length for DNA-B (MZ465585 and MZ46526). They showed a typical New World begomovirus gene organization, with DNA-A encoding the coat protein (CP) in the virion-sense strand and in the complementary-sense strand the *Replication associated Protein* (Rep) *Trans-Acting Protein* (TrAP), *Replication Enhancer* (Ren), AC4 and AC5, while DNA-B encoded two proteins, NSP (*Nuclear Shuttle Protein*) in the virion-sense strand and MP (*Movement Protein*) in the complementary-sense strand (Supplementary Table S1). Analysis of the common region (CR) showed a conserved nonanucleotide (5'-TAATATT/AC-3') and identified three putative iterons (GGGT), one of which was inverted (Supplementary Figure S1). The CR (200 nt) showed 96% nucleotide sequence identity between the two components, suggesting that they are a cognate pair. Using pairwise comparisons and established criteria for species demarcation within the genus *Begomovirus* [1], clones BR\_Ca96\_19A (MZ465527), BR\_Ca112\_19A (MZ465586), and BR\_Ca113\_19A (MZ465587) shared of 88.6–88.9% similarity with CnMLDV (NC\_038982; Supplementary Figure S2). Therefore, the new species *Begomovirus caboniensis*, and the name cnidoscolus mild mosaic virus (CnMMV), is proposed according to the binomial nomenclature system recently established by ICTV [21].

Bayesian inference phylogenetic trees (Figure 2). The analysis for the DNA-A component. For the DNA-B component, the isolates cluster with the CnMLDV isolate (KT966772), thus reinforcing their genetic relationship. No evidence of recombination was detected using the RDP 4 program [22].

In the presente study, a new bipartide begomovirus was characterized infecting *C.urens*. Host-range and infectivity studies are needed to confirm the potential of *C. urens* as a viral reservoir.

#### Statements

**Acknowledgments:** The authors thank the Universidade Federal de Alagoas. M.M.M.F was the recepient of a CAPES postdoctoral fellowship. L.F.G.C was the recepient of a FAPEAL doctoral fellowship.

**Funding:** The Fapeal (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas) for funding the research.

Conflict of interest: All authors declare no conflict of interest

Availability of data and material: 'Not applicable' for that section.

Code availability: 'Not applicable' for that section.

**Ethics approval:** This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors

**Consent to participate:** 'Not applicable' for that section.

**Consent for publication:** 'Not applicable' for that section.

#### Compliance with ethical standards

Conflict of interest: All authors declare no conflict of interest

#### References

- 1. Zerbini FM et al (2017) ICTV virus taxonomy profle: Geminiviridae. J Gen Virol 98:131–133
- 2. Barbosa LF et al (2014) Indigenous American species of the *Bemisia tabaci* complex are still widespread in the Americas. Pest Manag Sci 70:1440–1445
- Navas-Castillo J et al (2011) Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. Annu Rev. Phytopathol 49: 219-248
- Rojas MR et al (2018) World Management of Geminiviruses. Annu Rev Phytopathol 56: 637-677
- Hernandez Z et al (2007) Molecular characterization and experimental host range of Euphobia mosaic virus-Yucatan Peninsula a begomovirus species in the Squash leaf curl virus. Plant Pathol 56:763–770
- 6. Hussain K et al (2011) Complete nucleotide sequence of a begomovirus and associated betasatellite infecting croton (*Croton bonplandianus*) in Pakistan. Arch Virol 156:1101-1105
- 7. Fernandes FR et al (2011) Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting *Euphorbia heterophylla* plants. Arch Virol 156:2063-2069
- 8. Fiallo-Olivé E et al (2013) Complete genome sequences of two begomoviruses infecting weeds in Venezuela. Arch Virol 158:277–280
- 9. Simmonds-Gordon RN et al (2014) First report of a complete genome sequence for a begomovirus infecting *Jatropha gossypifolia* in the Americas. Arch Virol 159: 2815-8
- 10. Srivastava A et al (2015) Molecular characterization of a new begomovirus associated with leaf yellow mosaic disease of Jatropha curcas in India. Arch Virol 160:1359-1362
- 11. Vaca-Vaca JC et al (2018) Croton golden mosaic virus: a new bipartite begomovirus isolated from *Croton hirtus* in Colombia. Arch Virol 163: 3199–3202.
- 12. Melo AM et al (2016) *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus*: a novel begomovirus infecting euphorbiaceous plants in Brazil. Arch Virol 161:2605-2608.
- 13. Oliveira MHC et al (2021) Cnidoscolus blistering yellow mosaic virus: a new begomovirus isolated from *Cnidoscolus urens* in Brazil. Comunicata Sci 12:1-5
- 14. Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15
- 15. Inoue-Nagata AK et al (2004) A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. J Virol Methods 116:209–211
- 16. Altschul SF et al (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403-410
- 17. Muhire BM et al (2014) SDT: uma ferramenta de classificação de vírus baseada no alinhamento de sequência de pares e cálculo de identidade. PLoS One 9(9): e108277
- Tamura K et al (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28:2731–2739
- 19. Miller MA et al (2010) The CIPRES portals. CIPRES.

- 20. Ronquist F et al (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. Sys Bio Adv 61: 539-42.
- 21. Walker PJ et al (2021) Changes to virus taxonomy and to the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratifed by the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol X:1-16
- 22. Martin DP et al (2015) RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. Virus Evol 1:vev003

### List of Table

**Suplementary Table S1.** *Open Reading frame* (ORFs), with their respective numbers of amino acids (aa), found in the genomic component DNA-A and DNA-B of the begomoviruses described in this study.

		Genes	on the DN	A-A com	ponent			Genes on the		
Species/Clones								DN	A-B	
species/ciones		num	ber of am	ino acids	(aa)			compor	ent (aa)	
	Rep	CP	Trap	Ren	AC4	AC5		MP	NSP	
Begomovirus caboniensis										
BR_CA96_19A	357aa	255a	129aa	132aa	97aa	102aa	BR_CA111_19B	293aa	256aa	
BR_CA112_19A	357aa	255a	129aa	132aa	97aa	102aa				
BR_CA113_19A	357aa	255a	129aa	132aa	97aa	102aa	BR_CA114_19B	293aa	256aa	
<b>Fonte:</b> elabora pela autora (202	2)									

Fonte: elabora pela autora (2022)

#### List of figures

Fig.1 Symptoms milds of mosaic and leaf deformation in Cnidoscolus urens



Fonte: elabora pela autora (2022)

**Fig. 2** Phylogenetic reconstruction of DNA-A (a) and DNA-B (b) of *B. caboniensis* (highlighted in red) and the most closely related begomoviruses. *Tomato leaf curl new delhi virus* (ToLCNDV) was used as an outgroup. The phylogenetic trees were constructed using the Bayesian inference method.



Fonte: elaborada pela autora (2022).

**Supplementary Figure S1** 1 Alignment of the common region (CR) of DNA-A and DNA-B sequences of *B. caboniensis*. The TATA-box and nonanucleotide sequence are identified in the figure. Horizontal arrows indicate the iterated sequence and its position.

B. Caboniensis DNA-A: TGGGG---25nt--GGGGTTTGGGGGTCTTACT<u>TATA</u>---54nt---TAATATT TATA-box Stembop B. Caboniensis DNA-B: TGGGG---25nt--GGGGTTTGGGGGTCTTACT<u>TATA</u>---54nt---TAATATT TATA-box Stembop

Fonte: elaborada pela autora (2022).



CnMLDV\_NC\_038982 Bcaboniensis\_MZ465527 Bcaboniensis\_MZ465586 Bcaboniensis\_MZ465587 PSLDV\_FJ972767 PSLDV\_MF401391 CnBYMV\_MT553995 ToMoLCV\_JF803248 ToMoLCV\_JF803249 PepBLV\_MN518738 PepBLV\_MN518735 ToYVSV\_KC136339 ToYVSV\_EF417915 TCMV\_MT214086 TCMV\_KC706553 ToICV\_JF803253 ToICV\_NC\_038469 MaBYIV\_MN146017 MaYSV\_KJ939882 MaYSV\_KC004117 JMV\_KJ174332 JMV\_KJ174331 ToLCNDV\_HM007113



Fonte: elabora pela autora (2022).

## **8 CAPÍTULO II**

#### Artigo submetido: International Journal of Agriculture and Biology

## **Determination of transmission of** *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* **by seeds of** *Cnidoscolus urens*

Lívia Francyne Gomes Chaves<sup>1,\*</sup>; Mayra Machado Medeiros Ferro<sup>1</sup>; Mayara Oliveira

de Lima<sup>1</sup>; Caich Martins Rocha<sup>1</sup>; Iraildes Pereira Assunção<sup>1</sup>; Gaus Silvestre de Andrade Lima<sup>1</sup>;

Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Setor de Fitossanidade/CECA, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, AL,

57100-000, Brazil.

<sup>1,\*</sup> For correspondence: <u>liviagomezzz@gmail.com</u>

Novelty statement:

*Cnidoscolus urens* is an uncultivated plant that currently hosts three begomoviruses, making it a potent viral reservoir. In 2015, it was suggested that begomoviruses are seed-borne and this would be detrimental to the international seed market. Here, we observed that the cnidoscolus mosaic leaf deformation virus CnMLDV is not transmitted to *C. urens* seedlings, however, this begomovirus was detected in all floral parts and seed parts. The clarification of this aspect is of fundamental interest for epidemiological studies, especially in seed production fields, since *C. urens* plants are associated with economically important crops and their seeds would serve as an initial source of inoculum.

#### Abstract

In the epidemiology of phytopathogens, the transmission of viruses by seeds has become an important factor due to the various reports that have been verified, in addition to having an impact on changes in control strategies in the field. In the present study, the detection of cnidoscolus mosaic leaf deformation virus (CnMLDV) in different parts of the plant and the transmission capacity by seed of *Cnidoscolus urens* were evaluated. CnMLDV is a member of the genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*) able of naturally infecting *Cnidoscolus urens* (Euphorbiaceae), an uncultivated plant commonly found in the Northeast region of Brazil. To perform the detection, leaves of symptomatic plants, flowers and seeds, as well as seedlings from seeds infected with CnMLDV, were evaluated via PCR using species-specific primers. The results revealed that 62%, 79% and 83% of the sepals, androecium and flowers (petals and gynoecium) samples, respectively, were infected with CnMLDV. About 90% of seeds collected from symptomatic plants of *C. urens* were PCR positive for CnMLDV. CnMLDV was also identified from the tegument, endosperm and embryo, however, here, no evidence of transmission of CnMLDV via seeds was observed.

Keywords: Begomoviruses; Euphorbiaceae; CnMLDV; Transmissibility.

#### Introduction

The *Geminivirity* family encompasses 14 genera and is the largest family of viruses that infect plants (Zerbini *et al.* 2017). Geminiviruses have a single-stranded circular DNA (ssDNA) genome encapsidated in quasi-icosahedral twinned particles (Brown *et al.* 2015; Zerbini *et al.* 2017). The genus *Begomovirus* has more than 400 species recognized by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV; https://talk.ictvonline.org/taxonomy/), including the most important viruses in tropical and subtropical regions (Navas-Castilo *et al.* 2011), and these viruses are transmitted by whiteflies of the *Bemisia tabaci* complex (Varsani *et al.* 2017).

*Cnidoscolus urens* (family Euphorbiaceae) is an undergrowth species with a perennial cycle that develops in almost the entire Brazilian territory, living in areas such as edges of forest

fragments and pastures Moreira and Bragança (2011). The first report of begomovirus infection in *C. urens* occurred in 2006 in the state of Alagoas (Assunção *et al.* 2006); however, the characterization of the complete genome took until 2016, with the virus being identified as *Cnidoscolus* mosaic leaf deformation virus (CnMLDV). CnMLDV has the typical genomic organization of New World bipartite begomoviruses, with five to six ORFs in DNA-A (AV1, AC1, AC2, AC3, AC4, and AC5) and two in DNA-B (BC1 and BV1; Melo *et al.* 2016).

For a long time, it was believed that begomoviruses could not be transmitted via seeds; however, there are at least 11 reports indicating transmission of some species (Kil *et al.* 2016; Kil *et al.* 2017a, b; Kil *et al.* 2020; Kothandaraman *et al.* 2015; Suruthi*et al.* 2018; Kim *et al.* 2015; Ortega-Acosta *et al.* 2018; Kothandan *et al.* 2018; Fadhila *et al.* 2020; Sangeetha *et al.* 2018). Clarifying the transmissibility of viruses by seed is particularly important for the industry, as they can devise phytosanitary measures to prevent the spread of diseases (Tabein *et al.* 2021). In the present study, *C. urens* plants with typical symptoms of CnMLDV infection such as mosaics, leaf deformation, and stunting were observed. Interestingly, whiteflies (*Bemisia tabaci*), an insect vector of begomovirus, are not commonly found associated with this plant species, suggesting that CnMLDV can be vertically transmitted by seeds. Here, the possibility of vertical transmission of this virus was investigated.

# Material and methods

## **Collection of plant material**

Twelve plants of *C. urens* were collected that showed symptoms indicative of begomovirus infection (yellowing, mosaic, leaf deformation, and stunting) in different municipalities in the state of Alagoas between 2019 and 2020: Anadia (n = 1), Barra de São Miguel (n = 1), Chã-Preta (n = 2), Marechal (n = 2), Paripueira (n = 4), São Miguel dos Milagres (n = 1) and Traipu (n = 1). The plants were kept in vases in cages with anti-whitefly protection in a greenhouse at the Campus de Engenharias e Ciências Agrárias of the Universidade Federal de Alagoas, CECA/UFAL. To investigate the presence of CnMLDV in different parts of the flower, 100

flowers and 400 seeds of symptomatic plants were collected in the areas of the Paripueira region.

#### DNA extraction from leaves, flowers, and seeds and amplification via PCR

Initially, leaf samples were processed and total DNA extracted following the CTAB protocol Doyle and Doyle (1990). Then, the flowers were taken to the laboratory for separation of petals, sepals, androecium, and gynoecium with the aid of a stereoscopic microscope (Figure 1). A total of 24 sampling units were obtained for each floral piece. To investigate the incidence of CnMLDV in *C. urens*, seeds were collected from 50 symptomatic plants, with a total of eight seeds per plant, with each plant representing a sample unit. In addition, samples of integuments (n = 12), endosperms (n = 12), and embryos (n = 5) were obtained from mature seeds collected from plants showing typical symptoms of CnMLDV infection (Fig. 1). Viral incidence was determined by the percentage of infected tissues/organs, based on the total number of matched samples evaluated.

**Fig. 1:** Mosaic symptoms and leaf deformation in *Cnidoscolus urens* (a), flower (b), androecium (c), gynoecium (d), seed (e), tegument (f), endosperm (g) and embryo (h)



Fonte: elabora pela autora (2022).

Total DNA was extracted for each flower piece and seeds Doyle and Doyle (1990) and used as a template for detection, via PCR, of CnMLDV using the CnMLDV\_A-For/CnMLDV\_A-Rev primers, which amplify a fragment of 790 pairs of base (bp) of the protein coat region of the DNA-A genomic component of CnMLDV. The PCR reactions were performed in a final volume of 15  $\mu$ L, containing 1.5  $\mu$ L of 10X PCR buffer, 1.2  $\mu$ L of 10 mM dNTPs mixture, 1  $\mu$ L of each oligonucleotide at 10  $\mu$ M, 10 ng of template DNA, and one unit of Taq DNA Polymerase, making up to volume with ultrapure H<sub>2</sub>O. Thermocycling conditions consisted of an initial denaturation at 94 °C for 3 minutes and 35 cycles of denaturation at 94 °C for 45 seconds, annealing at 55 °C for 30 seconds, and extension at 72 °C for 90 seconds, followed by a final extension at 72 °C. °C for 10 minutes. Amplification products were analyzed on 1% agarose gel.

#### **Transmission test**

Approximately 100 seeds were collected from 20 symptomatic *C. urens* plants and individually sown in pots containing a commercial substrate mixture (Bioplant Plus<sup>®</sup>) and soil with the addition of 20% vermiculite. The pots were kept in cages with anti-whitefly screens. Sixty days post-germination, 67 seedlings were obtained and analyzed for the presence of begomovirus via PCR, using the degenerate primers PAR1c496/PAL1v1978 (Rojas *et al.* 1993). The incidence of begomovirus was determined by the percentage of possible infected seedlings, based on the total number of seedlings evaluated.

#### Results

#### Confirmation of the presence of CnMLDV in *C. urens* leaf samples

The 12 leaf samples showing typical symptoms of begomovirus infection collected in different municipalities in the state of Alagoas were positive for the DNA-A genomic component of CnMLDV, with ~780 bp amplification products.

#### Detection of CnMLDV in flowers, seeds, and dissected tissues

A total of 24 units of flowers, petals, sepals, androecium, and gynoecium from *C. urens* were investigated for the presence of the DNA-A genomic component of CnMLDV (Table 1). It was possible to verify an infection rate of 83% in flowers, petals, and gynoecium, 62% in sepals, and 79% in androecium.

*C. urens* seeds collected from symptomatic plants were analyzed using PCR. The results revealed the presence of the DNA-A genomic component of CnMLDV in 96% of the whole seeds. In further analysis, the seeds were separated into different parts (integument, endosperm,

and embryo) and the viral incidence in these tissues ranged from 75 to 100% (Table 1; Fig. 2), showing that the virus can move from vegetative to reproductive tissues, reaching the embryo. **Table 1:** Deteccion of *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* in flowers and floral parts of *Cnidoscolus urens* 

Localization	Tissue	n° of infected samples/n° of samples tested
	Flower	20/24
	Petal	20/24
Paripueira	Sepal	15/24
	Androecium	19/24
	Gynoecium	20/24
	Seeds	48/50
Paripueira	Seed coat	12/12
	Endosperm	15/12
	Embryo	5/5

Fonte: elabora pela autora (2022).

**Fig. 2:** Detection of CnMLDV by PCR analysis of flower, petal, sepal, androecium, gynoecium, seed, tegument, endosperm and embryo. Tissues were collected from plants that showed typical symptoms of CnMLDV (Negative Line, control with asymptomatic plant; Positive: positive control with symptomatic plants)



Fonte: elabora pela autora (2022).

#### **Transmission test**

None of the seedlings obtained from infected *C. urens* seeds exhibited typical begomovirus-induced symptoms, as observed in the control plants (Fig. 3). Additionally, the plants tested were PCR negative using universal degenerate primers (Rojas *et al.*1993) and specific for CnMLDV.



**Fig. 3:** Asymptomatic plant of *Cnidoscolus urens* 60 days post emergence (a) and young leaves asymptomatic and PCR negative (b).

Fonte: elabora pela autora (2022).

#### Discussion

CnMLDV infection was detected in all floral parts (petals, sepals, androecium, and gynoecium) of *C. urens*, with an incidence over 80%, suggesting the ability of this virus to reach different reproductive tissues. Similarly, the *Sweet potato leaf curl virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* begomoviruses were also detected in floral tissues of sweet potato and tomato plants, respectively (Kim *et al.* 2015; Pérez-Padilla, 2020). In addition to the ability to infect the reproductive organs of flowers, viruses can gain access to the seed during maturation Pérez-Padilla (2020). In the present study, a high infection rate (90%) was observed in seeds collected from CnMLDV-infected plants, as well as in dissected tissues (seed coat, endosperm, and embryo), with incidence rates ranging from 75–100%. Although the presence of the virus is found in the seedlings (Ali and Kobayashi 2010; Mink 1993; Assis Filho and Sherwood, 2009). Nolan and Campbell (1984) and (Hull, 2002) reinforce that even the presence of the virus in the embryo does not guarantee the infection of the growing seedling. This can be explained by the vigorous metabolic environment of a growing seedling, which may not be conducive to efficient virus accumulation and translocation (Kothandaraman *et al.* 2015).

Despite strong evidence of begomovirus transmissibility via seeds, different studies have shown that TYLCV was not transmitted from seeds to seedlings of *N. benthamiana*  (Rosas-Diaz *et al.* 2017). (Rajabu *et al.* 2018) reported that for the 'Florida Lanai' tomato variety, there was no evidence of seed transmission for the four evaluated geminiviruses.

The begomovirus *Okra yellow mosaic Mexico virus* was detected in seedlings of the uncultivated Malvaceae *Sida aggregateta*, *S. acuta*, *S. collina*, *S. haenkeana*, and *Malachra fasciata* (Ortega-Acosta *et al.* 2018); however, it was not detected via PCR in seeds and seedlings of different cultivars of *Hibiscus sabdariffa* (Ortega-Acosta *et al.* 2018). Amaral (2016), working with 269 seedlings of *Sida rhombifolia* and *Sida acuta*, from seeds infected with *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) and *Sida yellow leaf curl virus* (SiYLCV), respectively, did not observe evidence of transmission of these begomoviruses by seed.

Recently, (Pérez-Padilha *et al.* 2020) conducted studies with two TYLCV-IL isolates from southern Spain and seven tomato genotypes, and it was possible to detect the virus in seeds and floral organs, but no evidence of transmission to seedlings was observed. Sisodia and Mahatma (2020) detected the *Bhedin yellow vein mosaic virus* (BYVMV) in all vegetative and reproductive parts of *Abelmoschus esculentus*; however, the virus was not transmitted via seed. Similar results were obtained in the present study, where CnMLDV was detected in floral organs and seeds (including embryos), but transmission to seedlings was not observed.

Different factors can influence the transmission of viruses via seeds. (Johansen *et al.* 1994) reported that viruses present in the seed coat or internal parts of the seed, in many cases, can be inactivated during the seed maturation process. In addition, Maule and Wang (1996) mentioned some factors linked to the physiological processes that occur in seeds during maturation, such as the reallocation of nutrients, the drastic reduction in cellular activity, and the increase in the levels of inhibitors such as phenolic compounds and quinones. However, (Pagan *et al.* 2019) mention that there is little knowledge about which characteristics of the host and the virus interact to contribute to the efficiency of transmission via seeds. Recently, (Cobos *et al.* 2019) listed two main factors that can affect the efficiency of transmissibility: the speed

of movement and multiplication within the host in the inflorescence. In addition to these two factors, the number of seeds produced by infected plants and virulence also contribute to the number of infected seeds.

#### Conclusions

Despite the DNA-A genomic component of CnMLDV being found consistently in all floral tissues and seeds of *C. urens*, no evidence of transmissibility via seed was found, suggesting that vertical transmission may not be a propagation strategy for this begomovirus. The clarification of this aspect is of crucial interest for epidemiological studies, especially in seed production fields, since *C. urens* plants are associated with economically important crops and their seeds would serve as an initial inoculum source.

**Acknowledgment:** The authors thank the Universidade Federal de Alagoas. M.M.M.F was the recepient of a CAPES postdoctoral fellowship. L.F.G.C was the recepient of a FAPEAL doctoral fellowship.

Funding: The Fapeal (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas) for funding the research.

Author Contributions: All authors contributed equally to this work

Conflict of interest: All authors declare no conflict of interest

Ethics approval: This article does not contain any studies with human participants or animals perfomed by any of the authors.

#### References

Ali A, M Kobayashi (2010) Seed transmission of Cucumber mosaic virus in pepper. Journal of Virol methods 163:234-237

Assis filho F, J Sherwood (2000) Evaluation of seed transmission of Turnip yellow mosaic virus and Tobacco mosaic virus in Arabidopsis thaliana. Phytopathology 90:1233–1238

Assunção IP, AF Listik, MCS Barros, SJC Silva, IO Silva, CE Ramalho-Neto (2006) Diversidade genética de Begomovirus que infectam plantas invasoras na região nordeste. Planta Daninha 24:239-244

Brown JK, FM Zerbini, JN Castillo, E Moriones, RR Sobrinho, JSF Silva, EF Olivé, RW Briddon, CH Zepeda, A Idris, VG Malathi, DP Martin, RR Bustamentem, S Ueda, A Varsani (2015) Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. Arch Virol 160:1593–1619

Cobos A, N Montes, ML Herranz, M Gil-Vall, I Pagan (2019) Within-Host Multiplication and Speed of Colonization as Infection Traits Associated with Plant Virus Vertical Transmission. J Virol 93:e01078-19

Doyle JJ, JL Doyle (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15

Fadhila C, A Lal, TTB Vo, PT Ho, SH Hidayat, J Lee, EJ Kil, S Lee (2020) The threat of seed-transmissible peppwe yellow leaf curl Indonesia virus in chili pepper. Microb pathog 143:104-132

Hull R (2002) Matthew's Plant Virology, 4° ed. London, UK: Academic Press.

Johansen E, MC Edwards, RO Hampton (1994) Seed transmission of viruses: Current perspectives. Annu Rev. Phytopathol 32:363-386

Kil EJ, TTB Vo, C Fadhila, PT Ho, A Lal, E Troiano, G Parrella, S Lee (2020) Seed Transmission of Tomato Leaf Curl New Delhi Virus from Zucchini Squash in Italy. Plants 9:1-8

Kil EJ, J Park, HS Choi, CS Kim, S Lee (2017a). Seed Transmission of Tomato yellow leaf curl virus in White Soybean (*Glycine max*). Plant Pathol J 33:424–428

Kil EJ, J Park, EY Choi EY et al (2017b) Seed transmission of Tomato yellow leaf curl virus in sweet pepper (*Capsicum annuum*). Eur J Plant Pathol 150:759-764

Kil E, S Kim, Y Lee et al (2016) Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. Sci Rep 6:19013

Kim J, EJ Kil, S Kim et al (2015) Seed transmission of Sweet potato leaf curl virus in sweet potato (*Ipomoea batatas*). Plant Pathology 64:1284-1291

Kothandaraman SV, A Devadason, MV Ganesan (2015) Seed-borne nature of a begomovirus, Mung bean yellow mosaic virus, in black gram. Appl Microbiol Biotechnol 100:1925-1933

Manivannan K, P Renukadevi P, VG Malathi, G Karthikeyan, N Balakrishnan (2018) A new seed-transmissible begomovirus in bitter gourd (*Momordica charantia* L.). Microbial Pathogenesis 128:82-89

Maule AJ, D Wang (1996) Seed transmission of plant viruses: A lesson in biological complexity. Trends in Microbiology 4:153-158

Melo AM, SJC Silva, R Ramos-Sobrinho, MMM Ferro, IP Assunção, GSA Lima (2016) Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus: a novel begomovirus infecting euphorbiaceous plants in Brazil. Arch Virol 161:2605- 2608

Mink GI (1999) Pollen and seed-transmitted viruses and viroids. Annual Review of Phytopathology 31:375–402

Moreira HJC, HBN Bragança (2011) Manual de identificação de plantas infestantes hortifrúti, São Paulo: FMC Agricultural Products. Navas-Castillo J, E Fiallo-Olivé, S Sánchez-Campos (2011) Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. Annu. Rev. Phytopathol 49:219–248

Nolan PA, RN Campbell (1984) Squash mosaic virus detection in individual seeds and seed lots of cucurbits by enzyme-linked immunosorbent assay. Plant Dis 68:971–975.

Ortega-Acosta DL, O Martínez, JH Morales (2018) Evaluation of seed transmission of begomoviruses in roselle and roselle-associated weeds. Rev mex fitopatol 37:135-146

Pagán I (2019) Chapter 16: Movement Between Plants: Vertical Transmission. In Palukaits P, García-Arenal F, (ed) Washington, pp 185-198

Rajabu CA, GG Kennedy, J Ndunguru, EM Ateka, F Tairo, LH Bowdoin, JTA Ibanez (2018) Lanai: A small, fast growing tomato variety is an excellent model system for studying geminiviruses. J Virol Methods 256:89-99

Rojas MR, RL Gilbertson, DR Russel, DP Maxwell (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. Plant Dis 77:340-347

Rosas-Diaz T, D Zhang, RL Durán (2017) No evidence of seed ´ transmissibility of Tomato yellow leaf curl virus in *Nicotiana benthamiana*. J. Zhejiang UnivSci B 18:437-440

Sangeetha B, V Malathi, DAlice, M Suganthym, P Renukadevi (2018) A distinct seedtransmissible strain of tomato leaf curl New Delhi virus infecting Chayote in India. Virus Res 258: 81–91

Sisodia P, L Mahatma (2020) Detection of *Bhendi Yellow Vein Mosaic Virus* (BYVMV) from the Different Parts of Bhendi [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench] Plant, Flower and Seed. Int J Curr Microbiol App Sci 9:389-395

Suruthi V, S Nakkeeran, P Renukadevi, VG Malathi, V Rajasree (2018) Evidence of seed transmission of dolichos yellow mosaic virus, a begomovirus infecting lablab-bean in India. Virus Dis 29: 506–512

Tabein S, L Miozzi, S Matic, GP Accotto, E Neris (2021) No Evidence for Seed Transmission of Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus in Tomato. Cells 10:1673

Zerbini FM, RW Briddon, A Idris, DP Martin, E Mariones, JN Castillo, RR Bustamente, P Roumagnac, A Varsani (2017) ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. J. Gen Virol 98:131–133

Espécie (Acrônimo)	Número de acesso GenBank	Hospedeiro	País
Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus (CnMLDV)	NC38982	Cnidoscolus urens	Brazil
Passionfruit severe leaf distortion virus (PSLDV)	JF972767	Passiflora edulis f. flavicarpa	Brazil
Passionfruit severe leaf distortion virus (PSLDV)	MF401391	Passiflora edulis f. flavicarpa	Brazil
Tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV)	JF803248	Solanum lycopersicum	Brazil
Tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV)	JF803249	Solanum lycopersicum	Brazil
Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV)	MT214086	Solanum lycopersicum	Brazil
Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV)	MT215003	Solanum lycopersicum	Brazil
Tomato interveinal chlorosis virus (TICV)	JF803253	Solanum lycopersicum	Brazil
Tomato interveinal chlorosis virus (TICV)	NC038469	Solanum lycopersicum	Brazil
Cnidoscolus blistering yellow mosaic virus (CnBYMV)	MT553995	Cnidoscolus urens	Brazil
Macroptilium bright yellow interveinal virus (MaBYIV)	MN146017	Macroptilium erythroloma	Brazil
Jatropha mosaic virus (JMV)	KJ174332	Jatropha sp.	República Dominicana
Jatropha mosaic virus (JMV)	KJ174331	Jatropha sp.	República Dominicana
Tomato common mosaic virus (ToCmMV)	KC706573	Solanum lycopersicum	Brazil
Tomato common mosaic virus (ToCmMV)	KC706579	Solanum lycopersicum	Brazil
Cotton chlorotic spot virus (COCSV0)	NC38794	Gossypium hirsutum; Gossypium mustelinum	Brazil
Tomato rugose yellow leaf curl virus (ToRYLCV)	JN381813	Solanum lycopersicum	Uruguai
Tomato rugose yellow leaf curl virus (ToRYLCV)	JN381815	Solanum lycopersicum	Uruguai
Tomato severe leaf curl virus (ToSLCV)	KT099129	Planta não identificada	Guatemala
Corchorus mottle virus (CoMoV)	JQ805781	Corchorus hirtus	Brazil
Desmodium leaf distortion virus (DeLDV)	MF773890	Corchorus siliquosus	Cuba
Desmodium leaf distortion virus (DeLDV)	MF773888	Corchorus siliquosus	Brazil
Tomato chlorotic leaf curl virus (ToCLCV)	MK558060	Solanum lycopersicum	Brazil

**ANEXO I:** Sequências de begomovírus obtidas a partir do banco de dados não-redundante Genbank.

Tomato chlorotic leaf curl virus (ToCLCV)	KT099119	Solanum lycopersicum	Brazil
Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV)	HM007113	Chilli	Índia

Fonte: elabora pela autora (2022).