



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



ALINE MARQUES MELO

VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Macrotidium*
yellow vein virus EM *Macrotidium* spp. NO ESTADO DE ALAGOAS E PRIMEIRO
RELATO DE *Tomato interveinal chlorosis virus* EM *Rhynchosia minima*

Rio Largo - AL
2024

ALINE MARQUES MELO

VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Macrottilium yellow vein virus* EM *Macrottilium* spp. NO ESTADO DE ALAGOAS E PRIMEIRO
RELATO DE *Tomato interveinal chlorosis vírus* EM *Rhynchosia minima*

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. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Murilo Zerbini Júnior

Coorientadora: Dra. Ayane Fernanda Ferreira Quadros

Rio Largo - AL

2024

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Campus de Engenharias e Ciências Agrárias
Bibliotecário Responsável: Erisson Rodrigues de Santana - CRB4 - 1512

M528v Melo, Aline Marques.

Variabilidade genética e estrutura populacional de *Macrottilium yellow vein virus* em *Macrottilium*. spp. no Estado de Alagoas e primeiro relato de *Tomato interveinal chlorosis virus* em *Rhynchosia minima* / Aline Marques Melo. – 2024.

91f.: il.

Orientadores: Gaus Silvestre de Andrade Lima.
Coorientadores: Francisco Murilo Zerbini Júnior.
Ayane Fernanda Ferreira Quadros.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Proteção de Plantas. Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, 2024.

Inclui bibliografia

1. Geminivírus. 2. *Fabaceae*. 3. Planta daninha.
I. Título.

CDU: 632.51: 981.35

Folha de Aprovação

ALINE MARQUES MELO

VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Macoptilium yellow vein virus* EM *Macoptilium* spp. NO ESTADO DE ALAGOAS E PRIMEIRO RELATO DE *Tomato interveinal chlorosis vírus* EM *Rhynchosia minima*

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.

Aprovado em: 29/02/2024

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima (CECA/UFAL) (Orientador)

Prof. Dr. Mariote dos Santos Brito Netto (CECA/UFAL)

Prof.^a Dr.^a Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva (CECA/UFAL)

Prof. Dr. Roberto Ramos Sobrinho (UENF)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo seu amor, proteção e força durante esse período.

À minha família, em especial minha mãe Georgina, meu pai Acácio, minha irmã Clara, a minha segunda mãe Zefinha e ao meu namorado Leandro, pelo imprescindível apoio, por todo amor e incentivo que recebi e por compreenderem minhas ausências.

Ao Prof. Gaus Silvestre de Andrade Lima e Prof. Francisco Murilo Zerbini pela orientação, disponibilidade e por não medirem esforços para viabilizar o desenvolvimento do projeto.

À Prof.^a Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva, à Dr.^a Mayra Machado de Medeiros Ferro e à Dr.^a Ayane Fernanda Ferreira Quadros pelos ensinamentos, pela amizade e por todo o apoio que me deram ao longo dos anos.

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

Aos companheiros do Laboratório de Evolução e Ecologia de Vírus, em especial Tarsi, João e Franciely, pelo empenho na elaboração deste trabalho, pelos momentos de alegria, aprendizado e experiências compartilhadas.

À Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Campus de Engenharia e Ciências Agrárias (CECA) e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro) pela oportunidade de execução deste trabalho.

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

Aos meus amigos de Maceió e de Viçosa por todo apoio, carinho e por não me deixarem desanimar nos momentos mais complicados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

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

RESUMO

Plantas não-cultivadas possuem um importante papel como fonte de diversidade de begomovírus, podendo contribuir para emergência de novas espécies e ainda servirem como hospedeiros alternativos ou como fonte de inóculo para epidemias em culturas comerciais. O gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) é um importante grupo de vírus que infectam dicotiledôneas nas mais diversas regiões do planeta, causando significativas perdas econômicas em campos de cultivo. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a variabilidade genética e estrutura populacional de *Macroptilium yellow vein virus* (MacYVV) infectando *Macroptilium* spp. no estado de Alagoas e a identificação de uma espécie de begomovírus infectando *Rhynchosia minima*. Visando avaliar a variabilidade genética e a estrutura populacional de MacYVV infectando a planta não-cultivada *Macroptilium* spp. (família *Fabaceae*), amostras foliares apresentando sintomas indicativos de infecção por begomovírus foram coletadas em diferentes municípios do estado de Alagoas em 2019 e 2020. O DNA total foi extraído a partir de cada amostra e serviu como molde para amplificação por círculo rolante (ACR), seguido por digestão com endonucleases e clonagem em vetores plasmidiais que foram completamente sequenciados utilizando o método Sanger. Comparações de sequências pareadas do DNA-A mostraram que todos os isolados pertencem a uma única espécie, *Macroptilium yellow vein virus*. Análise filogenética mostrou a divisão dos isolados de MacYVV em cinco subpopulações, as quais apresentaram baixos valores de variabilidade nucleotídica. Análises de recombinação e reticulada mostraram evidências de eventos de recombinação intraespecífica em alguns isolados de MacYVV. Além disso, forte pressão de seleção negativa foi detectada atuando sobre os genes *CP* e *Rep* de MacYVV. Esses resultados sugerem uma baixa variabilidade genética que pode ter sido gerada por possíveis gargalos genéticos, e que a forte estruturação das subpopulações de MacYVV deve ser efeito da baixa interação entre elas, permitindo que estas subpopulações possam continuar se diferenciando. Para identificar a espécie de begomovírus infectando *Rhynchosia minima*, foi realizada a extração do DNA total das plantas sintomáticas. Alíquotas do DNA foram utilizadas como molde para detecção de begomovírus empregando oligonucleotídeos para PCR gênero-específicos. As amostras PCR-positivas foram utilizadas para obter genomas virais completos via ACR, digestão com endonucleases, clonagem em vetores plasmidiais e sequenciamento. Comparações de sequências pareadas indicaram que os clones (n=4) de DNA-A possuíam 94% de identidade nucleotídica com *Macroptilium yellow net virus* (MacYNV), que foi reclassificado como *tomato interveinal chlorosis virus* (ToICV). A análise filogenética mostrou que os isolados formaram um clado com outras sequências de ToICV, concordando com o resultado de comparações pareadas. *Rhynchosia minima* já foi descrita como hospedeira de begomovírus em países como Equador, Porto Rico, Estados Unidos, Cuba, México e Paquistão, mas ainda não havia sido relatada no Brasil.

Palavras-chave: Geminivírus, *Fabaceae*, planta daninha.

ABSTRACT

Non-cultivated plants play an important role as a source of begomovirus diversity, being able to contribute to the emergence of new species and also serve as alternative hosts or as a source of inoculum for epidemics in commercial crops. The genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*) is an important group of viruses that infect dicotyledons in the most diverse regions of the planet, causing significant economic losses in crop fields. In this context, the present study aimed to evaluate the genetic variability and population structure of *Macrottilium yellow vein virus* (MacYVV) infecting *Macrottilium* spp. in the state of Alagoas and the identification of a species of begomovirus infecting *Rhynchosia minima*. Aiming to evaluate the genetic variability and population structure of MacYVV infecting the non-cultivated plant *Macrottilium* spp. (*Fabaceae* family), leaf samples showing symptoms indicative of begomovirus infection were collected in different municipalities in the state of Alagoas in 2019 and 2020. Total DNA was extracted from each sample and served as a template for rolling circle amplification (ACR), followed by digestion with endonucleases and cloning into plasmid vectors that were completely sequenced using the Sanger method. Paired DNA-A sequence comparisons showed that all isolates belong to a single species, *Macrottilium yellow vein virus*. Phylogenetic analysis showed the division of MacYVV isolates into five subpopulations, which presented low values of nucleotide variability. Recombination and crosslinking analyzes showed evidence of intraspecific recombination events in some MacYVV isolates. Furthermore, strong negative selection pressure was detected acting on the *CP* and *Rep* genes of MacYVV. These results suggest a low genetic variability that may have been generated by possible genetic bottlenecks, and that the strong structure of MacYVV subpopulations must be the effect of the low interaction between them, allowing these subpopulations to continue differentiating. To identify the species of begomovirus infecting *Rhynchosia minima*, total DNA extraction from symptomatic plants was performed. Aliquots of the DNA were used as a template for detection of begomovirus using genus-specific PCR oligonucleotides. PCR-positive samples were used to obtain complete viral genomes via ACR, endonuclease digestion, cloning into plasmid vectors and sequencing. Pairwise sequence comparisons indicated that DNA-A clones (n=4) had 94% nucleotide identity with *Macrottilium yellow net virus* (MacYNV), which was reclassified as *tomato interveinal chlorosis virus* (ToICV). Phylogenetic analysis showed that the isolates formed a clade with other ToICV sequences, agreeing with the results of pairwise comparisons. *Rhynchosia minima* has already been described as a host for begomovirus in countries such as Ecuador, Puerto Rico, the United States, Cuba, Mexico and Pakistan, but it had not yet been reported in Brazil.

Keywords: Geminivirus, *Fabaceae*, weed.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1. Organização genômica dos begomovírus. Região comum (CR); 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.....16

Capítulo 1

Figura 1. Plantas de *Macropodium* sp. apresentando sintomas típicos de infecção por begomovírus. (A) Município de Maceió; (B) Município de Marechal Deodoro; (C) Município de Matriz de Camaragibe; (D) Município de União dos Palmares.....52

Figura 2. Matriz de identidades de sequências do DNA-A de isolados de MacYVV obtidas neste trabalho mais isolados disponíveis no GenBank. Subpopulação PI em preto – Isolados do GenBank oriundos de Palmeira dos Índios, subpopulação Mc + UP1 em verde – Isolados de Maceió com isolados 3UPC1P, 6UPC5P, 8UPC3P e 11UPC8P de União dos Palmares, subpopulação MD em laranja – Isolados de Marechal Deodoro, subpopulação UP2 em vermelho – Isolados 2UPC3K, 4UPC3P, 9UPC1P e 10UPC6K de União dos Palmares e subpopulação Mt em azul – Isolados de Matriz do Camaragibe.....53

Figura 3. Análise filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) *midpoint* baseada no DNA-A de isolados de MacYVV obtidas neste trabalho mais amostras disponíveis no GenBank, mostrando a formação de cinco clados principais. Clado I = isolados de Marechal Deodoro (MD) em laranja, Clado II = isolados 2UPC3K, 4UPC3P, 9UPC1P e 10UPC6K de União dos Palmares (UP2) em vermelho, Clado III = isolados de Palmeira dos Índios (PI) em preto, Clado IV = formação de dois subgrupos, no primeiro foram agrupados os isolados 3UPC1P, 6UPC5P, 8UPC3P e 11UPC8P de União dos Palmares (UP1) e no segundo os isolados de Maceió (Mc) em verde, e Clado V = isolados de Matriz do Camaragibe (Mt) em azul.....54

Figura 4. Análise estatística multivariada de agrupamento de subdivisão populacional usando Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) para subpopulações de MacYVV. (A) Gráfico de barra DAPC baseado no DNA-A, com barras coloridas

representando isolados em cada subpopulação inferida. (B) Gráficos de dispersão DAPC baseados no DNA-A, com números indicando cada subpopulação. Subpopulação 1 em azul – Isolados de Marechal Deodoro, Subpopulação 2 em verde – Isolados de Palmeira dos Índios (PI1 – KJ939898, KJ939899, KJ939905, KJ939908, KJ939910, KJ939912, KJ939913 e KJ939914), Subpopulação 3 em rosa – Isolados de Matriz do Camaragibe, Subpopulação 4 em laranja – Isolados de União dos Palmares (UP2 – Isolados 2UPC3K, 4UPC3P, 9UPC1P e 10UPC6K), Subpopulação 5 em roxo – Isolados de Palmeira dos Índios (PI2 – KJ939900, KJ939901, KJ939902, KJ939903, KJ939904, KJ939906, KJ939907, KJ939909, KJ939911 e KJ939915) e Subpopulação 6 em marrom – Isolados de Maceió com União dos Palmares (UP1 – Isolados 3UPC1P, 6UPC5P, 8UPC3P e 11UPC8P). (C) Gráfico de atribuição DAPC que mostra as probabilidades de atribuição dos indivíduos aos diferentes *clusters*: os *clusters* 2 e 5 apresentam extensa sobreposição, onde retângulos sombreados em vermelho indicam alta probabilidade de atribuição correta a cada cluster, com o espectro de cores do sombreamento passando do laranja e do amarelo ao branco, representando uma redução gradual em probabilidade. O código de cores indica a qual *cluster* pertence cada isolado.....55

Figura 5. Gráfico de barras gerado pela análise de estruturação de subpopulações no software STRUCTURE para subpopulações de MacYVV. As cores representam as subpopulações Mt – Isolados de Matriz do Camaragibe (vermelho), PI – Isolados de Palmeira dos Índios (verde), Mc + UP1 – Isolados de Maceió e isolados 3UPC1P, 6UPC5P, 8UPC3P e 11UPC8P de União dos Palmares (azul) e MD + UP2 – Isolados de Marechal Deodoro e isolados 2UPC3K, 4UPC3P, 9UPC1P e 10UPC6K de União dos Palmares (amarelo). Cada barra vertical representa um isolado viral cuja distribuição de cores é proporcional à estimativa de cada indivíduo pertencer a cada subpopulação.....57

Figura 6. Análise reticulada baseada no DNA-A dos isolados de MacYVV obtidos neste trabalho, junto com isolados depositados no GenBank. Subpopulação PI em preto – Isolados do GenBank oriundos de Palmeira dos Índios, subpopulação Mc + UP1 em verde – Isolados de Maceió com isolados 3UPC1P, 6UPC5P, 8UPC3P e 11UPC8P de União dos Palmares, subpopulação MD em laranja – Isolados de Marechal Deodoro, subpopulação UP2 em vermelho – Isolados 2UPC3K, 4UPC3P, 9UPC1P e 10UPC6K de União dos Palmares e subpopulação Mt em azul – Isolados de Matriz do Camaragibe.....58

Capítulo 2

Figura 1. Plantas de *Rhynchosia minima* apresentando sintomas típicos de infecção por begomovírus.....81

Figura 2. Matriz bidimensional representando porcentagem de identidade de comparações pareadas de sequências nucleotídicas do DNA-A de isolados de begomovírus provenientes de *Rhynchosia minima* (isolados em azul) com isolados de begomovírus disponíveis no GenBank (isolados em preto)82

Figura 3. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do componente DNA-A de begomovírus obtidos no estudo (isolados em azul) com isolados de begomovírus disponíveis no GenBank (isolados em preto) e *outgroup* em verde.....83

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Sequências de *primers* usadas para amplificação do componente genômico DNA-A de BGMV e MacYSV e *primer* universal para o gênero *Begomovirus*.....59

Tabela 2.

Sequências de begomovírus MacYVV obtidas apartir do banco de dados não-redundante Genbank.....59

Tabela 3. Hospedeiro, local, ano de coleta das amostras de *Macroptilium* spp., resultado da PCR com pares de *primers* universais e específicos para MacYSV e BGMV, clones e espécie viral.....60

Tabela 4. *Open reading frames* (ORFs), com seus respectivos números de aminoácidos (aa), encontrados no DNA-A dos isolado deste trabalho.....62

Tabela 5. Índices variabilidade genética das populações do begomovírus MacYVV infectando *Macroptilium lathyroides* em Alagoas. H – número de haplótipos; Hd – diversidade haplotípica; π – diversidade nucleotídica. PI – Palmeira dos Índios, UP1 – Isolados 3UPC1P, 6UPC5P, 8UPC3P e 11UPC8P de União dos Palmares, UP2 – Isolados 2UPC3K, 4UPC3P, 9UPC1P e 10UPC6K de União dos Palmares, Mt – Matriz do Camaragibe, Mc – Maceió e MD – Marechal Deodoro.....63

Tabela 6. Diferenciação genética entre subpopulações de MacYVV. UP1 – Isolados 3UPC1P, 6UPC5P, 8UPC3P e 11UPC8P de União dos Palmares, UP2 – Isolados 2UPC3K, 4UPC3P, 9UPC1P e 10UPC6K de União dos Palmares, Mt – Matriz do Camaragibe, Mc – Maceió, MD – Marechal Deodoro, PI1 – Isolados KJ939898,

KJ939899, KJ939905, KJ939908, KJ939910, KJ939912, KJ939913 e KJ939914 de Palmeira dos Índios e PI2 – Isolados KJ939900, KJ939901, KJ939902, KJ939903, KJ939904, KJ939906, KJ939907, KJ939909, KJ939911 e KJ939915 PI2 – KJ939900, KJ939901, KJ939902, KJ939903, KJ939904, KJ939906, KJ939907, KJ939909, KJ939911 e KJ939915.....	64
--	----

Tabela 7.

Eventos de recombinação detectados na população de MacYVV infectando <i>Macoptilum</i> spp. em Alagoas.....	65
--	----

Tabela 8. Sítios selecionados positiva e negativamente nas ORFs CP e Rep da população de MacYVV.....	65
--	----

Capítulo 2

Tabela 1. Hospedeiro, local, ano de coleta das amostras de <i>Rhynchosia minima</i> , resultado da PCR com pares de primers universais, clones e espécie viral.....	84
---	----

Tabela 2. <i>Open reading frames</i> (ORFs), com seus respectivos números de aminoácidos (aa), encontrados no DNA-A dos isolado deste trabalho.....	84
---	----

Tabela 3. Sequências de begomovírus obtidas apartir do banco de dados não-redundante Genbank.....	85
---	----

Tabela 4. Eventos de recombinação detectados nos isolados de ToICV infectando <i>Rhynchosia minima</i>	87
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 Família <i>Geminiviridae</i>	13
2.2 Gênero <i>Begomovirus</i>	14
2.3 Variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus.....	18
2.3.1 Mutação.....	20
2.3.2 Recombinação.....	20
2.3.3 Pseudorecombinação.....	21
2.4 Diversidade de <i>Begomovirus</i> infectando leguminosas.....	22
REFERÊNCIAS.....	25
3 CAPÍTULO I VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE <i>Macrottilium yellow vein virus</i> EM <i>Macrottilium</i> spp. NO ESTADO DE ALAGOAS.....	36
3.1 INTRODUÇÃO.....	39
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.2.1 Coleta do material vegetal.....	40
3.2.2 Extração de DNA e detecção de begomovírus.....	41
3.2.3 Clonagem e sequenciamento do genoma completo de begomovírus.....	41
3.2.4 Análise de sequências e demarcação de espécies.....	42
3.2.5 Alinhamento e análises filogenéticas.....	42
3.2.6 Estrutura genética e índices de variabilidade.....	43
3.2.7 Análise de recombinação.....	43
3.2.8 Análise de seleção.....	44
3.3 RESULTADOS.....	44
3.3.1 Detecção de begomovírus via <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	44
3.3.2 Análises de sequências e demarcação de espécie.....	45
3.3.3 Análises Filogenéticas.....	45
3.3.4 Estrutura genética e índices de variabilidade.....	46
3.3.5 Análise de recombinação.....	47
3.3.6 Análise de seleção.....	47
3.4 DISCUSSÃO.....	48

3.5 CONCLUSÕES.....	51
3.6 REFERÊNCIAS.....	66
4 CAPÍTULO II PRIMEIRO RELATO DE <i>Tomato interveinal chlorosis virus</i> EM <i>Rhynchosia minima</i>.....	71
4.1 INTRODUÇÃO.....	74
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	75
4.2.1 Coleta do material vegetal.....	75
4.2.2 Extração de DNA e detecção de begomovírus.....	75
4.2.3 Clonagem e sequenciamento do genoma completo de begomovírus.....	76
4.2.4 Análise de sequências e demarcação de espécies.....	77
4.2.5 Alinhamento e análises filogenéticas.....	77
4.2.6 Análise de recombinação.....	77
4.3 RESULTADOS.....	78
4.3.1 Detecção de begomovírus via <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	78
4.3.2 Análises de sequências e demarcação de espécie.....	78
4.3.3 Análises Filogenéticas.....	79
4.3.4 Análise de recombinação.....	79
4.4 DISCUSSÃO.....	79
4.5 CONCLUSÕES.....	81
4.4 REFERÊNCIAS.....	88

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os fitovírus que compõem a família *Geminiviridae* compartilham como característica o material genético composto por DNA circular de fita simples (ssDNA) encapsidado em partículas geminadas quasi-icosaédrica (Fiallo-olive et al., 2021). Esta família engloba 14 gêneros, *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Citlodavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Maldovirus*, *Mastrevirus*, *Mulcrilevirus*, *Topilevirus*, *Topocuvirus*, *Turncurtovirus* e *Opunvirus*, estabelecidos de acordo com o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização genômica e relacionamento filogenético (Fiallo-Olive et al., 2021; Fontenele et al., 2020; Varsani et al., 2017). *Geminiviridae* é a família mais diversificada entre os vírus de plantas, com mais de 500 espécies oficialmente reconhecidas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV; <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>).

O gênero *Begomovirus* é composto por vírus que possuem um ou dois componentes genômicos e são transmitidos às plantas dicotiledôneas por um complexo de espécies crípticas de *Bemisia tabaci* (Barbosa et al., 2014; Navas-Castillo; Fiallo-Olivé; Sánchez-campos et al., 2011). No componente genômico DNA-A encontram-se os genes envolvidos na replicação e encapsidação viral, enquanto no DNA-B estão presentes os genes responsáveis pelos movimentos intra- e intercelular (Lazarowitz, 1992).

Diversas espécies de begomovírus têm sido relatadas infectando leguminosas cultivadas, sendo *bean golden mosaic virus* (BGMV) e *Macroptilium yellow spot virus* (MacYSV) as mais relevantes economicamente no Brasil (Fauquet et al., 2008; Lima et al., 2013; Ramos-sobrinho et al., 2014). Além de infectarem plantas cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais, e causarem grandes perdas econômicas, os begomovírus também estão associados a hospedeiras não-cultivadas pertencentes à família *Fabaceae* como *Macroptilium* spp. (Moriones; Navas-Castillo, 2000; Morales; Anderson, 2001; Legg; Fauquet, 2004; Sserubombwe et al., 2008). Sabe-se que estas plantas podem servir como hospedeira para *bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), BGMV e MacYSV, que possuem grande importância socioeconômica na cultura dos feijoeiros nas Américas (Bracero; Rivera; Beaver, 2003; Ramos-sobrinho et al., 2014), além de outros begomovírus como *tomato interveinal chlorosis virus* (ToICV), *Macroptilium yellow vein virus* (MacYVV) e *Macroptilium common mosaic virus* (MacCMV) (Silva et al., 2012; Passos et al., 2017). Outra leguminosa não-cultivada onde já foi detectada infecção por begomovírus é a *Rhynchosia minina*. As espécies *Cabbage leaf curl virus* e *Pepper*

huasteco yellow vein virus (Hou et al., 1996; Fiallo-Olivé et al., 2018), begomovírus originalmente descritos em plantas cultivadas, foram encontradas infectando esta leguminosa, mostrando sua importância como hospedeira secundária.

A capacidade dos begomovírus de infectarem plantas cultivadas e/ou não-cultivadas tem sido destacada como um dos fatores associados à alta diversidade genética desses vírus no Brasil (Ambrozevicius et al., 2002; Castillo-Urquiza et al., 2008; Lima et al., 2013; Rocha et al., 2013; Ramos- sobrinho et al., 2014), que pode ser resultado de eventos de recombinação e pseudorecombinação entre os begomovírus na ocorrência de infecções mistas, o que contribui para a emergência de novas espécies (Ambrozevicius, et al, 2002, Zhou et al., 1997; Fondong et al., 2000). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética e estrutura populacional de MacYVV infectando *Macroptilium* spp. no estado de Alagoas e a identificação de uma espécie de begomovírus infectando *Rhynchosia minima*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Família Geminiviridae

Geminiviridae é considerada uma das maiores e mais importantes famílias de fitovírus, possuindo 14 gêneros (*Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulovirus*, *Citlodovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Maldovirus*, *Mastrevirus*, *Mulcrilevirus*, *Topilevirus*, *Topocuvirus*, *Turncurtovirus* e *Opunvirus*), classificados de acordo com o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, relacionamento filogenético e organização genômica (Fontenele et al., 2020; Varsani et al, 2014; 2017; Fiallo-Olivé et al., 2021). Os vírus desta família apresentam genoma formado por DNA circular de fita simples (ssDNA), com tamanho de 2,6 a 5,2 kb, encapsidados em partículas geminadas de morfologia quasi-icosaédrica com aproximadamente 18 nm de diâmetro e 30 nm de comprimento (Brown et al., 2015; Fiallo-Olivé et al., 2021).

A maioria dos gêneros da família possuem genoma monopartido, exceto os begomovírus que podem possuir um (monopartidos) ou dois (bipartidos) componentes genômicos. Cada partícula geminada possui uma única molécula de ssDNA e, no caso dos *Begomovirus* bipartidos, dois vírions contendo cada um dos componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) são indispensáveis para o estabelecimento da infecção sistêmica na planta hospedeira (Brown et al., 2015; Fiallo-Olivé et al., 2021). Causando infecções em plantas mono e dicotiledôneas, os geminivírus são responsáveis por perdas de rendimento

em importantes espécies cultivadas (Inoue-Nagata; Lima; Gilbertson, 2016), além de infectarem plantas não-cultivadas/silvestres e ornamentais (Hanley-Bowdoin et al., 2013).

Os geminivírus representam uma exceção quando se trata de vírus de DNA que estabelecem parasitismo em plantas (Koonin; Ilyina, 1992), apresentando grande importância por serem causadores de doenças que induzem impactos socioeconômicos negativos em diferentes continentes, sendo alguns desses geminivírus capazes de provocar perdas de até 100% (Legg; Fauquet, 2004; Shepherd et al., 2010; Sattar et al., 2013; Buerstmayr; Buerstmayr, 2023). Por exemplo, *bean golden mosaic virus* (BGMV) e *bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) infectando feijões nas Américas; *beet curly top virus* (BCTV; *Curtovirus*) infectando beterraba açucareira na América do Norte e Oriente Médio; *tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV; *Begomovirus*) causando infecções em tomateiros em vários continentes; *African cassava mosaic virus* (ACMV; *Begomovirus*) infectando plantas de mandioca, *maize streak virus* (MSV; *Mastrevirus*) causando doença em milho na África; *wheat dwarf virus* (WDV; *Mastrevirus*) em trigo na Europa e *cotton leaf curl viruses* (*Begomovirus*) infectando algodoeiro na Ásia (Hanley-Bowdoin et al., 2013; Inoue-Nagata; Lima; Gilbertson, 2016).

A transmissão da maioria dos geminivírus é realizada por insetos que se alimentam do floema da planta, abrangendo diferentes espécies de cigarrinhas, moscas-brancas do complexo de espécies crípticas *Bemisia tabaci*, membracídeos e afídeos (Inoue-Nagata; Lima; Gilbertson, 2016). Plantas infectadas podem apresentar vários sintomas típicos de geminivirose como deformação foliar, amarelecimento, nanismo, mosaico e/ou estriações (Varsani et al., 2017).

2.2 Gênero *Begomovirus*

O gênero *Begomovirus* é o mais numeroso dentro da família *Geminiviridae*, com 445 espécies reconhecidas pelo ICTV (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>), demonstrando sua importância. Os begomovírus são transmitidos por um complexo de espécies crípticas da mosca-branca *Bemisia tabaci*, causando doenças em plantas dicotiledôneas em regiões tropicais e subtropicais (Stanley et al., 2005; Faria et al., 2000; Navas-Castillo; Fiallo-Olivé; Sánchez-Campos, 2011; Brown et al., 2012; 2015; Fiallo-Olivé et al., 2021).

Os begomovírus são classificados em dois grupos de acordo com a diversidade genética, organização genômica e distribuição geográfica. São os chamados begomovírus

do “Velho Mundo” (VM – Europa, África, Ásia e Austrália) e do “Novo Mundo” (NM – Américas e Caribe). Os do “Velho Mundo” são mono ou bipartidos, componente genômico denominados de DNA-A e DNA-B, e estão geralmente associados a moléculas circulares de ssDNA satélites, os chamados alfassatélites e betassatélites (Fauquet; Stanley, 2005; Zhou, 2013; Lozano et al., 2016; Rosario et al., 2016). Já os de “Novo Mundo” são majoritariamente bipartidos, necessitando dos dois componentes genômicos para o estabelecimento da infecção sistêmica (Rojas et al., 2005).

A associação dos begomovírus do VM e, em menor número do NM, com DNAs satélites pode levar a alterações na expressão dos sintomas da doença nas plantas hospedeiras. Em alguns casos, a associação com alfasatélites não altera os sintomas causados pelo vírus auxiliar, já a presença de betassatélites é importante para a manifestação de sintomas nos begomovírus do VM (Zhou, 2013). Ainda não há relatos da presença de betassatélites no NM (Mar et al., 2017a). Além disso, deltasatélites foram descritos em associação com begomovírus bissegmentados no NM e no VM, e aparentemente não alteram os sintomas causados pelo vírus auxiliar (Fiallo-Olivé et al., 2016; Lozano et al., 2016).

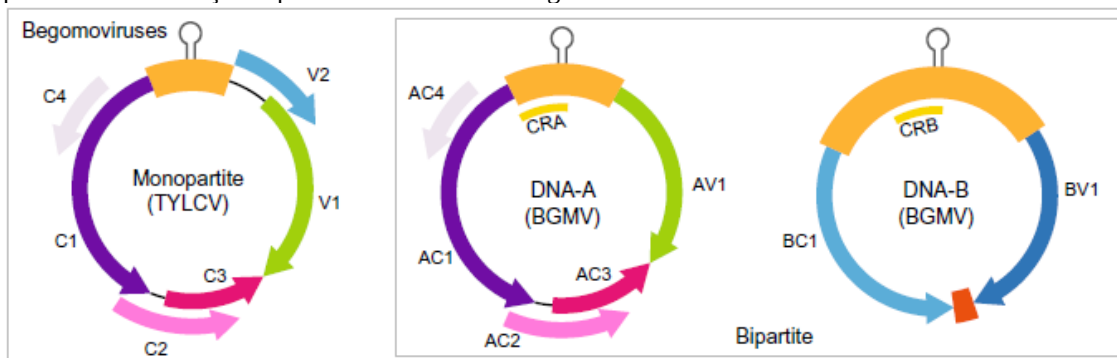
Genomas de begomovírus possuem *open reading frames* (ORFs) que codificam proteínas multifuncionais (Walsh; Mohr, 2006). O componente genômico DNA-A dos begomovírus do NM possui cinco ORFs, uma no sentido viral (AV1) e quatro no sentido complementar (AC1, AC2, AC3 e AC4) (Figura 1). A ORF AC1 codifica para a proteína Rep (*Replication associated Protein*) que é uma endonuclease associada à replicação do genoma viral (Hanley-Bowdoin et al., 2000). Ela se liga a regiões intergênicas conhecidas como iterons e cliva a fita de DNA no nonanucleotídeo (5'-TAATATT↓AC-3'), iniciando o processo de replicação por círculo rolante (Fontes et al., 1992; Saxena; Tiwari, 2017). A ORF AC2 codifica a proteína TraAP (*Transcriptional Activator Protein*) ativadora da transcrição dos genes no sentido viral CP (AV1 do DNA-A) e NSP (BV1 do DNA-B), além de atuar como supressora de silenciamento gênico (Zerbini; Carvalho; Maciel-Zambolin, 2002; Vanitharani et al., 2004; wang et al., 2005; Raja et al., 2008). A ORF AC3 codifica a proteína REn (*Replication Enhancer*) que, apesar de não ser essencial para a replicação do vírus, é intensificadora da replicação (Settlage et al., 1996; Saxena; Tiwari, 2017). A ORF AC4 codifica uma proteína relacionada a supressão do sistema de defesa da planta (Vanitharani et al., 2004). A ORF AC5 não é encontrada em todas as espécies de begomovírus e aparentemente codifica uma proteína que não tem papel essencial no ciclo da infecção viral (Kheyr-Pour et al., 2000; Fontenelle et al., 2007).

Entretanto, o trabalho realizado por Melgarejo et al. (2013) mostrou que sua ausência em mutantes induziu a sintomas menos agressivos e Li et al. (2015) descreveram 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.

O componente genômico DNA-B possui duas ORFs, uma no sentido viral (BV1) e outra no sentido complementar (BC1). A ORF BV1 codifica a proteína NSP (*Nuclear Shuttle Protein*), responsável pelo transporte do DNA núcleo-citoplasma através do envelope nuclear (Mcgarry et al., 2003). Já a ORF BC1 codifica a proteína MP (*Movement Protein*) que é responsável pelo movimento célula-à-célula através do mecanismo de aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (Noueiry et al., 1994; Sanderfoot; Lazarowitz, 1996; Zorzatto et al., 2015). Os dois componentes compartilham uma região intergênica com aproximadamente 200 nt chamada de região comum (CR), apresentando alta identidade nucleotídica e onde está localizada a origem de replicação (Briddon et al., 2010) (Figura 1).

Os begomovírus bipartidos do VM apresentam organização genômica similar aos do NM, porém aqueles geralmente possuem uma ORF adicional no sentido viral (AV2) que codifica a PCP (*Pre-coat protein*), a qual está relacionada ao movimento sistêmico mais eficiente do vírus na planta e também atua inibindo silenciamento gênico. Adicionalmente, a ORF V2 também está presente nos begomovírus monopartidos do VM (Padidam; Beachy; Fauquet, 1996; Chowda-Reddy et al., 2008; Zhang et al., 2012; Melgarejo et al., 2013) (Figura 1).

Figura 1. Organização genômica dos begomovírus. Região comum (CR); nsp (BV1): proteína de movimento nuclear; cp (V1/AV1): proteína capsidial; mp (V2/BC2): proteína de movimento; rep (C1): proteína associada a replicação; ren (C3/AC3): proteína potencializadora de replicação; trap (C2/AC2): proteína de transcrição/supressor de silenciamento gênico.



Fonte: VARSANI et al., 2017.

A rápida expansão dos begomovírus está relacionada à crescente prevalência de moscas-brancas (*Bemisia tabaci*; Hemiptera: Aleyrodidae) em todo o mundo (Wei et al., 2017). *Bemisia tabaci* forma um complexo de espécies crípticas composto por pelo menos 40 espécies, classificadas por meio de comparações de sequências do gene mitocondrial *citocromo oxidase I (mtCOI)*. Duas espécies possuem grande importância econômica como pragas agrícolas: *B. tabaci* Mediterranean (MED) e *B. tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), encontradas em várias regiões do planeta (Yskočilová et al., 2018). O fato de as moscas-brancas serem insetos sugadores favorece o processo de transmissão dos vírus, já que as partículas virais se encontram mais concentradas no floema das plantas infectadas e ao se alimentarem, introduzindo o estilete e sugando a seiva, as moscas-brancas adquirem as partículas (Hogenhout et al., 2008).

A transmissão se dá de forma persistente circulativa, ou seja, após a aquisição, as partículas virais circulam por todo corpo do inseto, passando do intestino para hemolinfa onde são transportadas, com o auxílio da proteína GroEL (sintetizada por endossimbiontes localizados no intestino das moscas-brancas), até a glândula salivar. Quando o inseto vai se alimentar em uma planta sadia acaba transmitindo o vírus, sendo o intestino médio uma das principais barreiras para a transmissão (Jia et al., 2018). É nesta região do corpo do inseto que ficam abrigadas a bactéria endossimbionte primária *Portiera aleyrodidarum* e uma variedade de endossimbiontes secundários (facultativos) como *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Fritschea*, *Hamiltonella*, *Rickettsia* e *Wolbachia* (Chiel et al., 2007). Por serem insetos polípagos (alimentam-se de uma ampla variedade de plantas), as moscas-brancas são excelentes vetores para transmissão desses vírus (Chen et al., 2016).

Vários sintomas estão relacionados às infecções causadas por begomovírus, como deformação foliar, nanismo, amarelecimento nerval ou internerval, uma combinação de mosaico/mosqueado de verde-claro a amarelo-dourado e pontos amarelos nas folhas (Inoue-Nagata; Lima; Gilbertson, 2016). Estes sintomas podem variar de acordo com diversos fatores, dependendo principalmente da espécie viral, da planta hospedeira e da fase da cultura em que a infecção se estabeleceu (Picó; Diaz; Nuez, 1996).

2.3 Variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus

Vírus possuem alto potencial para a ocorrência de variações genéticas por apresentarem grandes populações, altas taxas de replicação e um período de geração curto (Domingo; Holland, 1997; Roossinck, 1997; García-Arenal; Fraile; Malpica, 2001). Essa

variação é um ponto importante para a sobrevivência dos vírus, pois auxilia na adaptação a novas condições ambientais e a novos hospedeiros (Roossinck, 1997). Fatores como mutação, recombinação e pseudorecombinação são mecanismos comumente associados com a geração e amplificação da variabilidade genética em begomovírus (Padidam et al., 1999; SeaL et al., 2006; Lefeuvre et al., 2009).

A definição da estrutura genética é o primeiro passo no estudo de populações virais, pois reflete a história evolutiva e o potencial da população para evoluir (Pinel et al., 2003; Moreno et al., 2004; Font et al., 2007). Essa estrutura se refere à quantidade e distribuição da variabilidade genética dentro e entre subpopulações (García-Arenal; Fraile; Malpica, 2001). Vários fatores ecológicos/ambientais podem contribuir para o surgimento de variantes virais como a eficiência da transmissão pelo vetor, o tipo do hospedeiro e aspectos do agroecossistema (Rojas; Gilbertson, 2008).

A estrutura genética de uma população de vírus depende ainda de duas importantes forças evolutivas, a deriva genética e seleção, com esses dois processos podendo levar à redução de diversidade (Escriu, 2017; Dolan et al., 2018). Deriva genética é a alteração ao acaso na frequência de vírus variantes dentro da população viral, ocorrendo independente da seleção, que geralmente leva à diminuição da variabilidade genética devido a eventos de gargalos genéticos e efeito fundador (Roossinck, 2008; Escriu, 2017; Dolan et al., 2018). Esse processo pode causar significativa alteração na frequência relativa de mutações na população, podendo acarretar em eliminação de mutações benéficas devido a sua natureza estocástica (Mccrone; Luring, 2018). Portanto, um dos efeitos seria a diminuição da adaptabilidade da população a novas pressões de seleção como alterações ambientais ou na planta hospedeira (Ali; Roossinck, 2008). A ausência de recombinação e sucessivos gargalos genéticos podem também gerar o acúmulo de mutações deletérias, fenômeno conhecido como "catraca de Muller" (MulleR, 1964), levando à diminuição gradual da adaptabilidade das populações e consequente "colapso mutacional" (Ali; Roossinck, 2008). Finalmente, gargalos genéticos podem gerar efeito fundador durante o estabelecimento de novas população através de uma pequena porção de variantes presentes na população original (Novella et al., 1995; Wang et al., 2006). Logo, a deriva genética pode levar tanto a extinção de uma população como a fixação de variantes dentro dela (Fraile et al., 1997).

A seleção é uma força evolucionária determinística que age sobre populações beneficiando os indivíduos mais adaptados ao ambiente. Ela pode ser positiva (diversificadora), quando as variantes com maior adaptabilidade aumentam suas

frequências na população, ou negativa (purificadora), onde as variantes com menor adaptabilidade teriam suas frequências diminuídas (Ali; Roossinck, 2008). O ambiente e espécies de plantas hospedeiras são considerados importantes fontes de seleção. Por exemplo, mudanças nas condições ambientais podem oferecer diferentes oportunidades de adaptação (Dolan et al., 2018). É importante salientar que a seleção natural atua na diversidade fenotípica de genomas mutantes em uma população, portanto, a unidade de seleção é o indivíduo (Dolan et al., 2018). No caso do hospedeiro, diversos estudos têm demonstrado a ocorrência de diferenciação de populações virais em relação a diferentes hospedeiros. Além disso, a interação do vírus com o vetor durante o processo de transmissão pode levar a ambos os efeitos ocasionados pela deriva genética e seleção natural (Moreno-Delafuente et al., 2013; Luan et al., 2014). Já foi observado que insetos virulíferos podem manifestar mudanças significativas em relação a fecundidade, tempo de vida, comportamento alimentar e ativação dos mecanismos de defesa das plantas contra insetos, com os vírus podendo se beneficiar dessas mudanças para ampliar sua capacidade de disseminação (Moreno-Delafuente et al., 2013; Luan et al., 2014).

2.3.1 Mutação

Variabilidade genética em geminivírus é primariamente gerada por mutações (Lima et al., 2017) e elas são o resultado da incorporação de nucleotídeos, que não estavam presentes na fita molde, na nova fita durante o processo de replicação (Smith, 1989; Acosta-Leal et al., 2011). Apesar de serem vírus de DNA que utilizam a maquinaria do hospedeiro para replicar, begomovírus possuem uma alta frequência de mutação, sendo equivalentes às dos vírus de RNA. Ou seja, mesmo usando a DNA polimerase do hospedeiro que apresenta mecanismos de correção de erros durante a replicação, a ocorrência de mutações é alta (Duffy; Holmes, 2008; 2009). Uma das possíveis explicações para este fenômeno seria a baixa eficiência dos mecanismos de correção durante a replicação por círculo rolante e/ou na replicação de DNA de fita simples (Van Der Walt et al., 2008). Experimentos realizados com o *squash leaf curl China virus* (SLCCNV) mostraram que mutações na proteína capsidial não alteraram a capacidade do vírus de infectar as plantas hospedeiras, porém os tornaram mais competitivo na transmissão por algumas espécies de moscas-brancas (Pan et al., 2020).

2.3.2 Recombinação

A recombinação é outro mecanismo que apresenta relevante contribuição para a variabilidade genética em populações de begomovírus (Martin et al., 2011; Lima et al., 2013). Esta é caracterizada pela troca de partes da fita de DNA ou RNA entre diferentes indivíduos durante a replicação numa mesma célula hospedeira (Padidam et al., 1999), o que constitui uma importante vantagem evolutiva para os vírus já que estes eventos podem originar vírus mais adaptáveis às diferentes condições ambientais e também evitam o acúmulo de mutações deletérias no genoma viral (Pagán; García-Arenal, 2018). Os frequentes eventos de recombinação que ocorrem nos geminivírus podem ser explicados com base em dois mecanismos de replicação do genoma, a replicação por círculo rolante e a replicação dependente de recombinação, que recicla moléculas de DNA incompletas para produzir genomas completos (García-Arenal; Zerbini, 2019). Neste caso, as moléculas incompletas podem servir como “doadoras” de fragmentos de DNA que serão incorporados a outras moléculas de DNA viral durante o processo de replicação. Compreender os eventos de recombinação que estão ocorrendo em uma população viral é muito importante para ajudar a identificar quais genes estão sendo permutados e avaliar a probabilidade do surgimento de variantes recombinantes mais adaptados a genótipos de plantas resistentes, portanto, auxiliando no manejo das fitoviroses no campo (Monci et al., 2002; Awadalla, 2003; Sattar et al., 2013).

Em 2021, Crespo-Bellido et al. demonstraram que seis das 11 espécies de begomovírus que causam a doença do mosaico da mandioca (*cassava mosaic disease* - CMD) descendem de eventos únicos de recombinação interespecíficas. Por exemplo, acredita-se que *East African cassava mosaic Zanzibar virus* (EACMZV) seja um recombinante entre *East African cassava mosaic Kenya virus* (EACMKV) e *South African cassava mosaic virus* (SACMV), enquanto o EACMKV provavelmente se originou através de um evento de recombinação envolvendo o *East African cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV), que por sua vez é um recombinante entre o *East African cassava mosaic virus* (EACMV) e um vírus ainda desconhecido. Outros trabalhos mostraram que eventos de recombinação têm efeito direto na emergência de begomovírus em plantas cultivadas como as epidemias causadas pelo complexo TYLCV no Mediterrâneo, com o surgimento dos recombinantes *tomato yellow leaf curl Malaga virus* (TYLCMalV) e *tomato yellow leaf curl Axarquía virus* (TYLCAxV) em tomateiro na Espanha (Monci et al., 2002; García-Andrés et al., 2006; García-Andrés et al., 2007a; García-Andrés et al., 2007b), e as epidemias de enrolamento das folhas do algodoeiro

(*cotton leaf curl disease*) no Paquistão causadas por um complexo de begomovírus com vários recombinantes (Zhou et al., 1998; Idris; Brown, 2002).

2.3.3 Pseudorecombinação

A existência de begomovírus bipartidos permite o surgimento de um outro mecanismo de variabilidade genética chamado de pseudorecombinação, onde ocorre a troca de componentes genômicos inteiros (DNA-A e DNA-B). O surgimento de pseudorecombinantes viáveis é mais comum entre estirpes de uma mesma espécie de begomovírus (Faria et al., 1994; Pita et al., 2001), mas já foram observados entre espécies distintas (Gilbertson et al., 1993; Andrade et al., 2006). Vários estudos já relataram que geminivírus com regiões comuns suficientemente similares podem formar pseudorecombinantes infecciosos, porém destacam que os pseudorecombinantes recíprocos frequentemente apresentam diferenças na eficiência de replicação e infecção sistêmica (Faria et al., 1994). O principal determinante para a formação de pseudorecombinantes viáveis entre diferentes espécies/estirpes está ligado a especificidade da ligação da proteína Rep aos iterons (Argüello-Astorga et al., 1994; Eagle et al., 1994; Fontes et al., 1994; Chatterji et al., 1999; Andrade et al., 2006; Bull et al., 2007). Outro fator importante é a conservação da sequência de aminoácidos da proteína Rep, principalmente dos três aminoácidos do IRD (*iteron-related domain*) que estão diretamente envolvidos na ligação aos iterons (Arguello-Astorga; Ruiz-Medrano et al., 2001). Apesar disso, a formação de pseudorecombinantes não depende apenas de relações filogenéticas e da conservação de iterons, pois pseudorecombinantes infecciosos foram relatados entre DNA-A de *tomato golden mosaic virus* (TGMV) e DNA-B de *tomato yellow spot virus* (ToYSV) que são vírus que apresentam iterons distintos (Andrade et al., 2006). Em 2021, Chen et al. confirmaram a ocorrência de pseudorecombinantes naturais e artificiais de DNA-A do *tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) com o DNA-B do SLCCNV em cucurbitáceas na Malásia e no Sudeste Asiático, demonstrando que os pseudorecombinantes influenciaram tanto no agravamento dos sintomas, como na ampliação da gama de hospedeiros.

2.4 Diversidade de *Begomovirus* infectando leguminosas

Leguminosas são plantas pertencentes a família *Fabaceae*, a qual inclui 795 gêneros e quase 20.000 espécies, estando entre as três maiores famílias de plantas (Lewis et al. 2005; LPWG 2017). É a família com maior diversidade e número de espécies na

flora brasileira, com um total 222 gêneros dos quais se destacam espécies cultivadas (*Phaseolus* e *Glycine*) e ornamentais (*Delonix*, *Adenanthera* e *Tipuana*) (Lima et al., 2015).

Os begomovírus têm emergido como um dos principais fitopatógenos, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, gerando perdas econômicas significativas (Morales, 2010). No Brasil, uma das culturas mais severamente afetadas são os feijoeiros (*Phaseolus* spp.) (Faria; Maxwell, 1999). Embora existam relatos de infecção por begomovírus em outras culturas importantes como a soja (*Glycine max*) (Mello; Almeida; Zerbeni, 2000; Mello et al., 2002), estas ocorrem esporadicamente nos campos de cultivo e não são considerados fatores limitantes à produção.

Begomovírus que infectam feijoeiros são distribuídos através das Américas, constituindo um fator limitante para a produtividade dessa cultura. Pelo menos quatro begomovírus já foram descritos infectando feijoeiros nesta região: *bean calico mosaic virus* (BcaMV), *bean dwarf mosaic virus* (BDMV), *bean golden mosaic virus* (BGMV) e *bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) (Fauquet et al., 2008). O mosaico dourado do feijoeiro foi a primeira doença identificada sendo causada por um begomovírus (Costa, 1965). O vírus foi nomeado de BGMV e, na década de 70, a doença atingiu níveis importantes de perdas econômicas devido à forte expansão de lavouras de soja e populações do inseto vetor (Inoue-Nagata; Lima; Gilbertson, 2016). Durante muito tempo, o BGMV foi considerado como o único begomovírus de importância econômica em feijoeiros no Brasil, levando ao desenvolvimento e aprovação do feijão-comum transgênico Embrapa 5.1 resistente a este vírus (Aragão et al., 2013). Contudo, estudos indicaram a emergência do MacYSV como um dos principais begomovírus presente em plantios no Nordeste do país, apontando que BGMV não é mais o único begomovírus de relevância econômica para os feijoeiros (Ramos-Sobrinho et al., 2014).

Vários estudos mostram a importância dos begomovírus como fitopatógenos de plantas cultivadas dada a ampla gama de hospedeiras e as grandes perdas econômicas que podem induzir. Entretanto, muitas espécies de plantas não-cultivadas têm sido descritas como hospedeiras de begomovírus no Brasil e no mundo (Castillo-Urquiza et al., 2008; Silva et al., 2012; Lima et al., 2013; Rocha et al., 2013; Ramos-Sobrinho et al., 2014), com alguns desses vírus sendo capazes de infectar plantas cultivadas (Idris et al., 1999; Fernandes et al., 2009; Fernandes et al., 2011; Barbosa et al., 2012; Barreto et al., 2013; Lima et al., 2013; Rocha et al., 2013; Ramos-Sobrinho et al., 2014), mostrando a importância dessas plantas como reservatórios e fontes de inóculo desses patógenos

(Pinto et al., 2016). As espécies comumente relatadas como hospedeiras pertencem às famílias *Malvaceae*, *Euphorbiaceae* e *Fabaceae* (Morales; Anderson, 2001).

Plantas não-cultivadas da família *Fabaceae* têm sido relatadas como hospedeiras naturais de begomovírus há bastante tempo. O gênero *Macroptilium* é constituído por cerca de 12 espécies encontradas nas Américas (Snak; Ribeiro; Delgado-Salinas, 2020). Algumas espécies do gênero possuem utilidade como forrageiras, adubo verde e na medicina popular (Barbosa-Fevereiro, 1986). Diferentes begomovírus já foram relatados a partir de plantas deste gênero nas Américas, como *Macroptilium bright mosaic virus* (MacBMV), *Macroptilium golden mosaic virus* (MacGMV), *Macroptilium mosaic Puerto Rico virus* (MacMPRV), *Macroptilium yellow mosaic Florida virus* (MacYMFV), *Macroptilium yellow mosaic virus* (MacYMV), MacCMV, MacYSV, MacYVV e ToICV (Amarakoon et al., 2008; Idris et al., 2003; Silva et al., 2012; Lima et al., 2013; Ramos-Sobrinho et al., 2014; Passos et al., 2017).

O MacYSV já foi descrito em outras hospedeiras leguminosas não-cultivadas como *Calopogonium mucunoides*, *Canavalia* sp. e *Desmodium glabrum* (Silva et al., 2012; Fontenele et al., 2016). É também conhecido que plantas do gênero *Macroptilium* podem servir como hospedeiro alternativo para BGMV e BGYMV (Bracero; Rivera; Beaver, 2003; Ramos-Sobrinho et al., 2014).

Os begomovírus MacYVV e MacYNV foram descritos em *Macroptilium* sp. exibindo sintomas de mosaico e clorose internerval no estado de Alagoas (Silva et al., 2012; Ramos-Sobrinho et al., 2014). Entretanto, os isolados de MacYNV foram reclassificados como pertencentes ao *tomato interveinal chlorosis virus* (ToICV), begomovírus primeiramente descrito em plantas de tomate no estado de Pernambuco (Albuquerque et al., 2012). Infelizmente, poucos são os trabalhos que abordam a importância desses vírus infectando hospedeiras leguminosas e a variabilidade e estrutura genética de suas populações.

Outro gênero pertencente à família *Fabaceae* é o *Rhynchosia*, que possui cerca de 230 espécies, das quais 55 são endêmicas de áreas tropicais e subtropicais. No Brasil, foram descritas 22 espécies (Perez et al. 2020) e algumas são utilizadas como medicinais ou na alimentação humana e animal (Allem; Valls 1987; Burkart 1987; Lewis et al. 2005). Algumas espécies de *Rhynchosia* já foram descritas associadas a begomovírus ao redor do mundo, como *Rhynchosia golden mosaic Havana virus* (RhGMHaV) e *Rhynchosia rugose golden mosaic virus* (RhRGMV) em Cuba, *Rhynchosia golden mosaic Sinaloa virus* (RhGMSV) no México, *Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus* (RhGMYuV) na

Jamaica e no México, *Rhynchosia mild mosaic virus* (RhMMV) em Porto Rico, *Rhynchosia yellow mosaic virus* (RhYMV) no Paquistão, *Rhynchosia yellow mosaic India virus* (RhYMIV) na Índia, *cabbage leaf curl virus* (CabLCV) no Equador, *mungbean yellow mosaic virus* (MYMV) no Paquistão e *pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) nos Estados Unidos (Fiallo-Olive et al., 2010; Hernandez-Zepeda et al., 2010; Ilyas et al., 2009; Jyothsna; Rawat; Malathi, 2011; Hou et al., 1996; Ilyas et al., 2010; Fiallo-Olivé et al., 2018). Entretanto, nenhum begomovírus foi relatado infectando plantas de *Rhynchosia* spp. no Brasil.

REFERÊNCIAS

- Acosta-Leal, R., Duffy, S., Xiong, Z., Hammond, R.W., Elena, S.F. Advances in plant virus evolution: Translating evolutionary insights into better disease management. **Phytopathology**, 101, 1136-1148, 2011.
- Albuquerque, L.C., Varsani, A., Fernandes, F.R.; Pinheiro, B.; Martin, D.P.; Ferreira, P. de T. O.; Lemos, T. O.; Inoue-Nagata, A. K. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, 157, 747–752, 2012.
- Ali, A.; Roossinck, M.J. Genetic bottlenecks. In: ROOSSINCK, M.J. (Ed.). **Plant Virus Evolution**: Springer, p. 123-131, 2008.
- Allem, A. C.; Valls, J. F. M. Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-Grossense. Brasília: **Embrapa/Cenargem**. 339p, 1987.
- Amarakoon, I.I.; Roye, M.E.; Briddon, R.W.; Bedford, I.D.; Stanley, J. Molecular and biological characterization of *Macrotidium yellow mosaic virus* from Jamaica. **Plant Pathology**, v. 57, p. 417-426, 2008.
- Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B., Carvalho, M.G., Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 372-377, 2002.
- Andrade, E.C.; Manhani, G.G.; Alfenas, P.F.; Calegario, R.F.; Fontes, E.P.B.; Zerbini, F.M. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 3687-3696, 2006a.
- Aragão, F. J. L.; Nogueira, E. O. P. L.; Tinoco, M. L. P.; Faria, J. C. Molecular characterization of the first comercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus. **Journal of Biotechnology**, v. 166, p. 42-50, 2013.
- Arguello, G.R; Astorga, G.R; Guevara-González, R.G.; HerrerA-Estrella, L.R.; Rivera-Bustamante, R.F. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of interactive elements: a model for replication. **Virology**, v. 203, p. 90-100, 1994.
- 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, p. 1465–85, 2001.
- Awadalla, P. The evolutionary genomics of pathogen recombination. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, p. 50-60, 2003.
- Barbosa, J.C. et al. First report of *Tomato yellow spot virus* infecting *Leonurus sibiricus* in Brazil. **Plant Disease**, v. 97, p. 289-289, 2012.
- Barbosa, L.F. et al. Indigenous American species of the *Bemisia tabaci* complex are still widespread in the Americas. **Pest Management Science**, Sussex, Inglaterra, 70: 1440–1445, 2014.
- Barbosa-Feverieiro, V.P. *Macrotidium* (Bentham) Urban do Brasil (Leguminosae Faboideae – Phaseoleae – Phaseolineae). **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 28, 1986.

- 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. 436-44, 2013.
- Bracero, V., Rivera, L.I., Beaver, J.S. DNA analysis confirms *Macrotidium lathyroides* as alternative host of *Bean golden yellow mosaic virus*. **Plant Disease**, v. 87, p. 1022-1025, 2003.
- Briddon, R. W.; Patil, B. L.; Bagewadi, B.; Nawaz-Ul-Rehman, M. S.; Fauquet, C. M. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, p. 97, 2010.
- Brown, J. K.; Fauquet, C. M.; Briddon, R. W.; Zerbini, F. M.; Moriones, E.; Navas-Castillo, J. Family Geminiviridae. In: KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. (Ed.). Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London, UK: **Elsevier Academic Press**, p. 351-373, 2012.
- Brown, J. K.; Zerbini, F. M.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E.; Ramos-Sobrinho, R.; Silva, J. C.; Fiallo-Olive, E.; Briddon, R. W.; Hernandez-Zepeda, C.; Idris, A.; Malathi, V. G.; Martin, D. P.; Rivera-Bustamante, R.; Ueda, S.; Varsani, A. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. **Archives of Virology**, v. 160, p. 1593-619, 2015.
- Buerstmayr, M.; Buerstmayr, H. Two major quantitative trait loci control wheat dwarf virus resistance in four related winter wheat populations. **Theoretical and Applied Genetics**, 2023.
- Bull, S. E.; Briddon, R. W.; Sserubombwe, W. S.; Ngugi, K.; Markham, P. G.; Stanley, J. Infectivity, pseudorecombination and mutagenesis of Kenyan cassava mosaic begomoviruses. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1624-33, 2007.
- Burkart, A. Flora ilustrada de Entre Rios (Argentina). Tomo Vol. 6. Buenos Aires: **Coleccion Cientifica del INTA**, p. 442-738, 1987.
- Castillo-Urquiza, G.P. et al. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, v. 153, p. 1985-1989, 2008.
- Chatterji, A.; Padidam, M.; Beachy, R.N.; Fauquet, C. M. Identification of replication specificity determinants in two strains of *Tomato leaf curl virus* from New Delhi. **Journal of Virology**, v. 73, p. 5481-9, 1999.
- 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, p. 110, 2006.
- Chen, Y. J. et al. Genetic Diversity, Pathogenicity and Pseudorecombination of Cucurbit-Infecting Begomoviruses in Malaysia. **Plants-Basel**, 2021.
- Chiel, E.; Gottlieb, Y.; Zchori-Fein, E.; Mozes-Daube, N.; Katzir, N.; Inbar, M.; Ghanim, M. Biotype-dependent secondary symbiont communities in sympatric populations of *Bemisia tabaci*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 97, p. 407-13, 2007.
- 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.

Costa, A. S. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. **Plant Protection Bulletin F.A.O.**, v. 13, p. 2-12, 1965.

Costa, A. S.; Bennett, C. W. Whitefly transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. **Phytopathology**, v. 40, p. 266-283, 1950.

Crespo-Bellido A., Hoyer J. S., Dubey D., Jeannot R. B., Duffy S. Interspecies recombination has driven the macroevolution of cassava mosaic begomoviruses. **Journal of Virology**, ;95(17), 2021.

Dolan, P. T., Whitfield, Z. J., Andino, R. Mechanisms and concepts in RNA virus population dynamics and evolution. **Annual review of virology**, v. 5, p. 69-92, 2018.

Domingo, E. J. J. H.; Holland, J. J. RNA virus mutations and fitness for survival. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 151-178, 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.

Duffy, S.; Holmes, E. C. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 6, p. 1539-1547, 2009.

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.

Escriu, F. Diversity of Plant Virus Populations: A Valuable Tool for Epidemiological Studies. In: BITZ, L. (Org.). **Genetic Diversity. IntechOpen**, 2017. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/genetic-diversity/diversity-of-plant-virus-populations-a-valuable-tool-for-epidemiological-studies>.

Faria, J. C., Bezerra, I. C., Zerbini, F. M., Ribeiro, S. G., Lima, M. F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 125-137, 2000.

Faria, J. C.; Gilbertson, R. L., Hanson, S. F., Morales, F. J.; Ahlquist, P. G.; Loniello, A. O., Maxwell, D. P. Bean golden mosaic geminivirus Type II isolates from Dominican Republic and the Guatemala: Nucleotide sequences, infectious pseudorecombinants, and phylogenetic relationships. **Phytopathology**, v. 84, p. 321-329, 1994.

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

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

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

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, F. R. et al. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. **Archives of virology**, v. 154, n. 9, p. 1567-1570, 2009.

Fiallo-Olive, E., Chirinos, D., Castro, R., Navas-Castillo, J. First report of Cabbage leaf curl virus infecting common bean, cowpea, pigeon pea and *Mucuna pruriens* in Ecuador. **Plant Disease**, Vol. 102, 2018.

Fiallo-Olive, E., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Martinez-Zubiaur, Y. Two novel begomoviruses belonging to different lineages infecting *Rhynchosia minima*. **Archives of Virology**, 155 (12), 2053-2058, 2010.

Fiallo-Olivé, E.; Tovar, R.; Navas-Castillo, J. Deciphering the biology of deltasatellites from the New World: maintenance by New World begomoviruses and whitefly transmission. **New Phytologist**, v. 212, n. 3, p. 680-692, 2016.

Fiallo-Olivé, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae 2021. **Journal of General Virology**, v. 102, 2021.

Fondong, V. N.; Pita, J. S.; Rey, M. E. C.; Kochko, A.; Beachy, R. N.; Fauquet, C. M. Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. **Journal of General Virology**, v.81, p.287-297. 2000.

Font, M. I.; Rubio, L.; Martinez-CulebraS, P. V.; Jorda, C. Genetic structure and evolution of natural populations of viruses causing the tomato yellow leaf curl disease in Spain. **Virus Research**, Amsterdam, v. 128, p. 43-51, 2007.

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

Fontenele, R. S., Salywon, A. M., Majure, L. C., Cobb, I. N., Bhaskara, A., Avalos-Calleros, J. A., Argüello-Astorga, G. R., Schmidlin, K., Khalifeh, A., Smith, K. A novel divergent geminivirus identified in asymptomatic new world cactaceae plants. **Viruses**, v. 12, p. 398, 2020.

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

Fontes, E. P. B.; Eagle, P. A.; Sipe, P. S.; Luckow, V. A.; Hanley-Bowdoin, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 8459-8465, 1994.

Fraile, A., Alonso-Prados, J. L., Aranda, M. A., Bernal, J. J., Malpica, J. M., GARCIA-Arenal, F. Genetic exchange by recombination or reassortment is infrequent in natural populations of a tripartite RNA plant virus. **Journal of Virology**, v. 71, p. 934-940, 1997.

García-Andrés, S. et al. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. **Virology**, v. 350, n. 2, p. 433-42, 2006.

García-Andrés, S. et al. Founder effect, plant host, and recombination shape the emergent population of begomoviruses that cause the tomato yellow leaf curl disease in the Mediterranean basin. **Virology**, v. 359, n. 2, p. 302-12, 2007b.

García-Andrés, S. et al. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. **Virology**, v. 365, n. 1, p. 210-9, 2007a.

- Garcia-Arenal, F.; Fraile, A.; Malpica, J. M. Variability And Genetic Structure of Plant Virus Populations. **Annual Review Phytopathology**, v. 39, p. 157–186, 2001.
- García-Arenal, F.; Zerbini, F. M. Life on the edge: geminiviruses at the interface between crops and wild plant hosts. **Annual Review of Virology**, v. 6, 2019.
- Gilbertson, R. L. et al. Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 23-31, 1993.
- Ha, C. et al. Molecular characterization of begomoviruses and DNA satellites from Vietnam: Additional evidence that the New World geminiviruses were present in the Old World prior to continental separation. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 312-326, 2008.
- 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.; Settlage, S. B.; Orozco, B. M.; Nagar, S.; Robertson, D. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 105-140, 2000.
- Hernandez-Zepeda, C., Moreno-Valenzuela, O. A., Brown, J. K., Rivera-Bustamante, R. F. Characterization of Rhynchosia yellow mosaic Yucatan virus, a new recombinant begomovirus associated with two fabaceous weeds in Yucatan, Mexico. **Archives of Virology**, 2010.
- Hogenhout, S. A. et al. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 327-359, 2008.
- Hou, Y.-M., Garrido-Ramirez, E. R., Stingley, S., Guzman, P., Gilbertson, R. L. Characterization of the infectious clones of the Sinaloa strain of pepper huasteco geminivirus. **Plant Pathology**, 86, S43-S43, 1996.
- Idris, A. M.; Bird, J.; Brown, J. K. First report of a bean-infecting begomovirus from *Macroptilium lathyroides* in Puerto Rico that is distinct from bean golden mosaic virus. **Plant Disease**, v. 83, n. 11, p. 1071-1071, 1999.
- Idris, A. M. et al. Two newly described begomoviruses of *Macroptilium lathyroides* and common bean. **Phytopathology**, v. 93, n. 7, p. 774-783, 2003.
- Idris, A. M.; Brown, J. K. Molecular analysis of *Cotton leaf curl virus-Sudan* reveals an evolutionary history of recombination. **Virus Genes**, v. 24, p. 249-256, 2002.
- Idris, A. M.; Hiebert, E.; Bird, J.; Brown, J. K. Two newly described begomoviruses of *Macroptilium lathyroides* and common bean. **Phytopathology**, v. 93, p. 774-783, 2003.
- Ilyas, M., Qazi, J., Mansoor, S., Briddon, R. W. Genetic diversity and phylogeography of begomoviruses infecting legumes in Pakistan. **Gen. Virol.** 91 (PT 8), 2091-2101, 2010.
- Ilyas, M., Qazi, J., Mansoor, S., Briddon, R. W. Molecular characterisation and infectivity of a 'Legumovirus' (genus *Begomovirus*: family *Geminiviridae*) infecting the leguminous weed *Rhynchosia minima* in Pakistan. **Virus Res.** 145 (2), 279-284, 2009.
- Inoue-Nagata, A.K.; Lima, M. F.; Gilbertson, R. L. A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. **Horticultura Brasileira**, v. 34, p. 8-18, 2016.

- Jia, D.; Chen, Q.; Mao, Q.; Zhang, X.; Wu, W.; Chen, H.; Yu, X.; Wang, Z.; Wei, T. Vector mediated transmission of persistently transmitted plant viruses. **Current Opinion in Virology**, v. 28, p. 127-132, 2018.
- Jyothisna, P., Rawat, R., Malathi, V.G. Molecular characterization of a new begomovirus infecting a leguminous weed *Rhynchosia minima* in India. **Virus Genes**, 42 (3), 407-414, 2011.
- Kheyr-Pour, A. et al. *Watermelon chlorotic stunt virus* from the Sudan and Iran: sequence comparisons and identification of a whitefly-transmission determinant. **Phytopathology**, v. 90, n. 6, p. 629-635, 2000.
- Koonin, E.V.; Ilyina, T.V. Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 2763-2766, 1992.
- Lazarowitz, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 11, p. 327-349, 1992.
- Lefeuve, P. et al. Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. **Journal of Virology**, v. 83, n. 6, p. 2697-2707, 2009.
- Legg, J. P.; Fauquet, C. M. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. **Plant Molecular Biology**, v. 56, n. 4, p. 585-599, 2004.
- Lewis, G.P.; Schrire, B.D.; Mackinder, B.A.; Lock, J.M. Legumes of the World. **Royal Botanic Gardens**, Kew, 577p., 2005.
- Li, F. et al. The AC5 protein encoded by *Mungbean yellow mosaic India virus* is a pathogenicity determinant that suppresses RNA silencing-based antiviral defenses. **New Phytologist**, v. 208, n. 2, p. 555-569, 2015.
- Lima, A.T.M. et al. Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 418-431, 2013.
- Lima, A.T.M. et al. The diversification of begomovirus populations is predominantly driven by mutational dynamics. **Virus Evolution**, v. 3, p. vex005, 2017.
- Lima, H. C. et al. *Fabaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 26 jan. 2024.
- Lozano, G. et al. Characterization of non-coding DNA satellites associated with sweepoviruses (genus *Begomovirus*, *Geminiviridae*) - definition of a distinct class of begomovirus-associated satellites. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 162, 2016.
- LPWG (The Legume Phylogeny Working Group). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, 66: 44-77, 2017.
- Luan, J.-B. et al. Plant-mediated whitefly–begomovirus interactions: research progress and future prospects. **Bulletin of Entomological Research**, v. 104, p. 267-276, 2014.

- Mar, T.B. et al. Interaction between the New World begomovirus *Euphorbia yellow mosaic virus* and its associated alphasatellite: effects on infection and transmission by the whitefly *Bemisia tabaci*. **Journal of General Virology**, v. 98, p. 1552-1562, 2017a.
- Martin, D. P. et al. Complex recombination patterns arising during geminivirus coinfections preserve and demarcate biologically important intra-genome interaction networks. **PLoS Pathogens**, v. 7, e1002203, 2011.
- Mccrone, J.T.; Luring, A.S. Genetic bottlenecks in intraspecies virus transmission. **Current Opinion in Virology**, v. 28, p. 20-25, 2018.
- Mcgarra, R.C. et al. A novel Arabidopsis acetyltransferase interacts with the geminivirus movement protein NSP. **Plant Cell**, v. 15, p. 1605-18, 2003.
- 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, p. 5397-5413, 2013.
- Mello, R.N.; Almeida, A.M.R.; Zerbini, F.M. Detection and identification of geminiviruses infecting soybean and associated weeds in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 444, 2000.
- Mello, R.N.; Cotrim, M.A.A.; Lopes, E.F.; Moreira, A.G.; Contin, F.S.; Fontes, E.P.B.; Almeida, A.M.R.; Zerbini, F.M. Survey of begomoviruses associated with soybean and identification of *Sida mottle virus* (SiMoV) infecting this crop in Brazil. **Virus Reviews and Research**, Belo Horizonte, v. 7(Supplement), p. 157, 2002.
- 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, p. 317-26, 2002.
- Morales, F.J. Distribution and dissemination of begomoviruses in Latin America and the Caribbean. In: *Bemisia bionomics and management of global pest*; **Stansly PA & Naranjo SE** (eds), pp: 283-318, 2010.
- Morales, F.J.; Anderson, P.K. The emergence and dissemination of whitefly transmitted geminiviruses in Latin America. **Archives of Virology**, New York, v. 146, n. 3, p. 415-441, 2001.
- Moreno, I.M. et al. Variability and genetic structure of the population of *Watermelon mosaic virus* infecting melon in Spain. **Virology**, New York, v. 318, p. 451-460, 2004.
- Moreno-Delafuente, A. et al. A plant virus manipulates the behavior of its whitefly vector to enhance its transmission efficiency and spread. **PLoS ONE**, v. 8, p. e61543, 2013.
- Moriones, E.; Navas-Castillo, J. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. **Virus Research**, v. 71, p. 123-34, 2000.
- Muller, H.J. The relation of recombination to mutational advance. **Mutation Research**, v. 106, p. 2-9, 1964.
- Navas-Castillo, J. et al. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 219-248, 2011.
- Noueiry, A.O. et al. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, v. 76, p. 925-932, 1994.

- Novella, I.S. et al. Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 92, p. 5841-5844, 1995.
- 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.
- Padidam, M.; Sawyer, S.; Fauquet, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, v. 265, p. 218-224, 1999.
- Pagán, I.; García-Arenal, F. Population genomics of plant viruses. In: (Ed.). **Population Genomics: Microorganisms**: Springer, p. 233-265, 2018.
- Pan, L-L., Chi, Y., Liu, C., Fan, Y-Y., Liu, S-S. Mutations in the coat protein of abegomovirus result in altered transmission by different species of whitefly vectors. **Virus Evol.** 6, veaa014. (doi:10. 1093/ve/veaa014), 2020.
- Passos, L. S. et al. Complete genome sequence of a new bipartite begomovirus infecting *Macroptilium lathyroides* in Brazil. **Archives of Virology**, 162:3551–3554, 2017.
- Perez, A.P.F., Bezerra, L.M.P.A., Cândido, E.S., Santos-Silva, J. *Rhynchosia* in **Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. (<https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB23137>). Acesso em: 26 jan. 2024.
- Picó, B.; Díez, M.J.; Nuez, F. Viral disease causing the greatest economic losses to the tomato crop: II. the *Tomato yellow leaf curl virus*: a review. **Scientia Horticulturae**, v. 67, p. 151-196, 1996.
- Pinel, A.; Abubakar, Z.; Traore, O.; Konate, G.; Fargette, D. Molecular epidemiology of the RNA satellite of Rice yellow mottle virus in Africa. **Archives of Virology**, New York, v. 148, p. 1721-1733, 2003.
- Pinto, V.B.; Silva, J.P.; Fiallo-Olivé, E.; Navas-Castillo, J.; Zerbini, F.M. Novel begomoviruses recovered from Pavoniasp. in Brazil. **Archives of Virology**, v. 161, p. 735-739, 2016.
- Pita, J.S. et al. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. **Journal of General Virology**, London, v. 82, p. 655-665, 2001.
- 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. Pt 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, p. 5784-5799, 2013.
- Rojas, M.R.; Gilbertson, R.L. Emerging plant viruses: a diversity of mechanisms and opportunities. In: Plant virus evolution. **Springer**, p. 27-51, 2008.

- Rojas, M.R.; Hagen, C.; Lucas, W.J.; Gilbertson, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 361-394, 2005.
- Roossinck, M. J. Mechanisms of plant virus evolution. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, n. 1, p. 191-209, 1997.
- Roossinck, M.J. Symbiosis, mutualism and symbiogenesis. **Plant Virus Evolution**. Springer, 2008.
- Rosario, K. et al. Begomovirus-associated satellite DNA diversity captured through vector-enabled metagenomic (VEM) surveys using whiteflies (*Aleyrodidae*). **Viruses**, v. 8, n. 2, p. 36, 2016.
- Ruiz-Medrano, R.; Xoconostle-Cazares, B.; Lucas, W.J. The phloem as a conduit for inter-organ communication. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 202-9, 2001.
- Sanderfoot, A.A.; Lazarowitz, S.G. Getting it together in plant virus movement: Cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. **Trends in Cell Biology**, v. 6, p. 353-358, 1996.
- Sattar, M.N.; Kvarnheden, A.; Saeed, M.; BRIDDON, R.W. Cotton leaf curl disease - an emerging threat to cotton production worldwide. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 695-710, 2013.
- Saxena, S.; Tiwari, A.K. **Begomoviruses: occurrence and management in Asia and Africa**. Springer, 2017.
- Seal, S.E.; Jeger, M.J.; Van Den Bosch, F. Begomovirus evolution and disease management. **Advances in Virus Research**, v. 67, p. 297-316, 2006.
- Settlage, S.B.; Miller, A.B.; Hanley-Bowdoin, L. Interactions between geminivirus replication proteins. **Journal of Virology**, v. 70, p. 6790-6795, 1996.
- Shepherd, D. N. et al. Maize streak virus: an old and complex 'emerging' pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2010.
- Silva, S.J.C. et al. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 61, p. 457-467, 2012.
- Smith, J.M. Evolutionary genetics. **Oxford University Press**, 1989.
- Snak, C., Ribeiro, C.L., Delgado-Salinas, A. *Macropodium in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB29785>>. Acesso em: 30 jan. 2024.
- Sserubombwe, W.S.; Briddon, R.W.; Baguma, Y.K.; Ssemakula, G.N.; Bull, S.E.; Bua, A.; Alicai, T.; Omongo, C.; Otim-Nape, G.W.; Stanley, J. Diversity of begomoviruses associated with mosaic disease of cultivated cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its wild relative (*Manihot glaziovii* Mull. Arg.) in Uganda. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 1759-1769, 2008.
- Stanley, J.; Bisaro, D.M.; Briddon, R.W.; Brown, J.K.; Fauquet, C.M.; Harrison, B.D.; Rybicki, E.P.; Stenger, D.C. Family Geminiviridae. In: Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U. Ball, L.A. (Ed.). *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the

International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: **Elsevier Academic Press**, p. 301-326, 2005.

Van Der Walt, E.; Martin, D.P.; Varsani, A.; Polston, J.E.; Rybicki, E.P. Experimental observations of rapid *Maize streak virus* evolution reveal a strand-specific nucleotide substitution bias. **Virology Journal**, London, v. 5, p. -, 2008.

VanitharanI, R.; Chellappan, P.; Pita, J.S.; Fauquet, C.M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, p. 9487-9498, 2004.

Varsani, A. et al. Establishment of three new genera in the family *Geminiviridae*: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. **Archives of Virology**, 159, 2014.

Varsani, A.; RoumagnaC, P.; Fuchs, M.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E.; Idris, A.; Briddon, R.W.; Rivera-Bustamante, R.F.; Zerbini, F.M.; MARTIN, D.P. Capulavirus and Grablovirus: two new genera in the family *Geminiviridae*. **Archives of Virology**, v. 162, p. 1819-1831, 2017.

Vyskočilová, S.; Tay, W.T.; Van Brunschot, S.; Seal, S.; Colvin, J. An integrative approach to discovering cryptic species within the *Bemisia tabaci* whitefly species complex. **Scientific Reports**, v. 8, p. 10886, 2018.

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

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 of Virology**, Washington, v. 79, p. 7410-7418, 2005.

Wang, H.; Huang, L.F.; Cooper, J.I. Analyses on mutation patterns, detection of population bottlenecks, and suggestion of deleterious-compensatory evolution among members of the genus *Potyvirus*. **Archives of Virology**, New York, v. 151, p. 1625-1633, 2006.

Wei, J.; He, Y.-Z.; Guo, Q.; Guo, T.; Liu, Y.-Q.; Zhou, X.-P.; Liu, S.-S.; Wang, X.-W. Vector development and vitellogenin determine the transovarial transmission of begomoviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 114, p. 6746-6751, 2017.

Zerbini, F.M.; Carvalho, M.G.; Maciel-Zambolim, E. Introdução à Virologia Vegetal. Viçosa: **Ed. UFV**, 2002. 145p.

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

Zhou, X. Advances in understanding begomovirus satellites. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, 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, p. 2101-2111, 1997.

Zhou, X. et al. Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 915-923, 1998.

Zorzatto, C.; Machado, J.P.; Lopes, K.V.; Nascimento, K.J.; Pereira, W.A.; Brustolini, O.J.; Reis, P.A.; Calil, I.P.; Deguchi, M.; Sachetto-Martins, G.; Gouveia, B.C.; Lariato, V.A.; Silva, M.A.; Silva, F.F.; Santos, A.A.; Chory, J.; Fontes, E.P. NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. **Nature**, v. 520, p. 679-682, 2015.

3 CAPÍTULO I

VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Macrotidium*
yellow vein virus EM *Macrotidium* spp. NO ESTADO DE ALAGOAS

RESUMO

Begomovirus (família *Geminiviridae*) é um importante gênero de vírus que infecta plantas cultivadas nas mais diversas regiões do planeta, causando significativas perdas econômicas em campos de cultivo. Este gênero também está associado a uma ampla gama de plantas silvestres/daninhas, que podem servir como hospedeiras alternativas ou fontes de inóculo para epidemias em culturas comerciais. Pelo menos nove espécies de begomovírus já foram descritas em *Macroptilium* spp., mostrando que essa planta é uma fonte de diversidade para o gênero. Visando avaliar a variabilidade genética e a estrutura populacional de *Macroptilium yellow vein virus* (MacYVV) infectando a planta não-cultivada *Macroptilium* sp. (família *Fabaceae*), amostras foliares apresentando sintomas indicativos de infecção por begomovírus foram coletadas em diferentes municípios do estado de Alagoas em 2019 e 2020. O DNA total foi extraído a partir de cada amostra e serviu como molde para amplificação por círculo rolante (ACR), seguido de digestão com endonucleases, clonagem em vetores plasmidiais e sequenciamento. Comparações de sequências pareadas do DNA-A mostraram que todos os isolados pertencem a uma única espécie, *Macroptilium yellow vein virus*. Análise filogenética mostrou a divisão dos isolados de MacYVV em cinco subpopulações, as quais apresentaram baixos valores de variabilidade nucleotídica. Embora os resultados do DAPC (n=6) e STRUCTURE (n=4) tenham sugerido a formação de um número distinto de subpopulações, eles corroboraram os resultados da análise filogenética. Análises de recombinação e reticulada mostraram evidências de eventos de recombinação intraespecífica nos isolados de MacYVV. Foi ainda detectada forte pressão de seleção negativa atuando sobre os genes *CP* e *Rep* de MacYVV. Juntos, esses resultados sugerem uma baixa variabilidade genética nas subpopulações de MacYVV, que pode ter sido gerada por possíveis gargalos genéticos e estruturação geográfica.

Palavras-chave: Plantas não-cultivadas, begomovírus, *Fabaceae*.

ABSTRACT

Begomovirus (family *Geminiviridae*) is an important genus of viruses that infects cultivated plants in the most diverse regions of the planet, causing significant economic losses in crop fields. This genus is also associated with a wide range of wild/weed plants, which may serve as alternative hosts or inoculum sources for epidemics in commercial crops. At least nine species of begomovirus have already been described in *Macroptilium* spp., showing that this plant is a source of diversity for the genus. Aiming to evaluate the genetic variability and population structure of *Macroptilium yellow vein virus* (MacYVV) infecting the non-cultivated plant *Macroptilium* sp. (*Fabaceae* family), leaf samples showing symptoms indicative of begomovirus infection were collected in different municipalities in the state of Alagoas in 2019 and 2020. Total DNA was extracted from each sample and served as a template for rolling circle amplification (RCA), followed by digestion with endonucleases, cloning into plasmid vectors and sequencing. Paired DNA-A sequence comparisons showed that all isolates belong to a single species, *Macroptilium yellow vein virus*. Phylogenetic analysis showed the division of MacYVV isolates into five subpopulations, which presented low values of nucleotide variability. Although the results from DAPC (n=6) and STRUCTURE (n=4) suggested the formation of a distinct number of subpopulations, they corroborated the results of the phylogenetic analysis. Recombination and crosslinking analyzes showed evidence of intraspecific recombination events in MacYVV isolates. Strong negative selection pressure acting on the MacYVV *CP* and *Rep* genes was also detected. Together, these results suggest low genetic variability in MacYVV subpopulations, which may have been generated by possible genetic bottlenecks and geographic structuring.

Keywords: Non-cultivated plants, begomovirus, *Fabaceae*.

3.1 INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* é composta por vírus com genoma de DNA circular de fita simples (ssDNA) encapsidados em partículas geminadas quasi-icosaédricas, e inclui 14 gêneros classificados com base na organização genômica, filogenia, gama de hospedeiros e inseto-vetor (Varsani et al., 2014, 2017; Fiallo-Olivé et al., 2021). O gênero *Begomovirus* é tido como o de maior importância econômica e o que possui o maior número de espécies. Possuem genomas mono ou bipartidos, conhecidos como DNA-A e DNA-B, são transmitidas por um complexo de espécies crípticas de *Bemisia tabaci* e infectam uma ampla variedade de plantas cultivadas e não cultivadas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Brown et al., 2015; Navas-Castillo; Fiallo-Olivé; Sánchez-Campos, 2011; Rojas et al., 2005; Rojas et al., 2018).

Existe uma alta diversidade de begomovírus infectando plantas não-cultivadas em diferentes famílias botânicas, as quais podem atuar como hospedeiras alternativas, e possíveis fontes de inóculo, para begomovírus na ausência da sua hospedeira cultivada (Castillo-Urquiza et al., 2008; Wyant et al., 2011; Rocha et al., 2013; Rodríguez-Negrete et al., 2019). O gênero *Macrottilium* (família *Fabaceae*) é composto por cerca de 12 espécies encontradas nas Américas (Snak; Ribeiro; Delgado-Salinas, 2020). Algumas espécies deste gênero têm utilidade como forrageiras, adubo verde e na medicina popular (Barbosa-Fevereiro, 1986). *Macrottilium* spp. são comumente encontradas nas Américas do Sul e Central, sendo consideradas plantas espontâneas no Nordeste brasileiro (Ramos et al., 2006).

Diversas espécies de *Macrottilium* têm sido relatadas como hospedeiras para os begomovírus *Macrottilium bright mosaic virus* (MacBMV), *Macrottilium golden mosaic virus* (MacGMV), *Macrottilium mosaic Puerto Rico virus* (MacMPRV), *Macrottilium yellow mosaic Florida virus* (MacYMFV), *Macrottilium yellow mosaic virus* (MacYMV), *Macrottilium common mosaic virus* (MacCMV), *Macrottilium yellow spot virus* (MacYSV), *Macrottilium yellow vein virus* (MacYVV), *bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), *bean golden mosaic virus* (BGMV) e *tomato interveinal chlorosis virus* (ToICV), mostrando sua importância como fontes de inóculo para plantas cultivadas (Amarakoon et al., 2008; Idris et al., 2003; Silva et al., 2012; Lima et al., 2013; Ramos-Sobrinho et al., 2014; Passos et al., 2017).

O mosaico dourado dos feijoeiros (*Phaseolus* spp.) é geralmente causado por MacYSV em infecções simples, ou mistas com BGMV, na região Nordeste do Brasil,

induzindo perdas entre 40 e 100% na produtividade dessa cultura (Morales, 2006; Ramos-Sobrinho et al., 2014; Luna, 2023). Estudos prévios revelaram que as populações de MacYSV possuem elevado grau de variação genética quando comparadas às populações de BGMV (Silva et al., 2012, Lima et al., 2013, Ramos-Sobrinho et al., 2014). Adicionalmente, MacYSV e BGMV possuem distinta distribuição da variação genética, com as populações de BGMV sendo estruturadas segundo hospedeiro e região geográfica (Ramos-Sobrinho, 2014).

O begomovírus MacYVV tem sido descrito infectando plantas de *Macroptilium* spp. associadas a cultivos de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) e feijão-fava (*Phaseolus lunatus*) no estado de Alagoas há mais de uma década (Silva et al., 2012; Ramos-Sobrinho et al., 2014). Entretanto, estudos sobre a variabilidade e estrutura genética de populações desse vírus ainda não estão disponíveis.

Estudar a variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus contribuem para o entendimento das forças evolutivas que atuam sobre esses patógenos em condições de campo (Prasanna et al., 2010; González-Aguilera et al., 2012; Silva et al., 2012; Lima et al., 2013; Rocha et al., 2013; Ramos-Sobrinho et al., 2014; Ferro et al., 2017). Essas informações podem ser utilizadas para melhor compreender como as populações evoluem, com efeitos na longevidade das estratégias de manejo de doenças (Seal et al., 2006). Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a variabilidade genética e estrutura populacional de MacYVV infectando *Macroptilium* spp. no estado de Alagoas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta do material vegetal

Amostras foliares de *Macroptilium* spp. apresentando sintomas indicativos de infecção por begomovírus (mosaico, deformação foliar e nanismo) foram coletadas nos municípios de Maceió, Matriz do Camaragibe, Marechal Deodoro e União dos Palmares, no estado de Alagoas, entre 2019 e 2020. O material vegetal foi armazenado na forma de exsiccatas ou congelado em ultrafreezer a -80°C no Laboratório de Fitopatologia Molecular do Centro de Engenharias e Ciências Agrárias (CECA), Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

3.2.2 Extração de DNA e detecção de begomovírus

O DNA total foi extraído, individualmente, de acordo com o método CTAB (Doyle; Doyle, 1987) e utilizado como molde para amplificação, via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), de regiões genômicas virais com os primers universais PALIv1978/PARlc496 para o gênero *Begomovirus* (componente genômico DNA-A; ROJAS et al., 1993). As amostras PCR-positivas foram submetidas à amplificação, via PCR, usando os pares de primers espécie-específicos para o componente genômico DNA-A de BGMV (BGMV-Det_1191_For/BGMV-Det_1768_Rev) e MaYSV (MaYSV-Det_1137_For/MaYSV-Det_1427_Rev) (Tabela 1).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 15 µL, contendo 1,5 µL de tampão 10X PCR, 1,2 µL da mistura de dNTPs a 10 mM, 1 µL de cada oligonucleotídeo a 10 µM, 10 ng do DNA molde, e uma unidade de *Taq* DNA Polymerase, completando-se o volume com água ultrapura. As condições de termociclagem consistiram em umadesnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos, seguindo de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1% sob luz UV.

3.2.3 Clonagem e sequenciamento do genoma completo de begomovírus

Após a detecção pelo método de PCR, as amostras de DNA total foram usadas como molde para amplificação, via RCA (*Rolling Circle Amplification*), dos genomas completos de begomovírus (Inoue-Nagata et al., 2004). Os produtos da RCA foram clivados individualmente com três enzimas de restrição (*Pst*I, *Kpn*I e *Xba*I) e analisados em géis de agarose (0,8%). Aliquotas de reações de clivagem que apresentaram um fragmento de aproximadamente 2.600 nucleotídeos, correspondendo aos componentes DNA-A ou DNA-B de begomovírus bipartidos, foram ligados ao vetor plasmidial pBluescript-KS+ (Stratagene), previamente clivados com a mesma enzima e defosforilados. Os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH5α (Sambrook; Russel, 2001). Colônias contendo os possíveis plasmídeos recombinantes foram repicadas para meio LB líquido contendo ampicilina (*Ampicilin, sodium salt* USB[®]) e incubadas a 37°C sob agitação orbital de 180 rpm por 16h. Após incubação, as culturas foram submetidas à extração de DNA plasmidial com o Kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep (Cellco), seguindo o protocolo do fabricante. 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. Estas etapas foram realizadas no Laboratório de Ecologia e Evolução de Vírus na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Finalmente, os clones confirmados foram completamente sequenciados na Macrogen Inc. (Seul, Coreia do Sul) utilizando o método de Sanger.

3.2.4 Análise de sequências e demarcação de espécies

As sequências completas do DNA-A foram montadas utilizando o programa *CodonCode Aligner* v.10.0.3 (www.codoncode.com) e organizadas para iniciar no ponto de clivagem do nonanucleotídeo conservado (5'-TAATATT//AC-3'). As sequências obtidas foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLASTn (Altschul et al., 1990) e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para determinar as espécies virais com as quais elas compartilham maior identidade de sequência. Além das sequências dos isolados descritos nesse estudo, foram utilizadas 18 sequências de MacYVV depositadas no GenBank (Tabela 2). Comparações pareadas foram realizadas para o conjunto de dados de DNA-A utilizando-se o programa *Sequence Demarcation Tool* (SDT) v.1.2 (Muhire et al., 2014). Para demarcação de espécies do gênero *Begomovirus*, foi utilizado o critério de identidade $\geq 91\%$ para sequências completas de DNA-A estabelecido pelo *Geminiviridae Study Group* do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) (Brown et al., 2015).

3.2.5 Alinhamento e análises filogenéticas

Alinhamentos múltiplos das sequências nucleotídicas para o conjunto de dados DNA-A de MacYVV (Tabelas 2 e 3) foram preparados através do algoritmo MUSCLE implementado no pacote MEGA 11 (Kumar et al., 2018) e ajustados manualmente. A árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) foi reconstruída no programa RaxML-NG (Kozlov et al., 2019), disponibilizado no web-portal CIPRES (Miller et al., 2010), e empregando 1.000 replicações de *bootstrap*. O melhor modelo de substituição nucleotídica e distribuição de heterogeneidade foram escolhidos com o auxílio do programa MrModelTest-NG (Darriba et al., 2020), sendo utilizado o modelo GTR+G4 para o conjunto de dados DNA-A. A árvore foi visualizada e editada nos programas FigTree v.1.4 (tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree) e CorelDRAW 2021.

3.2.6 Estrutura genética e índices de variabilidade

As estimativas da variabilidade genética para os descritores número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π) foram obtidas utilizando o programa DnaSP v. 5 (Librado; Rozas, 2009).

As inferências sobre a estrutura genética populacional foram realizadas por meio da Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) (Jombart; Devillard; Balloux, 2010), uma estática multivariada não paramétrica implementada no pacote Adegenet (Jombart; Ahmed, 2011) no software R. DAPC é um método livre de modelo, sem suposições sobre o equilíbrio de Hardy-Weinberg ou desequilíbrio de ligação, sendo ideal para populações virais. Para o DNA-A, o número de *clusters* genéticos (k) foi pré-definido usando um algoritmo *k-means*. Para encontrar o melhor número de agrupamentos genéticos descrevendo os dados, as médias de k foram executadas sequencialmente com valores de k variando de 2 a 10, mantendo todos os componentes principais (PC). A escolha do melhor modelo de agrupamento baseou-se principalmente no número mínimo de k, após o qual o Critério de Informação Bayesiano (BIC) diminuiu em um valor insignificante, conforme proposto por Jombart et al. (2010). Depois de atribuir indivíduos a cada agrupamento genético inferido, os valores ideais de PC para executar a análise discriminante foram investigados através da análise visual do gráfico de variância cumulativa explicado por PC e otimização de *a-score*. Além disso, para apoiar e verificar o grau de diferenciação entre agrupamentos genéticos inferidos pelo DAPC, o índice de fixação *F* de Wright (F_{ST}) (Wright, 1951) entre subpopulações foi estimado utilizando DnaSP v. 5 (Librado; Rozas, 2009).

A estrutura genética de populações para os isolados de MacYVV foi também analisada utilizando o software STRUCTURE v. 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). O modelo de ancestralidade escolhido foi o *Admixture Model* com frequências alélicas independentes entre as populações. Foram determinadas 1.000.000 de iterações após uma fase *burn-in* de 10.000 iterações. O número de populações (K) testadas variou de um a dez, sendo dez corridas independentes para cada K avaliado. O valor de ΔK (Evanno; Regnaut; Goudet, 2005) foi calculado no programa StructureHarvester v. 0.6.94 (Earl; Vonholdt, 2012).

3.2.7 Análise de recombinação

O conjunto de dados alinhados para o DNA-A dos isolados de MacYVV (n=47) foi submetido à análise de detecção de evolução em rede utilizando o método *Neighbor-*

Net implementado no programa SplitsTree v. 4.10 (Huson; Bryant, 2006). Para determinar possíveis sequências parentais e pontos de recombinação (*breakpoints*) foram empregados os métodos RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan e 3Seq implementados no pacote RDP5 (Martin et al., 2020). O conjunto de dados DNA-A foi analisado com as configurações padrão para os diferentes métodos e a significância estatística foi inferida por um *P* valor menor que o valor de corte de Bonferroni corrigido de 0,05. Os eventos de recombinação que foram detectados por pelo menos cinco métodos foram considerados confiáveis.

3.2.8 Análise de seleção

Para detectar evidência de pressão de seleção positiva ou negativa, os conjuntos de dados de sequências nucleotídicas dos genes *CP* e *Rep* foram submetidos aos testes de neutralidade Tajima D, Fu & Li D*, Fu & Li F*, todos disponíveis no programa DnaSP v. 5.10 (Librado; Rozas, 2009), enquanto a estimativa da taxa média de substituições não-sinônimas por substituições sinônimas (dN/dS) foi calculada no servidor DataMonkey (www.datamonkey.org) empregando o método *Single-Likelihood Ancestor Counting* (SLAC). Relações dN/dS > 1 indicam atuação de seleção positiva (diversificadora), dN/dS = 1 sugere seleção neutra, e dN/dS < 1 dão indícios de seleção negativa (purificadora).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Detecção de begomovírus via *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Foram coletadas 59 amostras foliares de *Macropitulum* spp. apresentando sintomas típicos de infecção por begomovírus (Figura 1) nos municípios de Marechal Deodoro, Matriz de Camaragibe, Maceió e União dos Palmares, estado de Alagoas (Tabela 3).

Produto de amplificação de ~1,2 kb, correspondente a parte do componente DNA-A, mostrou que a maioria das amostras foram PCR-positivas para o gênero *Begomovirus*, exceto cinco amostras oriundas de Marechal Deodoro (dados não mostrados) (Rojas et al., 1993). As amostras oriundas de Matriz de Camaragibe, Maceió, União dos Palmares e as demais de Marechal Deodoro foram PCR-negativas para BGMV e MacYSV.

3.3.2 Análises de sequências e demarcação de espécie

Foram obtidos 29 clones correspondentes ao componente genômico DNA-A (Tabela 3). Analisando as sequências, e com base nos critérios estabelecidos para demarcação de espécies dentro do gênero *Begomovirus* (Brown et al., 2015), a análise de comparações pareadas de sequências nucleotídicas do DNA-A mostrou que todos os isolados pertencem a uma única espécie, *Macroptilium yellow vein virus* (MacYVV). Foi observado na matriz de identidade par-a-par a segregação desses isolados em cinco grupos distintos (Figura 2). O Grupo I, formado pelos isolados de Palmeira dos Índios (PI), obtidos do artigo de Ramos-sobrinho et al. (2014), foram os mais proximamente relacionados entre si, apresentando identidades de sequências variando entre 99,6-100%. O Grupo II, que abrange isolados de Maceió (Mc) e União dos Palmares (UP1 – Isolados 3UPC1P, 6UPC5P, 8UPC3P e 11UPC8P), apresentou identidades de sequências variando entre 97,6-100%. Já o Grupo III, formado pelos isolados de Marechal Deodoro (MD), apresentou identidades de sequências variando entre 97-99,8%. O Grupo IV, que engloba os demais isolados de União dos Palmares (UP2 – isolados 2UPC3K, 4UPC3P, 9UPC1P e 10UPC6K), com identidades de sequências variando entre 96,4-100%. O Grupo V, constituído por isolados provenientes de Matriz do Camaragibe (Mt) foi o que apresentou maior variação das identidades de sequências, apresentando entre 93,9-100%. Quando comparados isolados presentes nesses cinco grupos, foi observado que as identidades de sequência variaram entre 94,7-97,8% (Figura 2).

A organização genômica dos isolados foi típica de begomovírus do novo mundo com as ORFs (*open reading frames*) responsáveis por codificar as proteínas CP (capa proteica), Rep (proteína associada à replicação), REn (proteína potenciadora da replicação), TrAP (Proteína ativadora da transcrição) e AC4 apresentando o tamanho esperado para a espécie (Tabela 4).

3.3.3 Análises Filogenéticas

Análise filogenética baseada na sequência de nucleotídeos do conjunto de dados DNA-A das populações de MacYVV incluiu isolados obtidos neste trabalho e outras sequências disponíveis no GenBank (Tabelas 2 e 3). A árvore filogenética do DNA-A mostrou que os isolados de MacYVV estão distribuídos em cinco clados bem suportados (Figura 3). O Clado I engloba os isolados de MacYVV provenientes de MD, o Clado II é formado pelos isolados de UP2, já o Clado III é constituído pelos isolados de PI anteriormente caracterizados e disponíveis no GenBank. O Clado IV foi formado por dois

subclados, com os isolados de UP2 e Mc formando dois grupos irmãos. Finalmente, no Clado V foram incluídos os isolados de Mt. Estes resultados estão em concordância com o que já foi observado nas análises de comparações de sequências pareadas e sugerem a existência de estruturação das populações por local de amostragem.

3.3.4 Estrutura genética e índices de variabilidade

Baseado na análise filogenética, os isolados de MacYVV foram subdivididos em cinco subpopulações, e os índices de variabilidade foram calculados para população total e cada uma das subpopulações (Tabela 5). Os resultados demonstraram que a população de MacYVV, embora subdividida em cinco subpopulações, tem baixa variabilidade genética ($\pi_{\text{total}} = 0,02791$, Tabela 5). Quando avaliadas as subpopulações individuais, os valores de diversidade nucleotídica foram maiores para Mt ($\pi_{\text{Mt}} = 0,00667$) e Mc+UP1 ($\pi_{\text{Mt}} = 0,00603$), seguidas por MD ($\pi_{\text{Mt}} = 0,00229$), PI ($\pi_{\text{Mt}} = 0,00198$) e UP2 ($\pi_{\text{Mt}} = 0,00038$) (Tabela 5). Entretanto, essa variabilidade genética é pelo menos 10 vezes menor que o observado para a população total (Tabela 5). Além disso, os altos valores do teste F de Wright entre subpopulações ($F_{ST} > 0,7$; veja abaixo) reforçam a possível estruturação de populações observada anteriormente.

A análise discriminante de componentes principais (DAPC) também foi aplicada para inferir a subdivisão populacional. O resultado do DAPC baseado no DNA-A mostrou a existência de seis *clusters*. Foram detectadas as subpopulações de MD, Mc juntamente com UP1, Mt e UP2, que já haviam sido observadas na análise filogenética, além da divisão dos isolados de PI em duas subpopulações (PI1 e PI2). Entretanto, PI1 e PI2 formaram dois *clusters* que ficaram sobrepostos, indicando a existência de uma mistura entre os isolados (Figura 4).

Para avaliar a consistência dos agrupamentos genéticos inferidos pela análise DAPC, o grau de diferenciação entre os agrupamentos foi estimado por meio do F_{ST} (Tabela 6), o qual indicou alta diferenciação entre as subpopulações proposta pela análise DAPC.

De acordo com a análise realizada no STRUCTURE, utilizando o método Evanno (Evanno; Regnaut; Goudet, 2005), o maior valor de ΔK calculado foi para $K=4$, indicando a existência de pelo menos quatro subpopulações geneticamente distintas para os isolados de MacYVV. Apesar desse valor de K distinto, as subpopulações propostas pelo STRUCTURE relembram o que foi observado nas análises filogenética e DAPC, como as subpopulações Mc+UP1, Mt e PI. Já os isolados coletados a partir MD e UP2 formaram

uma única subpopulação, sugerindo a existência de fluxo gênico entre esses isolados (Figura 5).

3.3.5 Análise de recombinação

A análise reticulada revelou forte evidência de eventos de recombinação contribuindo para o processo evolutivo da população de MacYVV (Figura 6), como sugerido pelas incongruências encontradas na árvore filogenética.

Pelo menos dois eventos independentes de recombinação intraespecíficos foram detectados no conjunto de dados DNA-A de MacYVV (47 sequências). O evento 1 foi detectado nos isolados de MacYVV de UP2, com 8MCC3P como maior parental e com o menor parental desconhecido. Este evento tem *breakpoints* na região codificadora da CP (Tabela 7). O segundo evento foi detectado nos isolados de MacYVV de MD, com o maior parental sendo o isolado 2UPC3K e com o menor parental desconhecido. Os *breakpoints* encontrados para este evento foram localizados na região codificadora da Rep (Tabela 7). Nenhum evento de recombinação foi encontrado para o restante dos isolados.

3.3.6 Análise de seleção

Testes de neutralidade foram usados para acessar os tipos de seleção ou forças demográficas atuando nas sequências codificadoras para os genes *CP* e *Rep* das populações de MacYVV. A maioria dos valores obtidos para os testes Tajima D, Fu & Li D* e Fu & Li F* foram negativos e estatisticamente não suportados (Tabela 8). No entanto, foram encontrados valores positivos, estatisticamente não significativos, para os três testes de neutralidade para ORF Rep na população total. Esses resultados sugerem a ocorrência de seleção negativa (purificadora) sobre os genes *CP* e *Rep* de MacYVV.

Os valores de $dN/dS < 1$ foram encontrados para as ORFs CP e Rep da população total e subpopulações PI, Mc+UP1, e Mt, confirmando que seleção purificadora pode estar atuando sobre elas (Tabela 8). Os testes de neutralidade e o dN/dS não foram computados para as subpopulações MD e UP2 devido ao pequeno número de isolados, o que não fornecia confiabilidade aos resultados.

3.4 DISCUSSÃO

Begomovírus são fitovírus que causam sérias epidemias em culturas economicamente importantes em todo o mundo (Inoue-Nagata; Lima; Gilbertson, 2016; Rojas et al., 2018). Plantas não-cultivadas podem atuar como reservatórios de begomovírus e como fontes de inóculo para plantas cultivadas, favorecendo a ocorrência de epidemias (Silva et al., 2012; Rocha et al., 2013). No Brasil, a emergência de begomovírus infectando tomateiro e feijoeiro provavelmente ocorreu por transferência horizontal a partir de plantas não cultivadas após a introdução de *Bemisia tabaci* MEAM1 (Rocha et al., 2013; Inoue-Nagata; Lima; Gilbertson, 2016; Mar et al., 2017).

Estudos sobre a diversidade, variabilidade e estrutura de populações de begomovírus que infectam plantas cultivadas e não-cultivadas vêm fornecendo informações que ajudam a compreender quais processos evolutivos estão atuando nesses vírus e auxiliam na implementação de estratégias de controle de viroses (Prasanna et al., 2010; González-Aguilera et al., 2012; Castillo-Urquiza et al., 2008; Silva et al., 2011; Silva et al., 2012; Tavares et al., 2012; Lima et al., 2013, Rocha et al., 2013, Ramos-Sobrinho et al., 2014; Ferro et al., 2017; Lima et al., 2017, Mar et al., 2017). No presente estudo, foi investigada a variabilidade genética e estrutura populacional do begomovírus *Macropitilium yellow vein virus* na hospedeira não cultivada *Macropitilium* spp. no estado de Alagoas.

Diferentes trabalhos vêm demonstrando uma tendência das populações de begomovírus se estruturarem geograficamente (Silva et al., 2012; Lima et al., 2013; Rocha et al., 2013; Ramos-Sobrinho et al., 2014; Mendes et al., 2021). Similarmente, no presente estudo foi observado que isolados de MacYVV, infectando a espécie silvestre *Macropitilium* spp. no estado de Alagoas, estão estruturados em pelo menos cinco subpopulações locais. Ramos-Sobrinho et al. (2014) demonstraram a importância e prevalência de MacYSV infectando *M. lathyroides* no estado de Alagoas. Entretanto, este trabalho não detectou a presença de MacYSV nas amostras coletadas nos anos de 2019 e 2020.

Existe uma alta variabilidade genética em populações de begomovírus encontrados infectando hospedeiras não-cultivadas (Lima et al. 2013; Rocha et al., 2013; Ramos-Sobrinho et al., 2014; Ferro et al., 2017; Mendes et al., 2021). Contudo, baixa variabilidade genética foi encontrada neste estudo. Os resultados demonstraram que a população de MacYVV, embora dividida em cinco subpopulações, tem baixa

variabilidade genética ($\pi = 0,02791$). Baixas variabilidades genéticas também foram encontradas por Xavier et al. (2021) para os begomovírus BGMV, *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) e *Tomato severe rugose virus*. Também foi possível correlacionar os eventos de recombinação com a variabilidade genética, onde baixa variabilidade foi um indicativo de pouco ou nenhum evento de recombinação (Xavier et al., 2021). Uma possível hipótese para explicar essa baixa variabilidade genética na população de MacYVV é a ocorrência de gargalos genéticos que seriam resultados de deriva genética ou ainda decorrente de algum efeito fundador na população.

A estrutura genética das populações de begomovírus é altamente impulsionada por eventos como mutação e recombinação, além de ser influenciada pela interação entre espécies hospedeiras e de vetores (Navas-Castillo; Fiallo-Olivé; Sánchez-Campos, 2011; Lima et al., 2013; Rocha et al., 2013; Ramos-Sobrinho et al., 2014). Estudos anteriores demonstraram que populações brasileiras de begomovírus em solanáceas, euforbiáceas e leguminosas estão estruturadas biogeograficamente (Rocha et al., 2013; Ramos-Sobrinho et al., 2014; MENDES et al., 2021), o que também aconteceu com os isolados de MacYVV. Foi encontrado um alto valor do índice de fixação de Wright ($F_{ST} = 0,90860$) e os isolados foram estruturados geograficamente em cinco subpopulações, como observado na análise filogenética, apesar da proximidade entre as áreas de coleta (a maior distância entre os pontos de coleta foi de 194 km, entre os Municípios de Matriz do Camaragibe e Palmeira dos Índios, e a menor foi de 32,1 km, entre os Municípios de Maceió e Marechal Deodoro). O DAPC definiu que a população de MacYVV está subdividida em seis, as quais já haviam sido observadas na análise filogenética e, adicionalmente, dividiu a subpopulação de PI em duas, indicando a existência de uma mistura entre os isolados que pode ser resultado de algum evento de recombinação e que provavelmente não foi detectado no conjunto de dados utilizado no presente estudo. Já o STRUCTURE subdividiu a população de MacYVV em quatro, agrupando os isolados de UP2 e MD na mesma subpopulação, sugerindo a ocorrência de fluxo gênico entre elas, o que é adicionalmente confirmado pela evidência de recombinação envolvendo isolados dessas duas subpopulações, explicando assim o agrupamento observado para UP2 com MD. Apesar dessas diferenças, as subpopulações propostas pelo STRUCTURE relembram o que foi observado nas análises filogenética e DAPC.

A recombinação é um mecanismo evolutivo importante para a variabilidade genética e atua de forma relevante na estrutura populacional dos begomovírus (Lefeuvre et al., 2007; 2009; 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). Este mecanismo influencia no surgimento de novas espécies e/ou isolados causando a emergência de novas doenças e epidemias em culturas de importância econômica (Zhou et al., 1997; Monci et al., 2002; Idris; Brown, 2002; Briddon et al., 2014). Em begomovírus, as regiões dos genes *CP* e *Rep* apresentam altas taxas de ocorrência de eventos de recombinação, sendo consideradas *cold* e *hotspots* de recombinação, respectivamente (Lefeuvre et al., 2007; Silva et al., 2012; Rocha et al., 2013; Lima et al., 2013; Ramos-Sobrinho et al., 2014). Dois prováveis eventos de recombinação intraespecíficos foram detectados no *dataset* do DNA-A de MacYVV, um ocorrendo na região codificadora da *CP* e o outro na *Rep*. Eventos de recombinação também foram detectados nessas mesmas regiões em outros estudos com begomovírus. Entretanto, análises de seleção identificaram a ocorrência de seleção negativa ou purificadora como sendo a principal força seletiva atuando sobre essas populações (Silva et al., 2012; Lima et al. 2013; Rocha et al., 2013; Ramos-Sobrinho et al., 2014; Melo et al., 2016; Mendes et al., 2021). O mesmo aconteceu com as populações de MacYVV do presente trabalho, mostrando que a maioria das mutações são sinônimas, gerando alterações na sequência de aminoácidos, são removidas para possivelmente preservar a estrutura e função das proteínas. Infelizmente, não foi possível analisar a seleção nas subpopulações de MD e UP2 devido ao pequeno número de isolados, sendo necessária a obtenção de mais clones dessas localidades. Já que a *CP* dos begomovírus está relacionada a transmissão por mosca-branca (Briddon et al., 1990; Ohnesorge; Bejarano, 2009; Rana et al., 2012), e a *Rep* possui vários domínios relacionados com a replicação viral (Ilyina; Koonin, 1992; Heyraud-Nitschke et al., 1995; Orozco et al., 1997; Nash et al., 2011), a conservação dessas proteínas é importante para a manutenção dos principais processos biológicos dos begomovírus.

3.5 CONCLUSÕES

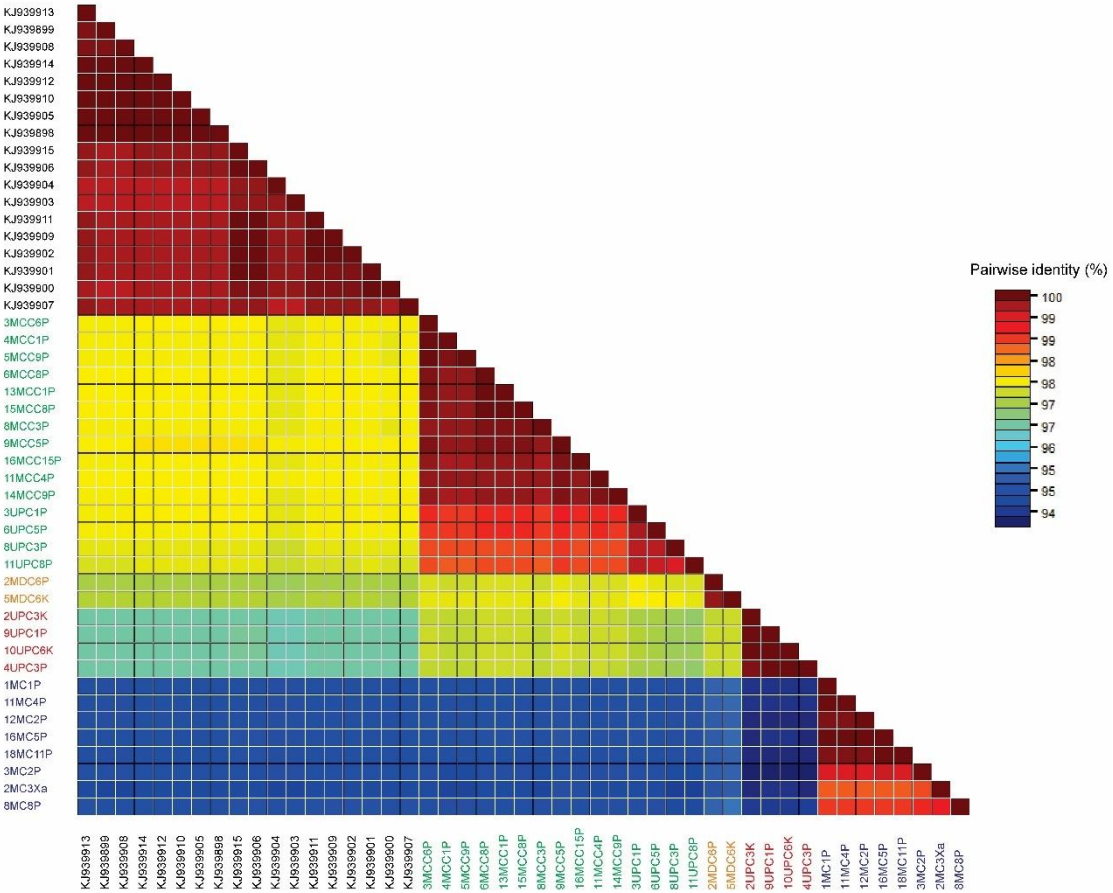
MacYVV foi o begomovírus predominante em *Macrottilium* spp. em municípios alagoanos entre os anos de 2019 e 2020. Os resultados obtidos sugerem uma baixa variabilidade genética na população de MacYVV, possivelmente devido a ocorrência de gargalos genéticos. A população está estruturada geograficamente em cinco subpopulações, apesar da proximidade entre as áreas de coleta, sugerindo que está acontecendo pouca interação entre elas.

Figura 1. Plantas de *Macroptilium* spp. apresentando sintomas típicos de infecção por begomovírus. (A) Município de Maceió; (B) Município de Marechal Deodoro; (C) Município de Matriz de Camaragibe; (D) Município de União dos Palmares.



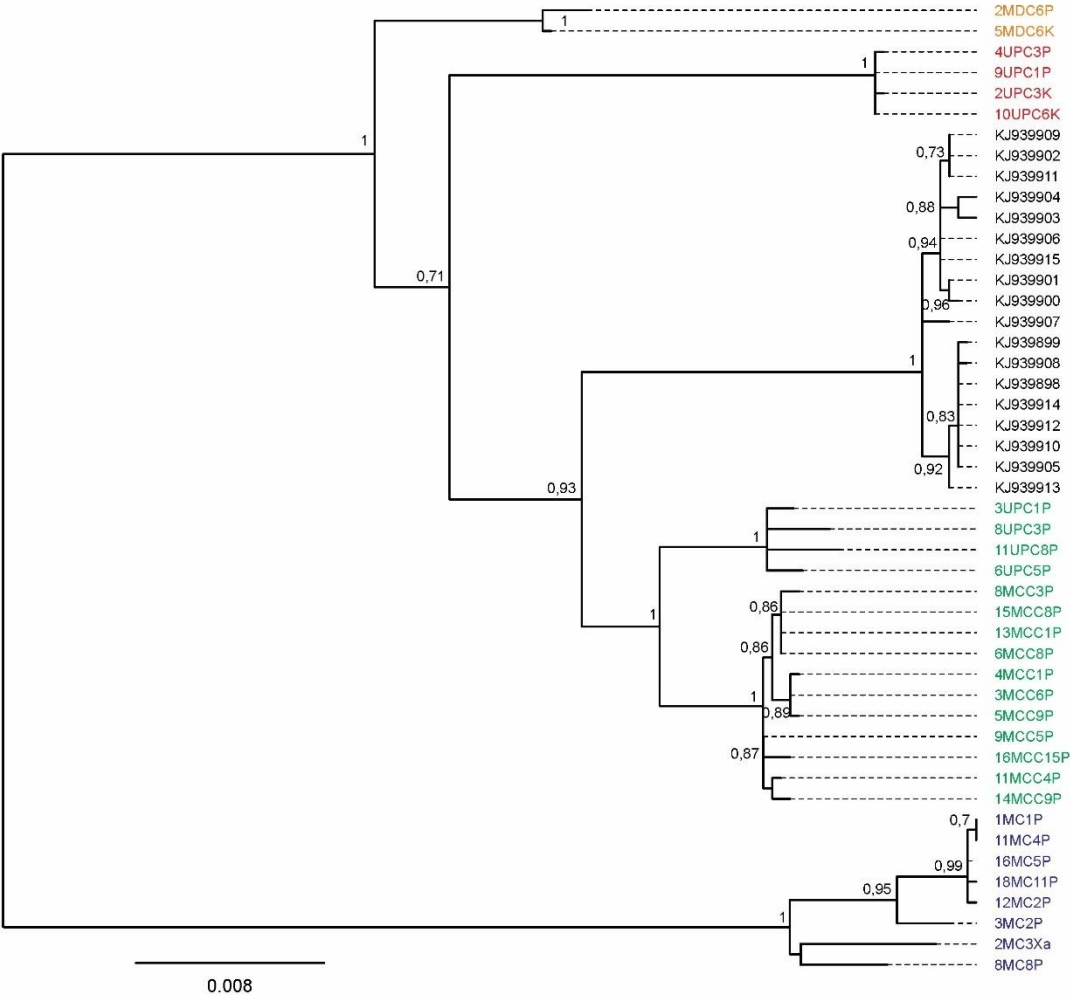
Fonte: Ferro, 2019 e 2020.

Figura 2. Matriz de identidades de sequências do DNA-A de isolados de MacYVV obtidas neste trabalho mais isolados disponíveis no GenBank. Subpopulação PI em preto – Isolados do GenBank oriundos de Palmeira dos Índios, subpopulação Mc + UP1 em verde – Isolados de Maceió com isolados 3UPC1P, 6UPC5P, 8UPC3P e 11UPC8P de União dos Palmares, subpopulação MD em laranja – Isolados de Marechal Deodoro, subpopulação UP2 em vermelho – Isolados 2UPC3K, 4UPC3P, 9UPC1P e 10UPC6K de União dos Palmares e subpopulação Mt em azul – Isolados de Matriz do Camaragibe.



Fonte: Autor, 2024.

Figura 3. Análise filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) *midpoint* baseada no DNA-A de isolados de MacYVV obtidas neste trabalho mais amostras disponíveis no GenBank, mostrando a formação de cinco clados principais. Clado I = isolados de Marechal Deodoro (MD) em laranja, Clado II = isolados 2UPC3K, 4UPC3P, 9UPC1P e 10UPC6K de União dos Palmares (UP2) em vermelho, Clado III = isolados de Palmeira dos Índios (PI) em preto, Clado IV = formação de dois subgrupos, no primeiro foram agrupados os isolados 3UPC1P, 6UPC5P, 8UPC3P e 11UPC8P de União dos Palmares (UP1) e no segundo os isolados de Maceió (Mc) em verde, e Clado V = isolados de Matriz do Camaragibe (Mt) em azul.



Fonte: Autor, 2024.

Figura 4. Análise estatística multivariada de agrupamento de subdivisão populacional usando Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) para subpopulações de MacYVV. (A) Gráfico de barra DAPC baseado no DNA-A, com barras coloridas representando isolados em cada subpopulação inferida. (B) Gráficos de dispersão DAPC baseados no DNA-A, com números indicando cada subpopulação. Subpopulação 1 em azul – Isolados de Marechal Deodoro, Subpopulação 2 em verde – Isolados de Palmeira dos Índios (PI1 – KJ939898, KJ939899, KJ939905, KJ939908, KJ939910, KJ939912, KJ939913 e KJ939914), Subpopulação 3 em rosa – Isolados de Matriz do Camaragibe, Subpopulação 4 em laranja – Isolados de União dos Palmares (UP2 – Isolados 2UPC3K, 4UPC3P, 9UPC1P e 10UPC6K), Subpopulação 5 em roxo – Isolados de Palmeira dos Índios (PI2 – KJ939900, KJ939901, KJ939902, KJ939903, KJ939904, KJ939906, KJ939907, KJ939909, KJ939911 e KJ939915) e Subpopulação 6 em marrom – Isolados de Maceió com União dos Palmares (UP1 – Isolados 3UPC1P, 6UPC5P, 8UPC3P e 11UPC8P). (C) Gráfico de atribuição DAPC que mostra as probabilidades de atribuição dos indivíduos aos diferentes *clusters*: os *clusters* 2 e 5 apresentam extensa sobreposição, onde retângulos sombreados em vermelho indicam alta probabilidade de atribuição correta a cada cluster, com o espectro de cores do sombreado passando do laranja e do amarelo ao branco, representando uma redução gradual em probabilidade. O código de cores indica a qual *cluster* pertence cada isolado.

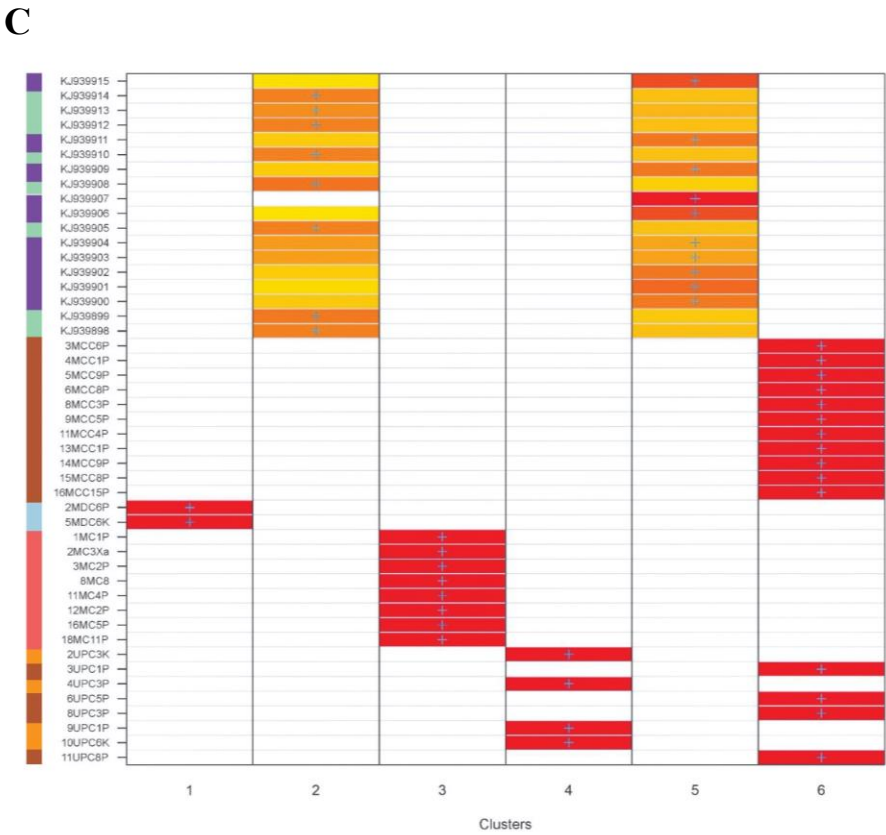
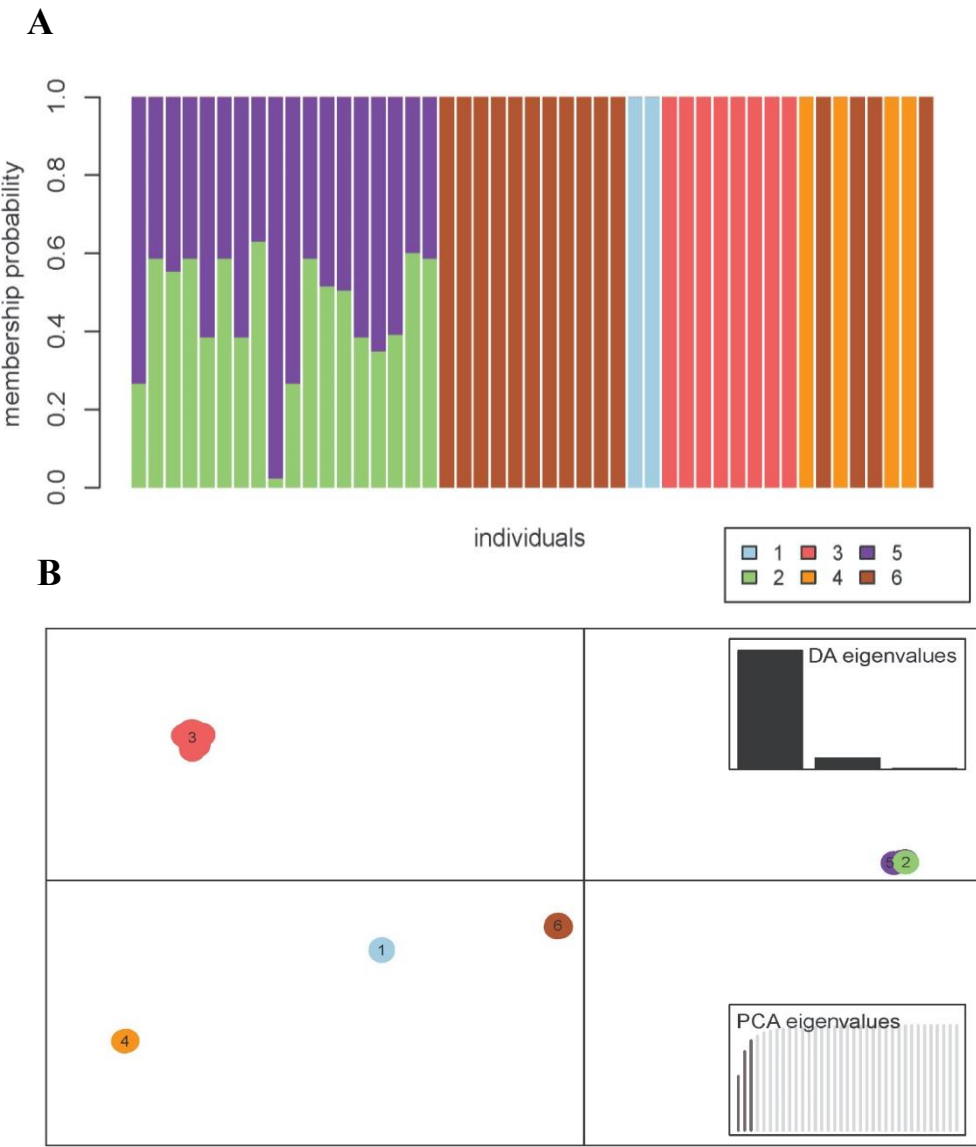
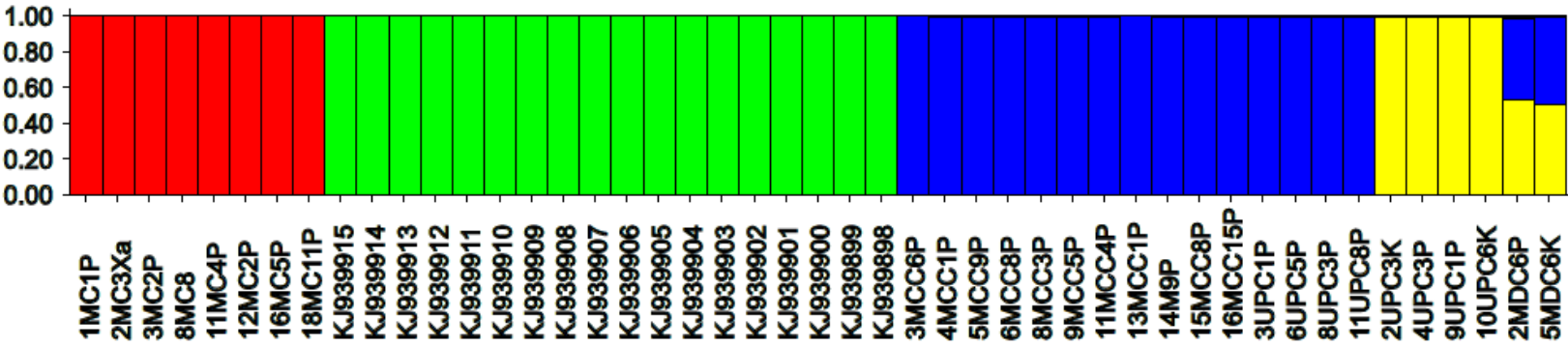
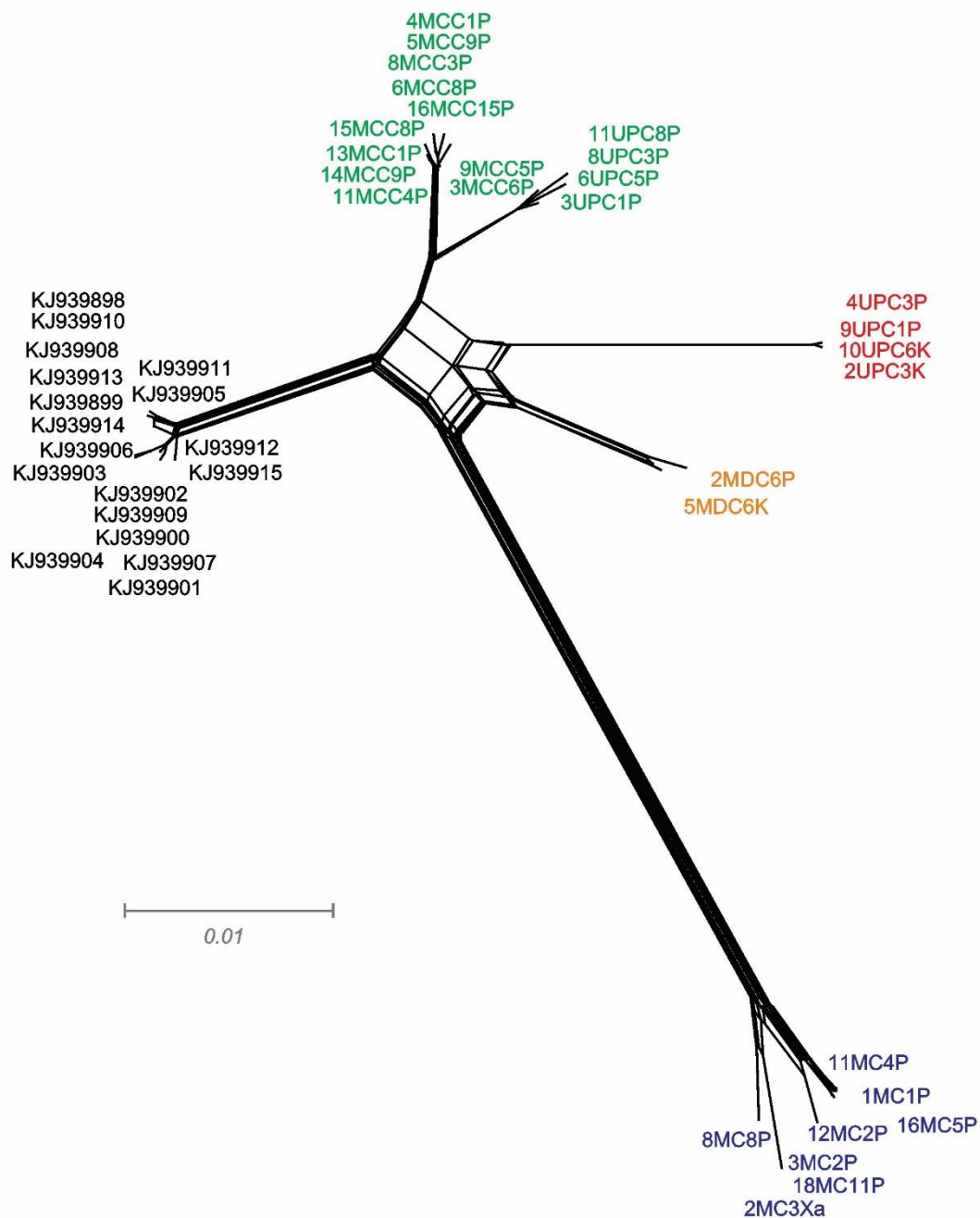


Figura 5. Gráfico de barras gerado pela análise de estruturação de subpopulações no software STRUCTURE para subpopulações de MacYVV. As cores representam as subpopulações Mt – Isolados de Matriz do Camaragibe (vermelho), PI – Isolados de Palmeira dos Índios (verde), Mc + UP1 – Isolados de Maceió e isolados 3UPC1P, 6UPC5P, 8UPC3P e 11UPC8P de União dos Palmares (azul) e MD + UP2 – Isolados de Marechal Deodoro e isolados 2UPC3K, 4UPC3P, 9UPC1P e 10UPC6K de União dos Palmares (amarelo). Cada barra vertical representa um isolado viral cuja distribuição de cores é proporcional à estimativa de cada indivíduo pertencer a cada subpopulação.



Fonte: Autor, 2024.

Figura 6. Análise reticulada baseada no DNA-A dos isolados de MacYVV obtidos neste trabalho, junto com isolados depositados no GenBank. Subpopulação PI em preto – Isolados do GenBank oriundos de Palmeira dos Índios, subpopulação Mc + UP1 em verde – Isolados de Maceió com isolados 3UPC1P, 6UPC5P, 8UPC3P e 11UPC8P de União dos Palmares, subpopulação MD em laranja – Isolados de Marechal Deodoro, subpopulação UP2 em vermelho – Isolados 2UPC3K, 4UPC3P, 9UPC1P e 10UPC6K de União dos Palmares e subpopulação Mt em azul – Isolados de Matriz do Camaragibe.



Fonte: Autor, 2024.

608 **Tabela 1.** Sequências de *primers* usadas para amplificação do componente genômico DNA-A de BGMV e MacYSV e *primer* universal para o gênero *Begomovirus*.

Nome	Sequência (5' – 3')	Alvo	Fragmento
PAL1v1978	GCATCTGCAGGCCCACTYGTCTTYCCNGT	DNA-A	1200pb
PAR1c496	AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG		
MaYSV_A_Det_308_For	GGAGGTGGAGGTCCAAAAA	DNA-A	850pb
MaYSV_A_Det_1149_Rev	TCTGGGACGACATATTTAGT		
BGMV-A_Det_1191_For	CCTTGTGTAGACCCAGTTTGT	DNA-A	570 pb
BGMV-A_Det_1768_Rev	CAAAGGTGTTTTCAAATCATGCTG		

609
610
611
612
613 **Tabela 2.** Sequências de begomovírus MacYVV obtidas apartir do banco de dados não-redundante Genbank.

Nº de acesso no Genbank	Hospedeiro	Local	Ano
KJ939915	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011
KJ939914	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011
KJ939913	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011
KJ939912	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011
KJ939911	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011
KJ939910	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011
KJ939909	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011
KJ939908	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011
KJ939907	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011
KJ939906	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011
KJ939905	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011
KJ939904	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011
KJ939903	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011
KJ939902	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011
KJ939901	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011
KJ939900	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011
KJ939899	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011
KJ939898	<i>M. lathyroides</i>	Palmeira dos Índios - AL	2011

614
615**Tabela 3.** Hospedeiro, local, ano de coleta das amostras de *Macroptilium* spp., resultado da PCR com pares de *primers* universais e específicos para MacYSV e BGMV, clones e espécie viral.

Código Amostra	Hospedeiro	Local de Coleta	Ano de Coleta	PCR primers universais DNA-A	PCR primers especificos BGMV DNA-A	PCR primers especificos MacYSV DNA-A	Códigos Clones	Espécie
1MD	<i>Macroptilium</i> sp.	Marechal Deodoro/AL	2019	+	-	-	-	-
2MD	<i>Macroptilium</i> sp.	Marechal Deodoro/AL	2019	+	-	-	2MDC6P	<i>Macroptilium yellow vein virus</i>
3MD	<i>Macroptilium</i> sp.	Marechal Deodoro/AL	2019	+	-	-	-	-
4MD	<i>Macroptilium</i> sp.	Marechal Deodoro/AL	2019	-	-	-	-	-
5MD	<i>Macroptilium</i> sp.	Marechal Deodoro/AL	2019	+	-	-	5MDC6K	<i>Macroptilium yellow vein virus</i>
6MD	<i>Macroptilium</i> sp.	Marechal Deodoro/AL	2019	+	-	-	-	-
7MD	<i>Macroptilium</i> sp.	Marechal Deodoro/AL	2019	-	-	-	-	-
8MD	<i>Macroptilium</i> sp.	Marechal Deodoro/AL	2019	-	-	-	-	-
9MD	<i>Macroptilium</i> sp.	Marechal Deodoro/AL	2019	-	-	-	-	-
10MD	<i>Macroptilium</i> sp.	Marechal Deodoro/AL	2019	+	-	-	-	-
11MD	<i>Macroptilium</i> sp.	Marechal Deodoro/AL	2019	+	-	-	-	-
12MD	<i>Macroptilium</i> sp.	Marechal Deodoro/AL	2019	-	-	-	-	-
13MD	<i>Macroptilium</i> sp.	Marechal Deodoro/AL	2019	+	-	-	-	-
1M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	1MC1P	<i>Macroptilium yellow vein virus</i>
2M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	2MC3Xa	<i>Macroptilium yellow vein virus</i>
3M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	3MC2P	<i>Macroptilium yellow vein virus</i>
4M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	-	-
5M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	-	-
6M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	-	-
7M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	-	-
8M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	8MC8P	<i>Macroptilium yellow vein virus</i>
9M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	-	-
10M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	-	-
11M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	11MC4P	<i>Macroptilium yellow vein virus</i>
12M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	12MC2P	<i>Macroptilium yellow vein virus</i>
13M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	-	-
14M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	-	-

15M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	-	-
16M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	16MC5P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
17M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	-	-
18M	<i>Macroptilium</i> sp.	Matriz de Camaragibe/AL	2019	+	-	-	18MC11P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
2MC	<i>Macroptilium</i> sp.	Maceió/AL	2020	+	-	-	-	-
3MC	<i>Macroptilium</i> sp.	Maceió/AL	2020	+	-	-	3MCC6P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
4MC	<i>Macroptilium</i> sp.	Maceió/AL	2020	+	-	-	4MCC1P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
5MC	<i>Macroptilium</i> sp.	Maceió/AL	2020	+	-	-	5MCC9P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
6MC	<i>Macroptilium</i> sp.	Maceió/AL	2020	+	-	-	6MCC8P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
7MC	<i>Macroptilium</i> sp.	Maceió/AL	2020	+	-	-	-	-
8MC	<i>Macroptilium</i> sp.	Maceió/AL	2020	+	-	-	8MCC3P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
9MC	<i>Macroptilium</i> sp.	Maceió/AL	2020	+	-	-	9MCC5P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
10MC	<i>Macroptilium</i> sp.	Maceió/AL	2020	+	-	-	-	-
11MC	<i>Macroptilium</i> sp.	Maceió/AL	2020	+	-	-	11MCC4P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
13MC	<i>Macroptilium</i> sp.	Maceió/AL	2020	+	-	-	-	-
14MC	<i>Macroptilium</i> sp.	Maceió/AL	2020	+	-	-	14MCC9P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
15MC	<i>Macroptilium</i> sp.	Maceió/AL	2020	+	-	-	15MCC8P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
16MC	<i>Macroptilium</i> sp.	Maceió/AL	2020	+	-	-	16MCC15P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
1UP	<i>Macroptilium</i> sp.	União dos Palmares/AL	2020	+	-	-	-	-
2UP	<i>Macroptilium</i> sp.	União dos Palmares/AL	2020	+	-	-	2UPC3K	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
3UP	<i>Macroptilium</i> sp.	União dos Palmares/AL	2020	+	-	-	3UPC1P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
4UP	<i>Macroptilium</i> sp.	União dos Palmares/AL	2020	+	-	-	4UPC3P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
5UP	<i>Macroptilium</i> sp.	União dos Palmares/AL	2020	+	-	-	-	-
6UP	<i>Macroptilium</i> sp.	União dos Palmares/AL	2020	+	-	-	6UPC5P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
7UP	<i>Macroptilium</i> sp.	União dos Palmares/AL	2020	+	-	-	-	-
8UP	<i>Macroptilium</i> sp.	União dos Palmares/AL	2020	+	-	-	8UPC3P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
9UP	<i>Macroptilium</i> sp.	União dos Palmares/AL	2020	+	-	-	9UPC1P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
10UP	<i>Macroptilium</i> sp.	União dos Palmares/AL	2020	+	-	-	10UPC6K	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
11UP	<i>Macroptilium</i> sp.	União dos Palmares/AL	2020	+	-	-	11UPC8P	<i>Macroptilium</i> yellow vein virus
12UP	<i>Macroptilium</i> sp.	União dos Palmares/AL	2020	+	-	-	-	-
13UP	<i>Macroptilium</i> sp.	União dos Palmares/AL	2020	+	-	-	-	-
14UP	<i>Macroptilium</i> sp.	União dos Palmares/AL	2020	+	-	-	-	-
15UP	<i>Macroptilium</i> sp.	União dos Palmares/AL	2020	+	-	-	-	-

616
617
618

619 **Tabela 4.** *Open reading frames* (ORFs), com seus respectivos números de aminoácidos (aa), encontrados no DNA-A dos isolado deste trabalho.

Código Clone	DNA-A	CP	Rep	REn	TrAP	AA
2MDC6P	2623 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
5MDC6K	2623 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
1MC1P	2656 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
2MC3Xa	2656 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
3MC2P	2656 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
8MC8P	2656 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
11MC4P	2656 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
12MC2P	2656 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
16MC5P	2656 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
18MC11P	2656 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
3MCC6P	2623 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
4MCC1P	2623 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
5MCC9P	2623 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
6MCC8P	2623 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
8MCC3P	2623 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
9MCC5P	2623 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
11MCC4P	2623 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
14MCC9P	2623 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
15MCC8P	2623 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
16MCC15P	2623 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
2UPC3K	2622 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
3UPC1P	2623 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
4UPC3P	2622 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
6UPC5P	2623 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
8UPC3P	2623 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
9UPC1P	2622 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
10UPC6K	2622 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa
11UPC8P	2623 nt	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa

655 **Tabela 5.** Índices variabilidade genética das populações do begomovírus MacYVV infectando *Macroptilum lathyroides* em Alagoas. H – número de haplótipos; Hd – diversidade
 656 haplotípica; π – diversidade nucleotídica. PI – Palmeira dos Índios, UP1 – Isolados 3UPC1P, 6UPC5P, 8UPC3P e 11UPC8P de União dos Palmares, UP2 – Isolados 2UPC3K,
 657 4UPC3P, 9UPC1P e 10UPC6K de União dos Palmares, Mt – Matriz do Camaragibe, Mc – Maceió e MD – Marechal Deodoro.

População	Nº de isolados	H	Hd	π
MacYVV – PI	18	11	0,90850	0,00198
MacYVV – Mc + UP1	15	13	0,97143	0, 00603
MacYVV – Mt	8	7	0,96429	0,00667
MacYVV – UP2	4	3	0,83333	0,00038
McaYVV – MD	2	2	1,00000	0,00229
MacYVV total	47	36	0,98242	0,02791

658
 659
 660
 661
 662
 663
 664
 665
 666
 667
 668
 669
 670
 671
 672
 673
 674
 675
 676

677 **Tabela 6.** Diferenciação genética entre subpopulações de MacYVV. UP1 – Isolados 3UPC1P, 6UPC5P, 8UPC3P e 11UPC8P de União dos Palmares, UP2 – Isolados 2UPC3K,
 678 4UPC3P, 9UPC1P e 10UPC6K de União dos Palmares, Mt – Matriz do Camaragibe, Mc – Maceió, MD – Marechal Deodoro, PI1 – Isolados KJ939898, KJ939899, KJ939905,
 679 KJ939908, KJ939910, KJ939912, KJ939913 e KJ939914 de Palmeira dos Índios e PI2 – Isolados KJ939900, KJ939901, KJ939902, KJ939903, KJ939904, KJ939906,
 680 KJ939907, KJ939909, KJ939911 e KJ939915 PI2 – KJ939900, KJ939901, KJ939902, KJ939903, KJ939904, KJ939906, KJ939907, KJ939909, KJ939911 e KJ939915.

Comparação Subpopulação	F_{ST}
Mc + UP1 vs MD	0,82651
Mc + UP1 vs Mt	0,88066
Mc + UP1 vs UP2	0,88378
Mc + UP1 vs PI1	0,85913
Mc + UP1 vs PI2	0,83845
MD vs Mt	0,90949
MD vs UP2	0,94891
MD vs PI1	0,95458
MD vs PI2	0,93687
Mt vs UP2	0,94075
Mt vs PI1	0,93530
Mt vs PI2	0,92500
UP2 vs PI1	0,99036
UP2 vs PI2	0,97509
PI1 vs PI2	0,71913

681
 682
 683
 684
 685
 686
 687
 688

689 **Tabela 7.** Eventos de recombinação detectados na população de MacYVV infectando *Macroptilum* spp. em Alagoas.

Evento	Começo	Fim	Recombinante	Maior Parental	Menor Parental	RDP	GENECONV	BootScan	MaxChi	Chimaera	SiScan	3Seq
1	219	782	2UPC3K	8MCC3P	NC*	1,229e ⁻⁴	9,125e ⁻⁴	6,561e ⁻⁵	8,395e ⁻⁹	9,876e ⁻⁷	9,443e ⁻²⁴	1,806e ⁻⁶
	187	782	4UPC3P									
	187	782	9UPC1P									
	187	782	10UPC6K									
2	1848	2201	2MDC6P	2UPC3K	NC*	1,971e ⁻²	3,8920e ⁻²	-	8,076e ⁻⁴	8,485e ⁻⁴	3,337e ⁻²	1,830e ⁻²
	1767	2001	5MDC6K									

690 NC* – Não conhecido

691
692
693

Tabela 8. Sítios selecionados positiva e negativamente nas ORFs CP e Rep da população de MacYVV.

População	ORF*	Tajima's <i>D</i>	Fu and Li's <i>D</i>	Fu and Li's <i>F</i>	dN/dS
MacYVV (Total)	CP	-0,25311 (ns)	0,37168 (ns)	0,17122 (ns)	0,0349
	REP	0,21776 (ns)	0,21212 (ns)	0,25594 (ns)	0,0341
MacYVV – PI	CP	-0,15908 (ns)	-1,07294 (ns)	-0,70534 (ns)	0,0067
	REP	-1,24649 (ns)	-1,72671 (ns)	-1,83617 (ns)	0,0046
MacYVV – Mc + UP1	CP	-0,08071 (ns)	-0,38210 (ns)	-0,34400 (ns)	0,0109
	REP	-1,10938 (ns)	-1,65090 (ns)	-1,72638 (ns)	0,0103
MacYVV – Mt	CP	-0,83815 (ns)	-1,07294 (ns)	-1,12959 (ns)	0,0162
	REP	-1,00360 (ns)	-0,87259 (ns)	-1,00511 (ns)	0,0141

694 *Rep, Replication-associated protein; CP, Coat protein.
695 (ns), valores não significativos a $P > 0,10$

3.6 REFERÊNCIAS

- Ali, A.; Li, H.; Schneider, W.L.; Sherman, D.J.; Gray, S.; Smith, D.; Roossinck, M.J. Analysis of genetic bottlenecks during horizontal transmission of Cucumber mosaic virus. **Journal of Virology**, v. 80, p. 8345-8350, 2006.
- Ali, A.; Roossinck, M.J. Genetic bottlenecks. In: ROOSSINCK, M.J. (Ed.). **Plant Virus Evolution**: Springer, p. 123-131, 2008.
- Altschul S.F., et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, 403-410, 1990.
- Amarakoon, I.I.; Roye, M.E.; Briddon, R.W.; Bedford, I.D.; Stanley, J. Molecular and biological characterization of *Macrotidium yellow mosaic virus* from Jamaica. **Plant Pathology**, v. 57, p. 417-426, 2008.
- Barbosa-Feverieiro, V.P. *Macrotidium (Bentham) Urban do Brasil (Leguminosae Faboideae – Phaseoleae – Phaseolinae)*. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 28, 1986.
- Briddon, R.W. et al. Effects of genetic changes to the begomovirus/betasatellite complex causing cotton leaf curl disease in South Asia post-resistance breaking. **Virus Research**, v. 186, p. 114-119, 2014.
- Brown, J.K. et al. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. **Archives of Virology**, v. 160, p. 1593-1619, 2015.
- Castillo-Urquiza, G.P. et al. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, v. 153, p. 1985-1989, 2008.
- Darriba, D.; Posada, D.; Kozlov, A. M.; Stamatakis, A.; Morel, B.; Flouri, T. ModelTest-NG: A New and Scalable Tool for the Selection of DNA and Protein Evolutionary Models. **Mol. Biol. Evol.**, 37:291–294, 2020.
- Dolan, P.T.; Whitfield, Z.J.; Andino, R. Mechanisms and concepts in RNA virus population dynamics and evolution. **Annual Review of Virology**, v. 5, p. 69-92, 2018.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- Earl, D. A.; Vonholdt, B. M. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.
- Escriu, F. Diversity of Plant Virus Populations: A Valuable Tool for Epidemiological Studies. In: BITZ, L. (Org.). **Genetic Diversity**. IntechOpen, 2017. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/genetic-diversity/diversity-of-plant-viruspopulations-a-valuable-tool-for-epidemiological-studies>.
- Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.
- 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*

- 737 *lycopersicum*) and *Sida* spp., respectively. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 42, n.
738 1, p. 39-45, 2017.
- 739 French, R.; Stenger, D.C. Population structure within lineages of Wheat streak mosaic
740 virus derived from a common founding event exhibits stochastic variation inconsistent
741 with the deterministic quasi-species model. **Virology**, v. 343, p. 179-189, 2005.
- 742 González-Aguilera, J. et al. Genetic structure of a Brazilian population of the
743 begomovirus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). **Tropical Plant Pathology**, v. 37, p.
744 346-353, 2012.
- 745 Hosseinzadeh, M. R. et al. Phylogenetic relationships, recombination analysis, and
746 genetic variability among diverse variants of *Tomato yellow leaf curl virus* in Iran and the
747 Arabian Peninsula: further support for a TYLCV center of diversity. **Archives of**
748 **Virology**, v. 159, n. 3, p. 485-497, 2014.
- 749 Huson, D. H.; Bryant, D. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies.
750 **Molecular Biology and Evolution**, 23(2):254-267, 2006.
- 751 Idris, A.M. et al. Two newly described begomoviruses of *Macroptilium lathyroides* and
752 common bean. **Phytopathology**, v. 93, n. 7, p. 774-783, 2003.
- 753 Idris, A.M.; BROWN, J.K. Molecular analysis of *Cotton leaf curl virus-Sudan* reveals an
754 evolutionary history of recombination. **Virus Genes**, v. 24, p. 249-256, 2002.
- 755 Inoue-Nagata, A.K. et al. A simple method for cloning the complete begomovirus genome
756 using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, v.
757 116, p. 209-211, 2004.
- 758 Jombart, T.; Devillard, S.; Balloux, F. Discriminant analysis of principal components: a
759 new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC Genet.** 2010.
- 760 Jombart. T.; Ahmed, I. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP
761 data. **Bioinformatics**. 2011.
- 762 Kozlov, A. M., Darriba, D.; Flouri, T.; Morel B; Stamatakis, A. RAxML-NG: a fast,
763 scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference.
764 **Bioinformatics** 35:4453–4455, 2019.
- 765 Kumar, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing
766 platforms. **Mol Biol Evol** 35, 2018.
- 767 Lefeuvre, P. et al. Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands:
768 Molecular diversity and evolution through recombination. **Journal of General Virology**,
769 v. 88, p. 3458-3468, 2007.
- 770 Lemos, P.P.F. **Genetic variability of the begomoviruses *Euphorbia yellow mosaic***
771 **virus and *Macroptilium yellow vein virus* in their respective natural hosts, *Euphorbia***
772 ***heterophylla* and *Macroptilium lathyroides*.** (Dissertação de mestrado). Universidade
773 Federal de Viçosa (UFV), 2013.
- 774 Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA
775 polymorphism data. **Bioinformatics**. 2009.
- 776 Lima, A. T. M. et al. Synonymous site variation due to recombination explains higher
777 genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. **Journal of**
778 **General Virology**, v. 94, p. 418-431, 2013.

- 779 Lima, A. T. M.; Silva, J. C. F.; Silva, F. N.; Castillo-Urquiza, G. P.; Silva, F. F.; Seah, Y.
780 M.; Mizubuti, E. S. G.; Duffy, S.; Zerbini, F. M. The diversification of begomovirus
781 populations is predominantly driven by mutational dynamics. **Virus Evol.** 2017.
- 782 Luna, I. M. S. C. **Diversidade genética de begomovírus associados a fava cultivadas**
783 **em sistema de produção familiar em Alagoas** (Dissertação de mestrado). Universidade
784 Federal de Alagoas (UFAL), 2023.
- 785 Martin, D. P.; Varsani, A.; Roumagnac, P.; Botha, G.; Maslamoney, S.; Schwab, T.; Kelz,
786 Z.; Kumar, V.; Murrell, B. RDP5: a computer program for analyzing recombination in,
787 and removing signals of recombination from, nucleotide sequence datasets. **Virus**
788 **Evolution**, 2020.
- 789 Martin, D. P. et al. Complex recombination patterns arising during geminivirus
790 coinfections preserve and demarcate biologically important intra-genome interaction
791 networks. **PLoS Pathog** 7, e1002203, 2011.
- 792 Mccrone, J. T.; LAURING, A. S. Genetic bottlenecks in intraspecies virus transmission.
793 **Current Opinion in Virology**, v. 28, p. 20-25, 2018.
- 794 Melo, A. M. et al. *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus*: a novel begomovirus
795 infecting euphorbiaceous plants in Brazil. **Archives of Virology**, v. 161, n. 9, p. 2605-
796 2608, 2016.
- 797 Mendes, A. L. S. F. et al. High molecular diversity and divergent subpopulations of the
798 begomovirus *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* associated with *Cnidoscolus*
799 *urens*. **Archives of Virology**, v. 166, p. 3289-3299, 2021.
- 800 Miller, M. A. et al. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large
801 phylogenetic trees. In: **Gateway Computing Environments Workshop**, 14., 2010, New
802 Orleans. Proceedings... New Orleans, p. 1-8, 2010.
- 803 Monci, F. et al. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl*
804 *Sardinia* virus and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype
805 and is becoming prevalent in Spanish populations. **Virology**, v. 303, p. 317-326, 2002.
- 806 Morales, F.J. History and current distribution of begomoviruses in Latin America.
807 *Advances in Virus Research*, v. 67, p. 127-162, 2006.
- 808 Muhire, B. M.; Varsani, A.; Martin, D. P. SDT: a virus classification tool based on
809 pairwise sequence alignment and identity calculation. **Plos One**, v. 9, n. 9, p. e108277,
810 2014.
- 811 Navas-Castillo, J.; Fiallo-Olivé, E.; Sánchez-Campos, S. Emerging virus diseases
812 transmitted by whiteflies. **Annual Review of Phytopathology** v. 49, p. 219-248, 2011.
- 813 Novella, I. S.; Duarte, E. A.; Elena, S. F.; Moya, A.; Domingo, E.; Holland, J. J.
814 Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions.
815 **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 92, p. 5841-5844, 1995.
- 816 Passos, L. S. et al. Complete genome sequence of a new bipartite begomovirus infecting
817 *Macroptilium lathyroides* in Brazil. **Archives of Virology**, 162:3551–3554, 2017.
- 818 Prasanna, H. C. et al. The population genomics of begomoviruses: global scale population
819 structure and gene flow. **Virology Journal**, v. 7, p. 220, 2010.

- 820 Prasanna, H. C.; RAI, M. Detection and frequency of recombination in tomato-infecting
821 begomoviruses of South and Southeast Asia. **Virology Journal**, v. 4, p. 111, 2007.
- 822 Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. Inference of population structure using
823 multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.
- 824 Ramos, L. A. et al. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores.
825 **Química Nova**, 29, 1114, 2006.
- 826 Ramos-Sobrinho, R. et al. Contrasting genetic structure between two begomoviruses
827 infecting the same leguminous hosts. **Journal of General Virology**, v.95, n. Pt 11, p.
828 2540-2552, 2014.
- 829 Rocha, C. S. et al. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly
830 evolving, and segregated based on geographical location. **Journal of Virology**, v. 87, p.
831 5784-5799, 2013.
- 832 Rodríguez-Negrete Ea, Morales-Aguilar Jj, Domínguez-Duran G, Torres-Devora G,
833 Camacho-Beltrán E, Leyva-López Ne, Voloudakis Ae, Bejarano Er, Méndez-Lozano J.
834 High-Throughput Sequencing Reveals Differential Begomovirus Species Diversity in
835 Non-Cultivated Plants in Northern-Pacific Mexico. **Viruses**, 11(7):594, 2019.
- 836 Rojas, M. R. et al. World management of geminiviruses. **Annual Review of**
837 **Phytopathology**, v. 56, p. 637-677, 2018.
- 838 Rojas, M.R.; Gilbertson, R.L.; Maxwell, D.P. Use of degenerate primers in the
839 polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**,
840 77: 340-347, 1993.
- 841 Rojas, M.R.; Hagen, C.; Lucas, W.J.; Gilbertson, R.L. Exploiting chinks in the plant's
842 armor: Evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**,
843 v. 43, p. 361-394, 2005.
- 844 Roossinck, M.J. Symbiosis, mutualism and symbiogenesis. **Plant Virus Evolution**.
845 Springer, 2008.
- 846 Sambrook J.; Russel D. Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3^a ed.). **Cold Spring**
847 **Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- 848 Seal, S. E. et al. Begomovirus evolution and disease management. **Advances in Virus**
849 **Research**, v. 67, p. 297-316, 2006.
- 850 Silva, S. J. C. et al. High genetic variability and recombination in a begomovirus
851 population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil. **Archives**
852 **of Virology**, v. 156, n. 12, p. 2205-2213, 2011.
- 853 Silva, S. J. C. et al. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus
854 populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 61,
855 p. 457–467, 2012.
- 856 Snak, C., Ribeiro, C.L., Delgado-Salinas, A. *Macropitium in Flora e Funga do Brasil*.
857 Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em:
858 <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB29785>>. Acesso em: 30 jan. 2024.
- 859 Varsani, A. et al. Capulavirus and Grablovirus: two new genera in the Family
860 *Geminiviridae*. **Archives of Virology**, p. 1-13, 2017.

- Varsani, A. et al. Establishment of three new genera in the family *Geminiviridae*: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. **Archives of Virology**, Springer Vienna, v. 159, p. 2193-2203, 2014.
- Venkataravanappa V., Prasanna H. C., Reddy C. N. L., Reddy M. K. Evidence for two predominant viral lineages, recombination and subpopulation structure in begomoviruses associated with yellow vein mosaic disease of okra in India. **Plant Pathology**. 64, 508–518, 2014.
- Xavier, C. A. D.; Godinho, M. T.; Mar, T. B.; Ferro, C. G.; Sande, O. F. L.; Silva, Jc, Ramos-Sobrinho, R.; Nascimento, R. N.; Assunção, I.; Lima, G. S. A.; Lima, A. T. M.; Zerbini F. M. Evolutionary dynamics of bipartite begomoviruses revealed by complete genome analysis. **Molecular Ecology**, 2021.
- Wang, H.; Huang, L.F.; Cooper, J.I. Analyses on mutation patterns, detection of population bottlenecks, and suggestion of deleterious-compensatory evolution among members of the genus Potyvirus. **Archives of Virology**, New York, v. 151, p. 1625- 1633, 2006.
- Wright, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, n. 4, p. 323-354, 1951.
- Wyant, P.S.; Gotthardt, D.; Schafer, B.; Krenz, B.; Jeske, H. The genomes of four novel begomoviruses and a new *Sida micrantha mosaic virus* strain from Bolivian weeds. **Archives of Virology**, v. 156, p. 347-352, 2011.
- Zhou, X.; Liu, Y.; Calvert, L.; Munoz, C.; Otim-Nape, G.W.; Robinson, D.J.; Harrison, B.D. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2101-2111, 1997.

4 CAPÍTULO II

PRIMEIRO RELATO DE *Tomato interveinal chlorosis virus* EM *Rhynchosia minima*

RESUMO

Begomovirus (família *Geminiviridae*) representam um sério problema para várias culturas de importância econômica devido as doenças que causam. Este gênero é também comumente associado a uma ampla gama de plantas não-cultivadas que podem servir como fonte de inóculo para epidemias em culturas agrícolas. Com isso, o objetivo desse estudo foi a identificação das espécies de begomovírus infectando *Rhynchosia minima*. Inicialmente, foi realizada a extração de DNA total de plantas de *R. minima* apresentando sintomas de infecção por begomovírus. Aliquotas do DNA foram utilizadas para realizar a detecção, a nível de gênero, através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers universais PAL1v1978 e PAR1c496. As amostras PCR-positivas foram utilizadas para obter genomas virais completos por meio da amplificação por círculo rolante (ACR), clonagem em vetores plasmidiais e sequenciamento Sanger. Um total de quatro clones foram obtidos, e comparações pareadas de sequências do DNA-A indicaram que os novos isolados possuíam 94% de identidade nucleotídica com isolados do begomovírus *tomato interveinal chlorosis virus* (ToICV), que foram originalmente descritos como *Macropodium yellow net virus* (MacYNV). A análise filogenética mostrou que os isolados formaram um clado monofilético com ToICV, corroborando com os resultados das comparações pareadas. Evidências de recombinação interespecíficas foram observadas entre os novos isolados e begomovírus que infectam *Macropodium* spp., tomate (*Solanum lycopersicum*) e soja (*Glycine max*). ToICV já foi descrito infectando plantas de tomate e *Macropodium* sp. *Rhynchosia minima* foi previamente descrita como hospedeira de begomovírus em países como Equador, Porto Rico, Estados Unidos, Cuba, México e Paquistão, porém esse constitui o primeiro relato no Brasil.

Palavras-chave: *Geminiviridae*, plantas daninhas, begomovírus.

ABSTRACT

Begomoviruses (family *Geminiviridae*) represent a serious problem for several crops of economic importance due to the diseases they cause. This genus is also commonly associated with a wide range of non-cultivated plants that can serve as a source of inoculum for epidemics in agricultural crops. Therefore, the objective of this study was to identify the species of begomovirus infecting *Rhynchosia minima*. Initially, total DNA was extracted from *R. minima* plants showing symptoms of begomovirus infection. Aliquots of the DNA were used to perform detection, at the genus level, through polymerase chain reaction (PCR) using the universal primers PAL1v1978 and PAR1c496. PCR-positive samples were used to obtain complete viral genomes through rolling circle amplification (RCA), cloning into plasmid vectors and Sanger sequencing. A total of four clones were obtained, and pairwise comparisons of A-DNA sequences indicated that the new isolates had 94% nucleotide identity with isolates of the begomovirus *tomato interveinal chlorosis virus* (ToICV), which were originally described as *Macrottilium yellow net virus* (MacYNV). Phylogenetic analysis showed that the isolates formed a monophyletic clade with ToICV, corroborating the results of paired comparisons. Evidence of interspecific recombination was observed between the new isolates and begomoviruses that infect *Macrottilium* spp., tomato (*Solanum lycopersicum*) and soybean (*Glycine max*). ToICV has already been described infecting tomato plants and *Macrottilium* sp. *Rhynchosia minima* was previously described as a host for begomovirus in countries such as Ecuador, Puerto Rico, the United States, Cuba, Mexico and Pakistan, but this is the first report in Brazil.

Keywords: *Geminiviridae*, weeds, begomoviruses.

4.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Begomovirus* é um dos 14 gêneros que compõem a família *Geminiviridae* (Fiallo-Olivé et al., 2021). São transmitidos para plantas dicotiledôneas por um complexo de espécies crípticas da mosca-branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (Brown et al., 2015). Estes vírus podem ser mono- ou bissegmentados (DNA-A e DNA-B) com genoma de DNA circular de fita simples (ssDNA), encapsidados em partículas icosaédricas geminadas (Fiallo-Olivé et al., 2021). Infecções causadas por begomovírus tem como principais sintomas mosaico intenso, deformações foliares como enrolamento e bolhosidade e diminuição do crescimento das plantas ou nanismo (Mondal et al., 2019).

Begomovírus são importantes fitopatógenos de plantas cultivadas devido a ampla gama de hospedeiras e as grandes perdas econômicas que podem causar. Além disso, muitas espécies de plantas não-cultivadas têm sido descritas como hospedeiras desses vírus (Castillo-Urquiza et al., 2008; Silva et al., 2012; Lima et al., 2013; Rocha et al., 2013; Ramos-Sobrinho et al., 2014), o que reforça a importância dessas plantas como reservatórios e fontes de inóculo desses patógenos (Pinto et al., 2016). As espécies comumente relatadas como hospedeiras pertencem às famílias botânicas *Malvaceae*, *Euphorbiaceae* e *Fabaceae* (Morales; Anderson, 2001).

O gênero *Rhynchosia* (família *Fabaceae*) possui cerca de 230 espécies, das quais 55 são endêmicas de áreas tropicais e subtropicais, consideradas centros de diversidade do grupo. No Brasil, foram descritas 22 espécies, com algumas sendo utilizadas como medicinais ou na alimentação humana e animal (Allem; Valls, 1987; Burkart, 1987; Lewis et al., 2005; Perez et al., 2020). Algumas espécies de *Rhynchosia* já foram descritas como hospedeiras de begomovírus ao redor do mundo. *Rhynchosia golden mosaic Havana virus* (RhGMHaV) e *Rhynchosia rugose golden mosaic virus* (RhRGMV) foram relatados em Cuba, *Rhynchosia golden mosaic Sinaloa virus* (RhGMSV) no México, *Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus* (RhGMYuV) na Jamaica e no México, *Rhynchosia mild mosaic virus* (RhMMV) em Porto Rico, *Rhynchosia yellow mosaic virus* (RhYMV) no Paquistão, *Rhynchosia yellow mosaic India virus* (RhYMIV) na Índia, *cabbage leaf curl virus* (CabLCV) no Equador, *mungbean yellow mosaic virus* (MYMV) no Paquistão e *pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) nos Estados Unidos (Fiallo-Olive et al., 2010; Hernandez-Zepeda et al., 2010; Ilyas et al., 2009; Jyothsna; Rawat; Malathi, 2011; Hou et al., 1996; Ilyas et al., 2010; Fiallo-Olivé et al., 2018). Até o

momento, nenhum begomovírus foi relatado infectando plantas de *Rhynchosia* spp. no Brasil.

O begomovírus *tomato interveinal chlorosis virus* (ToICV) tem sido descrito infectando tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e *Macroptilium lathyroides* nos estados de Alagoas e Pernambuco há mais de uma década (Albuquerque et al, 2012; Silva et al., 2012). Originalmente, os isolados de ToICV associados a plantas de *M. lathyroides* foram identificados como *Macroptilium yellow net virus* (MacYNV), porém esses isolados foram reclassificados como pertencentes à espécie *Tomato interveinal chlorosis virus*. Infelizmente, poucos são os trabalhos que abordam a importância desses vírus infectando hospedeiras leguminosas.

A alta diversidade genética que existe em *Begomovirus* que infectam plantas cultivadas e/ou não-cultivadas no Brasil é comumente explicada pela ocorrência de eventos de recombinação e pseudorecombinação entre begomovírus em infecções mistas, o que contribui para o surgimento de novas espécies virais (Ambrozevicius, et al, 2002, Zhou et al., 1997; Fondong et al., 2000; Ramos-Sobrinho et al., 2014). A identificação de espécies virais em novos hospedeiros é de extrema importância, pois fornece informações cruciais para o estabelecimento de estratégias mais eficazes no manejo da doença. Portanto, o objetivo desse trabalho foi identificar as possíveis espécies de begomovírus infectando *Rhynchosia minima*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Coleta do material vegetal

Amostras foliares de *Rhynchosia minima* apresentando sintomas indicativos de infecção por begomovírus (mosaico, deformação foliar e nanismo) foram coletadas no município de Novo Lino, estado de Alagoas, em 2020 (Figura 1). O material vegetal foi armazenado na forma de exsiccatas ou congelado em ultrafreezer a -80°C no Laboratório de Fitopatologia Molecular do Centro de Engenharias e Ciências Agrárias (CECA), Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

4.2.2 Extração de DNA e detecção de begomovírus

O DNA total foi extraído, individualmente, de acordo com o método CTAB (Doyle; Doyle, 1987) e utilizado como molde em reações de amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para detecção do gênero *Begomovirus*. Para tanto, foram

utilizados os primers universais que amplificam parte do componente genômico DNA-A, PALIV1978 (GCATCTGCAGGCCCACTYGTCTTYCCNGT) e PARlc496 (AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG) (Rojas et al., 1993). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 15 µL contendo 1,5 µL de tampão 10X PCR, 1,2 µL da mistura de dNTPs a 10 mM, 1 µL de cada oligonucleotídeo a 10 µM, 10 ng do DNA molde, e uma unidade de *Taq* DNA Polymerase, completando-se o volume com água ultrapura. As condições de termociclagem consistiram em um passo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos, seguindo de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1% sob luz UV.

4.2.3 Clonagem e sequenciamento do genoma completo de begomovírus

Após a detecção pelo método de PCR, as amostras foram usadas como molde para amplificação dos genomas virais pelo método RCA (*Rolling Circle Amplification*) (Inoue-Nagata et al., 2004). Os produtos da RCA foram clivados com a endonuclease *Hind*III e analisados em géis de agarose (0,8%). Alíquotas das reações de clivagem que apresentaram um fragmento de aproximadamente 2.600 nucleotídeos, correspondendo aos componentes DNA-A ou DNA-B de begomovírus bipartidos, foram clonadas no vetor plasmidial pBluescript-KS+ (Stratagene), previamente clivado com a mesma enzima e defosforilado. Os plasmídeos recombinantes foram transformados em *Escherichia coli* DH5α por eletroporação (Sambrook; Russel, 2001). Colônias contendo os possíveis plasmídeos recombinantes foram repicadas para meio LB líquido contendo ampicilina (*Ampicilin, sodium salt* USB[®]) e incubadas a 37°C sob agitação orbital de 180 rpm por 16h. Após incubação, as culturas foram submetidas à extração de DNA plasmidial com o kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep (Cellco), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. 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. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Ecologia e Evolução de Vírus (LEEV) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os clones confirmados foram completamente sequenciados na MacroGen Inc. (Seul, Coreia do Sul) pelo método de Sanger.

4.2.4 Análise de sequências e demarcação de espécies

As sequências completas do DNA-A foram montadas utilizando o programa *CodonCode Aligner* v.10.0.3 (www.codoncode.com) e organizadas para iniciar no ponto de clivagem do nonanucleotídeo conservado (5'-TAATATT//AC-3'). As sequências obtidas foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLASTn (Altschul et al., 1990) e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para determinar as espécies virais com as quais elas compartilham maior identidade de sequência. As sequências mais similares obtidas a partir do GenBank, juntamente com sequências de begomovírus do Velho e do Novo Mundo (Tabela 3), foram utilizadas para demarcação de espécie dos novos isolados de begomovírus utilizando-se o programa *Sequence Demarcation Tool* (SDT) v.1.2 (Muhire et al., 2014). Para demarcação de espécies no gênero *Begomovirus*, foi utilizado o critério de identidade $\geq 91\%$ para sequências completas de DNA-A estabelecido pelo *Geminiviridae Study Group* do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) (Brown et al., 2015).

4.2.5 Alinhamento e análises filogenéticas

Alinhamentos múltiplos das sequências nucleotídicas dos novos isolados, e das espécies obtidas a partir do GenBank (Tabela 1 e 3), foram preparados através do algoritmo MUSCLE implementado no pacote MEGA 11 (Kumar et al., 2018) e ajustados manualmente. Árvore filogenética para o conjunto de dados DNA-A foi construída utilizando-se o método de Máxima Verossimilhança (ML) com a software RaxML-NG (Kozlov et al., 2019), disponibilizado no web-portal CIPRES (Miller et al., 2010), com 1.000 réplicas de *bootstrap*. Os modelos de substituição de nucleotídeos e distribuição de heterogeneidade foram escolhidos com o auxílio do programa MrModelTest-NG (Darriba et al., 2020), sendo GTR+I+G4 o melhor modelo. A árvore foi visualizada e editada nos programas FigTree v.1.4 (tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree) e CorelDRAW 2021.

4.2.6 Análise de recombinação

Possíveis sequências parentais e pontos (*breakpoints*) de recombinação no DNA-A dos isolados de ToICV foram determinados utilizando-se os métodos RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan e 3Seq, implementados no pacote RDP5 (Martin et al., 2020). Os alinhamentos foram analisados com configurações padrão para os diferentes métodos e a significância estatística foi inferida por um *P valor* menor

que o valor de corte de Bonferroni corrigido de 0,05. Os eventos de recombinação detectados por pelo menos cinco métodos foram considerados confiáveis.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Detecção de begomovírus via *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Foram coletadas 15 amostras foliares, a partir de plantas de *Rhynchosia minima* apresentando sintomas típicos de infecção por begomovírus (Figura 1; Tabela 1), no município de Novo Lino, estado de Alagoas. O par de oligonucleotídeos PAL1v1978/PAR1c496 (Rojas et al., 1993) direcionou a amplificação de um fragmento com aproximadamente 1,2 kb na maioria das amostras analisadas no presente trabalho, mostrando que 12 de 15 plantas estavam infectadas por *Begomovirus* (dados não mostrados).

4.3.2 Análises de sequências e demarcação de espécie

Foram obtidos quatro clones correspondentes ao componente genômico DNA-A (Tabela 1). Com base nos critérios estabelecidos para demarcação de espécies dentro do gênero *Begomovirus* (Brown et al., 2015), a análise de comparações pareadas de sequências nucleotídicas do DNA-A mostrou que todos os isolados pertencem a uma única espécie, *Tomato interveinal chlorosis virus* (Figura 2). Os isolados apresentaram maiores identidades de sequências com isolados de ToICV, variando entre 92,4-94,7%.

A organização genômica dos isolados foi típica de begomovírus do Novo Mundo, com as ORFs (*Open Reading Frames*) responsáveis por codificar as proteínas CP (capa proteica), Rep (proteína associada à replicação), REn (proteína potenciadora da replicação), TrAP (proteína ativadora da transcrição) e AC4 apresentando o tamanho esperado para a espécie (Tabela 2).

4.3.3 Análise filogenética

O relacionamento filogenético foi realizado com base no DNA-A dos isolados obtidos no trabalho juntamente com 61 sequências pertencentes ao mesmo gênero (Figura 3; Tabela 1 e 3). Os begomovírus do Velho Mundo *tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *African cassava mosaic virus* (ACMV), *cotton leaf curl virus* (CLCuV) e *Rhynchosia yellow mosaic virus* (RhYMV) foram utilizados como *outgroup*. Analisando a árvore de ML, foi possível observar que os novos isolados formaram um grupo

monofilético com outras sequência de ToICV (Figura 3). Este agrupamento corrobora os resultados do SDT, e confirma que os isolados obtidos de *Rhynchosia minima* realmente pertencem à espécie ToICV.

4.3.4 Análise de recombinação

Evidências de recombinação interespecíficas foram observadas entre os isolados de ToICV (Tabela 3). Um evento de recombinação foi detectado nos isolados 6NLC10H, 7NLC1H, 10NLC12H e 11NLC2H, com MacYVV como maior parental e *tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) como menor parental, e *breakpoints* de recombinação localizadas na região codificadora da Rep (Tabela 4). Um segundo evento independente foi detectado nos isolados 7NLC1H, 10NLC12H e 11NLC2H, com *soybean blistering mosaic virus* (SbBMV) como maior parental e com menor parental desconhecido. Os *breakpoints* de recombinação também foram identificados na região codificadora da Rep (Tabela 4).

4.4 DISCUSSÃO

Vários estudos mostram a importância dos begomovírus como fitopatógenos de plantas cultivadas devido ao fato de infectarem diversas hospedeiras e gerarem perdas econômicas significativas. Entretanto, muitas espécies de plantas não-cultivadas também têm sido descritas como hospedeiras de begomovírus em vários locais do mundo (Castillo-Urquiza et al., 2008; Silva et al., 2012; Lima et al., 2013; Rocha et al., 2013; Ramos-Sobrinho et al., 2014), com alguns desses vírus sendo capazes de infectar plantas cultivadas (Idris et al., 1999; Fernandes et al., 2009; Fernandes et al., 2011; Barbosa et al., 2012; Barreto et al., 2013; Lima et al., 2013; Rocha et al., 2013; Ramos-Sobrinho et al., 2014).

Um caso de begomovírus de planta não-cultivada que emergiu para plantas cultivadas é o da espécie *Macroptilium yellow spot virus*, que foi descrita pela primeira vez em plantas de *Macroptilium* sp. no estado de Alagoas (Silva et al., 2012) e, em seguida, foi detectada em cultivos de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) e feijão-fava (*Phaseolus lunatus*) no mesmo estado (Ramos-Sobrinho et al., 2014).

O *Tomato interveinal chlorosis virus* é um begomovírus que foi primeiramente descrito por Albuquerque et al. em plantas de tomate no estado de Pernambuco em 2012. No mesmo ano, Silva et al. (2012) detectaram a presença de ToICV em *Macroptilium* sp.

no estado de Alagoas, porém esses isolados foram originalmente descritos como *Macropitilium yellow net virus* (MaYNV). No presente trabalho, ToICV foi encontrado em plantas sintomáticas de *Rhynchosia minina* em Alagoas. Esta espécie de planta não-cultivada da família *Fabaceae* é endêmica de áreas tropicais e subtropicais (Perez et al. 2020), e já foi descrita como hospedeira de begomovírus em países como Equador, Porto Rico, Estados Unidos, Cuba, México e Paquistão (Fiallo-Olive et al., 2018; Idris et al., 2003; Hou et al., 1996; Fiallo-Olive et al., 2010; Ilyas et al., 2009). Entretanto, *Rhynchosia minina* ainda não havia sido descrita como hospedeira de begomovírus no Brasil.

A recombinação, especialmente interespecífica, possui importante papel no processo evolutivo de populações de vírus de plantas (Harrison; Robinson, 1999; Lima et al., 2017), pois é frequentemente relacionada ao surgimento e emergência de novas espécies virais (Padidam et al., 1999; Lima et al., 2017). Possíveis eventos de recombinação interespecífica foram encontrados para os isolados de ToICV tendo como parentais begomovírus que infectam *Macroptilium* spp., tomate e soja, mostrando que esses eventos são importantes para os begomovírus, pois podem contribuir para a diversidade genética dos vírus, permitindo-lhes se adaptarem a novos ambientes e hospedeiros.

Plantas não-cultivadas tem papel muito importante como reservatórios e fontes de inóculo para begomovírus (Pinto et al., 2016), o que as torna uma séria ameaça para outras culturas economicamente importantes. Por isso, compreender a relação desses fitovírus na interação entre agroecossistemas e ecossistemas naturais é fundamental para entender o surgimento de begomovírus e como eles evoluem ao passar do tempo.

4.5 CONCLUSÕES

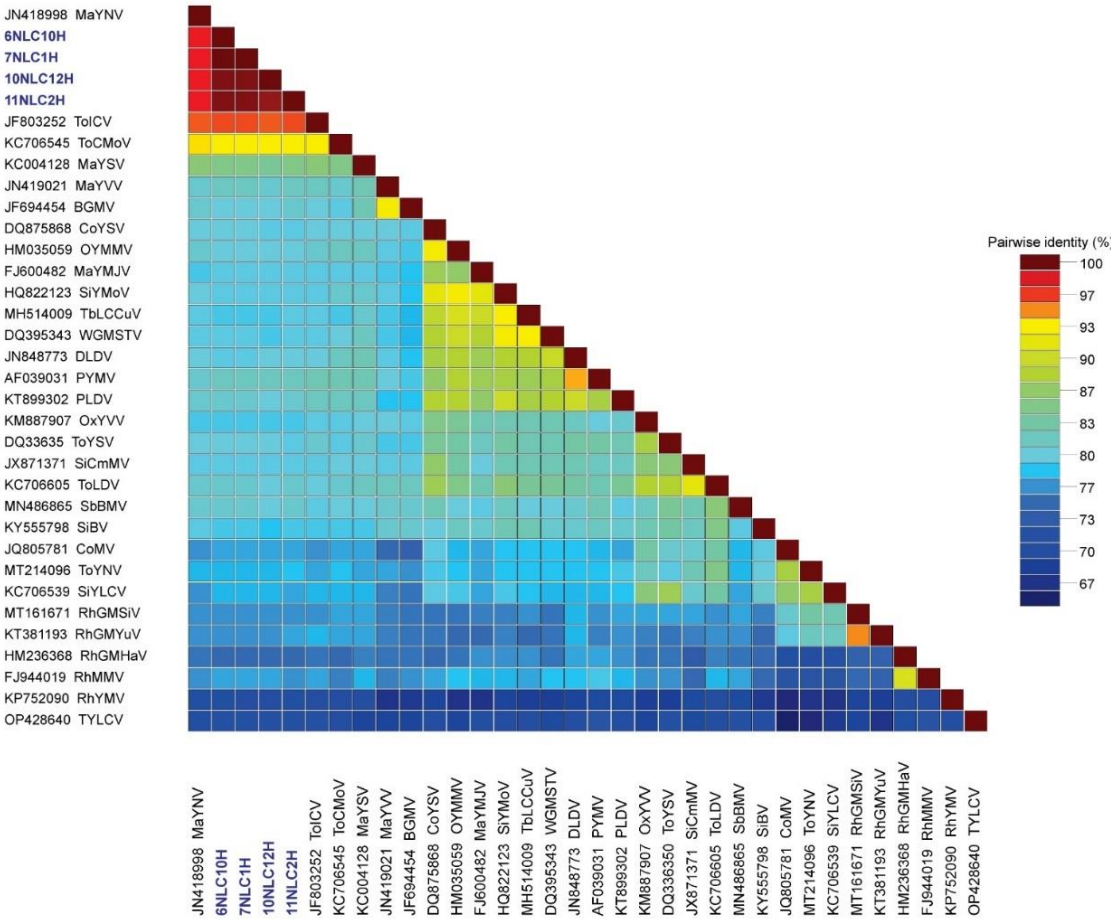
As descobertas aqui descritas representam o primeiro relato de *Rhynchosia minima* sendo infectada por um begomovírus no Brasil. É importante realizar novas coletas de campo para monitorar a evolução da espécie viral no novo hospedeiro e em plantas economicamente importantes como os tomateiros e feijoeiros.

239 **Figura 1.** Plantas de *Rhynchosia minima* apresentando sintomas típicos de infecção por begomovírus.



Fonte: Ferro, 2020.

Figura 2. Matriz bidimensional representando porcentagem de identidade de comparações pareadas de seqüências nucleotídicas do DNA-A de isolados de begomovírus provenientes de *Rhynchosia minima* (isolados em azul) com isolados de begomovírus disponíveis no GenBank (isolados em preto).



Fonte: Autor, 2024.

291 **Figura 3.** Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) do componente DNA-A de begomovírus
292 obtidos no estudo (isolados em azul) com isolados de begomovírus disponíveis no GenBank (isolados em
293 preto) e *outgroup* em verde.

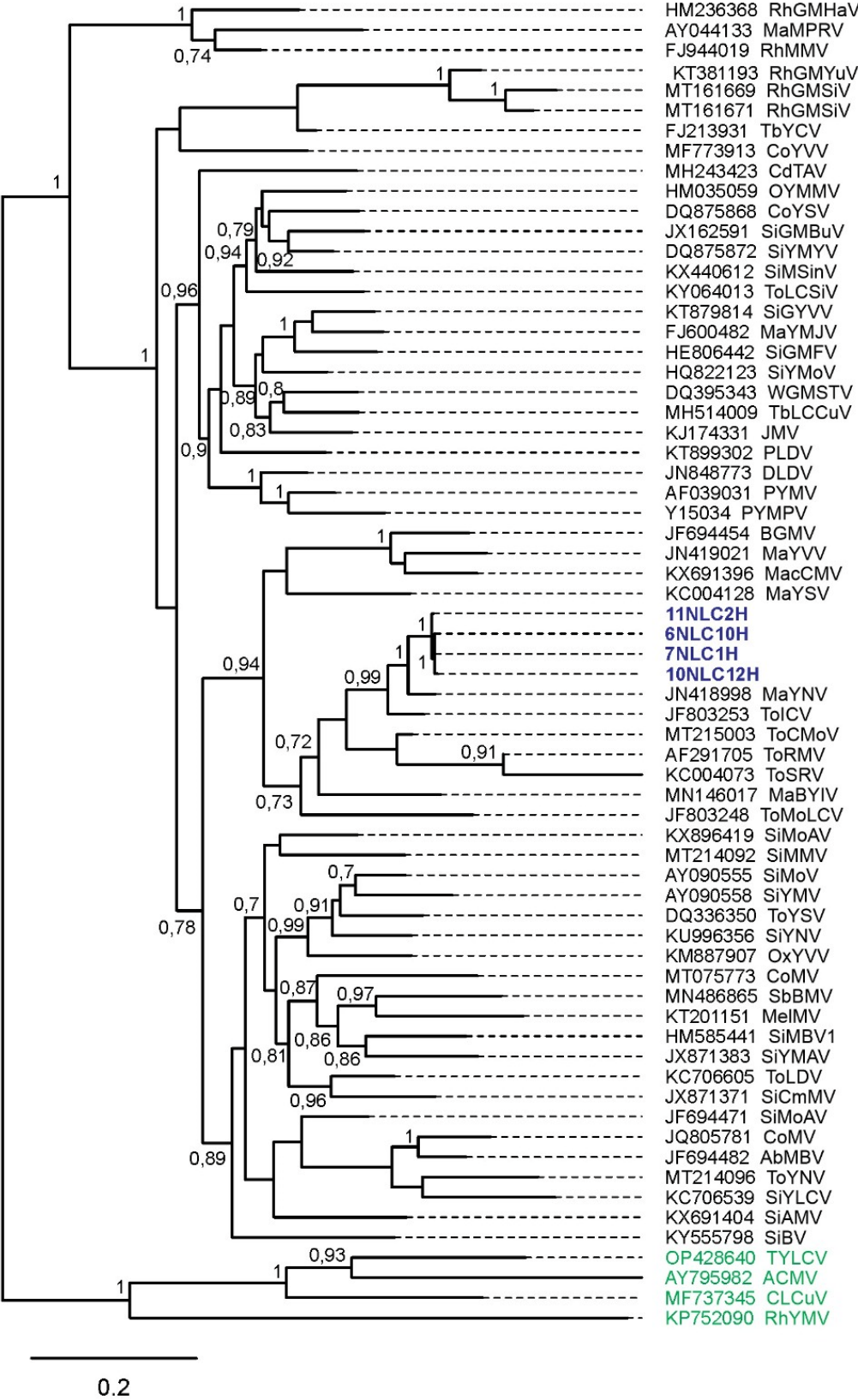


Tabela 1. Hospedeiro, local, ano de coleta das amostras de *Rhynchosia minima*, resultado da PCR com pares de *primers* universais, clones e espécie viral.

Código Amostra	Hospedeiro	Local de Coleta	Ano de Coleta	PCR primers universais DNA-A	Código Clone	Espécie
1NL	<i>Rhynchosia minima</i>	Novo Lino/AL	2020	+	-	-
2NL	<i>Rhynchosia minima</i>	Novo Lino/AL	2020	+	-	-
3NL	<i>Rhynchosia minima</i>	Novo Lino/AL	2020	+	-	-
4NL	<i>Rhynchosia minima</i>	Novo Lino/AL	2020	+	-	-
5NL	<i>Rhynchosia minima</i>	Novo Lino/AL	2020	-	-	-
6NL	<i>Rhynchosia minima</i>	Novo Lino/AL	2020	+	6NLC10H	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>
7NL	<i>Rhynchosia minima</i>	Novo Lino/AL	2020	+	7NLC1H	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>
8NL	<i>Rhynchosia minima</i>	Novo Lino/AL	2020	-	-	-
9NL	<i>Rhynchosia minima</i>	Novo Lino/AL	2020	+	-	-
10NL	<i>Rhynchosia minima</i>	Novo Lino/AL	2020	+	10NLC12H	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>
11NL	<i>Rhynchosia minima</i>	Novo Lino/AL	2020	+	11NLC2H	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>
12NL	<i>Rhynchosia minima</i>	Novo Lino/AL	2020	+	-	-
13NL	<i>Rhynchosia minima</i>	Novo Lino/AL	2020	-	-	-
14NL	<i>Rhynchosia minima</i>	Novo Lino/AL	2020	+	-	-
15NL	<i>Rhynchosia minima</i>	Novo Lino/AL	2020	+	-	-

Tabela 2. *Open reading frames* (ORFs), com seus respectivos números de aminoácidos (aa), encontrados no DNA-A dos isolados deste trabalho.

Código Clone	DNA-A	CP	Rep	REn	TrAP	AC4
6NLC10H	2619 nt	251 aa	351 aa	132 aa	134 aa	99 aa
7NLC1H	2619 nt	251 aa	351 aa	132 aa	134 aa	99 aa
10NLC12H	2623 nt	251 aa	351 aa	132 aa	134 aa	99 aa
11NLC2H	2619 nt	251 aa	351 aa	132 aa	134 aa	99 aa

Tabela 3. Sequências de begomovírus obtidas apartir do banco de dados não-redundante GenBank.

Nº de acesso no Genbank	Espécie	Acrônimo	Hospedeiro	Local
JF694482.1	<i>Abutilon mosaic Brazil virus</i>	AbMBV	<i>Sida rhomboidea</i>	Brasil
AY795982.1	<i>African cassava mosaic virus</i>	ACMV	<i>Manihot esculenta</i>	Tanzânia
JF694454.1	<i>Bean golden mosaic virus</i>	BGMV	<i>Phaseolus</i> sp.	Brasil
MH243423.1	<i>Chino del tomate Amazonas virus</i>	CdTAV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brasil
JQ805781.1	<i>Corchorus mottle virus</i>	CoMV	<i>Corchorus hirtus</i>	Brasil
DQ875868.1	<i>Corchorus yellow spot virus</i>	CoYSV	<i>Corchorus siliquosus</i>	México
MF773913.1	<i>Corchorus yellow vein virus</i>	CoYVV	<i>Corchorus siliquosus</i>	Cuba
MF737345.1	<i>Cotton leaf curl virus</i>	CLCuV	<i>Capsicum annum</i>	Índia
MT075773.1	<i>Cotton mosaic virus</i>	CoMV	<i>Gossypium hirsutum</i>	Argentina
JN848773.1	<i>Datura leaf distortion virus</i>	DLDV	<i>Datura stramonium</i>	Venezuela
KJ174331.1	<i>Jatropha mosaic virus</i>	JMV	<i>Jatropha</i> sp.	República Dominicana
MN146017.1	<i>Macropodium bright yellow interveinal virus</i>	MaBYIV	<i>Macropodium erythroloma</i>	Brasil
KX691396.1	<i>Macropodium common mosaic virus</i>	MacCMV	<i>Macropodium lathyroides</i>	Brasil
AY044133.1	<i>Macropodium mosaic Puerto Rico virus</i>	MaMPRV	<i>Macropodium</i> sp.	Porto Rico
JN418998.1	<i>Macropodium yellow net virus</i>	MaYNV	<i>Macropodium lathyroides</i>	Brasil
KC004128.1	<i>Macropodium yellow spot virus</i>	MaYSV	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brasil
JN419021.1	<i>Macropodium yellow vein virus</i>	MaYVV	<i>Macropodium</i> sp.	Brasil
FJ600482.2	<i>Malvastrum yellow mosaic Jamaica virus</i>	MaYMJV	<i>Malvastrum americanum</i>	Jamaica
KT201151.1	<i>Melochia mosaic virus</i>	MelMV	<i>Melochia</i> sp.	Brasil
HM035059.1	<i>Okra yellow mosaic Mexico virus</i>	OYMMV	<i>Abelmoschus esculentus</i>	EUA
KM887907.1	<i>Oxalis yellow vein virus</i>	OxYVV	<i>Oxalis debilis</i>	EUA
KT899302.1	<i>Passionfruit leaf distortion virus</i>	PLDV	<i>Passiflora edulis</i>	Colômbia
Y15034.1	<i>Potato yellow mosaic Panama virus</i>	PYMPV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Panamá
AF039031.1	<i>Potato yellow mosaic virus</i>	PYMV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Trinidad e Tobago
HM236368.1	<i>Rhynchosia golden mosaic Havana virus</i>	RhGMHaV	<i>Rhynchosia minima</i>	Cuba
MT161671.1	<i>Rhynchosia golden mosaic Sinaloa virus</i>	RhGMSiV	<i>Rhynchosia minima</i>	México
KT381193.1	<i>Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus</i>	RhGMYuV	<i>Glycine max</i>	Cuba
FJ944019.1	<i>Rhynchosia mild mosaic virus</i>	RhMMV	<i>Rhynchosia minima</i>	Porto Rico
KP752090.1	<i>Rhynchosia yellow mosaic virus</i>	RhYMV	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Índia
KX691404.1	<i>Sida angular mosaic virus</i>	SiAMV	<i>Sida acuta</i>	Brasil
KY555798.1	<i>Sida Brazil virus</i>	SiBV	<i>Phaseolus</i> sp.	Argentina
JX871371.1	<i>Sida common mosaic virus</i>	SiCmMV	<i>Sida micrantha</i>	Brasil

JX162591.1	<i>Sida golden mosaic Backup virus</i>	SiGMBuV	<i>Sida</i> sp.	Jamaica	309
HE806442.1	<i>Sida golden mosaic Florida virus</i>	SiGMFV	<i>Sida</i> spp.	Cuba	310
KT879814.1	<i>Sida golden yellow vein virus</i>	SiGYVV	<i>Sida acuta</i>	EUA	311
MT214092.1	<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	SimMV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brasil	312
JF694471.1	<i>Sida mosaic Alagoas virus</i>	SiMAV	<i>Sida</i> sp.	Brasil	313
HM585441.1	<i>Sida mosaic Bolivia virus 1</i>	SiMBV1	<i>Sida micrantha</i>	Bolívia	314
KX440612.1	<i>Sida mosaic Sinaloa virus</i>	SiMSinV	<i>Solanum lycopersicum</i>	México	315
KX896419.1	<i>Sida mottle Alagoas virus</i>	SiMoAV	<i>Sida</i> sp.	Brasil	316
AY090555.1	<i>Sida mottle virus</i>	SiMoV	<i>Sida</i> sp.	Brasil	317
KC706539.1	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	SiYLCV	<i>Sida rhombifolia</i>	Brasil	318
JX871383.1	<i>Sida yellow mosaic Alagoas virus</i>	SiYMAV	<i>Sida urens</i>	Brasil	319
AY090558.1	<i>Sida yellow mosaic virus</i>	SiYMV	<i>Sida</i> sp.	Brasil	320
DQ875872.1	<i>Sida yellow mosaic Yucatan virus</i>	SiYMYV	<i>Sida acuta</i>	México	321
HQ822123.1	<i>Sida yellow mottle virus</i>	SiYMoV	<i>Sida rhombifolia</i>	Cuba	322
KU996356.1	<i>Sida yellow net virus</i>	SiYNV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brasil	
MN486865.1	<i>Soybean blistering mosaic virus</i>	SbBMV	<i>Capsicum annuum</i>	Argentina	
MH514009.1	<i>Tobacco leaf curl Cuba virus</i>	TbLCCuV	<i>Malva</i> sp.	Haití	
FJ213931.1	<i>Tobacco yellow crinkle virus</i>	TbYCV	<i>Nicotiana tabacum</i>	Cuba	
KC706545.1	<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	ToCMoV	<i>Sida</i> sp.	Brasil	
JF803252.1	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	ToICV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brasil	
KY064013.1	<i>Tomato leaf curl Sinaloa virus</i>	ToLCSiV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Costa Rica	
KC706605.1	<i>Tomato leaf distortion virus</i>	ToLDV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brasil	
JF803248.1	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	ToMoLCV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brasil	
AF291705.1	<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	ToRMV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brasil	
KC004073.1	<i>Tomato severe rugose virus</i>	ToSRV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brasil	
OP428640	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	TYLCV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Espanha	
MT214096.1	<i>Tomato yellow net virus</i>	ToYNV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brasil	
DQ336350.1	<i>Tomato yellow spot virus</i>	ToYSV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brasil	
DQ395343.2	<i>Wissadula golden mosaic St Thomas virus</i>	WGMSTV	<i>Wissadula amplissima</i>	Jamaica	

323 **Tabela 4.** Eventos de recombinação detectados nos isolados de ToICV infectando *Rhynchosia minima*.

Evento	Começo	Fim	Recombinante	Maior Parental	Menor Parental	RDP	GENECONV	BootScan	MaxChi	Chimaera	SiScan	3Seq
1	1918	2456	6NLC10H	MaYVV	ToMoLCV	1,089e ⁻⁹	2,374e ⁻¹⁰	8,017e ⁻⁹	7,796e ⁻¹⁰	1,877e ⁻⁸	4,443e⁻¹⁴	7,457e ⁻⁶
	1767	2526	7NLC1H									
	1767	2526	10NLC12H									
	1767	2526	11NLC2H									
2	1955	2177	7NLC1H	SbBMV	NC*	3,052e ⁻²	-	-	9,183e ⁻²	8,402e ⁻³	1,145e⁻⁹	1,593e ⁻³
	1955	2177	10NLC12H									
	1955	2177	11NLC2H									

324 MaYVV – *Macrotidium yellow vein virus*

325 SbBMV – *Soybean blistering mosaic virus*

326 ToMoLCV – *Tomato mottle leaf curl virus*

327 NC* – Não conhecido

4.4 REFERÊNCIAS

- Albuquerque, L.C., Varsani, A., Fernandes, F.R.; Pinheiro, B.; Martin, D.P.; Ferreira, P. De T. O.; Lemos, T. O.; Inoue-Nagata, A. K. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, 157, 747–752, 2012.
- Allem, A. C.; Valls, J. F. M. Recursos forrageiros natives do Pantanal Mato-Grossense. Brasília: **Embrapa/Cenargem**. 339p, 1987.
- Altschul S.F., et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, 403-410, 1990.
- Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B., Carvalho, M.G., Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 372-377, 2002.
- Barbosa, J.C. et al. First report of *Tomato yellow spot virus* infecting *Leonurus sibiricus* in Brazil. **Plant Disease**, v. 97, p. 289-289, 2012.
- 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. 436-44, 2013.
- Brown, J.K.; Zerbini, F.M.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E.; Ramos-Sobrinho, R.; Silva, J.C.; Fiallo-Live, E.; Briddon, R.W.; Hernandez-Zepeda, C.; Idris, A.; Malathi, V.G.; Martin, D.P.; Rivera-Bustamante, R.; Ueda, S.; Varsani, A. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. **Archives of Virology**, v. 160, p. 1593-619, 2015.
- Burkart, A. Flora ilustrada de Entre Rios (Argentina). Tomo Vol. 6. Buenos Aires: **Coleccion Cientifica del INTA**, p. 442-738, 1987.
- Castillo-Urquiza, G.P. et al. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, v. 153, p. 1985-1989, 2008.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull** 19, 11-15, 1987.
- 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, Fernanda R. et al. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. **Archives of virology**, v. 154, n. 9, p. 1567-1570, 2009.
- Fiallo-Olive, E., Chirinos, D., Castro, R., Navas-Castillo, J. First report of Cabbage leaf curl virus infecting common bean, cowpea, pigeon pea and Mucuna pruriens in Ecuador. **Plant Disease**, Vol. 102, 2018.
- Fiallo-Olive, E., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Martinez-Zubiaur, Y. Two novel begomoviruses belonging to different lineages infecting *Rhynchosia minima*. **Archives of Virology**, 155 (12), 2053-2058, 2010.
- Fiallo-Olivé, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Geminiviridae* 2021 J. **Gen. Virol.**, 102, 2021.
- Fondong, V.N.; Pita, J.S.; Rey, M.E.C.; Kochko, A.; Beachy, R.N.; Fauquet, C.M. Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double

- 370 recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. **Journal of General Virology**,
371 v.81, p.287-297. 2000.
- 372 Harrison, B. D.; Robinson, D. J. Natural genomic and antigenic variation in white-fly
373 transmitted geminiviruses (begomoviruses). **Annual Review of Phytopathology**, v. 39,
374 p. 369-398, 1999.
- 375 Hernandez-Zepeda, C., Moreno-Valenzuela, O.A., Brown, J.K., Rivera-Bustamante, R.F.
376 Characterization of Rhynchosia yellow mosaic Yucatan virus, a new recombinant
377 begomovirus associated with two fabaceous weeds in Yucatan, Mexico. **Archives of**
378 **Virology**, 2010.
- 379 Hou, Y.-M., Garrido-Ramirez, E.R., Stingley, S., Guzman, P., Gilbertson, R.L.
380 Characterization of the infectious clones of the Sinaloa strain of pepper huasteco
381 geminivirus. **Plant Pathology**, 86, S43-S43, 1996.
- 382 Idris, A. M.; Bird, J.; Brown, J. K. First report of a bean-infecting begomovirus from
383 *Macroptilium lathyroides* in Puerto Rico that is distinct from bean golden mosaic virus.
384 **Plant Disease**, v. 83, n. 11, p. 1071-1071, 1999.
- 385 Idris, A. M.; Hiebert, E.; Bird, J.; Brown, J. K. Two Newly Described Begomoviruses of
386 *Macroptilium lathyroides* and Common Bean. **Phytopathology**, 2003.
- 387 Ilyas, M., Qazi, J., Mansoor, S., Briddon, R.W. Genetic diversity and phylogeography of
388 begomoviruses infecting legumes in Pakistan. **Gen. Virol.** 91 (PT 8), 2091-2101, 2010.
- 389 Ilyas, M., Qazi, J., Mansoor, S., Briddon, R.W. Molecular characterisation and infectivity
390 of a 'Legumovirus' (genus *Begomovirus*: family *Geminiviridae*) infecting the leguminous
391 weed *Rhynchosia minima* in Pakistan. **Virus Res.** 145 (2), 279-284, 2009.
- 392 Inoue-Nagata, A.K. et al. A simple method for cloning the complete begomovirus genome
393 using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, v.
394 116, p. 209-211, 2004.
- 395 Jyothsna, P., Rawat, R., Malathi, V.G. Molecular characterization of a new begomovirus
396 infecting a leguminous weed *Rhynchosia minima* in India. **Virus Genes** 42 (3), 407-414,
397 2011.
- 398 Kozlov, A. M., Darriba, D.; Flouri, T.; Morel B; Stamatakis, A. RAxML-NG: a fast,
399 scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference.
400 **Bioinformatics** 35:4453–4455, 2019.
- 401 Kumar, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing
402 platforms. **Mol Biol Evol** 35, 2018.
- 403 Lewis, G.P.; Schrire, B.D.; Mackinder, B.A.; Lock, J.M. Legumes of the World. **Royal**
404 **Botanic Gardens**, Kew, 577p., 2005.
- 405 Lima, A. T. M. et al. Synonymous site variation due to recombination explains higher
406 genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. **Journal of**
407 **General Virology**, v. 94, p. 418-431, 2013.
- 408 Lima, A. T. M.; Silva, J. C. F.; Silva, F. N., et al. The diversification of begomovirus
409 populations is predominantly driven by mutational dynamics. **Virus Evol** 3, 2017.
- 410 Martin, D. P.; Varsani, A.; Roumagnac, P.; Botha, G.; Maslamoney, S.; Schwab, T.; Kelz,
411 Z.; Kumar, V.; Murrell, B. RDP5: a computer program for analyzing recombination in,

- 412 and removing signals of recombination from, nucleotide sequence datasets. **Virus**
413 **Evolution**, 2020.
- 414 Miller, M. A. et al. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large
415 phylogenetic trees. In: **Gateway Computing Environments Workshop**, 14., 2010, New
416 Orleans. Proceedings... New Orleans, p. 1-8, 2010.
- 417 Mondal, D.; Mandal, S.; Shil, S.; Sahana, N.; Pandit, G.K.; Choudhury, A. Genome wide
418 molecular evolution analysis of begomoviruses reveals unique diversification pattern in
419 coat protein gene of Old World and New World viruses. **Virus Disease**, v. 30, p. 74-83,
420 2019.
- 421 Morales, F.J.; Anderson, P.K. The emergence and dissemination of whitefly transmitted
422 geminiviruses in Latin America. **Archives of Virology**, New York, v. 146, n. 3, p. 415-
423 441, 2001.
- 424 Muhire, B. M.; Varsani, A.; Martin, D. P. SDT: a virus classification tool based on
425 pairwise sequence alignment and identity calculation. **Plos One**, v. 9, n. 9, p. e108277,
426 2014.
- 427 Padidam, M.; Sawyer, S.; Fauquet, C. M. Possible emergence of new geminiviruses by
428 frequent recombination. **Virology**, 1999.
- 429 Perez, A.P.F., Bezerra, L.M.P.A., Cândido, E.S., Santos-Silva, J. *Rhynchosia in Flora do*
430 **Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020.
431 (<https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB23137>). Acesso em: 26 jan. 2024.
- 432 Pinto, V.B.; Silva, J.P.; Fiallo-Olivé, E.; Navas-Castillo, J.; Zerbini, F.M. Novel
433 begomoviruses recovered from Pavonia sp. in Brazil. **Archives of Virology**, v. 161, p.
434 735-739, 2016.
- 435 Ramos-Sobrinho, R. et al. Contrasting genetic structure between two begomoviruses
436 infecting the same leguminous hosts. **Journal of General Virology**, v. 95, n. Pt 11, p.
437 2540-2552, 2014.
- 438 Rocha, C. S. et al. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly
439 evolving, and segregated based on geographical location. **Journal of Virology**, v. 87, p.
440 5784-5799, 2013.
- 441 Rojas, M.R.; Gilbertson, R.L.; Maxwell, D.P. Use of degenerate primers in the
442 polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**
443 77: 340-347, 1993.
- 444 Sambrook J.; Russel D. Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3^a ed.). **Cold Spring**
445 **Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- 446 Silva, S.J.C. et al. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus
447 populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 61,
448 p. 457-467, 2012.
- 449 Zhou, X. et al. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava
450 mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. **Journal of General**
451 **Virology**, v. 78, p. 2101-2111, 1997.