



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO AGRONOMIA



PRIMEIRO RELATO DO BEGOMOVÍRUS *Blainvillea*
yellow spot virus **EM QUEBRA PEDRA (*Phyllanthus niruri*)**

LUCAS MARQUES MENEZES

RIO LARGO
ALAGOAS
2022

LUCAS MARQUES MENEZES

**PRIMEIRO RELATO DE *Blainvillea yellow spot virus* EM
QUEBRA PEDRA (*Phyllanthus niruri*)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Campus de Engenharias e
Ciências Agrárias como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo. Orientadora Dr^a.
Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva.

**RIO LARGO
ALAGOAS
2022**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Campus de Engenharias e Ciências Agrárias – CECA
Bibliotecário Responsável: Erisson Rodrigues de Santana

M536p Menezes, Lucas Marques.

Primeiro relato do begomovírus *Blainvillea yellow spot virus* em quebra pedra (*Phyllanthus niruri*). / Lucas Marques Menezes. – 2022.

37 f.: il.

Orientadora: Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Curso de Agronomia, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas. Rio largo, 2022.

Inclui Bibliografia

1. *Geminiviridae*. 2. Plantas não cultivadas. 3. Demarcação de espécies.

CDU: 632.3

Folha de Aprovação

AUTOR: LUCAS MARQUES MENEZES

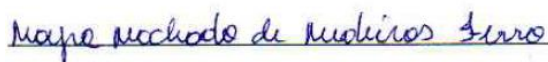
Primeiro relato do begomovírus *Blainvillea yellow spot virus* infectando quebra pedra (*Phyllanthus niruri*)

Trabalho de conclusão de curso defendido
e aprovada em 17 de fevereiro de 2022.

Documento assinado digitalmente
 SARA H JACQUELINE CAVALCANTI DA SILVA
Data: 21/02/2022 07:59:42-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

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

Banca Examinadora:



Prof^a. Dr^a. Mayra Machado de Medeiros Ferro, UFAL

Documento assinado digitalmente
 MARIOTE DOS SANTOS BRITO NETTO
Data: 19/02/2022 08:07:12-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Mariote dos Santos Brito Netto, UFAL

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meu filho Luiz
Valentim Accioly de Melo Menezes, pois ele
me ensina todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus pela oportunidade da vida e de sempre estar ao meu lado. Todo momento se fez presente, mostrando que sou capaz de tudo.

A minha família por sempre apoiar e confiar nas minhas decisões, deixando eu mesmo determinar o rumo da minha vida.

A Universidade Federal de Alagoas em conjunto do corpo docente, por todo o suporte e conhecimento concebido.

Ao professor Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima e à professora Dr^a. Iraildes Pereira Assunção pelo convite em participar do Laboratório de virologia e fitopatologia molecular.

A todos os companheiros de turma e laboratório por todos os momentos, em especial a minha orientadora Dr^a. Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva, Dr^a Mayra Machado de Medeiros Ferro, Mayara Oliveira de Lima e Lívia Francyne Gomes Chaves, grandes mulheres que fizeram de tudo para a realização do meu trabalho de conclusão de curso.

A todos, o meu muito obrigado.

RESUMO

O gênero *Begomovirus* é um importante fator limitante de produção para diversas culturas agrícolas, devido ao seu alto grau de severidade, área geográfica e o número de espécies, que permanece crescente. Sua transmissão é realizada por um complexo de espécies crípticas de *Bemisia tabaci*, principalmente a espécie MEAM1(Middle East – Asia Minor 1) e, mais recentemente, por sementes. Além de afetar as espécies cultivadas, cada vez mais vem sendo relatado à presença em espécies não cultivadas, servindo como reservatório natural e o possível surgimento de novas espécies. A identificação das espécies vem contribuindo para tomadas de decisões em campo, diminuindo os prejuízos causados por esses diferentes agentes patogênicos. Com isso, o objetivo desse estudo foi à identificação da espécie de *Begomovirus* infectando *Phyllanthus niruri*. Inicialmente, foi realizada a identificação em nível de gênero utilizando os primers universais PAL1v1978 (GCATCTGCAGGCCCACTYGTCTTYCCNGT) e PAR1c496 (AATACTGCAGGGCTTYCTRATACATRGG). As sequências obtidas dos dois clones BR_QPA_20A, BR_QPH_20A pertencem a isolados de *Blainvillea yellow spot virus*, possuindo cerca de 97% de identidade, segundo as análises feitas BLASTn e de comparações pareadas utilizando SDT (*Sequence Demarcation Tool*). No relacionamento filogenético foi observado que os componentes internos formaram um clado com os isolados BR_QPA_20A, BR_QPH_20A, JX871392_BYSV, X871390_BYSV, corroborando e complementando que realmente esses isolados pertencem a BYSV. *Phyllanthus niruri* é considerado hospedeiro de *Blainvillea yellow spot virus*, sendo o primeiro relato no mundo. Novas observações e coletas de campo devem ser realizadas para acompanhar o crescimento populacional da espécie no novo hospedeiro e em plantas cultivadas presentes na área.

Palavras-chave: *Geminiviridae*, plantas não cultivadas, demarcação de espécies.

ABSTRACT

The *Begomovirus* genus is an important production limiting factor for several agricultural crops, due to its high degree of severity, geographic area and the number of species, which remains increasing. Its transmission is carried out by a complex of cryptic species of *Bemisia tabaci*, mainly the species MEAM1 (Middle East – Asia Minor 1) and, more recently, by seeds. In addition to affecting cultivated species, it has increasingly been reported to be present in uncultivated species, serving as a natural reservoir and the possible emergence of new species. The identification of species has contributed to decision making in the field, reducing the damage caused by these different pathogens. Thus, the objective of this study was to identify the species of *Begomovirus* infecting *Phyllanthus niruri*. Initially, identification at the genus level was performed using the universal primers PAL1v1978 (GCATCTGCAGGCCCACTYGTCTTYCCNGT) and PAR1c496 (AATACTGCAGGGCTTYCTRTRACATRGG). The sequences obtained from the two clones BR_QPA_20A, BR_QPH_20A belong to isolates of *Blainvillea yellow spot virus*, having about 97% identity, according to BLASTn analyzes and paired comparisons using SDT (Sequence Demarcation Tool). In the phylogenetic relationship, it was observed that the internal components formed a clade with the isolates BR_QPA_20A, BR_QPH_20A, JX871392_BYSV, X871390_BYSV, corroborating and complementing that these isolates really belong to BYSV. *Phyllanthus niruri* is considered a host of *Blainvillea yellow spot virus*, being the first report in the world. New observations and field collections must be carried out to monitor the population growth of the species in the new host and in cultivated plants present in the area.

Keywords: *Geminiviridae*, uncultivated plants, species demarcation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 <i>PHYLLANTHUS NIRURI</i>	12
2.2 A FAMÍLIA <i>GEMINIVIRIDAE</i>	12
2.3 <i>BEGOMOVIRUS</i>	14
2.4 BEGOMOVÍRUS EM PLANTAS NÃO CULTIVADAS NO BRASIL	16
3. MATERIAL E METÓDOS	19
3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO	19
3.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	19
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA E DETECÇÃO DE BEGOMOVÍRUS	19
3.4 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA AMOSTRA	19
3.5 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
4.1 COLETA	22
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA E DETECÇÃO DO BEGOMOVÍRUS	22
4.3 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS, ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E DEMARCAÇÃO DE ESPÉCIES	23
4.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA	24
5. CONCLUSÃO	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* é conhecida por causar sérios problemas socioeconômicos, sendo distribuída em quatorze gêneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Citlodavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Maldovirus*, *Mastrevirus*, *Mulcrilevirus*, *Opunvirus*, *Topilevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus* se diferenciando pelo tipo de inseto vetor, gama de hospedeiro, organização genômica e relacionamento filogenético (VARSANI et al, 2014; 2017; ZERBINI et al., 2017). Membros dessa família são caracterizados por apresentarem DNA circular de fita simples encapsidados em partículas geminadas de morfologia quasi-icosaédrica (BROWN et al., 2012). Dentre os geminivírus, o gênero *Begomovirus* é o mais numeroso, com 445 espécies atualmente reconhecidas (ICTV, 2021). Estes são transmitidos por um complexo de espécies crípticas de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) para plantas dicotiledôneas (VARSANI et al., 2014; BROWN et al., 2015).

Os begomovírus estão presentes nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (MORALES, 2006), prejudicando importantes culturas como feijoeiros (*Phaseolus* spp.), mandioca (*Manihot esculenta*), algodão (*Gossypium* sp.), tomate (*Solanum lycopersicum*) e batata-doce (*Ipomoea batata*) (GRAHAM; MARTIN; ROYE, 2010). No Brasil, o feijoeiro e o tomateiro são as culturas mais severamente afetadas (FARIA; MAXWELL, 1999; ZERBINI et al., 2005). Estudos demonstraram que a infecção de plantas de tomate por begomovírus pode levar a danos de 60% na produtividade, sendo essa redução causada principalmente pela diminuição significativa do número médio de frutos por planta (GIORDANO et al., 2005). Além de plantas cultivadas, muitas plantas daninhas e/ou não cultivadas atuam como reservatórios de diversidade viral e fonte de novos vírus os quais podem causar doenças nas culturas (ASSUNÇÃO ET AL., 2006; AMARAKOON ET AL., 2008; CASTILLO-URQUIZA ET AL., 2008; BARBOSA ET AL., 2009; SILVA ET AL., 2011; SILVA ET AL., 2012; TAVARES ET AL., 2012; BARRETO ET AL., 2013, ROCHA ET AL., 2013; RAMOS-SOBRINHO ET AL., 2014, FERRO ET AL., 2017).

A diversidade genética dos begomovírus que infectam plantas cultivadas e/ou não-cultivadas no Brasil é alta (AMBROZEVICIUS et al., 2002; CALEGARIO, 2004; CASTILLO-URQUIZA, 2008; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-

SOBRINHO et al., 2014), podendo ser resultante de eventos de recombinação e pseudorecombinação entre os begomovírus em infecções mistas, e contribuindo para a emergência de novas espécies (AMBROZEVICIUS, et al, 2002, ZHOU et al., 1997; FONDONG et al., 2000). A identificação de espécies virais em novos hospedeiros é de extrema importância, pois facilita as medidas de controle com ações preventivas. Com isso, o objetivo do trabalho foi a identificação da espécie de *Begomovirus* infectando *Phyllanthus niruri*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Phyllanthus niruri*

O gênero *Phyllanthus* L. pertence à família Phyllanthaceae, anteriormente incluído na família Euphorbiaceae, mas que a partir de estudos filogenéticos foram desmembrados formando uma nova família (HOFFMANN, P., H. KATHRIARACHCHI E K. WURDACK. 2006; KATHRIARACHCHI, H. ET AL. 2005; WURDACK, K. ET AL. 2004) com cerca de 101 espécies (Flora do Brasil, 2020).

A quebra-pedra (*P. niruri*), como é popularmente chamada no Brasil, são plantas daninhas de crescimento ereto podendo chegar até 60 cm. Seu centro de origem é na Índia, mas sua ocorrência é abundante em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (N. KAUR ET AL., 2017).

É utilizada pela medicina ayurvédica, uma terapia milenar da Índia para o tratamento de problemas de estômago, sistema geniturinário, fígado, rim e baço (HM KAMRUZZAMAN, O HOQ, 2016). Em países como Indonésia, China e Brasil na fitoterapia para diversas condições e tratamentos, dentre eles: disenterias, cálculos renais, hepatotoxicidade e hepatite B (G. BAGALKOTKAR ET AL. 2006). Podem sobreviver em diferentes condições de estresse, competindo com monoculturas, germinando em estradas e construções, características essas de plantas daninhas (HM KAMRUZZAMAN, O HOQ, 2016).

A produtividade de culturas de interesses agrícolas é dependente de diversos fatores, como por exemplo, a sanidade vegetal. Um desses fatores são as plantas daninhas, atuando de forma direta (competição) e indireta (hospedeira alternativa de pragas e doenças). Além de possuir propriedades fitoterápicas e atuar de forma direta como planta daninha, gradativamente, o número de relatos dessa planta como hospedeiro alternativo de *begomovirus* em diversos cultivos vem aumentando, como solanáceas na Índia (KIRANMAI ET AL., 1998; PANT ET AL, 2018, PN SVALINGAM, A VARMA, 2007); tabaco na China (LIU ET AL., 2008) e algodão na Índia e no Paquistão (MANN, 2018; FAROOQ ET AL., 2001).

2.2 A família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é distribuída em quatorze gêneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Citlodavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Maldovirus*, *Mastrevirus*, *Mulcrilevirus*, *Opunvirus*, *Topilevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*,

diferenciados **com base** no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiro, organização genômica e relacionamento filogenético (VARSANI et al, 2014; 2017; ZERBINI et al., 2017).

Geminivírus possuem genoma de DNA fita simples (ssDNA) circular, com tamanho variando de 2,6 a 5,2 kilobases (kb), encapsidados em partículas quasi-icosaédricas geminadas com aproximadamente 18 nm de diâmetro e 30 nm de comprimento, característica morfológica que é expressa na sua nomenclatura.. A maioria dos gêneros são monopartidos, ou seja, possui um único componente genômico, com exceção dos *Begomovirus* que pode ter um ou dois componentes genômicos (bipartidos), denominados DNA-A e DNA-B, sendo ambos indispensáveis para que ocorra uma infecção sistêmica com sucesso (ARGÜELLO-ASTORGA; RUIZ-MEDRANO, 2001; BROWN et al., 2015; ROJAS et al., 2005).

A sua transmissão é realizada através da alimentação de insetos que utilizam os tecidos do floema da planta hospedeira, compreendendo diferentes espécies de cigarrinhas, moscas-brancas que abrangem um complexo de espécies crípticas de *Bemisia tabaci*, membracídeos e afídeos (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). Os gêneros *Citodlavirus*, *Eragrovirus*, *Maldovirus*, *Opunvirus*, *Topilevirus* são os únicos membros da família onde os vetores permanecem desconhecidos (VARSANI et al., 2014; 2017;). Os sintomas habitualmente encontrados nas plantas infectadas são: deformação foliar, amarelecimento, mosaico e/ou estriações (VARSANI et al., 2017).

A infecção ocorre em monocotiledôneas e dicotiledôneas, causando sérios prejuízos econômicos em diversas culturas devido a perda de rendimento, Além das plantas cultivadas, atuam infectando plantas invasoras e ornamentais (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). Os membros dessa família de vírus são conhecidos por causar sérios problemas socioeconômicos em todo mundo. Nas Américas, a cultura mais afetada é a do feijoeiro pelo *begomovírus bean golden mosaic virus* (BGMV) e o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV); América do norte e Oriente Médio o *Beet curly top virus* (BCTV; *Curtovirus*) em beterraba açucareira; Europa, África, Ásia, América Central, Caribe, Estados Unidos e Austrália o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) afetam no rendimento da tomateiro; *African cassava mosaic virus* (ACMV) a mandioca na África; *Cotton leaf curl virus* (CLCuV; *Begomovirus*) o algodoeiro na Ásia. Esses são alguns exemplos do gênero *Begomovirus*, onde algumas espécies podem provocar perdas de até 100% no seu rendimento (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013; INOUE NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016; LEGG; FAUQUET, 2004; SHEPHERD et al., 2010; SATTAR et al., 2013).

2.3 Begomovirus

Begomovirus é o gênero mais importante devido à severidade das doenças que causam e o mais numeroso, contando atualmente com 445 espécies reconhecidas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV* (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>), contendo como espécie tipo o *bean golden mosaic virus* (BGMV) (figura 1), ao qual dar o nome ao gênero pelas iniciais do nome (“BE”, “GO”, “MO”) (VARSANI et al., 2014; BROWN et al., 2015).

Sua transmissão é feita por um complexo de espécies crípticas (diferenciam-se através de biologia molecular) de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), principalmente as pertencentes ao complexo MEAM1 (Middle East – Asia Minor 1), anteriormente denominadas de biótipo B que se espalhou pelo mundo infectando plantas dicotiledôneas nas regiões tropicais e subtropicais (BROWN et al., 2012; 2015; NAVAS-CASTILLO; FIALLO-OLIVÉ; SÁNCHEZ-CAMPOS, 2011; STANLEY et al., 2005; FARIA et al., 2000). Recentemente, há alguns relatos de transmissões por semente, sendo o primeiro relato em batata-doce (*Ipomoea batatas*, Convolvulaceae) na Coreia do Sul pela espécie *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV) (KIM et al., 2015).

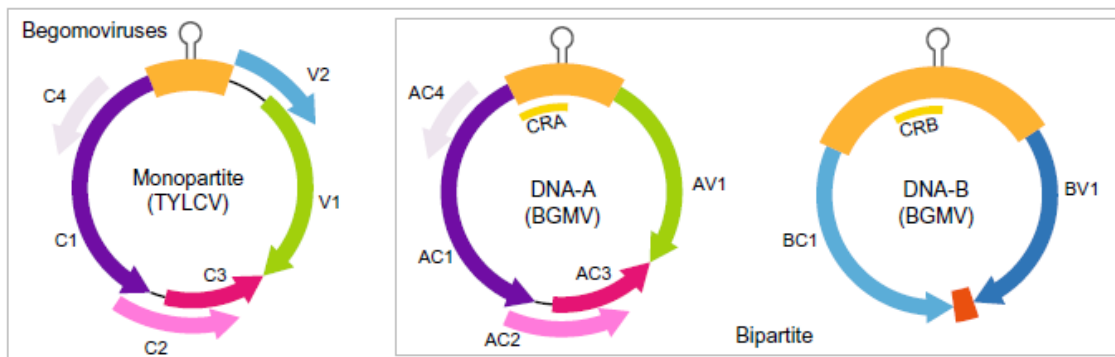


Figura 1. Organização genômica dos begomovírus. LIR, região intergênica longa; SIR, região intergênica curta; CR, região comum; nsP (BV1), proteína de movimento nuclear; cp (V1/AV1), proteína capsidial; mp (V2/BC2), proteína de movimento; rep (C1), proteína associada a replicação; ren (C3/AC3), proteína potencializadora de replicação; trap (C2/AC2), proteína de transcrição/supressor de silenciamento gênico (modificada de VARSANI et al., 2017).

Após a sua infecção o movimento do vírus na planta é dividido em dois: célula-a-célula via plasmodesmas, e movimento a longa distância, no qual o vírus atinge o sistema vascular e é transportado sistemicamente para toda a planta. Nos begomovírus bissegmentados o DNA-B possui as proteínas responsáveis por esses movimentos (PALMER, RYBICKI, 1998; NOUEIRY, LUCAS, GILBERTSON, 1994; SANDERFOOT, LAZAROWITZ, 1995). Para os vírus monosegmentados a proteína CP desempenha esse importante papel (ROJAS et al., 2001; GAFNI; EPEL, 2002). Além da CP, em alguns vírus a

proteína C4 e V1 são necessários para a ocorrência desse processo (ROJAS et al., 2001; 2005b).

Os sintomas observados nos hospedeiros variam de acordo com a espécie, fase da cultura, nutrição, espécie e carga viral. Sobretudo, os sintomas típicos são nanismo; uma combinação de mosaico/mosqueado verde-amarelo-dourado, enrolamento, enrugamento, deformação, manchas amarelas e amarelecimento das nervuras ou internervuras nas folhas (PICÓ et al., 1996; MORALES, 2001; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016).

Devido a sua grande diversidade genética os begomovírus foram divididos em dois grupos “Velho Mundo” (VM) (Europa, África, Ásia e Austrália) e do “Novo Mundo” (NM) (Américas). Além disso, também são utilizados para classificação a destruição geográfica e a organização genômica, onde os begomovírus do VM apresentam um ou dois componentes genômicos e frequentemente estão associados a moléculas de ssDNA satélites denominados alfassatélites (anteriormente DNA-1) e betassatélites (anteriormente DNA β) (FAUQUET; STANLEY, 2005; ZHOU et al., 2013; LOZANO et al., 2016; ROSARIO et al., 2016). Os begomovírus do NM apresentam em sua maioria dois componentes, denominados de DNA-A e DNA-B, apresentando algumas das vezes associação com alfassatélites (PAPROTKA; METZLER; JESKE, 2010; ROMAY et al., 2010). Já existem cinco begomovírus monopartidos do NM., *Tomato leaf deformation virus* (ToLDeV; SÁNCHEZ-CAMPOS et al., 2013; MELGAREJO et al., 2013); *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV); *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV; GILBERTSON et al., 2015); *Tomato twisted leaf virus* (ToTLV; ROMAY et al., 2019) e o putativo *Corchorus yellow vein Cuba virus* (CoYVCUV; FIALLO-OLIVÉ; NAVAS-CASTILLO, 2020).). Ainda não se sabe ao certo qual a função dos satélites de DNA, mas alguns estudos indicam uma relação com a patogenicidade (MANSOOR et al., 2003) e virulência (ZHOU et al., 2013; MANSOOR et al., 2003).

Recentemente, o ICTV oficializou a criação de uma família de DNA satélites de fita simples associados a begomovírus, *Tolecusatellitidae*, a qual inclui os gêneros *Betasatellite* e *Deltasatellite* (ADAMS et al., 2017). O gênero *Betasatellite* inclui 61 espécies listadas, com cerca da metade do tamanho dos componentes do genoma dos begomovírus. Betasatélites codificam a proteína β C1 que tem papéis importantes na indução de sintomas e na supressão do silenciamento gênico transcricional e pós-transcricional (ZHOU, 2013). O gênero *Deltasatellite* possui cerca de um quarto do tamanho dos componentes genômicos dos begomovírus, possuindo 11 espécies descritas (FIALLO-OLIVÉ et al., 2012; LOZANO et al., 2016). O *Tomato leaf curl deltasatellite*, anteriormente ToLCV-sat, foi o primeiro DNA satélite identificado em associação com um vírus de planta, o begomovírus monopartido do

VM, o tomato leaf curl virus (ToLCV), originário da Austrália (DRY et al., 1997). Deltatátelites também foram encontrados associados a begomovírus bipartidos do NM que infectam plantas não-cultivadas (família Malvaceae) e sweepovírus (FIALLO-OLIVÉ et al., 2012, 2016; LOZANO et al., 2016; FIALLO-OLIVÉ; NAVAS-CASTILLO, 2020). A demarcação da espécie é feita utilizando-se o programa *Sequence Demarcation Tool* (SDT) (MUHIRE; VARSANI; MARTIN, 2014) a partir da sequência completa do DNA-A comparando com as outras sequências já reconhecidas, onde espécies com $\geq 91\%$ de identidade nucleotídica é considerada mesma espécie, determinado com o método mais seguro para identificação (BROWN et al., 2015).

O método de amplificação dos componentes genômicos por círculo rolante (*rolling-circle amplification* - RCA) seguido por digestão com enzima de restrição e ligação ao vetor plasmidial, desenvolvido por Inoue-Nagata e colaboradores no ano de 2004, é utilizado como ferramenta para clonagem, possibilitando um maior número de sequências de vários isolados (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; ROCHA et al., 2013; SILVA et al., 2012).

2.4 Begomovírus em plantas não cultivadas no Brasil

Os begomovírus são uns dos fitopatógenos que mais causam danos em diversas culturas como feijão (*Phaseolus vulgaris*), mandioca (*Manihot esculenta*), algodão (*Gossypium* sp.), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e tomate (*Solanum lycopersicum*) nas regiões tropicais e subtropicais no mundo (MORALES, 2010; GRAHAM; MARTIN; ROYE, 2010). No Brasil, as espécies mais afetadas são o feijoeiro e o tomateiro com perdas de até 100% no seu rendimento (FARIA; MAXWELL, 1999; ZERBINI et al., 2005; MORALES, 2010).

Cada vez mais espécies de plantas que não são habitualmente cultivadas estão sendo infectadas por begomovírus (AMBROZEVICIUS et al., 2002; IDRIS et al., 2003; JOVEL et al., 2004; AMARAKOON et al., 2008; CASTILLO-URQUIZA et al., 2008; FIALLO-OLIVÉ et al., 2012; SILVA et al., 2012; STEWART et al., 2014; KUMAR et al., 2016; ROMAY et al., 2016), e algumas dessas espécies infectando plantas cultivadas (IDRIS et al., 1999; FERNANDES et al., 2009; FERNANDES et al., 2011; BARRETO et al., 2013; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Técnicas como rotações de cultura e pousio perdem sua eficiência, pois begomovírus que causam sérios problemas econômicos estão infectando plantas não cultivadas, servindo como hospedeiro alternativo e reservatório, dificultando sua extinção. (BRACERO, 2003; ALABI et al., 2008; BARBOSA et al., 2009; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Espécies de plantas não cultivadas das famílias Asteraceae, Caparaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae,

Malvaceae e Solanaceae têm sido relatadas como hospedeiras de begomovírus, constituindo um importante reservatório desses patógenos que podem ser transmitidos para espécies cultivadas (PINTO et al., 2016). O papel das hospedeiras não cultivadas como fontes de diversidade viral e reservatórios para emergência tem sido investigado principalmente para os begomovírus que infectam as famílias Euphorbiaceae, Fabaceae e Malvaceae (Silva et al 2012; Ramos-Sobrinho, 2014; Mar et al, 2017)

Plantas não-cultivadas da família Euphorbiaceae têm sido relatadas como hospedeiras naturais de begomovírus há bastante tempo. Na década de 1930, *Jatropha gossypifolia* L. foi descrita como hospedeira de begomovírus (COOK, 1931 apud SIMMONDS-GORDON, 2014). Desde então diversas espécies têm sido descritas e caracterizadas incluindo *Euphorbia mosaic virus* (EuMV), *Croton yellow vein virus* (CrYVV), *Euphorbia yellow mosaic virus*, (EuYMV), *Dalechampia chlorotic mosaic virus* (DaClMV) e *Jatropha mosaic virus* (JMV).

No Brasil, um begomovírus causando mosaico em *Euphorbia heterophylla* L. (syn. *Euphorbia prunifolia*) foi relatado em 1950 (COSTA; BENNET, 1950), e provavelmente corresponde a EuYMV, o primeiro begomovírus de euforbiáceas completamente caracterizado no país (FERNANDES et al., 2011). Adicionalmente EuYMV tem sido encontrado infectando naturalmente *Macrotilium artopurpureum*, *Sida santaremensis*, *Crotalaria juncea* e *Solanum lycopersicum*.

Acreditava-se que BGMV era o único begomovírus de importância econômica em feijoeiros no Brasil, levando a aprovação do feijão comum transgênico Embrapa 5.1 resistente ao BGMV, no qual resistência é devido ao silenciamento de RNA (BONFIM et al., 2007; ARAGÃO et al., 2013). Entretanto, resultados mais recentes sugerem a emergência do Macrotilim yellow spot virus (MaYSV), obtido da planta daninha *Macrotilium lathyroides* (Fabaceae) como um dos principais begomovírus em campos de cultivo no Nordeste do Brasil, indicando que BGMV já não é mais o único begomovírus de relevância econômica para os feijoeiros (*Phaseolus comum* e *P. lunatus*), por isso a grande importância do estudo de populações de vírus. MaYSV também infecta naturalmente as plantas não cultivadas *Calopogonium mucunoides*, *Canavalia* sp. (Silva et al., 2012; Ramos-Sobrinho et al., 2012) e *Desmodium glabrum* (FONTENELE et al., 2016). É também conhecido que *M. lathyroides* pode servir como hospedeiro alternativo para BGMV e BGYMV, begomovírus de grande importância econômica na cultura dos feijoeiros (BRACERO; RIVERA; BEAVER, 2003; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). No Brasil, outros begomovírus infectando *M. lathyroides* foram relatados como Soybean chlorotic spot virus (SoCSV) (COCO et al., 2013), vírus

inicialmente descrito em soja, *Macropodium yellow net virus* (MaYNV) e *Macropodium yellow vein virus* (MaYVV) (SILVA et al., 2012; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

Na família Malvaceae, um complexo de espécies de begomovírus é encontrado na planta não cultivada *Sida* spp., frequentemente em infecções mistas (GARCIA-ARENAL & ZERBINI, 2019). Um estudo empregando sequenciamento de alto rendimento de plantas de tomate e *Sida* crescendo lado a lado em campos em Minas Gerais (Brasil) mostrou que 99,5% das leituras da *Sida* detectaram *Sida micranta mosaic virus* (SimMV), mas 0,4% detectaram para *Tomato severe rugose virus* (ToSRV); enquanto em plantas de tomate >99,3% das leituras detectaram ToSRV e 0,6% SimMV (GARCIA-ARENAL & ZERBINI, 2019). Esses resultados são compatíveis com a transmissão que ocorre entre plantas de tomate e *Sida*, mas a população do vírus dentro do hospedeiro teria evoluído para que em cada hospedeiro o vírus mais apto (SimMV em *Sida*, ToSRV em tomate) se tornasse mais prevalente. Embora este estudo não tenha identificado o hospedeiro reservatório para ToSRV emergência, mostra que um hospedeiro selvagem negligenciado pode ter um papel importante como fonte de inóculo de epidemias em lavouras de tomate.

A espécie *Blainvillea yellow spot virus* (BiYSV) foi muito utilizada em estudos filogenéticos e de populações, principalmente no nordeste do Brasil (TAVARES, S.S. et al, 2012; M. A. Macedo et al, 2017; XAVIER et al, 2021). Até o momento não existe relatos desse fitovírus infectando plantas cultivadas. O seu hospedeiro quase exclusivo é a *Blainvillea rhomboidea*, espécie não cultivada pertencente ao gênero Asteraceae presente em diversos cultivos pelo país (Cardoso, A.D. et al., 2013; Seixas et al., 2011; Bandeira et al., 2018). Esta espécie já foi encontrada causando infecção em *Physalis* sp. (ROCHA et al., 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

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

3.2 Coleta e armazenamento das amostras

Uma planta de *Phyllanthus niruri* com sintomas típicos (mosaico amarelo, nanismo e amarelecimento) de begomovírus foi coletada no município de Rio Largo, Alagoas. Amostras foram acondicionadas, em sacos de papel, e armazenadas em ultra freezer (-80°C).

3.3 Extração de DNA e detecção de begomovírus

As amostras foliares de *P. niruri* foram submetidas à extração de DNA conforme descrito por Doyle e Doyle, 1987. O DNA total obtido foi usado como molde de reação de amplificação por Polymerase Chain Reaction (PCR), utilizando pares de primers universais PAL1v1978 (GCATCTGCAGGCCCACTYGTCTTYCCNGT) e PAR1c496 (AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG) descritos por 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 H₂O ultrapura. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf® modelo Mastercycler personal com incubação inicial de 95°C por dois minutos, seguido por 30 ciclos consecutivos de 95°C por um minuto para desnaturação, 52°C por um minuto para anelamento e extensão a 72°C por um minuto e meio, seguido de uma extensão final a 72°C por cinco minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2% em TAE 1X, corado com brometo de etídeo e as bandas visualizadas em luz ultravioleta (UV).

3.4 Clonagem e sequenciamento da amostra

Após a detecção pelo método de PCR as amostras foram amplificadas utilizando-se a enzima DNA polimerase do bacteriófago phi29, do Kit TempliPhi (GE Healthcare), de acordo com o método descrito por (Inoue-Nagata et al., 2004). Alíquotas das amplificações foram submetidas, individualmente, a clivagens com endonucleases de restrição para linearizar o genoma. Os produtos das reações foram analisados em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo (5 µg/mL) e visualizados sob luz UV. Alíquotas das reações de clivagem contendo fragmentos de aproximadamente 2600 nucleotídeos (nt), correspondente a uma cópia de cada componente genômico, foram utilizadas para ligação no vetor pBluescript KS+

(Stratagene) previamente linearizado com a mesma enzima e defosforilado. O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação de células ultracompetentes de *Escherichia coli* estirpe DH5 α pelo método de choque térmico (SAMBROOK, et al., 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 durante 12h. Após incubação, as culturas foram submetidas à extração de DNA plasmidial com KIT illustra™ plasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare), e o padrão eletroforético do DNA plasmidial digerido com a enzima utilizada para clonagem foi utilizado para confirmação da clonagem. Clones foram digeridos com a enzima *Hae*III para seleção de isolados a serem completamente sequenciados comercialmente por primer walking.

3.5 Análises das sequências

Os componentes genômicos virais completos foram montados utilizando o programa CodonCode Aligner v. 4.1.1 (www.codoncode.com). As sequências obtidas foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) e o banco de dados de nucleótídeos não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para determinar as espécies virais com as quais elas compartilham maior identidade de sequência. Alinhamentos múltiplos de sequências nucleotídicas foram preparados para os conjuntos de dados do DNA-A dos isolados de *Begomovirus* utilizando-se o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) e ajustados manualmente no pacote MEGA6 (TAMURA et al., 2013). Sequências similares obtidas a partir do GenBank (Anexo1) foram utilizadas para demarcação de espécie dos novos isolados de begomovírus utilizando-se o programa *Sequence Demarcation Tool* v. 1.2 (MUHIRE et al., 2013). Árvores de Inferência Bayesiana para cada conjunto de dados foram geradas no *web portal* CIPRES (MILLER et al., 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (RONQUIST et al., 2012). O melhor modelo de substituição de nucleótídeos foi determinado para cada conjunto de dados usando MrModeltest 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004) de acordo com o *Akaike Information Criterion* (AIC). O modelo evolutivo GTR+I+G, foi utilizado para o conjunto de dados DNA-A. Análises foram rodadas para cada conjunto de dados por 10 milhões de gerações usando quatro cadeias e amostrando a cada 1.000 gerações, para um total de 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas como uma fase de *burn-in*. Probabilidades posteriores (RANNALA; YANG, 1996) foram determinadas a partir de uma árvore consenso *majority-rule* gerada com as 7.500 árvores remanescentes. As árvores foram visualizadas e editadas nos

programas FigTree v. 1.4 (ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree) e Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Coleta

A planta da espécie *Phyllanthus niruri* (Figura 2) conhecida popularmente como quebra-pedra apresentou sintomas típicos de begomovírus (nanismo, mosaico amarelo e amarelecimento). Este é o primeiro relato dessa espécie com sintomas de begomovírus no Brasil, porém em países da Ásia essa espécie já foi relatada sendo hospedeira (KIRANMAI ET AL., 1998; PANT ET AL, 2018, PN SVALINGAM, A VARMA, 2007; LIU ET AL., 2008; MANN, 2018; FAROOQ ET AL., 2001).



Figura 2. Planta de *Phyllanthus niruri* infectada por begomovírus no município de Rio Largo, Alagoas.

4.2 Extração de DNA e detecção do begomovírus

As amostras do tecido foliar da planta (Figura 2) foram utilizadas para extração de DNA, posteriormente, utilizadas como molde na detecção a nível de gênero, utilizando os primers universais degenerados PALIv1978/PARlc496, direcionando à amplificação de um fragmento de 1,2 kb do DNA-A, validando a presença do vírus através de eletroforese em gel de agarose, corados em brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta (Figura 3).

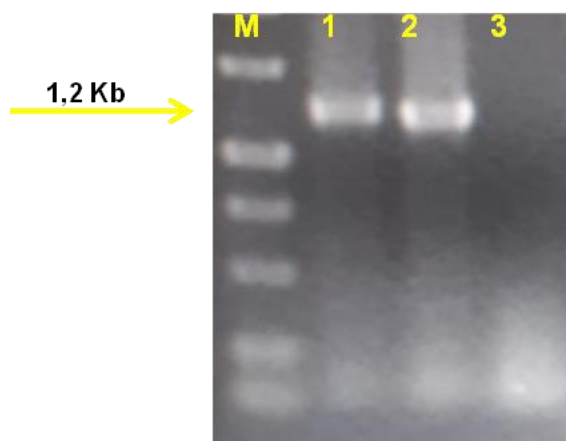


Figura 3. Produtos de PCR amplificados a partir das extrações de DNA obtidas de *Phyllanthus niruri*. M = 1 Kb DNA Plus Ladder; Linha: 1= amostra QP1; 2= Controle positivo 3= Controle negativo.

4.3 Análise das sequências, organização genômica e demarcação de espécies.

Dois clones codificados como BR_QPA_20A, BR_QPH_20A pertencentes ao DNA-A foram sequenciados. A partir do critério de demarcação de espécie $\geq 91\%$ de identidade nucleotídica estabelecido pelo *Geminiviridae Study Group* do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) (BROWN et al., 2015) essas sequências pertencem à isolados de *Blainvillea yellow spot virus*, possuindo cerca de 97% de identidade, segundo as análises feitas BLASTn e de comparações pareadas utilizando SDT (*Sequence Demarcation Tool*) (Figura 4).

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), AC4 e AC5 (Tabela 1).

A ORF AC5 (120aa) foi a única a se diferenciar dos isolados identificados no Sudeste e Nordeste do Brasil, respectivamente com 184aa e 181aa (Castillo-Urquiza et al., 2008; S.S Tavares et al., 2012). Mas Fangfang Li et al. (2015) mostraram que essa ORF é altamente divergente e tem comprimentos variados, inclusive dentro dos mesmos isolados, como foi no caso do *Mungbean yellow mosaic India virus* (MYMIV) variando de 83aa até 143aa.

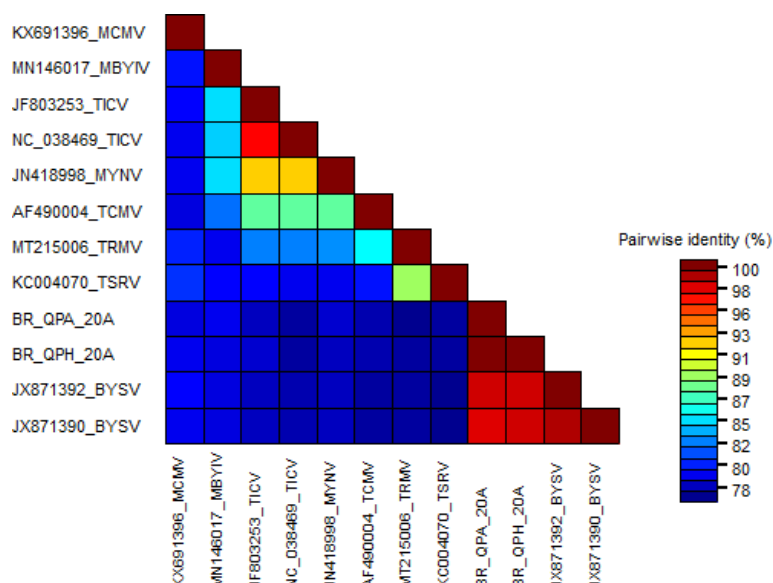


Figura 4. Matriz bidimensional representando porcentagem de identidade de comparações pareadas de sequências nucleotídicas do DNA-A de isolados de begomovírus provenientes Quebra pedra (*Phyllanthus niruri*) (BR_QPA_20A e BR_QPH_20A) com amostras de begomovírus disponíveis no GenBank.

Espécie/Clones	ORFs do componente DNA-A número de aminoácidos(aa)					
	CP	Rep	Ren	Trap	AC4	AC5
<i>Blainvillea yellow spot virus</i>						
BR_QPA_20A	251aa	358aa	132aa	131aa	85aa	120aa
BR_QPH_20A	251aa	358aa	132aa	131aa	85aa	120aa

Tabela 1. Representação das regiões codificadoras, referente aos isolados da espécie *Blainvillea yellow spot virus* obtidas no trabalho.

4.4 Análise filogenética

O relacionamento filogenético (Figura 5) foi realizado com base no DNA-A dos isolados obtidos no trabalho e com quinze sequências pertencentes ao mesmo gênero (tabela 2). O *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) foi utilizado como outgroup, pois é uma espécie que está distantemente relacionada com os componentes internos da árvore. Nos componentes internos foi observada a formação de um clado com os isolados BR_QPA_20A, BR_QPH_20A, JX871392_BYSV, X871390_BYSV. Este agrupamento é um resultado que corrobora e complementa que os isolados do estudo realmente pertencem à espécie *Blainvillea yellow spot virus*. Apesar da sua alta variabilidade genética, até o momento a espécie tem sido associada quase que exclusivamente a planta daninha *Blainvillea rhomboidea*, na qual causa sintomas de manchas amarelas; com exceção de um único relato em *Physalis* spp. (ROCHA et al., 2013). Seu primeiro relato no hospedeiro *Blainvillea rhomboidea* ocorreu em 2008, por Castillo-Urquiza no sudeste do Brasil. No ano de 2012

houve seu segundo relato, dessa vez na região nodeste (Silva et al., 2012). A presença BYSV em *P. niruri* amplia a gama de hospedeiras da espécie.

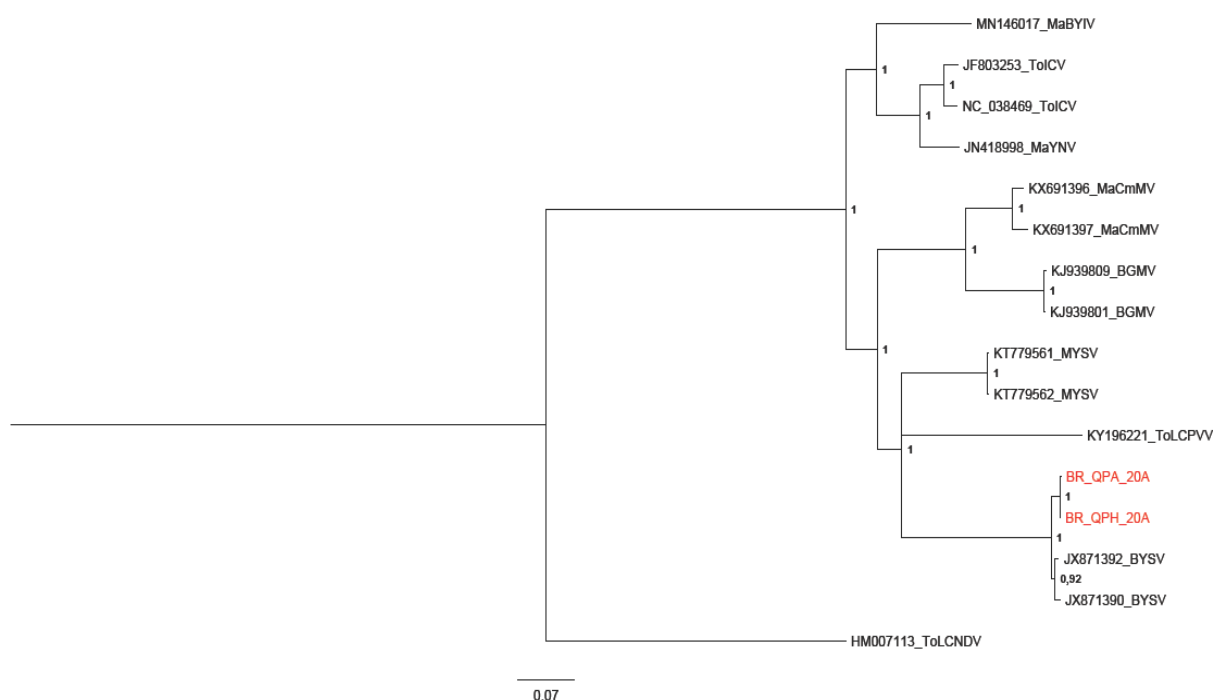


Figura 5. Árvore filogenética do componente DNA-A de begomovírus obtidos no estudo e os dez aproximadamente mais relacionados, utilizando o método de inferência bayesiana.

Código de acesso do GenBank	Espécie	Tamanho do DNA-A
JX871392.1	<i>Blainvillea yellow spot virus</i>	2679 bp
JX871390.1	<i>Blainvillea yellow spot virus</i>	2679 bp
KT779561.1	<i>Macrottilium yellow spot virus</i>	2658 bp
KT779562.1	<i>Macrottilium yellow spot virus</i>	2658 bp
MN146017.1	<i>Macrottilium bright yellow interveinal virus</i>	2611 bp
JF803253.1	<i>Tomato interveinal chlorosis virus isolate</i>	2617 bp
KX691396.1	<i>Macrottilium common mosaic virus</i>	2632 bp
KX691397.1	<i>Macrottilium common mosaic virus</i>	2632 bp
NC_038469.1	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	2617 bp
JN418998.1	<i>Macrottilium yellow net virus</i>	2620 bp
KJ939809.1	<i>Bean golden mosaic virus</i>	2617 bp
KJ939801.1	<i>Bean golden mosaic virus</i>	2617 bp
KY196221.1	<i>Tomato leaf curl purple vein virus</i>	2629 bp
HM007113.1	<i>Tomato leaf curl New Delhi virus-India</i>	2739 bp

Tabela 2. Isolados utilizados para análise filogenética

No mundo, diversas espécies de begomovírus que antes eram encontradas em apenas um hospedeiro, foram relatadas infectando outras plantas daninhas, e até mesmo, culturas economicamente importantes (IDRIS et al., 2003; JOVEL et al., 2004; FIALLO-OLIVE et al., 2013; MUBIN et al., 2010), sendo observado o oposto também (IDRIS et al., 1999; Barbosa et al., 2009; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

Um exemplo é a espécie *Macropitulum yellow spot virus* (MaYSV) que foi descrita pela primeira vez em 2009 (Silva et al., 2012) e emergiu recentemente em feijoeiro. Estudos de diversidade revelaram a prevalência da espécie MaYSV no Nordeste do Brasil em cultivos de leguminosas, como feijão comum e feijão fava no ano de 2011, mostrando a substituição da população de Bean golden mosaic virus, predominante em amostragens no ano de 2005 (LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Este fato se dar pela polifagia do vetor *Bemisia tabaci* (mosca-branca) e a alta agressividade de Middle East – Asia Minor 1 (anteriormente denominado de biótipo B) espécie críptica introduzida na América (Lima et al., 2001; Santos et al., 2004; VillasBôas et al., 2002), somado com a grande variabilidade genética e a elevada produção de sementes das plantas daninhas, pois recentemente foi descoberto a existência da transmissão do vírus por sementes (LIMA et al., 2013; KIM, J. et al., 2015; Kothandaraman et al., 2016; Kil, Eui-Joon, et al., 2016; Suruthi, V., et al, 2018).

Entender a ecologia dos geminivírus na interface entre culturas/agroecossistemas e hospedeiros de plantas não cultivadas/ecossistemas silvestres é essencial compreender sua evolução e emergência. Portanto, é crucial a identificação e a observação do crescimento populacional das espécies emergentes de plantas daninhas para decisões fitossanitárias em campo.

5. CONCLUSÃO

Phyllanthus niruri é considerado hospedeiro de *Blainvillea yellow spot virus*, sendo o primeiro relato no mundo. Novas observações e coletas de campo devem ser realizadas para acompanhar o crescimento populacional da espécie no novo hospedeiro e em plantas cultivadas presentes na área.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALABI, O. J. et al. Alternate hosts of *African cassava mosaic virus* and *East African cassava mosaic Cameroon virus* in Nigeria. **Archives of Virology**, v. 153, n. 9, p. 1743-1747, 2008.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990.
- AMARAKOON, I. I. et al. Molecular and biological characterization of *Macropodium yellow mosaic virus* from Jamaica. **Plant Pathology**, v. 57, n. 3, p. 417-426, 2008.
- 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.
- ARAGÃO, Francisco JL; IBRAHIM, Abdulrazak B.; TINOCO, M. L. RNA interferente. **Ômicas**, v. 360, p. 69-94, 2013.
- ARGÜELLO-ASTORGA, G. R.; RUIZ-MEDRANO, R. An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. **Archives of virology**, v. 146, n. 8, p. 1465-1485, 2001.
- BAGALKOTKAR, G. et al. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, n. 12, p. 1559-1570, 2006.
- 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.
- BARBOSA, et al. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, n. 6, p. 440, 2009.
- BRACERO, V.; RIVERA, L.; BEAVER, J. DNA analysis confirms *Macropodium lathyroides* as alternative host of *Bean golden yellow mosaic virus*. **Plant Disease**, v. 87, n. 9, p. 1022-1025, 2003.
- BONFIM, Kenny. Resistência ao Bean Golden Mosaic Vírus mediada por RNA Interferente em plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). 2007.

BRIDDON, Rob W. et al. Diversity of DNA β , a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. **Virology**, v. 312, n. 1, p. 106-121, 2003.

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

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

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

CARDOSO, Adriana Dias et al. Levantamento fitossociológico de plantas daninhas na cultura da mandioca em Vitória da Conquista, Bahia. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 5, p. 1130-1140, 2013.

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

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

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

DA COSTA, Nivânia Pereira; DOS SANTOS, Terezinha Monteiro; JÚNIOR, Arlindo Leal Boiça. Preferência para oviposição de *Bemisia tabaci* biótipo-B em genótipos de caupi. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 26, n. 2, p. 227-230, 2004.

DA SILVA BANDEIRA, Arlete et al. Levantamento fitossociológico de plantas daninhas na cultura do feijão-caupi. **Revista Cultura Agrônômica**, v. 27, n. 2, p. 327-340, 2018.

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

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

Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004 Mar 19;32(5):1792-7, 2004

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

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

FAUQUET, C. M.; STANLEY, 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, n. 10, 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, 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-OLIVÉ, Elvira et al. A novel class of DNA satellites associated with New World begomoviruses. **Virology**, v. 426, n. 1, p. 1-6, 2012.

Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 08 fev. 2022

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.

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

GAFNI, Yedidya; EPEL, Bernard L. The role of host and viral proteins in intra-and inter-cellular trafficking of geminiviruses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 60, n. 5, p. 231-241, 2002.

GARCÍA-ARENAL, Fernando; ZERBINI, Francisco Murilo. Life on the edge: geminiviruses at the interface between crops and wild plant hosts. **Annual Review of Virology**, v. 6, p. 411-433, 2019.

Giordano, Leonardo de B. et al. Efeito da infecção precoce por Begomovirus com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. *Horticultura Brasileira* [online]. 2005, v. 23, n. 3.

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

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

HOFFMANN, Petra; KATHRIARACHCHI, Hashendra; WURDACK, Kenneth J. A phylogenetic classification of Phyllanthaceae (Malpighiales; Euphorbiaceae sensu lato). **Kew Bulletin**, p. 37-53, 2006.

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.

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

INOUE-NAGATA, Alice K.; LIMA, Mirtes F.; GILBERTSON, Robert 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.

JOVEL, J. et al. Sida micrantha mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from Abutilon mosaic virus. **Archives of Virology**, v. 149, n. 4, p. 829-841, 2004.

KAMRUZZAMAN, Hakim Md; HOQ, Obydul. A review on ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological properties of Phyllanthus niruri. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 4, n. 6, p. 173-180, 2016.

KATHRIARACHCHI, Hashendra et al. Molecular phylogenetics of Phyllanthaceae inferred from five genes (plastid atpB, matK, 3' ndhF, rbcL, and nuclear PHYC). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 36, n. 1, p. 112-134, 2005.

KOTHANDARAMAN, Satya Vijayalakshmi; DEVADASON, Alice; GANESAN, Malathi Varagur. Seed-borne nature of a begomovirus, Mung bean yellow mosaic virus in black gram. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1925-1933, 2016.

KUMAR, Susheel et al. Molecular Characterization of a begomovirus, α -satellite, and β -satellite associated with leaf curl disease of Parthenium hysterophorus in India. **Plant Disease**, v. 100, n. 11, p. 2299-2305, 2016.

KIL, Eui-Joon et al. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.

KIM, J.; KIL, E.J.; KIM, S.; SEO, H.; BYUN, H.S.; PARK, J.; CHUNG, M.N.; KWAK, H.R.; KIM, M.K.; KIM, C.S.; YANG, J.W.; LEE, K.Y.; CHOI, H.S.; LEE, S. Seed transmission of Sweet potato leaf curl virus in sweet potato (Ipomoea batatas). **Plant Pathology**, v. 64, p. 1284-1291, 2015.

LEGG, James P.; FAUQUET, Claude M. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. **Plant molecular biology**, v. 56, n. 4, p. 585-599, 2004.

LI, Fangfang et al. The AC 5 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, Antonio CS; LARA, F. M.; SANTOS, J. M. Morfologia da mosca branca, Bemisia tabaci biótipo "B"(Hemiptera: Aleyrodidae), encontrada em Jaboticabal, SP, com base em eletron-micrografias de varredura. **Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas**, v. 27, p. 315-322, 2001.

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

LOZANO, Gloria 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.

KAUR, Navneet; KAUR, Baljinder; SIRHINDI, Geetika. Phytochemistry and pharmacology of *Phyllanthus niruri* L.: a review. *Phytotherapy research*, v. 31, n. 7, p. 980-1004, 2017.

MANSOOR, Shahid et al. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends in plant science*, v. 8, n. 3, p. 128-134, 2003.

MAR, Talita Bernardon 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, n. 6, p. 1552-1562, 2017.

MACEDO, Monica Alves et al. First report of Tomato severe rugose virus, a tomato-infecting begomovirus, in soybean plants in Brazil. *Plant Disease*, v. 101, n. 11, p. 1959-1959, 2017.

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

MILLER, M. A. et al. The CIPRES Portals. *Cipres*. 2010. Website http://www.phylo.org/sub_sections/portal [8 de fevereiro de 2022]

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. History and current distribution of begomoviruses in Latin America. *Advances in Virus Research*, v. 67, p. 127-162, 2006.

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

MUHIRE, Brejnev Muhizi; VARSANI, Arvind; MARTIN, Darren Patrick. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e108277, 2014.

MUHIRE B., et al. A genome-wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the genus Mastrevirus (family Geminiviridae). **Archives of Virology**, v. 158, p. 1411–1424, 2013.

NAVAS-CASTILLO, Jesús; FIALLO-OLIVÉ, Elvira; SÁNCHEZ-CAMPOS, Sonia. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual review of phytopathology**, v. 49, p. 219-248, 2011.

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

NOUEIRY, Amine O.; LUCAS, William J.; GILBERTSON, Robert L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, v. 76, n. 5, p. 925-932, 1994.

PALMER, Kenneth E.; SCHNIPPENKOETTER, Wendelin H.; RYBICKI, Edward P. Geminivirus isolation and DNA extraction. In: **Plant virology protocols**. Humana Press, 1998. p. 41-52.

PANT, R. P.; ANUJ, B.; MURARI, L. Role of alternate host plants in the transmission of apical leaf curl disease of potato caused by tomato leaf curl New Delhi virus-potato (ToLCNDV-pot.) in Northern India. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 88, n. 8, p. 1258-62, 2018..

PAPROTKA, T.; METZLER, V.; JESKE, H. The first DNA 1-like α satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. **Virology**, v. 404, n. 2, p. 148-157, 2010.

PICÓ, Belén; DÍEZ, María José; NUEZ, Fernando. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The Tomato yellow leaf curl virus—A review. **Scientia Horticulturae**, v. 67, n. 3-4, p. 151-196, 1996

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

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

PRAMESH, D. et al. Host range and genetic diversity of croton yellow vein mosaic virus, a weed-infecting monopartite begomovirus causing leaf curl disease in tomato. *Archives of Virology*, v. 158, n. 3, p. 531-542, 2013.

RAMOS-SOBRINHO, R., et al. Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous Hosts. *Journal of General Virology*, 95,2540–2552. 2014.

RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, v. 43, p. 304-311, 1996.

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

ROJAS, Maria R. et al. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v. 43, p. 361-394, 2005.

ROJAS, Maria R. et al. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, Tomato yellow leaf curl virus. *Virology*, v. 291, n. 1, p. 110-125, 2001.

ROJAS, M. R.; GILBERTSON, R. L.; RUSSELL, D. R.; MAXWELL, D. P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease*, Saint Paul, v.77, n.4, p.340-343, Apr. 1993.

ROMAY, G. et al. First report of Potato yellow mosaic virus infecting *Solanum americanum* in Venezuela. *New Disease Reports*, v. 34, p. 20-20, 2016.

ROMAY, Gustavo et al. Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. *Archives of virology*, v. 155, n. 11, p. 1843-1847, 2010.

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

ROSARIO, Karyna 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.

SAMBROOK J.; RUSSEL D. **Molecular Cloning -A Laboratory Manual** (3^a ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANDERFOOT, Anton A.; LAZAROWITZ, Sondra G. Cooperation in viral movement: the geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. **The Plant Cell**, v. 7, n. 8, p. 1185-1194, 1995.

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

SATTAR, M. Naeem et al. Cotton leaf curl disease—an emerging threat to cotton production worldwide. **Journal of General Virology**, v. 94, n. 4, p. 695-710, 2013.

SHEPHERD, Dionne N. et al. Maize streak virus: an old and complex ‘emerging’ pathogen. **Molecular plant pathology**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2010.

SEIXAS, André Luis; ALVES, Pedro Luis da Costa Aguiar; CARVALHO, Leonardo Bianco de. Pendimethalin aplicado à casca de arroz e serragem para o controle de plantas daninhas em *Ixora chinensis* Lam. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 4, p. 718-727, 2011.

SILVA, S. J. C. et al. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 61, n. 3, p. 457-467, 2012.

SIMMONDS-GORDON, R. N. et al. First report of a complete genome sequence for a begomovirus infecting *Jatropha gossypifolia* in the Americas. **Archives of virology**, v. 159, n. 10, p. 2815-2818, 2014.

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

STEWART, Cheryl et al. The molecular characterisation of a Sida-infecting begomovirus from Jamaica. **Archives of virology**, v. 159, n. 2, p. 375-378, 2014.

SIVALINGAM, P. N.; VARMA, ANUPAM. Non-tomato natural hosts of tomato infecting begomoviruses in. **Indian J. Virol**, v. 18, n. 1, p. 20-27, 2007.

SURUTHI, V. et al. Evidence of seed transmission of dolichos yellow mosaic virus, a begomovirus infecting lablab-bean in India. **VirusDisease**, v. 29, n. 4, p. 506-512, 2018.

TAMURA, K. et al. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

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

VARSANI, A. et al. *Capulavirus* and *Grablovirus*: two new genera in the family *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**, v. 159, p. 2193-2203, 2014.

VILLAS BÔAS, Geni L.; FRANÇA, Félix Humberto; MACEDO, Newton. Potencial biótico da mosca-branca *Bemisia argentifolii* a diferentes plantas hospedeiras. **Horticultura Brasileira**, v. 20, p. 71-79, 2002.

WURDACK, Kenneth J. et al. Molecular phylogenetic analysis of Phyllanthaceae (Phyllanthoideae pro parte, Euphorbiaceae sensu lato) using plastid rbcL DNA sequences. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 11, p. 1882-1900, 2004.

XAVIER, César AD et al. Evolutionary dynamics of bipartite begomoviruses revealed by complete genome analysis. **Molecular Ecology**, v. 30, n. 15, p. 3747-3767, 2021.

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

ZERBINI, F. M. et al. Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, n. 4, p. 475-480, 2005.

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.