



Novo badnavírus em infecção mista com begomovírus em *Centrosema brasilianum*

Página | 3013

New badnavirus in mixed infection with begomovirus in *Centrosema brasilianum*

Raíza da Rocha Oliveira Teixeira ⁽¹⁾; Aline Marques Melo ⁽²⁾;
Mayra Machado de Medeiros Ferro ⁽³⁾; Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva ⁽⁴⁾;
Iraíldes Pereira Assunção ⁽⁵⁾; Gaus Silvestre de Andrade Lima ⁽⁶⁾.

⁽¹⁾ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2261-919x>; Universidade de Pisa (Unipi)/Doutoranda em Alimento, Agricultura e Meio Ambiente do Departamento de Ciências Agrárias, ITALY, E-mail: raiza.rocha@live.com;

⁽²⁾ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7340-5859>; Universidade Federal de Alagoas (UFAL)/Doutoranda do PPG em Proteção de Plantas do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Rio Largo - AL, BRAZIL, E-mail: marques.a@outlook.com;

⁽³⁾ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4362-8127>; Universidade Federal de Alagoas (UFAL)/Pós-Doutoranda do PPG em Proteção de Plantas do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Rio Largo - AL, BRAZIL, E-mail: mayra.ferro@hotmail.com;

⁽⁴⁾ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9336-4126>; Universidade Federal de Alagoas (UFAL)/Professora Doutora do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Rio Largo - AL, BRAZIL, E-mail: sarah.silva@ceca.ufal.br;

⁽⁵⁾ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5087-0168>; Professora Doutora do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Rio Largo - AL, BRAZIL, E-mail: iraildes.assuncao@ceca.ufal.br;

⁽⁶⁾ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2910-5896>; Professor Doutor do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Rio Largo - AL, BRAZIL, E-mail: gaus@ceca.ufal.br.

Todo o conteúdo expresso neste artigo é de inteira responsabilidade dos seus autores.

Recebido em: 13/03/2021; Aceito em: 26/06/2021; publicado em 01/08/2021. Copyright© Autor, 2021.

RESUMO: Fitovírus possuem uma ampla gama de hospedeiras daninhas/silvestres, as quais podem funcionar como reservatórios de vírus. *Centrosema brasilianum* é uma espécie silvestre leguminosa frequentemente encontrada em associação com campos de cultivo na região Nordeste do país. Em março de 2017, foi encontrada uma planta de *C. brasilianum* apresentando sintomas de mosaico e enrolamento foliar, no município de Maceió, estado de Alagoas. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo detectar e caracterizar molecularmente vírus com genoma de DNA infectando *C. brasilianum*. O DNA total foi extraído a partir da amostra foliar e usado como molde para reações de amplificação via PCR utilizando os primers universais para detecção de badnavírus e begomovírus. Sequências parciais foram obtidas para região RT/RNaseH dos badnavírus e DNA-A dos begomovírus. Comparações de sequências pareadas e análises filogenéticas indicaram a presença de infecção mista em *C. brasilianum* por badnavírus e begomovírus. O isolado BR:Mac:17 pode ser considerado uma putativa nova espécie de badnavírus para a qual o nome 'Centrosema bacilliform virus' (CenBV) foi proposto. Esta espécie foi filogeneticamente mais relacionada com *Dioscorea bacilliform* AL virus (DBALV, KX008573), proveniente de *Dioscorea rotundata*. Enquanto, o isolado BR:Mac2:17 é um *Begomovirus*, provavelmente, da espécie *Bean golden mosaic virus* (BGMV). Os resultados demonstram que *C. brasilianum* pode atuar como reservatório de badnavírus e begomovírus na ausência da cultura no campo.

PALAVRAS-CHAVE: Caracterização molecular, *Caulimoviridae*, *Geminiviridae*, Plantas não cultivadas.

ABSTRACT: Plant viruses have a wide range of weed/wild hosts, which can act as virus reservoirs. *Centrosema brasilianum* is a wild leguminous species frequently found in association with cultivated fields in the Northeast region of the country. In March 2017, a plant of *C. brasilianum* was found showing symptoms of mosaic and leaf rolling, in the municipality of Maceió, state of Alagoas. In this context, the present study aimed to detect and molecularly characterize viruses with DNA genomes infecting *C. brasilianum*. Total DNA was extracted from the leaf sample and used as a template via PCR amplification reactions assays using universal primers, aiming respectively at the detection of badnavirus and begomovirus. Partial sequences were obtained for the badnavirus RT/RNaseH and begomovirus DNA-A regions. Comparisons of paired sequences and phylogenetic analyzes indicated the presence of coinfection in *C. brasilianum* by badnavirus and begomovirus. The isolate BR:Mac:17 should be considered a putative new species of badnavirus, for which the name 'Centrosema bacilliform virus' (CenBV) is proposed. This species was phylogenetically more related to *Dioscorea bacilliform* AL virus (DBALV, KX008573), from the *Dioscorea rotundata*. Meanwhile, the isolate BR:Mac2:17 is a *Begomovirus*, probably of the species *Bean golden mosaic virus* (BGMV). The results demonstrate that *C. brasilianum* can act as a reservoir of badnavirus and begomovirus in the absence of culture in the field.

KEYWORDS: Molecular characterization, *Caulimoviridae*, *Geminiviridae*, non-cultivated plants.

INTRODUÇÃO

Espécies dos gêneros *Badnavirus* e *Begomovirus* constituem importantes fitovírus de DNA que tem emergido como sérios patógenos para um grande número de plantas cultivadas, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Bhat et al., 2016; Inoue-Nagata et al., 2016).

Os badnavírus (Família *Caulimoviridae*) possuem DNA fita dupla (dsDNA), semicirculares, com partículas bacilliformes e genoma monossegmentado com cerca de 7,2 a 9,2 kb. São transmitidos frequentemente por cochonilhas (*Planococcus* spp.) e algumas espécies por afídeos (*Aphis* spp.) de forma semi-persistente (Bhat et al., 2016). Badnavírus, também, podem ocorrer como sequências endógenas, que se integram aos genomas hospedeiros e podem ser ativados, por exemplo, através do estresse abiótico, dando origem a formas epissomais infecciosas (Bhat et al., 2016). No Brasil, infecções causadas por badnavírus já foram descritas nas culturas do abacaxi, banana, inhame e cana-de-açúcar (Figueiredo et al., 2006; Brioso et al., 2012; Lima et al., 2013; Santos, 2013; Silva et al., 2015).

Membros do gênero *Begomovirus* (Família *Geminiviridae*) possuem genoma monossegmentado ou bissegmentado de DNA circular de fita simples (ssDNA) encapsulado em partícula geminada de morfologia quasi-icosaédrica (Brown et al., 2015). Estes vírus são transmitidos por um complexo de espécies crípticas de *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) para uma ampla gama de hospedeiras dicotiledôneas (Zerbini et al., 2017). No Brasil, begomovírus são fatores limitantes para os cultivos de feijão e tomate, levando a perdas substanciais na produtividade dessas culturas (Inoue-Nagata et al., 2016).

Além de infectarem plantas cultivadas, os begomovírus também infectam outras hospedeiras daninhas/silvestres, as quais desempenham um importante papel na epidemiologia, atuando como fontes de novos vírus ou variantes virais (Cotrim et al., 2007; Castillo-Urquiza et al., 2008; Silva et al., 2012). Poucos são os relatos de ocorrência de badnavírus em plantas não cultivadas, predominando a infecção de *Commelina* spp., família Commelinaceae (Geering et al., 2012). Estas hospedeiras abrigam muitas espécies de vírus, podendo ocorrer infecções mistas que promovem a interação entre diferentes espécies e/ou isolados levando a uma série de efeitos como: aumento/decrécimo das taxas de replicação, transmissão e expressão de sintomas na

hospedeira (Syller, 2012). Adicionalmente, infecções mistas com mais de uma espécie viral constituem o pré-requisito para ocorrência de recombinação, um importante mecanismo na evolução de badnavírus e begomovírus (Padidam et al., 1999; Ahmad et al., 2011; Silva et al., 2012; Lima et al., 2013; Ramos-Sobrinho et al., 2014; Sharma et al., 2015).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização molecular de vírus de DNA infectando *Centrosema brasilianum*, uma planta daninha associada a diversas culturas economicamente importantes no estado de Alagoas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal

Amostras foliares (0,5-1g) de *C. brasilianum* apresentando sintomas indicativos de infecção por vírus (mosaico e deformação foliar) foram coletadas em Maceió, Alagoas, em março de 2017. O material vegetal foi armazenado como exsiccata e em freezer a -80°C, no Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas.

Deteção e caracterização dos genomas parciais de Begomovírus e Badnavírus

O DNA total foi extraído, a partir da amostra vegetal, segundo protocolo de Lodhi (1994) e submetido à amplificação via *Polymerase Chain Reaction* (PCR), para detecção dos vírus pertencentes aos gêneros *Begomovirus* e *Badnavirus*, utilizando os pares de oligonucleotídeos universais e degenerados, respectivamente, PAL1v1978 (5'-GCATCTGCAGGCCACATYGTTCTTLYCCNG-3') PAR1c496 (5'-AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG-3'), BadnaFP (5'-ATGCCITTYGGIITIAARAAYGCICC-3') e BadnaRP (5'-CCAYTTTRCAIACISICCCCAICC-3') (Rojas et al., 1993; Yang et al., 2003). As reações foram realizadas em um volume final de 60 µL, contendo 6 µL de tampão 10X PCR, 4,8 µL da mistura de dNTPs a 10 mM, 1,8 µL de MgCl a 50 mM, 3 µL de cada oligonucleotídeo a 10 µM, 10 ng do DNA molde e uma unidade da *Taq* DNA Polimerase, completando-se o volume com H₂O ultrapura. As reações foram realizadas

em termociclador (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler) nas seguintes condições: para o gênero *Begomovirus*, utilizou-se uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos e 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 52 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Já para *Badnavirus*, as condições utilizadas foram: desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minutos, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1% sob luz UV e purificados utilizando-se o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), seguindo as recomendações dos fabricantes. O sequenciamento foi realizado comercialmente na Macrogen, Inc. (Seul, Coréia do Sul).

Análise de sequências e demarcação de espécies

As sequências parciais do componente genômico DNA-A dos begomovírus e domínio RT/RNaseH do genoma dos badnavírus foram montadas utilizando-se o programa *CodonCode Aligner* v. 4.1.1 (www.codoncode.com). As sequências obtidas foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLAST n (Altschul et al., 1990) e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para determinar as espécies virais com as quais elas compartilham maior identidade de sequência. As sequências similares obtidas a partir do GenBank (Tabela 1) foram utilizadas para demarcação de espécie dos novos isolados de begomovírus e badnavírus utilizando-se o programa *Sequence Demarcation Tool* (SDT) v. 1.2 (Muhire et al., 2013), com base no nível limite de 80% estabelecido pelo ICTV para badnavírus (Geering et al., 2012) e 91% para begomovírus (Brown et al., 2015).

Tabela 1. Sequências de badnavírus e begomovírus obtidas a partir do banco de dados não-redundantes GenBank.

Espécies (Acrônimos)	Código de acesso no Genbank	Família
<i>Banana streak CA virus</i> (BSCAV)	HQ593111	Caulimoviridae
<i>Banana streak IM virus</i> (BSIMV)	HQ593112	Caulimoviridae
<i>Banana streak OL virus</i> (BSOLV)	N C003381	Caulimoviridae
<i>Banana streak UA virus</i> (BSUAV)	HQ593107	Caulimoviridae
<i>Banana streak UI virus</i> (BSUIV)	HQ593108	Caulimoviridae
<i>Banana streak UL virus</i> (BSULV)	HQ593109	Caulimoviridae
<i>Banana streak UM virus</i> (BSUMV)	HQ593110	Caulimoviridae
<i>Banana streak virus Acuminata Yunnan</i> (BSYNV)	DQ092436	Caulimoviridae
<i>Banana streak virus strain Acuminata Vietnam</i> (BSVNV)	AY750155	Caulimoviridae
<i>Bean golden mosai virus</i> (BGMV)	KJ939753	Geminiviridae
<i>Bean golden mosaic virus isolate BR:Arp1:05</i> (BGMV)	KJ939707	Geminiviridae
<i>Bougainvillea spectabilis chlorotic vein-banding virus</i> (BsCVBV)	EU034539	Caulimoviridae
<i>Cacao swollen shoot virus</i> (CSSV)	NC001574	Caulimoviridae
<i>Canna yellow mottle virus</i> (CaYMV)	MF074075	Caulimoviridae
<i>Centrosema yellow spot virus</i> (CenYSV)	JN419002	Geminiviridae
<i>Citrus yellow mosaic virus</i> (CiYMV)	NC003382	Caulimoviridae
<i>Commelina yellow mottle virus</i> (ComYMV)	NC001343	Caulimoviridae
<i>Cowpea golden mosaic virus</i> (CPGMV)	AF188708	Geminiviridae
<i>Cycad leaf necrosis virus</i> (CyNLV)	EU853709	Caulimoviridae
<i>Dioscorea bacilliform AL virus</i> (DBALV)	KX008573	Caulimoviridae
<i>Dioscorea bacilliform RT virus</i> (DBRTV1)	KX008574	Caulimoviridae
<i>Dioscorea bacilliform RT virus</i> (DBRTV2)	KX008577	Caulimoviridae
<i>Dioscorea bacilliform virus</i> (DBSNV)	DQ822073	Caulimoviridae
<i>Dioscorea rotundata endogenous virus eDBV5</i>	KF829974	Caulimoviridae
<i>Dioscorea rotundata endogenous virus eDBV8</i>	KF829997	Caulimoviridae
<i>Dracaena mottle virus</i> (DrMV)	DQ473478	Caulimoviridae
<i>Fig badnavirus 1</i> (FBV1)	JF411989	Caulimoviridae
<i>Gooseberry vein banding virus</i> (GVBAV)	HQ852248	Caulimoviridae
<i>Grapevine roditis leaf discoloration-associated virus</i> (GRLDaV)	HG940503	Caulimoviridae
<i>Grapevine vein-clearing virus</i> (GVGC)	JF301669	Caulimoviridae
<i>Kalanchoe top-spotting virus</i> (KTSV)	NC004540	Caulimoviridae
<i>Macroptilium common mosaic virus</i> (MaCmMV)	KX691396	Geminiviridae
<i>Macroptilium common mosaic virus isolate ALM9_2A</i> (MaCmMV)	KX691397	Geminiviridae
<i>Macroptilium yellow vein virus</i> (MaYVV) isolate BR:Pai26:11	KJ939906	Geminiviridae
<i>Macroptilium yellow vein virus isolate BR:Pai22:11</i>	KJ939902	Geminiviridae
<i>Mulberry badnavirus 1</i> (MBV-1)	LN651258	Caulimoviridae
<i>Musa acuminata endogenous Badnavirus</i>	KF386728	Caulimoviridae
<i>Pelargonium vein banding virus</i> (PVBV)	GQ428155	Caulimoviridae
<i>Pineapple bacilliform comosus virus</i> (PBCoV)	GU121676	Caulimoviridae
<i>Piper yellow mottle virus</i> (PYMoV)	KJ873042	Caulimoviridae
<i>Rubus yellow net virus</i> (RYNV)	KM078034	Caulimoviridae
<i>Spiraea yellow leaf spot virus</i> (SYLSV)	AF299074	Caulimoviridae
<i>Sugarcane bacilliform Guadeloupe D virus</i> (SCBGCV)	FJ439817	Caulimoviridae

<i>Sugarcane bacilliform Ireng Maleng virus</i> (SCBIMV)	NC003031	<i>Caulimoviridae</i>
<i>Sugarcane bacilliform Mor virus</i> (SCBMOV)	NC_008017	<i>Caulimoviridae</i>
<i>Sugarcane bacilliform virus</i> clone 10 (SCBGAV)	FJ824814	<i>Caulimoviridae</i>
<i>Sugarcane bacilliform virus</i> isolate BB (SCBVBB)	JN377535	<i>Caulimoviridae</i>
<i>Sugarcane bacilliform virus</i> isolate BRU (SCBV-BRU)	JN377537	<i>Caulimoviridae</i>
<i>Sugarcane bacilliform virus</i> isolate BT (SCBVBT)	JN377536	<i>Caulimoviridae</i>
<i>Sugarcane bacilliform virus</i> isolate Iscam (SCBV-IsCam)	JN377534	<i>Caulimoviridae</i>
<i>Sweet potato pakakuy virus</i> (SPVa)	FJ560943	<i>Caulimoviridae</i>
<i>Sweetpotato badnavirus B</i> (SPBb)	FJ560944	<i>Caulimoviridae</i>
<i>Taro bacilliform virus</i> (TaBV)	AF357836	<i>Caulimoviridae</i>
<i>Turmeric mild chlorosis virus</i> (TuMCIV)	AJ810081	<i>Caulimoviridae</i>
<i>Yacon necrotic mottle virus</i> (YNMoV)	KM229702	<i>Caulimoviridae</i>

Análise filogenética

Alinhamentos múltiplos de sequências nucleotídicas foram preparados para o conjunto de dados de sequência parcial do DNA-A dos isolados begomovírus e domínio RT/RNaseH dos badnavírus (Tabela 1), utilizando-se o algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004), e ajustados manualmente no pacote MEGA6 (Tamura et al., 2013). O método de Máxima Verossimilhança para o conjunto de dados de sequência parcial do DNA-A foi usado para determinar o relacionamento filogenético dos begomovírus usando o software MEGA6 (Tamura et al., 2013). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos para cada grupo foi determinado com a ferramenta *Find Best DNA/Protein Models* (ML) e a confiabilidade de cada ramo determinada por bootstrap de 1000 replicações.

Inferência Bayesiana para o conjunto de dados RT/RNaseH dos badnavírus foi realizada no website CIPRES (Miller et al., 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (Ronquist et al., 2012). O melhor modelo de substituição (GTR + I) de nucleotídeos foi determinado para cada conjunto de dados usando MrModeltest 2.3 (Posada; Buckley, 2004) de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC). Análises foram rodadas 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 no programa FigTree v.1.4 (ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises de sequências e demarcação de espécie

O par de oligonucleotídeos BadnaFP/BadnaRP direcionou a amplificação de um fragmento com aproximadamente 580 pares de base (pb) que corresponde ao domínio RT/RNaseH do genoma dos badnavírus. Enquanto o par de oligonucleotídeos PAL1v1978/PAR1C496 direcionou a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1200pb que compreende a região comum e as extremidades amino terminal dos genes *Rep* e *Cp* do genoma dos begomovírus (Figura 1). Esses resultados revelam a ocorrência natural de infecção mista por *Badnavirus* e *Begomovirus* em *C. brasilianum*.

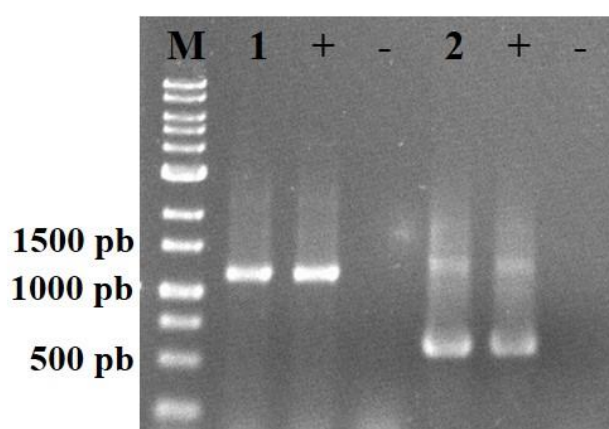


Figura 1. Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) da confirmação da infecção viral via PCR em *C. brasilianum*. **M**, marcador de comprimento (“1Kb DNA ladder RTU”); **1**, fragmento de aproximadamente 1,2kb referente a região comum e as extremidades amino terminal dos genes *Rep* e *Cp* do genoma dos begomovírus; (+), controle positivo; (-), controle H₂O; **2**, fragmento de aproximadamente 580 pb referente ao domínio RT/RNaseH do genoma dos badnavírus; (+), controle positivo; (-), controle H₂O.

As análises BLAST n e comparações de sequências pareadas utilizando SDT confirmaram a infecção mista por *Badnavirus* e *Begomovirus* em *C. brasilianum* (Figuras 2 e 3). O isolado BR:Mac1:17 (acesso no GenBank MW218447) compartilhou maior identidade nucleotídica (68,7%) com o Dioscorea bacilliform AL virus (DBALV,

KX008573), obtido em amostras foliares de *Dioscorea rotundata*, na Nigéria (Bömer et al., 2016). De acordo com o critério de $> 80\%$ de identidade de sequência nucleotídica no domínio RT/RNaseH estabelecido pelo ICTV (Geering et al., 2012), o isolado BR:Mac1:17 corresponde a uma provável nova espécie do gênero *Badnavirus*, para qual foi proposto o nome 'Centrosema bacilliform virus' (CenBV). Este também constitui o primeiro relato da ocorrência natural de infecção por badnavírus em planta não cultivada e na família Fabaceae no Brasil.

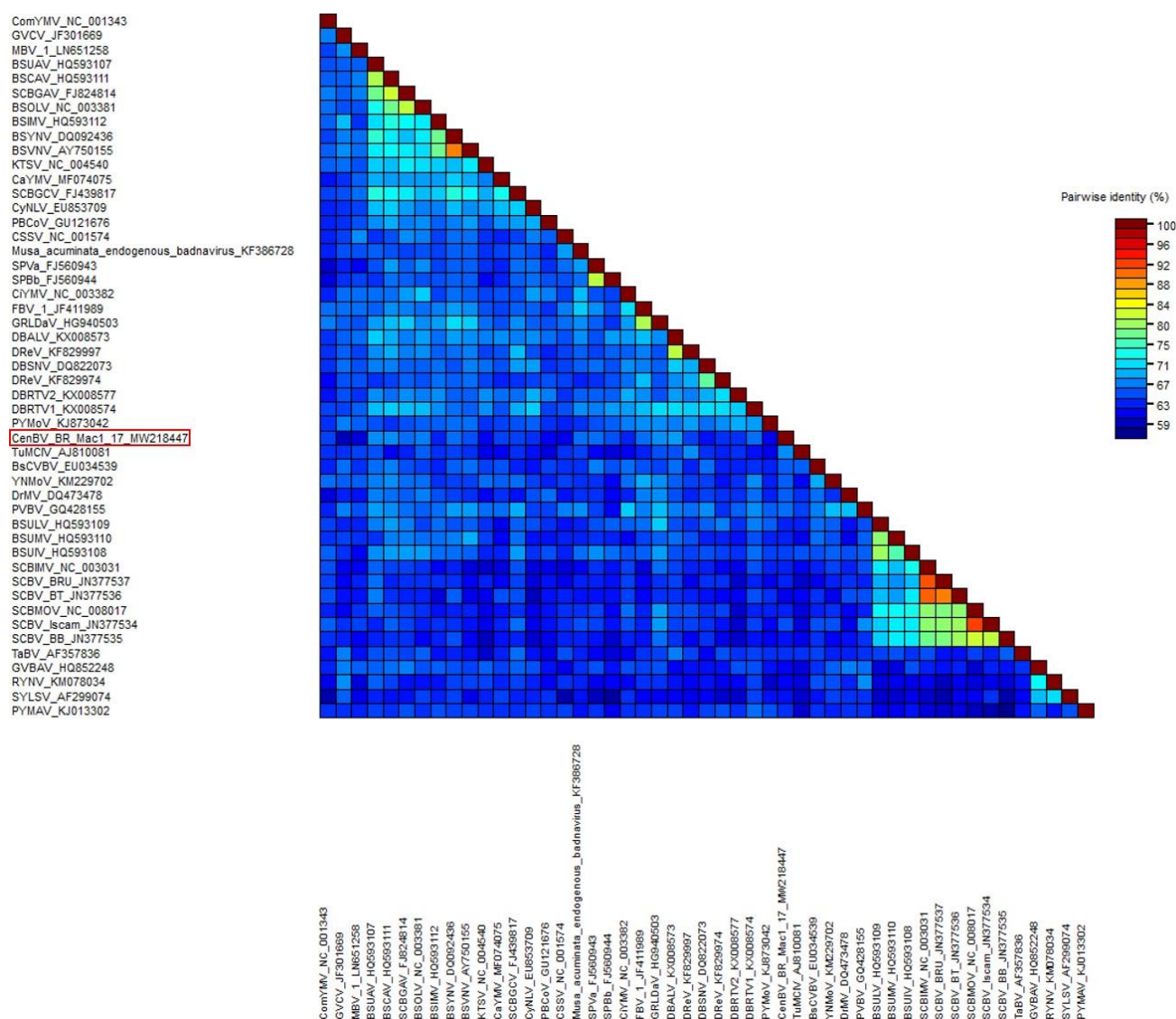


Figura 2. Matriz bidimensional representando porcentagem de identidade de comparações pareadas de sequências nucleotídicas do domínio RT/RNaseH do isolado BR:Mac1:17 com amostras de badnavírus disponíveis no GenBank.

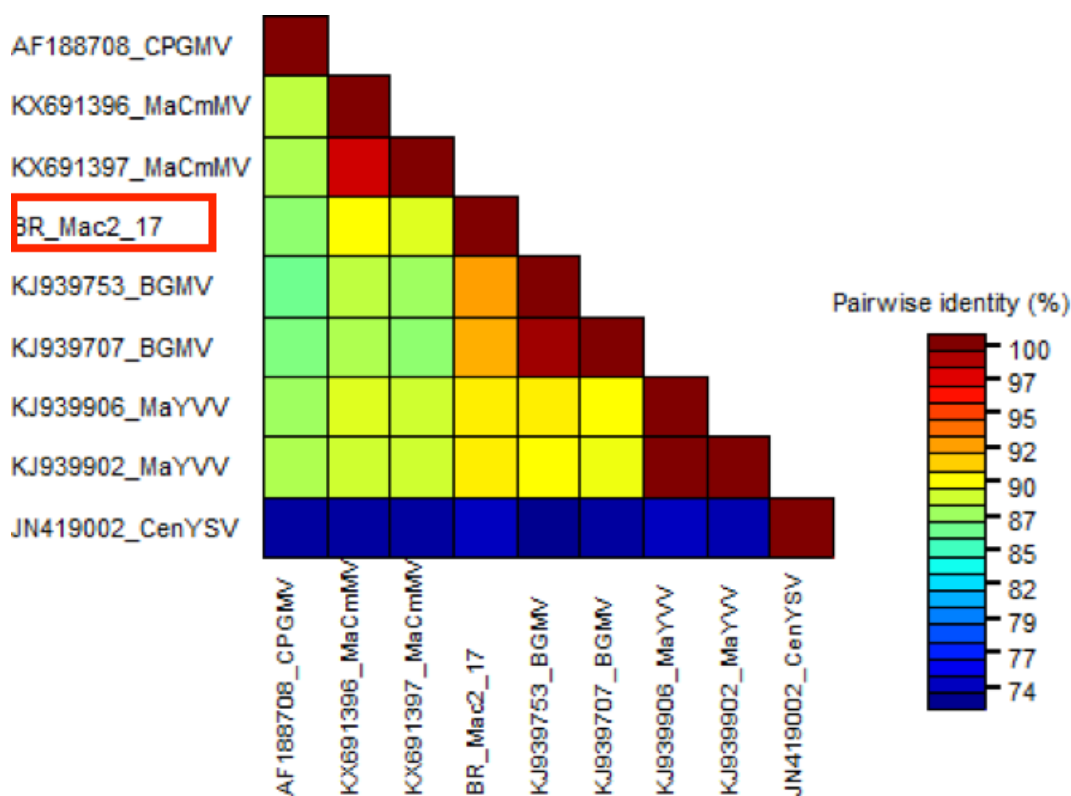


Figura 3. Matriz bidimensional representando porcentagem de identidade de comparações pareadas de sequências nucleotídicas do DNA-A do isolado BR:Mac2:17 com amostras de begomovírus disponíveis no GenBank.

Relatos de detecção de badnavírus em plantas daninhas são escassos, poucas espécies foram já descritas e caracterizadas, por exemplo, *Commelina yellow mottle virus* isolado de *Commelina difusa*, que é a espécie tipo do gênero *Badnavirus* (Geering et al., 2012) e *Red clover bacilliform virus* (RCBV) obtida de *Trifolium pratense* na República Tcheca (Fránová et al., 2012). Dois badnavírus sem espécie definida foram obtidos das plantas daninhas da família Asteraceae, *Ambrosia psilostachya* (Melcher et al., 2008) e *Sclerocarpus africanus* presente em plantações de inhame na Nigéria (Asala et al., 2012). Quanto a ocorrência de badnavírus em plantas da família Fabaceae, apenas duas espécies foram descritas, RCBV (Fránová et al., 2012) e *Wisteria badnavirus 1* (WBV1) isolado da planta ornamental *Wisteria sinensis* na China (Li et al., 2017).

O isolado BR:Mac2:17 apresentou maior identidade variando de 91,8% a 92% com dois isolados do bean golden mosaic virus (KJ939707, KJ939753), obtidos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus*) provenientes dos municípios de Arapiraca e Palmeira dos Índios, Alagoas (Ramos-Sobrinho et al., 2014). O ICTV determina que begomovírus que

compartilham > 91% de identidade de sequência de nucleotídeos do genoma completo pertencem a mesma espécie (Brown et al., 2015). O fragmento de 1,2 kb amplificado, corresponde a aproximadamente metade da sequência do genoma viral do DNA-A (2,6 kb), sugerindo que BR:Mac2:17 seja um novo isolado do BGMV. Até o presente momento, a espécie *Centrosema yellow spot virus* (CenYSV) era o único begomovírus descrito em *C. brasilianum* (Silva et al., 2012). A obtenção da sequência do genoma completo é essencial para revelar o real estado taxonômico isolado BR:Mac2:17.

No Brasil, BGMV tem sido um importante patógeno infectando feijoeiros (*Phaseolus* spp.) desde 1970 (Costa, 1976; Faria; Maxwell, 1999), causando perdas na produção entre 40 e 100% (Morales, 2006). As leguminosas, feijão comum (*P. vulgaris*), feijão fava (*P. lunatus*) e a planta não cultivada *Macroptilium lathyroides* são hospedeiras naturais de BGMV na região Nordeste, incluindo o estado de Alagoas (Silva et al., 2012; Ramos-Sobrinho et al., 2014). Até o momento, não existe relato da ocorrência de infecção natural de *C. brasilianum* por BGMV no Brasil e no mundo. No entanto, em um estudo realizado em Cuba, 44 acessos de *Centrosema* spp. foram testados para resistência a infecção por BGMV e 26 deles foram suscetíveis, na sua maioria da espécie *C. pubescens* (Schultze-Kraft, 1990). Portanto, este consiste no primeiro relato desta infecção natural em *C. brasilianum* em todo o mundo e amplia a gama de hospedeiras desse vírus.

Os sintomas apresentados na planta de *C. brasilianum* co-infectada pelas espécies CenBV e BGMV foram de mosaico e enrolamento foliar (Figura 4). Mosaico amarelo é o sintoma comumente causado por BGMV em plantas infectadas de feijão (*Phaseolus* spp.) e daninhas da família Fabaceae (Faria; Maxwell, 1999; Silva et al., 2012; Ramos-Sobrinho et al., 2014). Enquanto os sintomas mais frequentes causados por badnavírus são clorose interveinal, mosqueado e estrias cloróticas (Geering et al., 2012). Portanto, os sintomas de mosaico e enrolamento foliar causado por coinfeção de CenBV e BGMV em *C. brasilianum* indica a possível ocorrência de sinergismo entre as duas espécies virais. A expressão dos sintomas devido a uma infecção viral depende de vários fatores, como o nível de resistência do hospedeiro, o estágio de crescimento da planta, espécie de vírus ou cepas e condições ambientais (Picó; Díez; Nuez, 1996).



Figura 4. Planta de *C. brasilianum* exibindo sintomas de mosaico e enrolamento foliar (seta vermelha) causados pela de coinfeção com os vírus CenBV e BGMV.

Na natureza, infecções mistas de plantas por vírus são comuns e dois ou mais vírus podem causar sinergismo onde formas mais severas de sintomas são expressas pela planta. Em situações de sinergismo, a concentração do vírus, o movimento do vírus ou ambas podem ser aumentadas (Zhang et al., 2001). No entanto, para confirmar o efeito sinérgico da infecção mista na expressão de sintomas em *C. brasilianum* torna-se necessário realizar um estudo de transmissão experimental para diferenciar os sintomas que cada vírus causa quando em infecção simples na hospedeira e em plantas indicadoras.

Infecções mistas também são importantes para evolução de vírus porque fornece a pré-condição para recombinação, mecanismo que pode contribuir para o surgimento de isolados virais mais severos ou novas espécies de vírus (Padidam et al., 1999; Syller, 2012; Martin et al., 2015). Além disso, recombinação tem sido demonstrada como o principal fator que contribui para a variabilidade de vírus de DNA (Martin et al., 2015).

Análises Filogenéticas

A árvore filogenética de Inferência Bayesiana, obtida para o conjunto de dados RT/RNaseH, revelou que o isolado BR:Mac1:17 (CenBV) ocupou um ramo independente o qual está mais proximamente relacionado com as espécies *Dracaena mottle virus* (DrMV) e *Pelargonium vein banding virus* (PVBV), que infectam *Dracaena sanderiana* (Liliaceae), *Pelargonium peltatum* (Geraniaceae) bem como alguns membros das famílias Amaranthaceae e Solanaceae (Brunt et al, 2008) (Figura 5). Este resultado não corrobora com o observado na análise par-a-par (*pairwise* em inglês) a qual indicou

que a espécie *Grapevine roditis leaf discoloration-associated virus* (GRLLDaV) é mais próxima da espécie tentativa CenBV. O fato de CenBV apresentar baixa identidade de sequência e não apresentar relacionamento filogenético com badnavirus endógenos, indica que esse vírus está ocorrendo de forma episossomal na amostra de *C. brasilianum* da qual foi obtido. Estas incongruências encontradas nas análises par-a-par e filogenéticas podem refletir na ocorrência de possíveis eventos de recombinação entre as espécies.

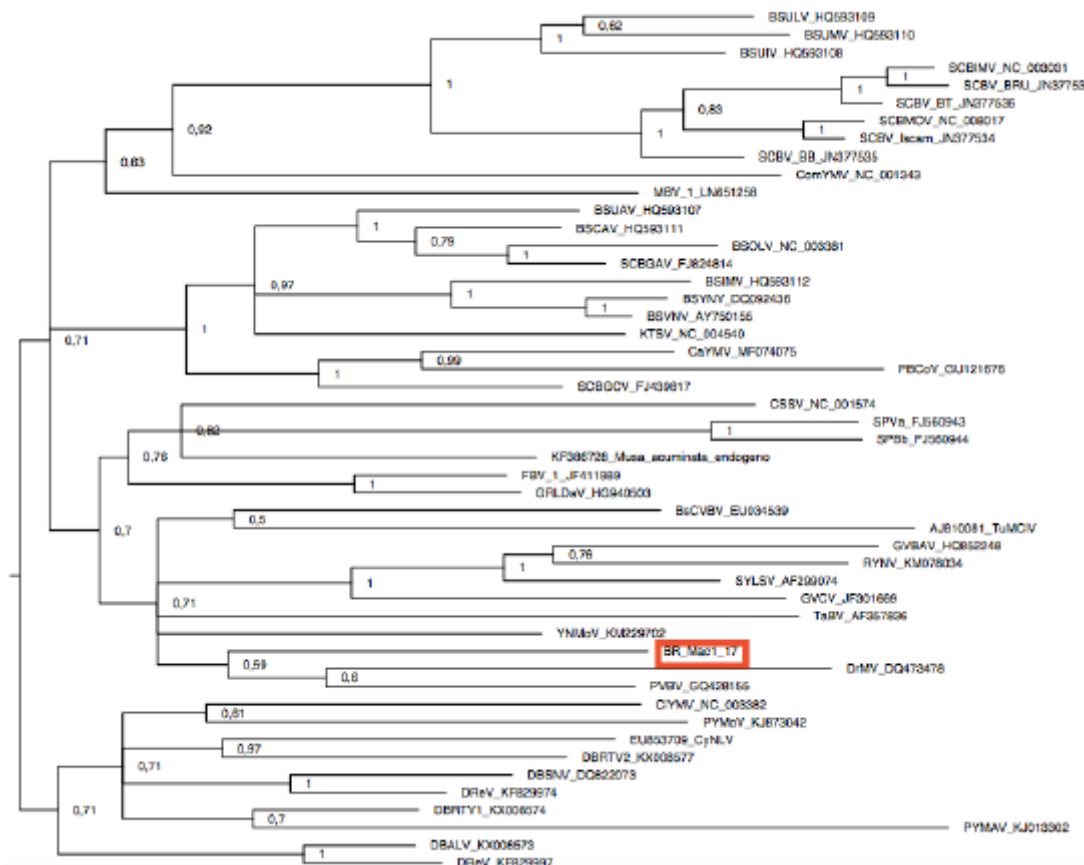


Figura 5. Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada na sequência da região RT/RNaseH da ORF III do genoma dos badnavírus mais similares obtidos no GenBank. BR:Mac1:17 foi isolado neste estudo.

Na árvore ML para o conjunto de dados de sequência parcial do DNA-A, o isolado BR:Mac2:17 (BGMV) agrupou com os dois isolados de BGMV obtidos de *P. lunatus* em Alagoas (Figura 6). Esses resultados reforçam a hipótese que o isolado BR:Mac2:17 pertence a espécie BGMV.

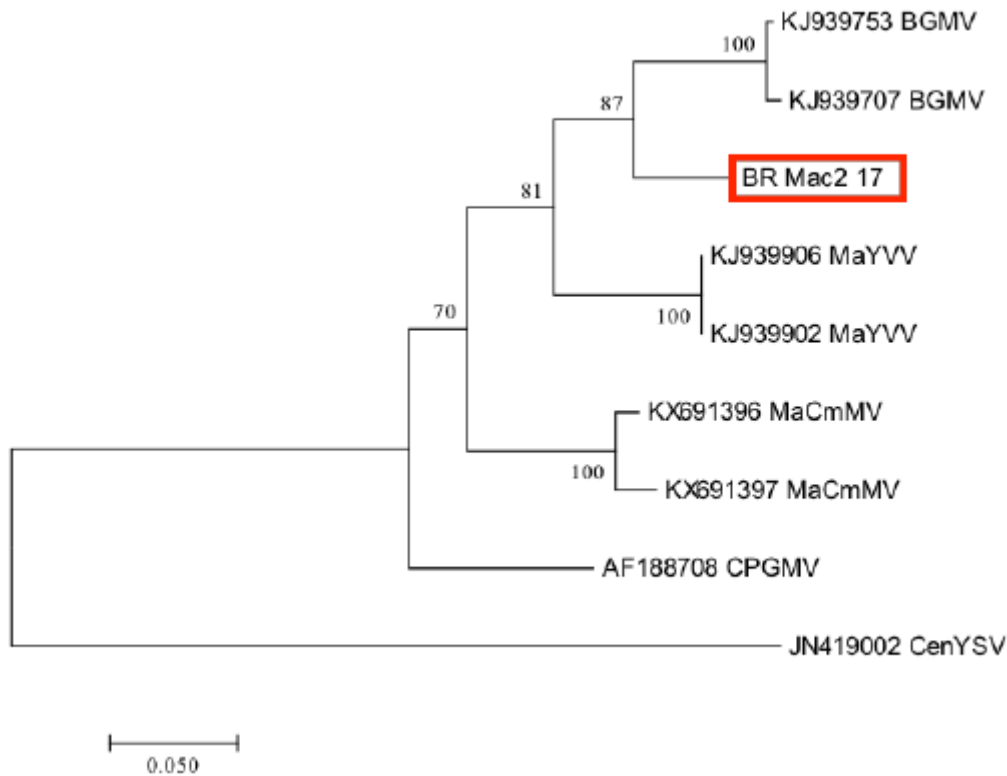


Figura 6. Análise filogenética de Máxima Verossimilhança baseada na sequência parcial do DNA-A do genoma dos begomovírus mais similares obtidos no GenBank BGMV, MaYVV, MaCmMV, CPGMV e CenYSV. BR:Mac2:17 foi isolado neste estudo.

Estudos tem demonstrado que a espécie BGMV possui baixa variabilidade genética em hospedeiras da família Fabaceae como *P. vulgaris* e *P. lunatus* (fava), (Faria; Maxwell, 1999; Ramos-Sobrinho et al., 2014) e que este fato reflete um reduzido grau de eventos de recombinação ocorrendo no seu genoma (Ramos-Sobrinho et al., 2014). Apesar de poucos eventos de recombinação serem encontrados ao longo do genoma dessa espécie, hotspots de recombinação são frequentemente encontrados na região que codifica para os genes *Rep* e *Cp* e tem identificado BGMV e outros begomovírus nativos de plantas daninhas como *Macroptilium lathyroides* e *Sida* spp. como doadores parentais (Silva et al., 2012; Ramos-Sobrinho et al., 2014). Mais uma evidência da importância de hospedeiras daninhas na sobrevivência e evolução de BGMV.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nesse estudo indicam que *Centrosema brasilianum* constitui um reservatório de badnavírus e begomovírus, inclusive ocorrendo coinfeções desses vírus. O isolado BR:Mac1:17 é uma provável nova espécie do gênero *Badnavirus* para qual foi designado o nome tentativo *Centrosema bacilliform virus* e existem fortes evidências que o isolado BR:Mac2:17 pertence a espécie *Bean golden mosaic virus*. Entretanto, estudos adicionais são necessários para demonstrar se *C. brasilianum* desempenha um papel ativo como fonte de inóculo ou fonte contínua de novos vírus para plantas cultivadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Alagoas (FAPEAL) pelo apoio nas pesquisas.

REFERÊNCIAS

1. AHMAD, J. et al. Characterization of Sunn hemp begomovirus and its geographical origin based on in silico structural and functional analysis of recombinant coat protein. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, p. 2600-2610, 2011.
2. ASALA, S. et al. Distribution and incidence of viruses infecting yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. **G.J.B.B.**, vol 1(2), 163-167, 2012.
3. BHAT, A.I. et al. Badnaviruses: The Current Global Scenario. **Viruses**. v. 8, 1-29, 2016.
4. BRIOSO, P. S. T. Badnavirus e seu controle. In: 45 o Congresso Brasileiro de Fitopatologia. **Tropical Plant Pathology** (Suplemento) v. 37, p. 1-19. 2012.

5. BROWN, J. K. et al. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence Comparisons. **Archives of Virology**, v. 160, p. 1593-1619, 2015.
6. BRUNT, A. A. et al. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**. v. 153, p. 1985-1989. 2008.
7. CASTILLO-URQUIZA, G.P. et al. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology** 153:1985-1989, 2008.
8. COSTA, A. S. Whitefly-transmitted plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**. v. 14, p. 429-449. 1976.
9. COTRIM, M. A. et al. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 300-303, 2007.
10. EDGAR, R. C. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792-1797, 2004.
11. FARIA, J. C.; MAXWELL, D. P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. **Phytopathology**. v. 89, n. 3, p. 262-268, 1999.
12. FRÁNOVÁ, J. et al. First Report of Bacilliform Badnavirus-like Virus Particles in Red Clover. **Journal of Phytopathology**, 2012.
13. FIGUEIREDO, D. et al. Detecção e análise da variabilidade de sequências do Banana streak virus (BSV) em bananeiras no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 118-23, 2006.
14. GEERING A. D. W. et al. (Eds.). Virus Taxonomy. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London UK: **Elsevier Academic Press**, pp.429-443, 2012.
15. GUIMARÃES, K. M. et al. Genetic variability of badnaviruses infecting yam (*Dioscorea* spp.) in northeastern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 111-118, 2015.
16. HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**. v. 23, p. 254-267, 2006.
17. INOUE-NAGATA, A. K. et al. A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. **Horticultura Brasileira**. v. 34, n. 1, p. 8-18, 2016.

18. LI, Y. et al. Characterization of a new badnavirus from *Wisteria sinensis*. **Archives of Virology**. 162, 2125-2129, 2017.
19. 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.
20. LODHI, M. A. et al. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**. v. 12, n. 1, p. 6-13, 1994.
21. MALIOGKA, V. I. et al. Control of viruses infecting grapevine. **Adv Virus Res**. 91:175-227, 2015.
22. MARTIN D, P. et al. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. **Virus Evolution**. v. 1, n. 1, p. 1-5, 2015.
23. MARTIN, D. P. et al. The CIPRES Portals. **Cipres**. 2010. Disponível em: <http://www.phylo.org/sub_sections/portal > Acesso em: 28 de novembro de 2020.
24. MELCHER, U. et al. Evidence for novel viruses by analysis of nucleic acids in virus-like particle fractions from *Ambrosia psilostachya*. **Journal of Virological Methods**. v. 152, e. 1-2, p. 49-55, 2008.
25. MILLER, A, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is required for cell cycle-regulated silent chromatin on replicated and nonreplicated genes. **J Biol Chem**. 285(45):35142-54, 2010.
26. MORALES, F. J. History and current distribution of begomoviruses in Latin America. **Advances in Virus Research**. v. 67, 127-162, 2006.
27. 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.
28. MULLER, E. et al. High molecular variability of sugarcane bacilliform viroses in Guadeloupe implying the existence of at least three new species. **Virus Research**. v. 160, n. 1-2, p. 414-419, 2011.
29. MUHIRE, B. et al. A genome-wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the genus *Mastrevirus* (family *Geminiviridae*). **Arch Virol** 158:1411-1424, 2013.

30. MUSARRAT, J. Characterization of Sunn hemp begomovirus and its geographical origin based on in silico structural and functional analysis of recombinant coat protein. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, p. 2600-2610, 2011.
31. PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C. M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, New York. v. 265, n. 2, p. 218-225, 1999.
32. PICÓ, B.; DIAZ, M. J.; NUEZ, F. Viral disease causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The Tomato yellow leaf curl virus – a review. **Scientia Horticulturae**. v. 67, p. 151-196, 1996.
33. 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.
34. RAMOS-SOBRINHO, R. et al. Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous Hosts. **Journal of General Virology**. v. 95, p. 2540-2552, 2014.
35. RANNALA, B.; YANG, Z. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo method. **Molecular Biology and Evolution**. 1996.
36. ROJAS, M. R. et al. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v. 77, n. 4, p. 340-347, 1993.
37. RONQUIST F. et al. A total-evidence approach to dating with fossils, applied to the early radiation of the Hymenoptera. **Syst. Biol.** 2012.
38. SANTOS, J. M. S. Incidência e caracterização de Badnavirus no banco de germoplasma de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) na Serra do Ouro, Murici/AL. **Dissertação** (Mestrado em Proteção de Plantas), Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo-AL, 2013.
39. SCHULTZE-KRAFT, R.; CLEMENTS, R. J. Centrosema: Biology, agronomy, and utilization. **Centro Internacional de Agricultura Tropical** (CIAT), Cali, CO. 667 p. (CIAT publication no. 92), 1990.

40. SHARMA, S. K. et al. Subpopulation level variation of banana streak viruses in India and common evolution of banana and sugarcane badnaviruses. **Virus Genes**. v. 50, n. 3, p. 450-65, 2015.
41. SILVA, J. M. et al. Incidence and species diversity of badnaviruses infecting sugarcane from a germplasm collection in Brazil. **Tropical Plant Pathology**. v. 40, n. 3, p. 212-217, 2015.
42. 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.
43. SYLLER, J. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. **Molecular Plant Pathology**. v. 13, n. 2, p. 204-216, 2012.
44. TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 30, p. 2725-2729, 2013.
45. VARSANI, A. Recombination in Eukaryotic Single Stranded DNA Viruses. **Viruses**. v. 3, n. 9, p. 1699-1738, 2011.
46. VERCHOT-LUBICZ, J. et al. Evidence for novel viruses by analysis of nucleic acids in virus-like particle fractions from *Ambrosia psilostachya*. **Journal of Virological Methods**. v. 152, n. 1-2, p. 49-55, 2008.
47. YANG, I. C. et al. Genomic characterization of taro bacilliform virus. **Archives of Virology**. v. 148, p. 937-949, 2003.
48. ZERBINI, F. M. et al. ICVT Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. **Journal of General Virology**. v. 98, n. 2, p. 131-133, 2017.
49. ZHANG, X. S.; HOLT, J.; COLVIN, J. Synergism between plant viruses: a mathematical analysis of the epidemiological implications. **Plant Pathology**. v. 50, n. 6, p. 732-46, 2001.
50. ZURCHER, E. J. Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database, 1997. Disponível em: <<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>>. Acesso em janeiro de 2021.