

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA

GISLAINE NASCIMENTO VIEIRA DE SÁ

**CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES DE RECOMBINAÇÃO EM GENOMAS DE
BEGOMOVÍRUS BRASILEIROS**

Uberlândia, MG

Dezembro – 2017

GISLAINE NASCIMENTO VIEIRA DE SÁ

**CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES DE RECOMBINAÇÃO EM GENOMAS DE
BEGOMOVÍRUS BRASILEIROS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Alison Talis Martins Lima

Uberlândia, MG

Dezembro – 2017

GISLAINE NASCIMENTO VIEIRA DE SÁ

**CARACTERIZAÇÃO DE PADRÕES DE RECOMBINAÇÃO DE GENOMAS DE
BEGOMOVÍRUS BRASILEIROS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Alison Talis Martins Lima

Aprovado pela banca examinadora em 04 de dezembro de 2017.

Prof. Dr. Lísias Coelho
Membro da banca

Eng. Agrônoma Ana Paula Ferreira Pinheiro
Membro da Banca

Prof. Dr. Alison Talis Martins Lima
Orientador

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela fé e coragem a mim confiadas. Pelos gestos que me fizeram acreditar que Ele estava comigo todos os dias, durante essa caminhada.

À Virgem Maria e Mãe, aos Anjos e Santos do Céu e à Santa Rita de Cássia, que intercedem por mim à Deus.

Aos meus queridos pais, Pedro e Lucivania, que sonham comigo os meus sonhos! Que com esforço e suor, lutaram e lutam para fazer de mim o que sou. Obrigada pelo amor, paciência e compreensão. Essa conquista é de vocês!

Ao Luiz Carlos, pelo suporte, incentivo e companheirismo de sempre.

Aos amigos e familiares pelas orações e torcida.

Ao Prof. Dr. Alison Lima, pela confiança e apoio para a realização deste trabalho.

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação!

RESUMO

O gênero *Begomovirus* (Família *Geminiviridae*) compreende um grande número de espécies virais cujas populações são caracterizadas pela capacidade de evoluir rapidamente por meio da ação dos mecanismos de mutação, recombinação e pseudorecombinação. Juntos, esses mecanismos são responsáveis pelo grau elevado de variabilidade genética observado, principalmente, em populações virais associadas a hospedeiros não-cultivados. A recombinação refere-se à troca de segmentos de DNA ou RNA entre genomas de vírus distintos. Estudos indicam que begomovírus recombinantes são frequentemente encontrados no Brasil infectando diversas culturas de importância econômica. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo contrastar os padrões de recombinação em sequências de DNA-A de begomovírus obtidos de plantas coletadas no Brasil e no restante dos países das Américas. As sequências foram obtidas do Genbank e alinhadas para a detecção dos segmentos recombinantes e inferência de taxas de recombinação escalonadas para população. Com base na análise dos resultados, os genomas dos begomovírus brasileiros apresentaram um número elevado de sítios de recombinação (“breakpoints”) na região intergênica (IR, do inglês: *intergenic region*). Em contraste, genomas de begomovírus de outras partes das Américas apresentaram maior número de sítios de recombinação na região correspondente ao gene *ren* (do inglês: *replication enhancer*). Para melhor caracterizar os padrões de recombinação nos genomas virais, taxas de recombinação foram inferidas para as populações dos begomovírus brasileiros *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Macroptilium yellow spot virus* (MaYSV). As taxas de recombinação inferidas neste estudo para genomas de begomovírus obtidos de plantas coletadas no Brasil foram consideravelmente diferentes daquelas previamente determinadas para uma outra população viral.

Palavras-chave: Evolução molecular, hotspots, variação genética, vírus de DNA fita simples.

ABSTRACT

The genus *Begomovirus* (Family *Geminiviridae*) comprises a large number of viral species whose populations are characterized by the ability to evolve rapidly due to the mechanisms of mutation, recombination and pseudorecombination. Together, these mechanisms are responsible for the high degree of genetic variability observed in viral populations specially those associated with uncultivated hosts. Recombination refers to the exchange of DNA or RNA segments between genomes of distinct viruses. Studies indicate that recombinant begomoviruses are frequently found in Brazil, infecting several crops of economic importance. In this context, this study aimed to contrast the recombination patterns in the DNA-A sequences of begomoviruses obtained from plants collected in Brazil and in other countries from Americas. The sequences were obtained from Genbank and aligned for the detection of recombinant segments and inference of population-scaled recombination rates. Based on the analysis of the results, the genomes of Brazilian begomoviruses showed a higher number of recombination sites ("breakpoints") in the intergenic region (IR). In contrast, the genomes of begomoviruses from other American countries presented a larger number of recombination sites in the region corresponding to the *ren* gene (replication enhancer). To better characterize the recombination patterns in the viral genomes, recombination rates were inferred for populations of the Brazilian begomoviruses *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) and *Macroptilium yellow spot virus* (MaYSV). The recombination rates inferred in this study for genomes of begomoviruses obtained from plants collected in Brazil were considerably different from that previously determined for another viral population.

Keywords: Molecular evolution, hotspots, genetic variation, single-stranded DNA viruses.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	10
1.1	Gênero <i>Begomovirus</i>	10
1.2	Mutação e pseudorecombinação	10
1.3	Recombinação.....	11
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	12
1.4	Obtenção das sequências genômicas virais	12
1.5	Alinhamentos múltiplos de sequências e análises de recombinação	12
1.6	Análise dos padrões de recombinação	13
1.7	Inferência de taxas de recombinação escalonadas para população.....	13
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
1.8	Mapas de densidade de sítios de recombinação (“breakpoints”).....	14
1.9	Inferência de taxas de recombinação escalonadas para população.....	15
5	CONCLUSÕES	18
	REFERÊNCIAS	19

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Begomovirus* apresenta o maior número de espécies virais dentre os nove gêneros pertencentes à família *Geminiviridae* e caracteriza-se por apresentar genomas compostos por DNA circular de fita simples encapsidados em partículas icosaédricas geminadas (Zhang *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2012; Varsani *et al.*, 2014; Varsani *et al.*, 2017). Os begomovírus infectam exclusivamente plantas dicotiledôneas, limitando a produção de diversas culturas nas regiões tropicais e subtropicais (Rosario *et al.*, 2015). Esses vírus são transmitidos por um “complexo críptico de moscas-brancas” denominado *Bemisia tabaci* (Assunção *et al.*, 2006). O gênero *Begomovirus* divide-se em dois grupos: aqueles nativos do ‘Velho Mundo’ (Europa, África, Ásia e Oceania) e do ‘Novo Mundo’ (Américas) (Rybicki, 1994). Enquanto a maioria absoluta das espécies de begomovírus encontradas no ‘Novo Mundo’ apresentam genomas divididos em dois segmentos genômicos (denominados DNA-A e DNA-B), begomovírus nativos do ‘Velho Mundo’ podem apresentar um (genomas não-segmentados) ou dois componentes genômicos (genomas bipartidos) dependendo da espécie viral. No caso dos begomovírus com genomas segmentados, o DNA-A é responsável por codificar proteínas responsáveis pela replicação e encapsidação viral, enquanto o DNA-B codifica genes responsáveis pelo movimento célula-a-célula e via floema (Brown *et al.*, 2012).

Alguns dos fatores que contribuem para os begomovírus serem considerados emergentes e bem-sucedidos são a ampla gama de espécies hospedeiras e sua capacidade de evoluir rapidamente por meio de mutação, recombinação e pseudorecombinação (Melgarejo *et al.*, 2013), sendo responsáveis pela alta variabilidade genética em suas populações (García-Arenal *et al.*, 2001; 2003). Estudos apontam que genomas de begomovírus estão sujeitos a um elevado número de mutações, sendo que a maior parte da variabilidade advém desse mecanismo (Duffy & Holmes, 2008; Lima *et al.*, 2013). A pseudorecombinação se limita a vírus segmentados, onde há a formação de pseudorecombinantes através da troca de componentes genômicos completos entre membros de mesma espécie ou mesmo de espécies diferentes (García-Arenal *et al.*, 2003)

A recombinação caracteriza-se pela troca de fragmentos de DNA ou RNA entre genomas de vírus distintos (Roossinck, 1997), sendo um evento frequentemente observado entre begomovírus de uma mesma estirpe ou entre vírus de espécies diferentes (Navas-Castillo *et al.*, 2000; Padidam *et al.*, 1999; Pita *et al.*, 2001; Saunders *et al.*, 2001). Estudos confirmam que begomovírus recombinantes são frequentemente encontrados no Brasil, principalmente na

última década, infectando diversas culturas de importância econômica (Lima *et al.*, 2013; Inoue-Nagata *et al.*, 2006; Monci *et al.*, 2002; Ndunguru *et al.*, 2005). Assim, para que haja a elaboração de estratégias de controle eficientes, faz-se necessário a quantificação da frequência de tal mecanismo que atua nos begomovírus nativos do Brasil (Seal *et al.*, 2006b).

A descrição e caracterização de inúmeras espécies de begomovírus são possíveis devido ao surgimento de técnicas moleculares, tais como a amplificação de moléculas de DNA circular utilizando-se a DNA polimerase do fago phi29 (Haible *et al.*, 2006; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Fiallo-Olive *et al.*, 2013; Tavares *et al.*, 2012; Albuquerque *et al.*, 2012). Ao decorrer dos anos observa-se que o número de genomas virais tem aumentado exponencialmente, sendo estes disponíveis em bases de dados públicas, como o Genbank. Tais bases são de fácil acesso, possibilitando pesquisas através de diversas ferramentas computacionais, como o uso da bioinformática para estudos de genética de populações em vírus. Apesar do grande número de genomas de begomovírus recombinantes obtidos em plantas coletadas no Brasil, poucos grupos de pesquisa brasileiros têm focado seus esforços em entender, detalhadamente, os padrões predominantes de recombinação ao longo dos genomas virais. Sendo assim, o conhecimento sobre a evolução de populações locais de begomovírus ainda é limitado, dificultando a elaboração de estratégias de controle eficientes para esses vírus no Brasil.

O objetivo do presente estudo é construir um mapa de recombinação de alta resolução e caracterizar, por meio do uso de ferramentas de bioinformática, a estrutura de genomas recombinantes de begomovírus isolados de plantas (cultivadas, daninhas e silvestres) coletadas no Brasil e disponíveis na base de dados do Genbank. Mais especificamente, o estudo tem como foco detectar e caracterizar os eventos de recombinação em genomas de espécies de begomovírus obtidas de plantas coletadas no Brasil; identificar sítios frequentes (“hotspots”) e não frequentes (“coldspots”) de recombinação ao longo dos genomas de begomovírus; e estimar as taxas de recombinação por sítio e escalonadas para população a partir de sequências genômicas de begomovírus (DNA-A) utilizando-se métodos de genética de populações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Gênero *Begomovirus*

O gênero *Begomovirus* é o mais importante da família *Geminiviridae*, sendo que esta se divide em oito outros gêneros: *Becurtovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus* (Varsani *et al.*, 2017). Essa divisão se dá através dos diferentes tipos de organização genômica, tipo de inseto-vetor, gama de hospedeiros e relacionamento filogenético (Brown *et al.*, 2012; Varsani *et al.*, 2014). Os geminivírus se caracterizam por possuir genomas compostos por uma ou duas moléculas de DNA fita simples circular encapsidadas em partículas icosaédricas geminadas (Zhang *et al.*, 2001). Esses patógenos limitam a produção de diversas culturas, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, infectando uma ampla gama de hospedeiros (Morales & Anderson, 2001; Rojas *et al.*, 2005).

Os begomovírus infectam somente plantas dicotiledôneas e são vírus emergentes, ou seja, a incidência e severidade das doenças por eles causadas têm aumentado consideravelmente ao longo das últimas décadas, fato associado também à explosão populacional de seus agentes transmissores, representados por um complexo críptico de espécies de ‘moscas-brancas’ denominado *Bemisia tabaci* (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). Os begomovírus do ‘Velho Mundo’ podem possuir genomas não-segmentados, em sua maioria, ou segmentados (nesse caso, constituídos por duas moléculas denominadas DNA-A e DNA-B) e podem estar associados a alfasatélites e betasatélites, que são moléculas de DNA de fita simples circulares (Mansoor *et al.*, 2003). Já os begomovírus do ‘Novo Mundo’, em sua maioria, possuem o genoma segmentado (Brown *et al.*, 2012; Rosario *et al.*, 2015). As populações de begomovírus possuem alta variabilidade genética. Esta variabilidade se dá através da ação de mecanismos de evolução, sendo os principais a mutação e a recombinação (Ariyo *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2011; García-Arenal *et al.*, 2001; 2003). Além desses dois mecanismos, o fato do genoma de diversos begomovírus ser segmentado, possibilita a ocorrência também da pseudorecombinação (rearranjo) (García-Arenal *et al.*, 2001; Gilbertson *et al.*, 1993b; Sung & Coutts, 1995).

1.2 Mutação e pseudorecombinação

A mutação se dá através da incorporação incorreta dos nucleotídeos durante a replicação viral (Roossinck, 1997). Estudos que mapearam as mutações mais frequentes em genomas de

begomovírus sugerem que uma grande fração da variabilidade genética viral (Duffy & Holmes, 2008; Monjane *et al.*, 2012) resulta de processos bioquímicos espontâneos e erros cometidos pela DNA polimerase do hospedeiro durante o ciclo de infecção viral. Devido ao fato das RNA polimerases não apresentarem atividade de correção de erros, acreditava-se que a frequência de mutações seria consideravelmente maior em vírus de RNA. Entretanto, os vírus de DNA, que utilizam enzimas com atividade de correção de erros para replicação, também estão sujeitos a altos níveis de mutação (Drake, 1991; Shackelton & Holmes, 2006; Shackelton *et al.*, 2005).

O mecanismo de pseudorecombinação, também conhecido como rearranjo, caracteriza-se pela troca de segmentos genômicos completos entre vírus segmentados. Embora begomovírus pseudorecombinantes sejam encontrados infectando naturalmente plantas de várias espécies, o impacto desse mecanismo sobre a evolução desses vírus é pouco conhecido (Andrade *et al.*, 2005; Bull *et al.*, 2007; Gilbertson *et al.*, 1993b; Sung & Coutts, 1995; Hou *et al.*, 1998).

1.3 Recombinação

A recombinação também ocorre durante o processo de replicação viral e se dá pela troca de segmentos de DNA ou RNA entre componentes genômicos de vírus distintos (García-Arenal *et al.*, 2001; 2003; Padidam *et al.*, 1999). Infecções mistas presentes no campo, ou seja, situações nas quais mais de um vírus infecta a mesma planta, possibilitam a troca desses materiais genéticos (Harrison *et al.*, 1997; Pita *et al.*, 2001; Sanz *et al.*, 2000). Ainda não se sabe o que torna os genomas de begomovírus propensos à recombinação (Padidam *et al.*, 1999). Entretanto, observa-se que algumas posições dos genomas virais são mais propensas à recombinação, chamadas “hotspots” e outras menos propensas, chamadas “coldspots” (Lefeuvre *et al.*, 2009). Estimar a frequência na qual a recombinação ocorre faz-se necessária, visto que está relacionada à capacidade adaptativa das populações virais (Monci *et al.*, 2002; Prasanna & Rai, 2007; Varsani *et al.*, 2008; Vuillaume *et al.*, 2011). Além disso, sugere-se que essa frequência está relacionada à rápida suplantação da resistência genética de plantas às doenças, devido à geração de alta variabilidade genética (Seal *et al.*, 2006b).

3 MATERIAL E MÉTODOS

1.4 Obtenção das sequências genômicas virais

Sequências genômicas correspondentes ao DNA-A de begomovírus bipartidos depositados na base de dados do Genbank referentes às principais espécies de begomovírus encontradas no Brasil e nos demais países das Américas foram baixadas utilizando-se o “Taxonomy Browser” (www.ncbi.nlm.nih.gov). As espécies de begomovírus brasileiros baixadas e seus respectivos números de sequências foram: *Bean golden mosaic virus* (155), *Blainvillea yellow spot virus* (16), *Cleome leaf crumple virus* (17), *Euphorbia yellow mosaic virus* (173), *Macroptilium yellow spot virus* (51), *Tomato chlorotic mottle virus* (24), *Tomato severe rugose virus* (84) e *Tomato yellow spot virus* (24), totalizando 544 sequências. As espécies de begomovírus do restante das Américas baixadas e seus respectivos números de sequências foram: *Pepper huasteco yellow vein virus* (47) e *Squash leaf curl virus* (166), totalizando 213 sequências. Todas as sequências foram organizadas de forma a iniciarem-se no sítio de clivagem do nonanucleotídeo invariante localizado na origem de replicação (5-TAATATT//AC-3). Porcentagens de identidade de nucleotídeos obtidas por meio das comparações par-a-par entre todas as sequências supostamente representando uma dada espécie viral foram calculadas utilizando-se o software “Species Demarcation Tool” (SDT) (Muhire *et al.*, 2014). Sequências com menos de 91% de identidade (limite definido pelo ICTV como critério de demarcação de espécies de begomovírus) foram automaticamente realocadas para o conjunto de dados apropriado.

1.5 Alinhamentos múltiplos de sequências e análises de recombinação

Alinhamentos múltiplos de sequências foram construídos utilizando-se o software Muscle (Edgar, 2004) e manualmente corrigidos no programa Mega 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). Os alinhamentos foram analisados para a presença de segmentos recombinantes utilizando-se os métodos RDP (Martin & Rybicki, 2000), Geneconv (Padidam *et al.*, 1999), Bootscan (Martin *et al.*, 2005), Maximum Chi Square (Smith, 1992), Chimaera (Posada & Crandall, 2001), Sister Scan (Gibbs *et al.*, 2000) e 3Seq (Boni *et al.*, 2007) implementados no “Recombination Detection Program” (RDP) versão 4.51 (Martin *et al.*, 2015). Somente eventos de recombinação detectados por, pelo menos, quatro dos métodos de análise disponíveis no programa foram considerados nas análises.

1.6 Análise dos padrões de recombinação

Mapas de densidade de sítios de recombinação (“breakpoints”) foram construídos utilizando-se o RDP4 (Martin *et al.*, 2015) em uma metodologia descrita previamente por Heath *et al.* (2006) e Lefeuve *et al.* (2007a). Os mapas representam o número de vezes que eventos de recombinação separam pares de sítios de nucleotídeos. Essa representação indica a propensão diferencial de segmentos de sequências serem ‘quebrados’ por eventos de recombinação.

1.7 Inferência de taxas de recombinação escalonadas para população

Variações sítio-a-sítio das taxas de recombinação foram analisadas utilizando-se o módulo INTERVAL do software LDhat versão 2.2 (McVean *et al.*, 2002). Foram utilizadas tabelas de verossimilhança pré-computadas para uma taxa de mutação escalonada para população de 0,001; uma frequência alélica mínima de 0,05 (para conjuntos de dados contendo 20 ou mais sequências) ou 0,01 (para conjuntos de dados contendo entre 11 e 19 sequências) e uma taxa de recombinação inicial de 5. Foram corridas 100.000 simulações de Monte Carlo via cadeias de Markov (“Markov chain Monte Carlo”, MCMC) amostrando-se a cada 2000 simulações, sendo que as primeiras 500 foram descartadas como “burnin”.

A frequência média de recombinação obtida após a primeira corrida com os parâmetros mencionados acima foi utilizada para uma segunda corrida usando os mesmos parâmetros, mas com a taxa de recombinação inicial substituída por aquela estimada na primeira corrida. Para evitar imprecisões nas estimativas das taxas de recombinação das extremidades dos genomas linearizados foi adotada a mesma estratégia proposta por Lefeuve *et al.* (2009). Foram simulados genomas circulares por meio da construção de alinhamentos repetidos sequencialmente. As estimativas de taxa de recombinação para as extremidades repetidas dos alinhamentos foram excluídas posteriormente e considerados somente os dados provenientes de uma única unidade genômica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.8 Mapas de densidade de sítios de recombinação (“breakpoints”)

Um conjunto de dados composto por oito espécies de begomovírus obtidas de plantas coletadas no Brasil, sendo elas o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Blainvillea yellow spot virus* (BIYSV), *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV), *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), *Macroptilium yellow spot virus* (MaYSV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), totalizando 544 sequências, foi alinhado utilizando-se o programa Muscle e os eventos de recombinação foram detectados pelo RDP. O mesmo programa foi utilizado para calcular o número de sítios de recombinação (“breakpoints”) presentes em janelas móveis de 200 nucleotídeos ao longo de todos os genomas virais. Os dados foram plotados (Figura 1) e pode-se observar a presença de um grande número de “breakpoints” (“hotspot”) na região intergênica representada nas porções inicial e final dos genomas linearizados.

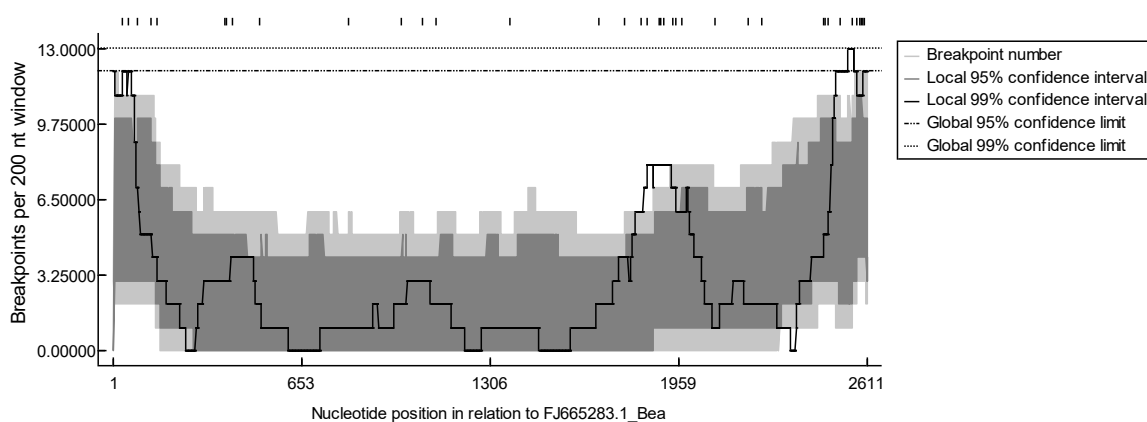


Figura 1. Mapa de densidade de sítios de recombinação (“breakpoints”) detectados em genomas de begomovírus brasileiros.

A título de comparação, o mesmo procedimento foi realizado com um conjunto de dados composto por duas espécies de begomovírus obtidas de plantas coletadas em outros países das Américas, sendo elas o *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) e *Squash leaf curl virus* (SqLCV), totalizando 213 sequências. Observa-se a presença de um “hotspot” na porção central do genoma linearizado na região correspondente ao gene *ren* (Figura 2), o que contrasta com o padrão de recombinação obtido para os genomas de begomovírus brasileiros, sugerindo perfis distintos de evolução molecular entre os dois grupos de vírus.

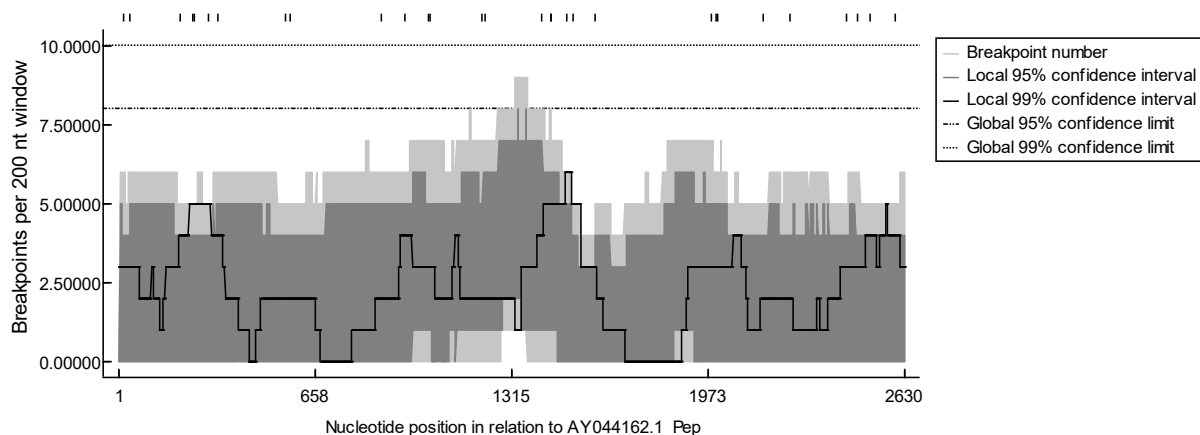


Figura 2. Mapa de densidade de sítios de recombinação (“breakpoints”) detectados em genomas de begomovírus obtidos de plantas coletadas em outros países das Américas.

Lefeuve *et al.* (2009), também encontraram um hotspot na região intergênica dos genomas linearizados de uma outra espécie de begomovírus obtida do ‘Velho Mundo’, o *Cotton leaf curl virus* (CLCuV). O padrão de recombinação determinado por Lefeuve *et al.* (2009), entretanto, se difere parcialmente daquele observado para os begomovírus brasileiros, já que além do “hotspots” presente na região intergênica, um segundo “hotspots” de recombinação foi detectado em genomas alinhados do CLCuV na região correspondente ao gene *ren*. Por outro lado, embora begomovírus de outras partes das Américas tenham apresentado um “hotspots” na região correspondente ao gene *ren*, na região intergênica não apresentaram.

1.9 Inferência de taxas de recombinação escalonadas para população

Partindo do princípio de que os begomovírus brasileiros ToSRV e o MaYSV apresentam um número de sequências mínimo necessário às análises mais detalhadas, taxas de recombinação escalonadas para as populações foram inferidas somente para essas espécies virais.

A Figura 3 demonstra a distribuição das taxas de recombinação ao longo do DNA-A dos genomas do ToSRV. Embora esse begomovírus seja o principal vírus que infecta a cultura do tomateiro no Brasil atualmente, e se encontre presente em todas as regiões produtoras do país, este apresentou uma baixa taxa de recombinação quando comparado ao MaYSV (Figura 4), o qual apresentou uma alta taxa de recombinação ao longo do genoma, principalmente na região mediana do genoma linearizado e na extremidade 3’ da região intergênica. Trabalhos recentes indicam que o MaYSV apresenta uma ampla gama de hospedeiros que inclui fabáceas não cultivadas e cultivadas como, por exemplo, o feijoeiro. A emergência recente desse vírus poderia estar relacionada, dentre outros fatores, às altas taxas de recombinação estimadas para

os seus genomas gerando grande diversidade genética. Trabalhos anteriores indicam que a ocorrência frequente de recombinação em populações de begomovírus tem sido associada à ampliação da gama de hospedeiros desses vírus (Monci *et al.* 2002).

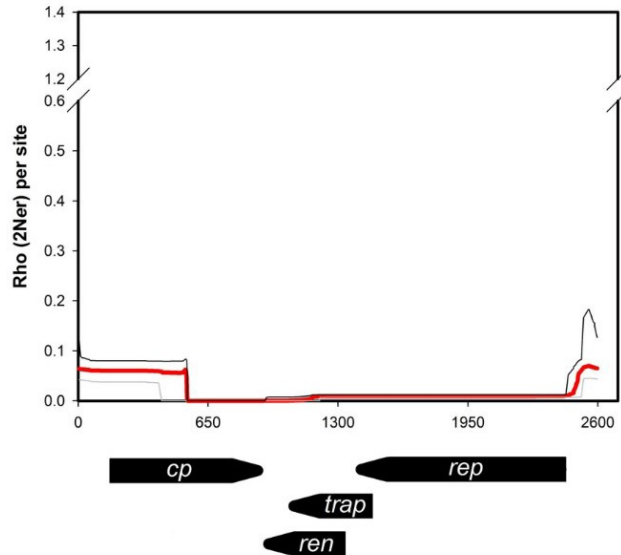


Figura 3. Taxas de recombinação por sítio escalonadas para população baseada em sequências do DNA-A do ToSRV. A localização precisa dos genes virais presentes ao longo do componente genômico é representada na parte basal do gráfico. As linhas vermelhas representam estimativas médias de taxas de recombinação pontual, enquanto as linhas preta e cinza representam, respectivamente, os intervalos de credibilidade superiores e inferiores de 95% das taxas de recombinação pontual determinadas a partir das simulações de RJMCMC.

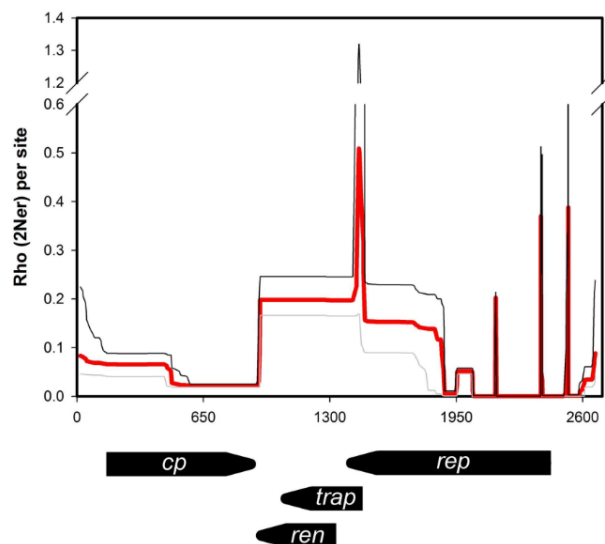


Figura 4. Taxas de recombinação por sítio escalonadas para população baseada em sequências do DNA-A do MaYSV. A localização precisa dos genes virais presentes ao longo do componente genômico é representada na parte basal do gráfico. As linhas vermelhas representam estimativas médias de taxas de recombinação pontual, enquanto as linhas preta e cinza representam, respectivamente, os intervalos de credibilidade superiores e inferiores de 95% das taxas de recombinação pontual determinadas a partir das simulações de RJMCMC.

Lefeuvre *et al.* (2009) observaram ao longo do DNA-A do begomovírus do ‘Velho Mundo’, *East African cassava mosaic virus* (EACMV), uma alta taxa de recombinação na região codificadora do gene *rep* (do inglês: *replication associated protein*). No presente estudo verificou-se uma taxa de recombinação significativamente maior na região 5’ do gene *cp* (do inglês: *coat protein*) para ambos os begomovírus brasileiros quando comparados ao EACMV. Por outro lado, as taxas de recombinação inferidas para a região correspondente ao gene *rep* do ToSRV (Figura 3) foram comparativamente baixas quando comparadas àquelas estimadas para a mesma região genômica do EACMV. Para o MaYSV (Figura 4) observou-se um aumento acentuado na taxa de recombinação na região de interface entre os genes codificadores das proteínas Trap (*Transactivating protein*) e Rep, assim como observado no EACMV. Entretanto, alguns trechos de sequência no interior da região codificadora do gene *rep* do MaYSV apresentaram baixas taxas de recombinação diferindo-se do padrão observado para o EACMV, no qual uma alta e constante taxa de recombinação foi estimada ao longo de todo o gene.

5 CONCLUSÕES

Os genomas de begomovírus brasileiros apresentaram um “hotspot” na região intergênica, diferindo-se do padrão observado para os genomas de begomovírus obtidos de plantas coletadas em outros países das Américas, que por sua vez, apresentaram “hotspots” na região correspondente ao gene *ren*. Os resultados apresentados neste estudo confirmam hipóteses propostas por outros pesquisadores, indicando que esses dois grupos de vírus evoluem de formas distintas. Nesse caso, regiões distintas dos genomas de ambos os grupos apresentaram níveis maiores de propensão à ‘quebra’ por eventos de recombinação.

Quanto às taxas de recombinação, o ToSRV e o MaYSV apresentaram padrões distintos de distribuição de taxas de recombinação ao longo de seus genomas. Além disso, ambos padrões inferidos neste estudo para os begomovírus foram distintos daquele determinado previamente para o EACMV, o que se contrapõe à hipótese proposta por Lefeuvre *et al.* (2009) de que os padrões de recombinação em populações de vírus de DNA de fita simples são conservados evolutivamente.

REFERÊNCIAS

- Albuquerque, L. C., Varsani, A., Fernandes, F. R., Pinheiro, B., Martin, D. P., Oliveira Ferreira, P. d. T., Lemos, T. O. & Inoue-Nagata, A. K. (2012). Further characterization of tomatoinfecting begomoviruses in Brazil. *Arch Virol* 157, 747-752.
- Andrade, E. C., Manhani, G. G., Fontes, E. P. B. & Zerbini, F. M. (2005). Pseudorecombination between Sida micrantha mosaic virus (SimMV) and other begomoviruses. *Fitopatologia Brasileira* 30, S190.
- Ariyo, O. A., Koerbler, M., Dixon, A. G. O., Atiri, G. I. & Winter, S. (2005). Molecular variability and distribution of Cassava mosaic begomoviruses in Nigeria. *J Phytopathol* 153, 226-231.
- Assunção, I.P., Listik, A.F., Barros, M.C.S., Amorin, E.P.R., Silva, S.J.C., O. Silva, Izael, Ramalho-Neto, C.E., & Lima, G.S.A. (2006). Diversidade genética de Begomovirus que infectam plantas invasoras na região nordeste. *Planta Daninha*, 24(2), 239-244.
- Boni, M. F., Posada, D. & Feldman, M. W. (2007). An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* 176, 1035-1047.
- Brown, J. K., Fauquet, C. M., Briddon, R. W., Zerbini, F. M., Moriones, E. & Navas-Castillo, J. (2012). Family *Geminiviridae*. In *Virus Taxonomy 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 351-373. Edited by A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens & E. J. Lefkowitz. London, UK: Elsevier Academic Press.
- Bull, S. E., Briddon, R. W., Sserubombwe, W. S., Ngugi, K., Markham, P. G. & Stanley, J. (2007). Infectivity, pseudorecombination and mutagenesis of Kenyan cassava mosaic begomoviruses. *J Gen Virol* 88, 1624-1633.
- Castillo-Urquiza, G. P., Beserra Jr., J. E. A., Bruckner, F. P., Lima, A. T. M., Varsani, A., Alfenas-Zerbini, P. & Zerbini, F. M. (2008). Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Arch Virol* 153, 1985-1989.
- Drake, J. W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7160-7164.
- Duffy, S. & Holmes, E. C. (2008). Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus*. *J Virol* 82, 957-965.
- Edgar RC (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797.
- Fiallo-Olive, E., Chirinos, D. T., Geraud-Pouey, F., Moriones, E. & Navas-Castillo, J. (2013). Complete genome sequences of two begomoviruses infecting weeds in Venezuela. *Arch Virol* 158, 277-280.
- García-Arenal, F., Fraile, A. & Malpica, J. M. (2001). Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annu Rev Phytopath* 39, 157-186.
- García-Arenal, F., Fraile, A. & Malpica, J. M. (2003). Variation and evolution of plant virus populations. *Int Microbiol* 6, 225-232.
- Ge, L. M., Zhang, J. T., Zhou, X. P. & Li, H. Y. (2007). Genetic structure and population variability of tomato yellow leaf curl China virus. *J Virol* 81, 5902-5907.

- Gibbs, M. J., Armstrong, J. S. & Gibbs, A. J. (2000). Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* 16, 573-582.
- Gilbertson, R. L., Hidayat, S. H., Paplomatas, E. J., Rojas, M. R., Hou, Y.-H. & Maxwell, D. P. (1993b). Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. *J Gen Virol* 74, 23-31.
- Haible, D., Kober, S. & Jeske, H. (2006). Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *J Virol Met* 135, 9-16. .
- Harrison, B. D., Zhou, X., Otim Nape, G. W., Liu, Y. & Robinson, D. J. (1997). Role of a novel type of double infection in the geminivirus-induced epidemic of severe cassava mosaic in Uganda. *Ann Appl Biol* 131, 437-448.
- Heath, L., van der Walt, E., Varsani, A. & Martin, D. P. (2006). Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. *J Virol* 80, 11827-11832.
- Hou, Y. M., Paplomatas, E. J. & Gilbertson, R. L. (1998). Host adaptation and replication properties of two bipartite geminiviruses and their pseudorecombinants. *Mol Plant-Microbe Interact* 11, 208-217.
- Inoue-Nagata, A. K., Martin, D. P., Boiteux, L. S., Giordano, L. D., Bezerra, I. C. & de Avila, A. C. (2006). New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato-infecting begomovirus complex. *Pesqui Agropecu Bras* 41, 1329-1332.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33, 5.
- Lefevre, P., Lett, J. M., Reynaud, B. & Martin, D. P. (2007a). Avoidance of protein fold disruption in natural virus recombinants. *Plos Pathog* 3, e181.
- Lefevre, P., Lett, J. M., Varsani, A. & Martin, D. P. (2009). Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *J Virol* 83, 2697-2707.
- Lima, A. T. M., Sobrinho, R. R., Gonzalez-Aguilera, J., Rocha, C. S., Silva, S. J. C., Xavier, C. A. D., Silva, F. N., Duffy, S. & Zerbini, F. M. (2013). Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in begomovirus populations infecting noncultivated hosts. *J Gen Virol* 94, 418-431.
- Mansoor, S., Briddon, R. W., Zafar, Y. & Stanley, J. (2003). Geminivirus disease complexes: An emerging threat. *Trends Plant Sci* 8, 128-134.
- Martin, D. & Rybicki, E. P. (2000). RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 16, 562-563.
- Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A. & Muhire, B. (2015). RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1, vev003.
- Martin, D. P., Posada, D., Crandall, K. A. & Williamson, C. (2005). A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS research and human retroviruses* 21, 98-102.
- McVean, G., Awadalla, P. & Fearnhead, P. (2002). A coalescent-based method for detecting and estimating recombination from gene sequences. *Genetics* 160, 1231-1241.
- Melgarejo, T. A., Kon, T., Rojas, M. R., Paz-Carrasco, L., Zerbini, F. M. & Gilbertson, R. L. (2013). Characterization of a new world monopartite begomovirus causing leaf curl disease

- of tomato in Ecuador and Peru reveals a new direction in geminivirus evolution. *J Virol* 87, 5397-5413.
- Monci, F., Sanchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. & Moriones, E. (2002). A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology* 303, 317-326.
- Monjane, A. L., Pande, D., Lakay, F., Shepherd, D. N., van der Walt, E., Lefeuvre, P., Lett, J. M., Varsani, A., Rybicki, E. P. & Martin, D. P. (2012). Adaptive evolution by recombination is not associated with increased mutation rates in Maize streak virus. *BMC Evol Biol* 12, 252.
- Morales, F. J. & Anderson, P. K. (2001). The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch Virol* 146, 415-441.
- Muhire, B. M., Varsani, A. & Martin, D. P. (2014). SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. *PloS one* 9, 8.
- Navas-Castillo, J., Sanchez-Campos, S., Noris, E., Louro, D., Accotto, G. P. & Moriones, E. (2000). Natural recombination between Tomato yellow leaf curl virus-is and Tomato leaf curl virus. *J Gen Virol* 81, 2797-2801.
- Ndunguru, J., Legg, J., Aveling, T., Thompson, G. & Fauquet, C. (2005). Molecular biodiversity of cassava begomoviruses in Tanzania: Evolution of cassava geminiviruses in Africa and evidence for East Africa being a center of diversity of cassava geminiviruses. *Virol J* 2, 21.
- Padidam, M., Sawyer, S. & Fauquet, C. M. (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265, 218-224.
- Pita, J. S., Fondong, V. N., Sangare, A., Otim-Nape, G. W., Ogwal, S. & Fauquet, C. M. (2001). Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *J Gen Virol* 82, 655-665.
- Posada, D. & Crandall, K. A. (2001). Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 13757-13762.
- Prasanna, H. C. & Rai, M. (2007). Detection and frequency of recombination in tomato-infecting begomoviruses of South and Southeast Asia. *Virol J* 4, 111.
- Rojas, M. R., Hagen, C., Lucas, W. J. & Gilbertson, R. L. (2005). Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annu Rev Phytopath* 43, 361-394.
- Roossinck, M. J. (1997). Mechanisms of plant virus evolution. *Annu Rev Phytopath* 35, 191-209.
- Rosario, K., Seah, Y. M., Marr, C., Varsani, A., Kraberger, S., Stainton, D., Moriones, E., Polston, J. E., Duffy, S. & Breitbart, M. (2015). Vector-Enabled Metagenomic (VEM) Surveys Using Whiteflies (Aleyrodidae) Reveal Novel Begomovirus Species in the New and Old Worlds. *Viruses*, 7(10), 5553-5570.
- Rybicki, E. P. (1994). A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Arch Virol* 139, 49-77.
- Sanz, A. I., Fraile, A., García-Arenal, F., Zhou, X., Robinson, D. J., Khalid, S., Butt, T. & Harrison, B. D. (2000). Multiple infection, recombination and genome relationships among

- begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *J Gen Virol* 81, 1839-1849.
- Saunders, K., Bedford, I. D. & Stanley, J. (2001). Pathogenicity of a natural recombinant associated with ageratum yellow vein disease: implications for geminivirus evolution and disease aetiology. *Virology* 282, 38-47.
- Seal, S. E., Van den Bosch, F. & Jeger, M. J. (2006b). Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25, 23-46.
- Shackelton, L. A. & Holmes, E. C. (2006). Phylogenetic evidence for the rapid evolution of human B19 erythrovirus. *J Virol* 80, 3666-3669.
- Shackelton, L. A., Parrish, C. R., Truyen, U. & Holmes, E. C. (2005). High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 379-384.
- Silva, S. J. C., Castillo-Urquiza, G. P., Hora-Junior, B. T., Assunção, I. P., Lima, G. S. A., PioRibeiro, G., Mizubuti, E. S. G. & Zerbini, F. M. (2012). Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. *Plant Pathol* 61, 457-467.
- Silva, S. J. C., Castillo-Urquiza, G. P., Hora-Júnior, B. T., Assunção, I. P., Lima, G. S. A., PioRibeiro, G., Mizubuti, E. S. G. & Zerbini, F. M. (2011). High genetic variability and recombination in a begomovirus population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil. *Arch Virol* 156, 2205-2213.
- Smith, J. M. (1992). Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* 34, 126-129.
- Sung, Y. K. & Coutts, R. H. (1995). Pseudorecombination and complementation between potato yellow mosaic geminivirus and tomato golden mosaic geminivirus. *J Gen Virol* 76, 2809-2815.
- Tavares, S. S., Ramos-Sobrinho, R., Gonzalez-Aguilera, J., Lima, G. S. A., Assunção, I. P. & Zerbini, F. M. (2012). Further molecular characterization of weed-associated begomoviruses in Brazil with an emphasis on *Sida* spp. *Planta Daninha* 30, 305-315.
- Varsani, A., Navas-Castillo, J., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Brown, J. K., Zerbini, F. M. & Martin, D. P. (2014). Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. *Arch Virol* 159, 11.
- Varsani, A., Roumagnac, P., Fuchs, M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Idris, A., Briddon, R. W., Rivera-Bustamante, R., Zerbini, F. M. & Martin, D. P. (2017). Capulavirus and Grablovirus: two new genera in the family Geminiviridae. *Arch Virol* 162.
- Varsani, A., Shepherd, D. N., Monjane, A. L., Owor, B. E., Erdmann, J. B., Rybicki, E. P., Peterschmitt, M., Briddon, R. W., Markham, P. G., Oluwafemi, S., Windram, O. P., Lefeuvre, P., Lett, J. M. & Martin, D. P. (2008). Recombination, decreased host specificity and increased mobility may have driven the emergence of maize streak virus as an agricultural pathogen. *J Gen Virol* 89, 2063-2074.
- Vuillaume, F., Thebaud, G., Urbino, C., Forfert, N., Granier, M., Froissart, R., Blanc, S. & Peterschmitt, M. (2011). Distribution of the phenotypic effects of random homologous recombination between two virus species. *Plos Pathog* 7, e1002028.

Zhang, W., Olson, N. H., Baker, T. S., Faulkner, L., Agbandje-McKenna, M., Boulton, M. I., Davies, J. W. & McKenna, R. (2001). Structure of the *Maize streak virus* geminate particle. *Virology* 279, 471-477.