



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
ESCOLA DE AGRONOMIA (EA)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
MELHORAMENTO DE PLANTAS (PPGGMP)

NAÍZE MOTTA BERTHOLDO

**Diversidade genética de BGMV em linhagens elite de
feijoeiro-comum**

GOIÂNIA

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Naíze Motta Bertholdo

3. Título do trabalho

Diversidade genética de BGMV em linhagens elite de feijoeiro-comum

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Siqueira Guedes Coelho, Professor do Magistério Superior**, em 05/07/2021, às 14:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **NAIZE MOTTA BERTHOLDO, Discente**, em 05/07/2021, às 14:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2145926** e o código CRC **5CCEBD48**.

NAÍZE MOTTA BERTHOLDO

**Diversidade genética de BGMV em linhagens elite de
feijoeiro-comum**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Escola de Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho

Coorientador:

Dr. Josias Corrêa de Faria

GOIÂNIA

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Bertholdo, Naíze Motta

Diversidade genética de BGMV em linhagens elite de feijoeiro comum [manuscrito] / Naíze Motta Bertholdo. - 2021.

lvii, 57 f.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho; co orientador Dr. Josias Corrêa de Faria.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia (EA), Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Goiânia, 2021.

Bibliografia.

1. Bean golden mosaic virus. 2. Phaseolus vulgaris. 3. mosaico dourado. 4. diversidade genética. I. Coelho, Alexandre Siqueira Guedes, orient. II. Título.

CDU 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE AGRONOMIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 101/2021 da sessão de Defesa de Dissertação de **Naíze Motta Bertholdo**, que confere o título de Mestra em Genética e Melhoramento de Plantas, na área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas.

Aos trinta dias do mês de junho do ano de dois mil e vinte e um, a partir das catorze horas, por meio de videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “Diversidade genética de BGMV em linhagens elite de feijoeiro-comum”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Prof. Alexandre Siqueira Guedes Coelho - EA/UFG**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Dr. Josias Corrêa de Faria - Embrapa Arroz e Feijão**, coorientador; **Prof. Érico de Campos Dianese - EA/UFG**, membro titular externo; **Profa. Leila Garcês de Araújo - ICB/UFG**, membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **APROVADA** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo **Prof. Alexandre Siqueira Guedes Coelho**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos trinta dias do mês de junho do ano de dois mil e vinte e um.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Siqueira Guedes Coelho, Professor do Magistério Superior**, em 30/06/2021, às 16:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Érico de Campos Dianese, Usuário Externo**, em 30/06/2021, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **JOSIAS CORREA DE FARIA, Usuário Externo**, em 06/07/2021, às 10:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leila Garces De Araujo, Professora do Magistério Superior**, em 07/07/2021, às 15:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2145925** e o código CRC **D850A505**.

Dedicatória

AD MAIOREM DEI GLORIAM

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus. Por ter me conduzido até aqui e ter, através do mestrado, me mostrado o chamado à docência. Por ter me sustentado neste caminho longo e sinuoso, mas que já teve bons frutos e, se assim me conceder, terá muitos mais.

À minha família, pelo apoio em todos os momentos e por me acompanharem, mesmo de longe, nessa caminhada de crescimento pessoal e profissional. Por entenderem minhas ausências e pelo entusiasmo com a minha pesquisa.

Ao meu namorado pela paciência, apoio e companheirismo.

Agradeço a todos os meus amigos. Aos que estiveram comigo no PPGGMP, e ofereceram seu tempo, apoio e amizade. Aos que me ajudaram diretamente com este trabalho. Aos que compartilham a caminhada e valores, buscando crescimento sempre maior.

Agradeço, muito mesmo, ao meu orientador Prof. Alexandre. Por toda a disponibilidade e dedicação, pelo conhecimento e confiança, e principalmente pelo exemplo, por ser um excelente professor, o melhor que já tive.

Ao Dr. Josias, meu coorientador, por todo o apoio e incentivo. Aprendi muito com seu entusiasmo, dedicação e amor ao que faz. Sem dúvidas, este tempo de aprendizado com o senhor, foi um grande divisor de águas na minha vida.

Agradeço, em especial, à Letícia e ao Pedro, que fizeram as coletas comigo.

Aos meus alunos, que sempre ficam tão animados quando descobrem que vírus infectam plantas.

Agradeço à Embrapa Arroz e Feijão pelo suporte, estrutura e oportunidade.

Agradeço à UFG por todos estes anos de aprendizado.

Agradeço à FAPEG pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA DO FEIJOEIRO	12
2.2	VIROSES QUE AFETAM O FEIJOEIRO	14
2.2.1	Vírus em plantas	14
2.2.2	Vírus que infectam o feijoeiro	16
2.2.2.1	BGMV e o mosaico dourado	17
2.2.3	Resistência genética ao BGMV em feijoeiro	20
2.3	GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE VÍRUS EM PLANTAS	21
2.3.1	Diversidade genética em populações de <i>Begomovirus</i>	24
2.4	TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO DE DNA DE NOVA GERAÇÃO ...	26
2.4.1	Tecnologia de sequenciamento por síntese	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	COLETA DE MATERIAL	29
3.2	OBTENÇÃO DE MATERIAL GENÉTICO VIRAL.....	31
3.2.1	Extração de DNA total	32
3.2.2	Seleção de DNA circular	33
3.3	SEQUENCIAMENTO DE DNA	33
3.4	ANÁLISES DOS DADOS.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	EXTRAÇÃO DO DNA VIRAL	36
4.2	ANÁLISE DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO.....	37
4.2.1	Obtenção das sequências genômicas de BGMV	37
4.2.2	Análise de diversidade genética	40
4.2.3	Análise de estrutura genética	47
4.2.4	Análise de divergência genética	48

5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
6	REFERÊNCIAS	52

RESUMO

BERTHOLDO, N. B. **Diversidade genética de BGMV em linhagens elite de feijoeiro-comum**. 2021. 57 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2021.¹

O Brasil é o principal consumidor de feijão comum do mundo, sendo também o principal produtor, com sua produção voltada principalmente para o mercado interno. Dentre os diversos fatores que influenciam a produtividade, a ampla distribuição de mosaico dourado nas lavouras de feijoeiro-comum é de grande importância, causando clorose, enrugamento foliar e nanismo, podendo levar a perdas de até 100%. Diante disso, a Embrapa desenvolveu, através da tecnologia de RNAi, um feijoeiro transgênico resistente ao vírus causador do mosaico dourado, o *Bean golden mosaic virus*. A presença de um gene de resistência, no entanto, pode aumentar a pressão de seleção sobre o patógeno que, por meio de mutações, pode suplantar esta resistência. Apesar de serem vírus de DNA, a literatura descreve que nas espécies de *Begomovirus*, gênero do qual o BGMV faz parte, as taxas de mutação são semelhantes àquelas dos vírus de RNA. No entanto, até então, o BGMV apresenta-se como um vírus com menor variabilidade genética em relação aos demais do gênero. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética de populações de BGMV que infectam diferentes linhagens de feijoeiro-comum, transgênicas e convencionais, em dois locais, Brasília e Santo Antônio de Goiás. Para tal, foram coletadas amostras foliares de linhagens e cultivares presentes em ensaios de valor de cultivo e uso, buscando comparar as variantes dentro de cada planta. Utilizou-se, para tanto, uma metodologia amplamente utilizada em seres vivos, o sequenciamento de DNA de nova geração, seguido da genotipagem de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs). Utilizando os SNPs encontrados, foram realizadas análises de diversidade genética populacional em que, com base nas estimativas da proporção de sítios polimórficos e da diversidade genética de Nei, encontrou-se maior diversidade genética nas populações virais amostradas em plantas transgênicas. Estes resultados sugerem que nestas plantas, apesar da restrição existente à replicação viral e da consequente menor abundância das partículas virais, estão dadas as condições para a ocorrência de pressão de seleção sobre as populações virais. Os resultados das análises de estrutura genética populacional revelaram a existência de estruturação por localidade, como tem sido amplamente descrito na literatura.

Palavras-chave: BGMV, *Phaseolus vulgaris*, mosaico-dourado, diversidade genética.

¹ Orientador: Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho. EA/UFG.
Coorientador: Dr. Josias Corrêa de Faria. Embrapa Arroz e Feijão.

ABSTRACT

BERTHOLDO, N. B. **BGMV genetic diversity in common bean elite lines**. 2021. 57 f. Dissertation (Master of Science in Genetics and Plant Breeding) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2021.¹

Brazil is the main common bean consumer in the world, also being the main producer, whose production supply the intern market. Among the factors that influence the productivity, the wide distribution of *Bean golden mosaic virus* in common bean fields is very important because it can cause chlorosis, leaf crumpling and stunting, and lead up to 100% yield losses. As a response to that, Embrapa developed, through the RNAi approach, a transgenic common bean line with resistance to the *Bean golden mosaic virus*. Nonetheless, the presence of a resistance gene can increase the selection pressure over the pathogen, that can mutate and overcome the resistance. Despite being DNA viruses, it is described that in species of *Begomovirus*, the genus of the BGMV, mutation rates are similar to those of RNA viruses. Nevertheless, until now, BGMV has shown smaller genetic variability compared to other species of the genus. The objective of this work was to characterize BGMV populations that infect different common bean elite lines, transgenic and conventional, in two locations: Brasília and Santo Antônio de Goiás. To that, leaf samples from different elite lines were collected in Value for Cultivation and Use (VCU) trials, searching for differences in viral populations from different sources. We used a strategy widely used on studies related to other living beings: next generation DNA sequencing followed by single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyping. The SNPs obtained were used to carry out genetic diversity analysis. The estimates of the proportion of polymorphic sites and of Nei's gene diversity revealed a greater genetic diversity in viral populations sampled in transgenic plants. The results suggest that, despite the restriction to the viral replication and, therefore, of smaller viral populations, the necessary conditions to the occurrence of selection pressure are given. In the genetic structure analysis, a significant effect was attributed to localities, as has been widely described in literature.

Keywords: BGMV, *Phaseolus vulgaris*, golden mosaic, genetic diversity.

¹ Advisor: Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho. EA/UFG.
Co-Advisor: Dr. Josias Corrêa de Faria. Embrapa Arroz e Feijão.

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro-comum é uma leguminosa de grande importância socioeconômica para o Brasil, o qual é o maior produtor mundial deste tipo de grão. A produção brasileira atende principalmente ao mercado interno, onde o consumo de feijão comum é elevado. Trata-se de uma excelente fonte de proteínas, além de diversos outros nutrientes essenciais à dieta humana (CONAB, 2020).

O cultivo do feijoeiro-comum ocorre em três safras ao longo do ano no Brasil e, em cada época/região, diferentes fatores podem limitar sua produção. Diversas doenças e pragas acometem o feijoeiro, inclusive doenças virais. Doenças virais em plantas são de difícil controle pois, após a infecção, o manejo para controle da doença não é efetivo. Dessa forma, as principais medidas envolvidas no controle de vírus em plantas são aquelas preventivas, incluindo o uso de sementes e mudas saudáveis, plantas resistentes ou minimamente tolerantes e o controle de vetores. Este se dá principalmente através do uso de defensivos químicos, que, no entanto, podem levar à seleção, nestas espécies, de mecanismos de resistência aos inseticidas utilizados. A melhor forma de atuar nesses casos, se dá pelo manejo integrado (Medeiros et al., 2015). O uso de cultivares resistentes é de grande importância nesse cenário pois, ao impedir a infecção, a planta deixa de ser fonte de inóculo, limitando a disseminação da doença.

A principal doença viral do feijoeiro é o mosaico dourado, causada pelo bean golden mosaic virus (BGMV) que é transmitido pela mosca-branca (*Bemisia tabaci* MEAM1) (CONAB, 2016). Em atendimento a esta demanda, a EMBRAPA Arroz e Feijão desenvolveu a variedade BRS FC401RMD, resistente ao mosaico dourado, utilizando a técnica de RNA interferente (Faria et al., 2016). Esta técnica é baseada no mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional, no qual um construto que codifica um fragmento do gene associado à replicação do vírus, que forma um grampo, desencadeia a sua quebra em pequenos RNAs interferentes, que culminam com a degradação de transcritos complementares a estes, por um complexo proteico. Como os transcritos degradados dariam origem a proteína de replicação, a replicação e o acúmulo de DNAs virais são diminuídos, evitando assim a doença na planta (Bonfim, et al., 2007).

O uso de genótipos resistentes ao mosaico dourado, em campo, evidenciou a presença de um *Carlavirus* (o *Cowpea mild mottle vírus*) causando, principalmente, enrugamento foliar (Faria, et al., 2016). Diante disso, evidenciou-se a necessidade de caracterização das comunidades virais em feijoeiro, buscando antecipar-se a outros possíveis vírus e direcionar programas de melhoramento. Estudos prévios, com os dados deste trabalho, associados à caracterização de comunidades virais no feijoeiro, buscando verificar a presença de infecções mistas e a influência do transgene sobre a composição destas comunidades, indicaram que a presença de BGMV é predominante em relação aos demais possíveis vírus de DNA, de forma que se faz importante caracterizar essas populações e verificar a possibilidade de impacto da transgenia sobre elas, haja vista a ausência de estudos recentes neste sentido.

A presença de genes de resistência a patógenos, sejam naturais ou introduzidos via transgenia, em plantas, exerce, do ponto de vista evolutivo, forte pressão de seleção sobre as populações do patógeno, o que pode resultar na suplantação daquela resistência por parte deste (García-Arenal et al., 2003). Vários trabalhos foram publicados na literatura descrevendo a superação de genes de resistência a vírus estabelecidos (Beam & Ascencio-Ibáñez, 2020). Quanto a isso, é importante monitorar as populações virais, verificando a variabilidade destas, principalmente associadas às regiões genômicas que possam estar sob maior pressão de seleção. Por se tratar de uma resistência via RNAi, que é altamente sítio-específica, o estudo de genética de populações de BGMV é de grande valia, pois permite verificar a diversidade e, a partir disso, inferir sobre a pressão de seleção existente.

No presente trabalho optou-se por utilizar amostras de populações virais presentes em linhagens elite de feijoeiro-comum oriundas de Ensaio de Valor de Cultivo e Uso (VCU), os quais são ensaios que objetivam realizar a caracterização agrônômica de linhagens, para fins de registro de cultivares. Nestes ensaios, as futuras cultivares são avaliadas em termos de suas características morfológicas, biológicas e/ou fisiológicas. Nos ensaios de VCU são também obtidos dados de produtividade, de comportamento frente a estresses como doenças e pragas, e de regiões de adaptação. De acordo com as especificações dispostas na Portaria nº 294/1998, bem como na Instrução Normativa nº 58/2008, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, é necessária a realização de ensaios de VCU para 29 espécies vegetais, incluindo o feijoeiro. Haja vista que nestes ensaios estão presentes diversas cultivares oriundas das fases finais dos programas de melhoramento, bem como cultivares comerciais comumente utilizadas, torna-se possível a comparação entre as

cultivares que estão sendo produzidas atualmente com aquelas mais antigas, permitindo a avaliação do impacto do melhoramento genético e da presença do transgene sobre as populações virais em questão.

Neste contexto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de realizar a caracterização da diversidade genética em populações de BGMV em linhagens elite de feijoeiro-comum, avaliadas em ensaios VCU. Objetivou-se, especificamente, além de dimensionar a magnitude da diversidade genética nas populações virais, avaliar o grau de estruturação e divergência genética nestas populações, bem como avaliar a associação de fatores, como o genótipo do hospedeiro e a presença de transgenes, com os valores das estimativas dos parâmetros avaliados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA DO FEIJOEIRO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa que ocupa papel de destaque no prato do brasileiro, sendo que o consumo *per capita* no país é de cerca de 17 kg/ano (Faria et al., 2016). Do ponto de vista nutricional é fonte de proteínas, carboidratos complexos, vitaminas, ferro e cálcio. Em termos mundiais, o feijão é consumido por cerca de um bilhão de pessoas (Rossi et al., 2017). É rico em aminoácidos essenciais como a lisina, mas pobre em metionina, o que torna a combinação típica da dieta brasileira, o arroz com feijão, uma excelente fonte de aminoácidos essenciais, uma vez que o arroz, por ser um cereal, é rico em metionina e cisteína (Gepts et al., 2008).

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão, no entanto o continente asiático é o que apresenta maiores exportações deste grão (Gepts et al., 2008). O plantio de feijão no Brasil ocupa atualmente cerca de 2,9 milhões de hectares, tendo apresentado uma produção estimada em 3 milhões de toneladas na safra 2020/2021 (CONAB, 2021). A região brasileira responsável pela maior parte da produção de feijão, em 2020, foi a região Sudeste, com 26,4% da produção. A região Centro-Oeste, em 2019, totalizou 21,6% da produção nacional, em 11,4% da área de produção de feijão. Já o Estado de Goiás, neste mesmo ano, participou com 10,4% da produção, contando com cerca de 4,5% da área cultivada de feijoeiro no Brasil (IBGE, 2020).

A produção de feijão no Brasil ocorre em três safras ao longo do ano: a “safra das águas”, ou primeira safra, no período de agosto a dezembro, principalmente na região Sul; a “safra da seca”, ou segunda safra, de ocorrência geral no território brasileiro nos meses de janeiro a abril; e ainda a “safra de inverno”, ou terceira safra, de ocorrência principalmente nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, de maio a agosto (Faria et al., 2016). Na Tabela 1 pode-se observar os dados estimados para a safra de feijão de 2020/2021, de acordo com estas três safras. A maior produção é obtida na segunda safra, apesar da produtividade menor. A região Centro-Oeste possui as maiores produtividades nacionais na primeira e segunda safras, sendo a segunda maior na terceira safra, logo atrás do Sudeste (CONAB, 2021).

Tabela 1. Dados das safras (2020/2021) de feijão no Brasil. Fonte: CONAB (2021).

Safra	Produção (milhares de t)	Área (milhares de ha)	Produtividade (kg/ha)
1 ^a	1.011,7	909,2	1.113
2 ^a	1.203,1	1.459,6	824
3 ^a	794,7	569,9	1.395
Total	3.009,6	2.938,7	1.024

Considerando a produção total das safras, os principais estados produtores de feijão no Brasil são: Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso e Bahia, sendo que o estado de Goiás se destaca na produção da primeira safra (Figura 1). O perfil do produtor que cultiva o feijoeiro tem suas particularidades em cada um desses locais. No Paraná, Mato Grosso, Minas Gerais e Goiás há mais tecnologia aplicada em propriedades de agricultura empresarial. Já na Bahia, a produção quase em sua totalidade é realizada pela agricultura familiar (CONAB, 2016).

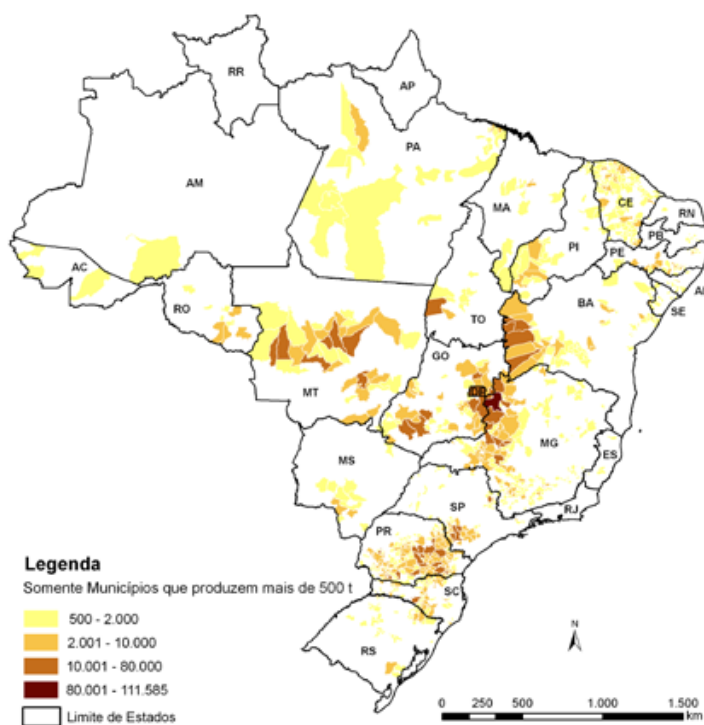


Figura 1. Produção de feijão no Brasil. Fonte: CONAB (2016).

Fatores bióticos e abióticos podem afetar a qualidade da produção e até mesmo nutricional do feijão (Rossi et al., 2017). Segundo Bianchini et al. (2005), 27 doenças de

feijoeiro já foram identificadas e descritas no Brasil, sendo que 11 destas são causadas por vírus. Diversos patógenos acometem a cultura do feijoeiro-comum, destacando-se a antracnose, a ferrugem e a mancha angular, como principais doenças fúngicas (Valentini, et al., 2017). As principais doenças bacterianas são o crestamento-bacteriano-comum e a murcha de *Curtobacterium*, enquanto os nematóides que infectam o feijoeiro são principalmente os do gênero *Meloidogyne* e *Pratylenchus brachyurus* (Wendland, et al., 2018). A cigarrinha verde, a vaquinha, os ácaros e percevejos são os artrópodes-praga de maior importância para a cultura (Tartarin et al., 2016). O mosaico dourado é a doença viral de maior importância econômica (Faria et al., 2016).

Nos principais estados produtores de feijão no Brasil houve diminuição da área de cultivo nos últimos anos devido ao aumento dos custos de produção. Dentre os fatores que levaram a este cenário, incluem-se desde a substituição por culturas mais rentáveis e mais facilmente mecanizáveis, como o milho e a soja, até aqueles relacionados a dificuldades de armazenamento. Do ponto de vista sanitário, um dos fatores de destaque é a presença do mosaico dourado nos cultivos dos Estados de Goiás, Bahia, Mato Grosso e Minas Gerais. A mosca-branca *Bemisia tabaci* MEAM1, que é vetor do BGMV, destaca-se como uma das principais pragas do feijoeiro, e, em consequência disso, em Goiás há determinação de vazão sanitário para o feijoeiro no período entre 5 de setembro e 20 de outubro (CONAB, 2016).

2.2 VIROSES QUE AFETAM O FEIJOEIRO

2.2.1 Vírus em plantas

Vírus são conjuntos de uma ou mais moléculas de ácido nucleico envoltas em uma capa proteica ou lipoproteica, capazes de organizar sua própria replicação em um hospedeiro, porém sem capacidade de se multiplicar ou de se manter sozinhos (Hull, 2002). Segundo Medeiros et al. (2015), os vírus podem utilizar como material genético primário o DNA de fita simples (ssDNA), o DNA de dupla-fita (dsDNA), o RNA de fita simples (ssRNA) ou o RNA de fita dupla (dsRNA). Os vírus de ssRNA são divididos entre aqueles que possuem ssRNA senso negativo e ssRNA senso positivo. Além disto, podem apresentar genomas circulares, lineares, segmentados ou não, e empacotados de diferentes formas podendo ou não ser envoltos por membrana lipídica. Devido a essa variedade de formas de genomas, sua rápida replicação na célula infectada, e pela baixa fidelidade das RNA

polimerases codificadas pelos vírus, a capacidade de mutação é alta e ocorre rapidamente (Medeiros et al., 2015).

A entrada do vírus na célula vegetal é decorrente de uma lesão prévia. Sua interação com o hospedeiro, que tem por consequência a decapsidação viral, ocorre posteriormente. A isso se segue sua replicação e acúmulo nas células, para que então possa ocorrer a translocação viral célula-célula, via plasmodesmas e, posteriormente, a sua chegada aos vasos e distribuição pelo restante da planta. Como os vírus não podem, por si só, gerar esse tipo de lesão, sua transmissão se dá através de vetores e, em alguns casos, as plantas infectadas podem perpetuar a infecção viral para sua progênie, via semente e reprodução vegetativa (Hull, 2002).

A replicação viral varia de acordo com o tipo de ácido nucleico presente. Vírus de ssRNA senso negativo e dsRNA necessitam da transcrição em ssRNA senso positivo para que este atue como RNA mensageiro (mRNA), usando a maquinaria celular do hospedeiro para a sua tradução. Vírus que possuem ssRNA senso positivo já atuam diretamente como mRNA na maquinaria celular do hospedeiro. Existe ainda a transcrição em ssRNA senso negativo e novamente em ssRNA senso positivo, para que exista a replicação deste último. No caso de vírus de DNA com genoma circular, a replicação do genoma viral se dá por meio do mecanismo conhecido como círculo rolante (Figura 2), gerando assim novos genomas que estão prontos para serem empacotados pelas proteínas advindas da tradução, formando então novas partículas virais (Medeiros et al., 2015).

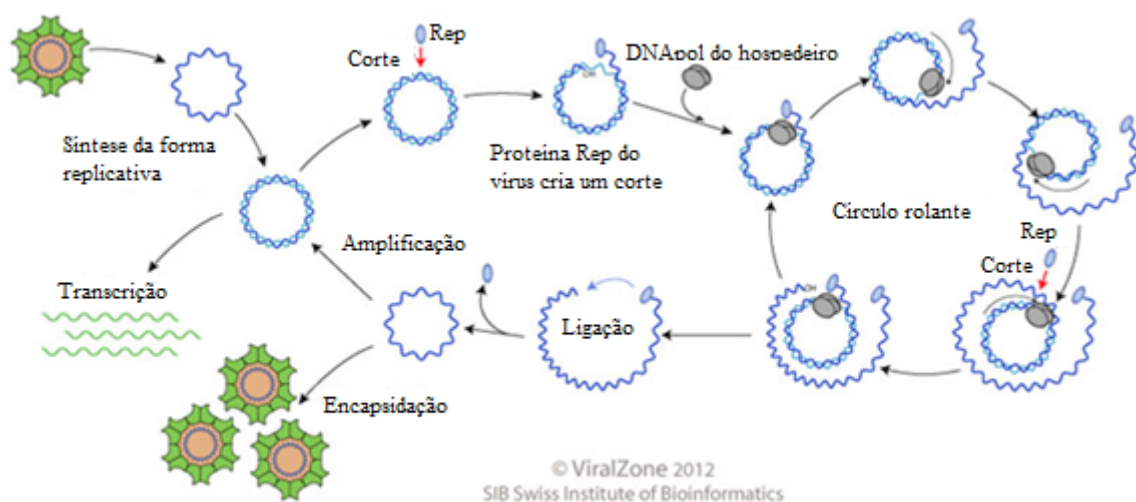


Figura 2. Esquema da replicação pelo círculo rolante. Modificado de *ViralZone*.

Doenças virais causam em plantas sintomas como clorose, enrugamento, necrose, bolhosidade foliar e mosaico, podendo devastar plantações. As consequências da infecção viral em plantas são determinadas pela interação parasito-hospedeiro e também por diversos fatores relacionados a ambos, como idade e estado fisiológico do hospedeiro, bem como quantidade de inóculo viral (Medeiros et al., 2015).

2.2.2 Vírus que infectam o feijoeiro

O feijoeiro (*P. vulgaris*) é tido como a espécie de leguminosa com o maior número de viroses descritas (Morales, 2006a). No entanto, apesar da descrição de diversos vírus em diversas regiões do mundo, poucos vírus causam danos econômicos, devido ao espectro de resistência existente na espécie (Morales, 2006b). As doenças virais mais importantes na cultura do feijoeiro no Brasil são bean common mosaic virus - BCMV, bean common mosaic necrosis virus - BCMNV, bean rugose mosaic virus - BRMV, cowpea mild mottle virus - CPMMV, southern bean mosaic virus - SBMV e bean golden mosaic virus - BGMV (Fiallos, 2010). Este último é o principal geminivírus que afeta a cultura.

Os geminivírus são uma família de vírus caracterizados por apresentarem partícula viral geminada formada por dois icosaedros incompletos, sendo que alguns membros se apresentam como monopartidos – contendo apenas um componente de DNA – outros como bipartidos contendo DNA-A e DNA-B (Hanley-Bowdoin et al., 2013). Os vírus monopartidos são em geral transmitidos por membracídeos, enquanto os bipartidos são transmitidos por aleirodídeos, sendo que nenhum deles é transmitido por sementes. Os sintomas causados por esses vírus em geral são: mosaico, atrofia foliar, manchas amarelas e nanismo (Medeiros et al., 2015).

Os genomas desses vírus são circulares, contendo DNA de fita simples de tamanhos que variam entre 2,5 e 5,2 kb (Inoue-Nagata et al., 2016). Possuem uma região intergênica (IR – *intergenic region*) de cerca de 200 pb com alta similaridade entre os dois componentes de um mesmo vírus, denominada Região Comum (RC ou CR - *common region*). Essa região abriga parte da sequência da origem de replicação desses vírus, que se dá através da formação de um grampo (*stem*) composto por regiões palindrômicas, interrompidas por uma sequência de cerca de poucos pares de bases, que formam um *loop*. A origem de replicação é formada por um nonanucleotídeo e tende a ser conservada em geminivírus. A replicação destes vírus se dá pelo mecanismo de círculo rolante (Orozco &

Hanley-Bowdoin, 1996) e, por não possuírem DNA polimerase própria, contam completamente com a maquinaria do hospedeiro (Zerbini et al., 2017).

Os gêneros presentes nessa família atualmente são: *Becurtovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, *Turncurtovirus* e *Begomovirus*. Destes, o gênero que abriga o maior número de espécies é *Begomovirus* (Zerbini et al., 2017). Os vírus deste gênero se apresentam como partículas de 15 a 20 nm de diâmetro, que infectam tanto mono quanto dicotiledôneas (Medeiros et al., 2015), podem ser mono ou bipartidos (Figura 3), sendo que os *Begomovirus* bipartidos são predominantes do Novo Mundo (Américas), enquanto os monopartidos são característicos do Velho Mundo (Europa, Ásia, África e Austrália) (Inoue-Nagata et al., 2016). No Brasil, as espécies de *Begomovirus* são predominantemente transmitidas por *Bemisia tabaci*. Os vírus deste gênero mais importantes economicamente são o BGMV no feijoeiro, juntamente com outras espécies que provocam doenças no tomateiro (Inoue-Nagata et al., 2016).

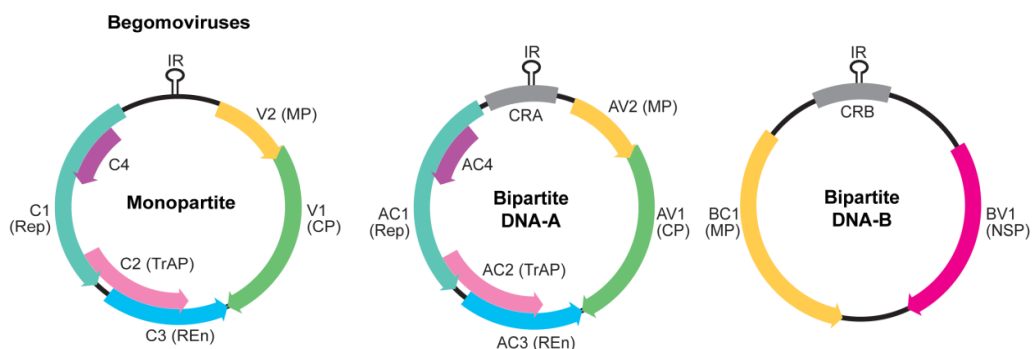


Figura 3. Esquema do genoma de *Begomovirus*. IR: Região intergênica. MP: proteína de movimento. TrAP: transativação de transcrição. Rep: proteína associada à replicação. REEn: intensificadora de replicação. CP: proteína do capsídeo. CR: região comum. AC4/C4: supressão do silenciamento. NSP: transporte do DNA viral através do envoltório nuclear. Fonte: ICTV.

2.2.2.1 BGMV e o mosaico dourado

O mosaico dourado é causado por vírus pertencente à família *Geminiviridae*, tendo genoma bipartido de ssDNA de fita simples circular, e é transmitido pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*). O mosaico dourado foi descrito em feijoeiro no Brasil e no Caribe, no entanto haviam indícios de que eram causados por vírus diferentes (Zerbini & Ribeiro, 2008). O BGYMV foi sequenciado pela primeira vez por Morinaga e colaboradores (1987),

no Japão. Foi caracterizado como uma partícula geminada que possuía dois componentes genômicos, circulares e diferentes (Morinaga et al., 1983), no entanto compartilhando uma região comum de cerca de 200 pares de base (pb), sendo que o componente “DNA A” possui 2.585 pb, enquanto o componente “DNA B” tem 2.647 pb (Morinaga et al., 1987).

O primeiro BGMV isolado no Brasil foi sequenciado em 1989, por Gilbertson e colaboradores, sendo clonado em sítios de *Hind*III e *Acc*I, gerando respectivamente um componente A de 2.617 pb e um componente B de 2.580 pb. Nestas sequências genômicas foram identificadas quatro e duas ORFs, respectivamente. No DNA-A estão presentes os genes codificantes da proteína de replicação, capa proteica e duas proteínas supressoras do mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional. No DNA-B estão as proteínas relacionadas com o movimento intra e extracelular do vírus (Gilbertson et al., 1989).

Entre os vírus que causam mosaico dourado em feijoeiro é notória a diferença de transmissibilidade através de inoculação mecânica. Esta característica está presente nos isolados do Japão e de Porto Rico, descritos por Goodman et al. (1985), obtidos de *Macropitilium lathyroides*, e ausente em isolados obtidos no Brasil. Mais tarde esses isolados foram separados por estudos filogenéticos e hoje são considerados distintos (Aragão & Faria, 2009; Faria et al., 1994; Zerbini & Ribeiro, 2008).

O BGMV possui no DNA-A um gene associado à replicação, que codifica a proteína associada a replicação (Rep – *replication associated protein*), um gene que codifica uma proteína associada à ativação da transcrição de genes em ambos os fragmentos genômicos (TrAP – *trans-activation associated protein*) e um gene que codifica uma proteína intensificadora da replicação (REn – *replication enhancer*), todos na fita complementar (senso complementar). Ainda no DNA-A existe um único gene no senso viral, que codifica a capa proteica (CP – *coat protein*). Já no DNA-B estão presentes os genes que codificam proteínas associadas ao movimento da partícula viral, seja do núcleo para o citoplasma (NSP – *nuclear shuttle protein*), seja entre células via plasmodesmas (MP – *movement protein*) (Zerbini et al., 2017; Zerbini & Ribeiro, 2008).

A impossibilidade da transmissão mecânica do BGMV levou ao desenvolvimento de outras técnicas de inoculação que permitissem seu estudo, independentemente do vetor, como a inoculação via biobalística. Esta consiste na aceleração de partículas de ouro ou tungstênio recobertas com os plasmídeos nos quais foram clonados ambos os componentes genômicos do vírus, bombardeadas sobre tecido vegetal de feijoeiro,

que após cerca de 3 semanas exibe os sintomas característicos de mosaico dourado (Aragão et al., 1993; Aragão et al., 1995).

O mosaico dourado é caracterizado por manchas amarelo-esverdeadas nas folhas, bolhosidades e enrugamento foliar, além de nanismo. Causa grandes prejuízos em lavouras de feijoeiro atualmente, onde estimam-se que as perdas anuais estejam em torno de 20% (Faria et al., 2016). O BGMV foi descrito pela primeira vez, no Brasil, por Costa (1965 *apud* Morales, 2006), causando mosaico dourado em plantas de feijão em 1961, no Estado de São Paulo, no entanto sem ocorrência suficiente para ser importante economicamente. Cerca de uma década depois, ocorreu expansão das áreas afetadas para outras regiões e estados (Morales, 2006). Em resposta ao crescente prejuízo causado pelo BGMV, a EMBRAPA desenvolveu uma variedade transgênica de feijão resistente ao mosaico dourado, pela expressão de RNA interferente (Bonfim et al., 2007), que já está aprovada para comercialização (Faria et al., 2016).

As elevadas perdas em lavouras de feijoeiro, decorrentes do aumento das populações do vetor do BGMV, a mosca-branca, são relacionadas principalmente à expansão das lavouras de soja para áreas onde se cultivava feijão. A soja, que também é hospedeira da mosca-branca, se mostra hospedeira de diversas viroses transmitidas por este hemíptero, sem, no entanto, apresentar sintomas semelhantes aos encontrados no feijoeiro (Aragão et al., 2013). Quintela et al. (2016) descreveram inclusive a capacidade da mosca-branca de completar o seu ciclo de vida em milho, tanto em condições de campo quanto em casa-de-vegetação.

A introdução do biótipo B (ou *Middle East Asia Minor 1*, MEAM1) da mosca-branca, no início dos anos 1990, acentuou o problema causado pela mosca-branca em lavouras devido à alta adaptabilidade, fecundidade e por apresentar comportamento “mais polífago” em relação ao biótipo A (ou *New world*, NW). Isso gerou o aumento das populações que, aliado à expansão das espécies que atuam como fonte alimentar (gama de hospedeiros) para a mosca-branca, possibilitou a expansão das doenças transmitidas por ela (Morales, 2006; Inoue-Nagata et al., 2016). Em 2014, Barbosa e colaboradores descreveram a presença do biótipo Q (ou *Mediterranean*, MED) no Brasil, cujos relatos indicam ser invasivo e apresentar resistência a inseticidas utilizados no controle químico desta praga. Além disso esse biótipo apresenta tolerância a altas temperaturas, o que pode alterar também a distribuição das populações de mosca-branca (Hsieh et al., 2011).

Segundo Faria et al. (2016), existem ainda outros *Begomovirus* que infectam o feijoeiro no Brasil e que são transmitidos pelo mesmo vetor que o BGMV, como macroptilium yellow spot virus - MaYSV e o sida micrantha mosaik virus - SimMV. Ambos já foram descritos infectando o feijoeiro-comum. Além do BGYMV, existem outros *Begomovirus* que infectam o feijoeiro ao redor do mundo, como *Tomato yellow leaf curl virus* e *Bean dwarf mosaik virus*. Dentro da família *Geminiviridae* existem ainda *Curtovirus* descritos como patógenos do feijoeiro em algumas regiões do planeta (Meziadi et al., 2017).

2.2.3 Resistência genética ao BGMV em feijoeiro

O uso de variedades resistentes geneticamente a vírus é uma forma eficaz de manejo de viroses em plantas. A existência de resistência (natural ou induzida) em hospedeiros em relação a determinados isolados de vírus pode ser usada como forma de controle viral, sendo inserida no material de interesse por melhoramento convencional ou via transgenia (Medeiros, et al., 2015).

A estratégia de obtenção de resistência genética por melhoramento convencional, caracteriza-se pela busca da presença de um ou mais genes que confirmam resistência na planta a determinada doença (Medeiros, et al., 2015). Para tal, pode-se usar de diversas estratégias como genes dominantes ou recessivos que confirmam resistência, caracteres quantitativos de efeito maior mapeados que estejam associados à resposta ao vírus e a piramidação de genes. Neste sentido, ferramentas biotecnológicas, como o uso de marcadores moleculares para seleção assistida, são de grande importância pois podem acelerar e direcionar o melhoramento para resistência a esse tipo de estresse biótico (Nicaise, 2014)

Do ponto de vista do melhoramento molecular as técnicas de biologia molecular e a biotecnologia trouxeram grandes possibilidades para o melhoramento frente a estresses bióticos. Técnicas de mapeamento, por exemplo, permitem identificar e localizar regiões de interesse, sejam características quantitativas ou qualitativas, de forma a possibilitar, por exemplo, o rastreamento dessas regiões nos programas de melhoramento através da seleção assistidas por marcadores. Além disso, técnicas de transformação genética de plantas permitem a inserção de genes/regiões específicas que levem a planta a apresentar resistência. Assim podem ser incorporados genes de origens diversas que interfiram no ciclo de replicação e disseminação do vírus, genes de resistência qualitativa ou defesa, ou genes do próprio vírus que estimulem o sistema de defesa da planta, como na técnica de RNAi ou

RNA antisense. São em geral resistências específicas a determinados vírus ou isolados, de forma que grandes mutações ou recombinações permitem que uma planta resistente a um isolado mais comum não tenha resistência ao vírus mutado/recombinado (Medeiros et al., 2015).

O melhoramento convencional para a resistência ao BGMV mostrou-se, ao longo dos anos, insuficiente. O Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) desenvolveu algumas cultivares com resistência parcial ao BGMV, bem como a Embrapa, e, no entanto, ambos os esforços não obtiveram bom desempenho sob epidemias moderadas ou severas de BGMV. Não foram identificadas, até então, fontes de resistência ao BGMV no germoplasma de *Phaseolus* (Faria, et al., 2016).

Partindo, então, da transgenia do feijoeiro, foram realizadas algumas tentativas de obtenção de resistência baseados em, por exemplo, resistência derivada do patógeno (Faria, et al, 2016), expressão de RNAs antisense (Aragão, et al, 1998), transdominância letal (Faria, et al., 2006) e, no entanto, nenhuma delas foi eficaz em obter resistência satisfatória à BGMV. Utilizando a tecnologia de RNA de interferência (RNAi), obteve-se um transformante a partir da inserção de um fragmento do gene rep (nucleotídeos 1836 a 2247, número de acesso GenBank M88686) com autocomplementariedade capaz de induzir, assim, ao silenciamento gênico (Bonfim, et al., 2007).

O mecanismo de silenciamento de RNAi ocorre através da ação da maquinaria celular que atua sobre dsRNA (Nicaise, 2014). O gene inserido, após transcrito, forma um grampo (*hairpin*) que é processado pela DICER (uma ribonuclease tipo III) em pequenos RNAs que, ao serem incorporados no complexo citoplasmático de silenciamento induzido por RNA, são capazes de induzir a quebra de regiões complementares, culminando no silenciamento gênico. Como o gene inserido é codificante para a proteína de replicação do BGMV seu silenciamento impede a replicação e acumulação do vírus na planta, tornando-a resistente (Bonfim, et al., 2007).

2.3 GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE VÍRUS EM PLANTAS

A genética de populações busca estudar a origem e a transmissão da variação genética em grupos de indivíduos (populações ou demes) da mesma espécie que vivem e se

multiplicam em local específico e restrito, de forma a se comportarem como uma unidade evolutiva (Escriu, 2017). A existência de variação numa população implica em diversidade populacional, ou seja, na probabilidade de que dois isolados de uma mesma população sejam diferentes (García-Arenal et al., 2003).

As variações genéticas em populações virais são oriundas de dois processos: a mutação e a recombinação. A mutação resulta de uma alteração de nucleotídeo, na replicação, em uma fita nova em relação à fita molde. Já a recombinação é referente ao evento de troca de fragmentos de material genético entre variantes, que coexistem, durante a replicação (Escriu, 2017; García-Arenal et al., 2001; McLeish et al., 2020). Segundo García-Arenal e colaboradores (2001), a recombinação pode ser a maior fonte de variação para que ocorra evolução, principalmente em alguns grupos de vírus, apresentando taxas mais elevadas para vírus de RNA. Existe ainda outra forma de troca genética, chamada pseudo-recombinação, que ocorre quando segmentos genômicos inteiros são trocados entre diferentes genótipos virais, ocorrendo em populações naturais de vírus de plantas (Escriu, 2017; García-Arenal et al., 2003; McLeish et al., 2020; García-Arenal et al., 2001).

Populações virais apresentam, quando comparadas àquelas de procariotos e eucariotos, taxas de mutações mais elevadas. Quando comparados, vírus de plantas e vírus de animais, as populações dos primeiros tendem a ser mais estáveis (em termos de variabilidade) ao longo do tempo (Moury et al., 2006). No entanto, proteínas de vírus de DNA e RNA de plantas, além de possuírem taxas de variações semelhantes entre si, não são menos variáveis que vírus que infectam animais (García-Arenal et al., 2001). Ademais, vírus possuem tamanhos populacionais maiores com menores tempos de geração (Moury et al., 2006) além de outros fatores que influenciam as forças evolutivas que atuam sobre as variações existentes nesses seres (Escriu, 2016).

Os principais mecanismos evolutivos que determinam a diversidade genética de populações virais em plantas são a seleção e a deriva genética (*genetic drift*) (Escriu, 2017; García-Arenal et al., 2001; McLeish et al., 2020). A seleção faz com que a frequência de uma variante com maior aptidão, em um dado ambiente, aumente em relação a outras na população. Os principais fatores que podem atuar como pressões seletivas aos vírus são a manutenção de estruturas funcionais (como estabilidade da partícula viral ou replicação), interações com o hospedeiro e interações com os vetores (García-Arenal et al., 2003). A deriva ocorre pois o tamanho da população efetiva (que de fato vai contribuir para a próxima geração) é menor que o tamanho da população total. Isso faz com que as frequências alélicas

sejam alteradas, levando à fixação de alguns alelos em detrimento de outros, o que ocorre pelo fato de uma parte da população ser composta de mutantes que não irão se multiplicar, além de cada nova infecção (seja de célula, indivíduo ou novo hospedeiro) consistir em um evento com efeito fundador (García-Arenal et al., 2001).

Um efeito possível de consecutivos gargalos populacionais, associados à presença de variantes que apresentam menor desempenho, é chamado de Catraca de Muller. Como resultado do acúmulo de mutações deletérias, indivíduos menos aptos passam a dominar a população, de forma que esta possa vir a sucumbir devido a um colapso mutacional (García-Arenal et al., 2001; García-Arenal et al., 2003). Tanto a seleção quanto a deriva tendem a diminuir a diversidade dentro de populações e aumentar a divergência entre populações que estão sob diferentes condições. Portanto, diferenciar, na prática, evolutivamente os efeitos de deriva e seleção é frequentemente difícil (García-Arenal et al., 2001).

A presença de transgenes de resistência a viroses em plantas pode afetar a diversidade de vírus presentes em uma comunidade, mas não necessariamente alterar a variabilidade genética das populações (Moury et al., 2006). De qualquer forma, é possível a ocorrência de seleção nas populações virais para superar os genes de resistência do hospedeiro (García-Arenal et al., 2001).

Populações virais são heterogêneas e contêm diferentes variantes, sendo que, a sequência dessas variantes oscila ao redor de uma sequência consenso (García-Arenal et al., 2001), o que leva à necessidade de se estabelecerem critérios quantitativos que delimitam diferentes espécies (Moury, et al., 2006). Isso se dá, entre outros, por sucessivos gargalos populacionais que ocorrem quando uma partícula viral infecta uma nova célula ou um novo hospedeiro e, a partir dela, dá origem a uma nova população (McLeish et al., 2020).

A diversidade populacional está associada a três fatores: número de haplótipos presentes na população, suas frequências e a distância genética entre eles (García-Arenal et al., 2001). Moury et al. (2006) revisa as diversas técnicas disponíveis para avaliar tais fatores, à época, como marcadores moleculares (RFLP) e análise de fragmentos genômicos. A partir da descrição do uso da técnica de RCA, associada à clonagem e sequenciamento de genomas de *Begomovirus*, por Inoue-Nagata et al. (2004), esta técnica vem sendo amplamente empregada para acessar a variabilidade genética destes vírus. Com a diminuição de custos ao longo dos anos, o uso de sequenciamento de nova geração associado à genotipagem de SNPs vem sendo empregado para trabalhos de genética de populações de diversos

organismos (Wosula et al., 2017). SNPs são polimorfismos de um único nucleotídeo e, por serem originados através de mutações pontuais, são abundantes e amplamente distribuídos em genomas.

2.3.1 Diversidade genética em populações de *Begomovirus*

Begomoviroses afetam diversas leguminosas, sendo que o feijão está entre as mais afetadas. Além disso, infectam diversas plantas não cultivadas que servem como fonte de inóculo e, devido às infecções mistas que ocorrem com frequência nestes hospedeiros, podem atuar como reservatórios que possibilitam a ocorrência de recombinação ou pseudo-recombinação (Silva et al., 2012; Ramos-Sobrinho et al., 2014).

Begomovirus apresentam a região intergênica (IR) conservada, indicando seleção para a manutenção de uma estrutura funcional importante, além de apresentarem também variação associada à localidade geográfica, indicando seleção influenciada pelo vetor (García-Arenal et al., 2001).

Segundo García-Arenal e colaboradores (2001), *Begomovirus* apresentam, com frequência, recombinantes em populações naturais, quando comparados a vírus de RNA com genomas segmentados. Silva e colaboradores (2012) analisaram plantas leguminosas não cultivadas e encontraram que *Macroptilium lathyroides* atua como hospedeiro promíscuo onde ocorre recombinação entre *Begomovirus*, concluindo que a recombinação é um evento comum entre estes vírus infectando leguminosas não cultivadas. Entretanto, Lima e colaboradores (2017), ao buscarem pela origem da variabilidade genética em *Begomovirus*, usando vírus presentes em vários locais do planeta, encontraram que a maior parte da variação genética deste grupo é devida a mutações, em detrimento da contribuição de recombinações para tanto.

Ramos-Sobrinho e colaboradores (2014) encontraram níveis similares de variabilidade em populações de BGMV e MaYSV, entre plantas leguminosas cultivadas (*Phaseolus* sp.) e não cultivadas (*M. lathyroides*), indicando que a sugestão de que populações de plantas não cultivadas (por tenderem a ser mais variáveis geneticamente) apresentem maiores níveis de variabilidade nas populações virais, como já descrito na literatura por Moury et al. (2006), nem sempre é válida. Todavia, Rocha et al. (2013) encontraram maiores níveis de diversidade genética em populações de *Begomovirus* que infectam plantas não cultivadas do que nas populações virais predominantes detectadas infectando tomateiro (*Solanum lycopersicum*).

Populações de MaYSV, encontradas em plantas não cultivadas no nordeste brasileiro, descritas por Silva et al. (2012), apresentaram grande variabilidade genética, similares às encontradas em populações de BGMV, descritas em fava (*Phaseolus lunatus*), por Ramos-Sobrinho et al. (2010). Já estudos realizados por Faria & Maxwell (1999) encontraram baixa variabilidade genética em populações de BGMV, descritas em feijoeiro-comum no Brasil. Resultados obtidos por Ramos-Sobrinho e colaboradores (2014) vão ao encontro desses estudos anteriores, mostrando que populações de BGMV possuem estruturação por hospedeiro e localização geográfica, enquanto apresentam menor variabilidade genética do que as populações de MaYSV que, por sua vez, não apresentam estruturação semelhante.

Recentemente, comparações realizadas entre sequências classificadas como BGMV de bancos de dados públicos, provenientes de isolados de *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *M. lathyroides*, *Glycine max*, *Solanum lycopersicum*, *Nicandra physalodes*, *Macroptilium erythroloma* e *Anadenanthera colubrina*, indicaram que a identidade entre elas está na zona crítica de diferenciação entre espécies de isolados de um dado hospedeiro (Reis et al., 2020a). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Faria & Maxwell (1999) que já haviam sugerido o nome *Lima bean golden mosaic virus*, indicando que essa nova espécie estaria mais associada a *P. lunatus*, enquanto o BGMV estaria associado a *P. vulgaris*.

Estudos comparativos entre populações de tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) de plantas suscetíveis e resistentes foram conduzidos por Merchant et al. (2020). Os tomateiros resistentes não eram completamente imunes, mas, exibiam infecção sistêmica associada a sintomas leves, o que reduz as perdas em campo. Não foram encontradas diferenças entre as populações de TYLCV, que não apresentaram estruturação genética nem seleção ou aumento de genótipos mutantes. Reis e colaboradores (2020b) analisaram grupos de tomateiros com e sem o gene de resistência *Ty-1* e não observaram diferenças entre os grupos quando da ocorrência de infecções mistas por até cinco espécies de *Begomovirus*. No entanto, o grupo sem o gene de resistência apresentou maior número de espécies de vírus.

O sequenciamento de nova geração dentro da virologia vegetal tem sido empregado para diversos fins, permitindo acessar certas informações com maior facilidade, associadas à diagnose de viroses, auxiliando por exemplo na triagem de materiais em quarentena, podendo ser identificados não apenas vírus conhecidos em materiais sintomáticos, mas também novos vírus, vírus infectando plantas assintomáticas e infecções

mistas (Adams, et al., 2018). Além disso, a partir destes podem ser realizados estudos de ecologia, caracterizando a diversidade genética presente nas comunidades virais, bem como em populações em diferentes ou mesmo dentro de um hospedeiro, espécie ou local. (Roossink, et al., 2015).

2.4 TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO DE DNA DE NOVA GERAÇÃO

São denominadas como tecnologias de sequenciamento de DNA de nova geração diversas tecnologias que surgiram após o sequenciamento descrito por Sanger (1977), baseadas na combinação de diferentes estratégias de preparo de amostras, sequenciamento, *base-calling* (chamada ou identificação das bases sequenciadas), alinhamento e montagem (Metzker, 2010). São características marcantes dessas tecnologias o sequenciamento direto (sem a necessidade de clonagem), o grande volume de dados gerado, o baixo custo por base (em geral), e o não uso de bibliotecas bacterianas que podem gerar erros adicionais aos de sequenciamento.

2.4.1 Tecnologia de sequenciamento por síntese

A tecnologia de sequenciamento por síntese, utilizada pelos sequenciadores Illumina, foi desenvolvida pela empresa Solexa, em 2006. Nesta tecnologia utilizam-se terminadores reversíveis para a leitura das bases das amostras de ácidos nucleicos. O sequenciamento só ocorre após uma etapa de amplificação do genoma fragmentado em pedaços de cerca de 200 a 400 pb (Goodwin et al., 2016). As extremidades são ligadas a adaptadores em Y com pontas diferentes que, após a desnaturação e um ciclo de amplificação, serão incorporados aos fragmentos de forma linear gerando diferentes extremidades que permitem a fixação dos fragmentos à placa de sequenciamento (*flowcell*), através de hibridização das regiões complementares (Metzker, 2010).

Ocorre então a PCR em ponte que gera de centenas de milhões a bilhões de *clusters* dos fragmentos a serem sequenciados, em uma superfície sólida (Metzker, 2010). Essa amplificação denomina-se PCR em ponte devido à disposição dos adaptadores distribuídos na *flowcell*: os adaptadores estão colocados em fileiras alternadas de forma que, pelo movimento browniano das moléculas, os adaptadores presentes na outra extremidade hibridizam com outros adaptadores (Figura 4). Quando ocorre a amplificação e desnaturação

esse processo se repete e, após algumas reações, há a formação dos *clusters* (Goodwin et al., 2016).

O sequenciamento ocorre a partir de uma das extremidades dos fragmentos ligados à *flowcell*, de forma que estejam todos posicionados no mesmo sentido. Enquanto isso, os fragmentos ligados à *flowcell* pelo outro adaptador são clivados. Após o sequenciamento em uma direção, a amplificação se repete e desta vez os fragmentos já amplificados são clivados, de forma que há o sequenciamento no sentido oposto. O sequenciamento Illumina gera sequências de 100 a 300 pb, nos sentidos *forward* e *reverse* das extremidades dos mesmos fragmentos (Illumina, 2019).

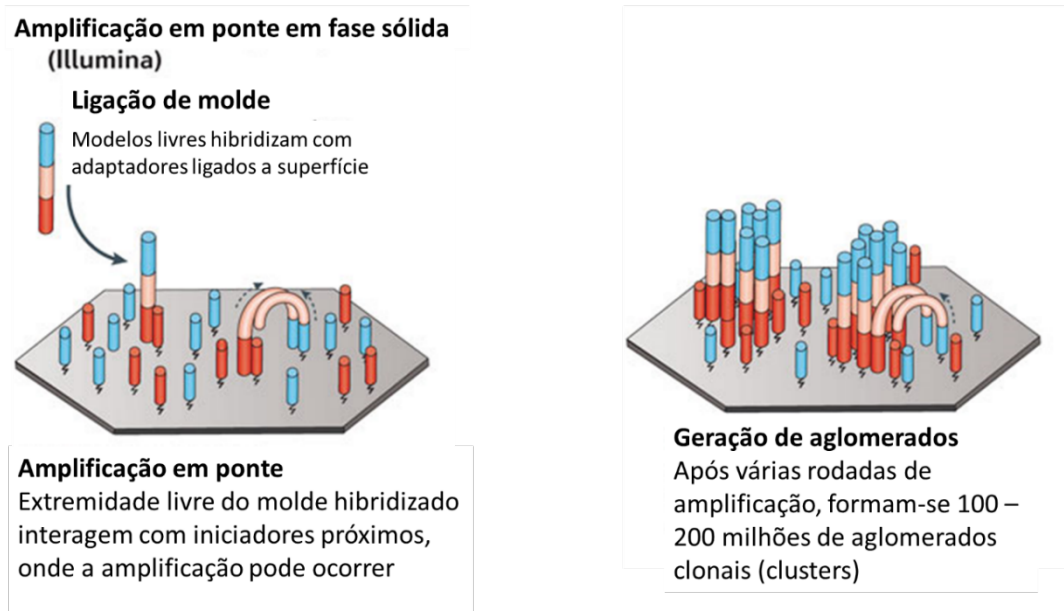


Figura 4. Esquema evidenciando a formação de *clusters* pela PCR em ponte. Adaptado de Goodwin et al. (2016).

A reação de sequenciamento ocorre a partir da incorporação de nucleotídeos modificados com grupos 3'-O-azidometil e marcados com fluorocromos de diferentes cores para as diferentes bases, de forma a impedir a continuação da elongação enquanto não houver a liberação do fluorocromo (Metzker, 2010). Dessa forma, há a incorporação do nucleotídeo complementar, a captação do sinal emitido por cada *cluster* através de imagens, a clivagem do grupamento que impede a continuação da elongação e a clivagem do fluorocromo, como apresentado pela Figura 5. Todas as etapas ocorrem de maneira cíclica numa série de liberações de reagentes e lavagens consecutivas. As incorporações ocorrem a partir de

primers complementares aos adaptadores, usados também na PCR, e os fragmentos são sequenciados em ambos os sentidos (*forward* e *reverse*) (Goodwin et al., 2016).

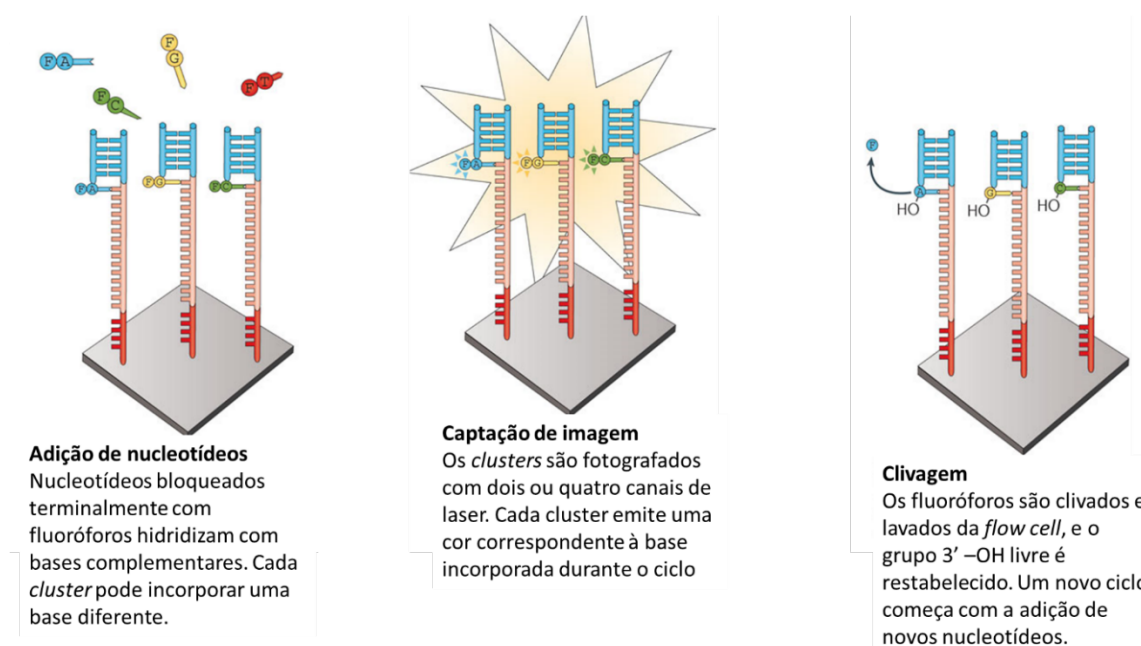


Figura 5. Esquema evidenciando o processo de sequenciamento por síntese. Adaptado de Goodwin et al. (2016).

O sequenciamento Illumina foi capaz de resolver os problemas de determinação de homopolímeros, pois a incorporação de um novo nucleotídeo só ocorre após a captação do sinal da incorporação anterior (Guo et al., 2008). O sistema de captura que determina as sequências dos fragmentos a partir de *clusters* clonais eleva a confiabilidade de identificação de cada base, pois trata-se de uma base consenso a partir de várias incorporadas ao mesmo tempo, diminuindo a taxa de erros. No entanto, esse processo em conjunto pode ser defasado, gerando atraso da extensão de alguns fragmentos, o que pode resultar em erros decorrentes da dessincronização do processo. O tipo de erro de sequenciamento mais comum nesta tecnologia são as substituições (Metzker, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DE MATERIAL

Para fins de avaliação da diversidade genética em populações de BGMV, foram realizadas coletas, em triplicata, em Ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU) da EMBRAPA Arroz e Feijão, conduzidos em Santo Antônio de Goiás (GO) (Figura 6) e Brasília (DF) (Figura 7). Os ensaios escolhidos foram conduzidos com linhagens de feijoeiro-comum, tipo carioca, sendo que os ensaios que visavam avaliar linhagens elite transgênicas são chamados VCT, enquanto os ensaios que avaliaram linhagens elite convencionais são chamados VCN. A única diferença no manejo dos ensaios de VCU é quanto ao controle de mosca-branca, que não foi realizado nos ensaios de VCT, enquanto nos ensaios de VCN foi realizada a aplicação de defensivos quando essa esteve presente, até o estágio do florescimento.



Figura 6. Aspecto geral do ensaio de VCU (VCN) em Santo Antônio de Goiás (GO).



Figura 7. Aspecto geral do ensaio de VCU (VCT) em Brasília (DF).

Foram coletadas amostras foliares de quatro linhagens (Tabela 2) de feijoeiro-comum em ambos os tipos de ensaio (VCN e VCT), cujas especificações estão presentes na Tabela 3. As linhagens amostradas foram escolhidas levando-se em conta suas genealogias, prezando-se por linhagens de diferentes origens. Em ambos os ensaios, estavam presentes, além das linhagens em avaliação, cultivares que atuam como plantas testemunhas, das quais também foram coletadas amostras com objetivo de se avaliar as eventuais diferenças entre as populações virais de BGMV em linhagens selecionadas recentemente e em cultivares comerciais mais antigas.

Tabela 2. Linhagens elite amostradas nos ensaios de VCU transgênicos (VCT) e convencionais (VCN).

Ensaio	
VCT	VCN
BRS Estilo ¹	BRS Estilo ¹
BRS FC401RMD ^{*1}	IPR Campos Gerais ¹
CNFCT 19119 ^{*2}	BRS Pérola ¹
IPR Celeiro ¹	CNFC 16561 ²

* Linhagens transgênicas. ¹ Cultivares testemunhas. ² Linhagens em avaliação.

Tabela 3. Dados das coletas e dos ensaios de VCU amostrados.

Experimento	Ensaio	Local	Data de plantio	Data de coleta	Dias após o plantio
1	VCT24	Santo Antônio de Goiás (GO)	15/02/2019	10/04/2019	54
2	VCT25	Brasília (DF)	20/02/2019	12/04/2019	51
3	VCN54	Santo Antônio de Goiás (GO)	30/01/2019	22/03/2019	51
4	VCN56	Brasília (DF)	19/02/2019	12/04/2019	52

Foram coletadas, então, quatro linhagens em cada um dos quatro ensaios, sendo um ensaio de cada tipo (VCT e VCN) em cada uma das localidades, totalizando 48 amostras (2 locais x 2 tipos de ensaio x 4 linhagens x 3 réplicas). Os ensaios presentes em Santo Antônio de Goiás exibiam apenas alguns focos de sintomas virais (mosaico, clorose, nanismo, enrugamento foliar), enquanto os ensaios presentes em Brasília exibiam sintomas de forma generalizada em plantas suscetíveis. A coleta foi realizada priorizando-se plantas sintomáticas.

As amostras obtidas foram codificadas para fins de identificação. O código foi composto de uma letra (a primeira), indicando a origem, se VCT (T) ou VCN (C). A segunda letra indica o local (B – Brasília, G- Santo Antônio de Goiás). Após esta letra tem-se um ponto final (.) que é seguido pela abreviação do nome da linhagem coletada (Est – Estilo, Cg Campos Gerais, Per – Pérola, C- CNFC16561, F -FC401RMD, T- CNFCT19119, Cel – Celeiro). O número final é referente à réplica (1, 2 ou 3).

3.2 OBTENÇÃO DE MATERIAL GENÉTICO VIRAL

O material coletado foi macerado em nitrogênio líquido com o auxílio de almofariz e pistilo, e separado em dois microtubos, em alíquotas de aproximadamente 100 mg, destinadas à extração de DNA. O material macerado foi mantido a -80°C até o seu processamento.

3.2.1 Extração de DNA total

As extrações foram realizadas em duplicatas, seguindo o protocolo a seguir, baseado em Doyle & Doyle (1990). Foram adicionados 600 µL de tampão de extração CTAB 2% (pré aquecido, contendo β-mercaptoetanol) ao material congelado. A mistura foi então incubada a 65°C por 40 minutos, invertendo-se os microtubos de 10 em 10 minutos. Após esse período foram adicionados 600 µL de uma mistura 24:1 de clorofórmio:álcool isoamílico às amostras, que foram homogeneizadas por inversão delicada, por 5 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos. Após a transferência dos sobrenadantes para novos tubos, a eles foram novamente adicionados 600 µL da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), repetindo-se a homogeneização por inversão, por 5 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos. Em seguida os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol a -20°C. As amostras foram homogeneizadas invertendo-se os tubos várias vezes durante cerca de 5 minutos, e foram então acondicionadas em freezer (-20°C) durante 2 a 3 horas para precipitação do DNA. Uma nova centrifugação foi então realizada durante 10 minutos, a 14.000 rpm, e descartou-se cuidadosamente o sobrenadante. O precipitado foi lavado 2 vezes com etanol 70% e uma vez com etanol 95%. Na sequência os tubos foram invertidos sobre papel toalha e então submetidos ao *speed-vac* para secagem. Após ressuspender o *pellet* em 200 µL de TE contendo RNase (40 µg/mL), as amostras incubadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Às amostras foi então adicionado NaCl 5 M na proporção de 1:10 (NaCl:DNA ressuspensão) e ainda 2/3 do volume de isopropanol gelado para nova precipitação do DNA. Após homogeneização, as amostras foram acondicionadas em congelador a -20°C, por 3 horas. As amostras foram então novamente centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi lavado duas vezes com etanol a 70% (10 minutos) e uma vez com etanol absoluto (5 minutos). Após cada centrifugação os tubos foram invertidos sobre lenços de papel por 5 minutos para verter o excesso de etanol. Ao final do processo os *pellets* foram levados ao *speed-vac* (± 10 minutos). Os *pellets* foram resuspenso em 40 µL de TE e em seguida foram levados ao banho-maria a 37°C por ± 40 minutos ou até que todo DNA estivesse ressuspenso.

3.2.2 Seleção de DNA circular

Com o objetivo de obter o enriquecimento das amostras para DNAs virais através de amplificação foi utilizada a técnica de RCA (*Rolling Circle Amplification*), de forma que apenas DNAs circulares fossem amplificados, na busca de se detectar a presença de *Geminivirus*. Foi utilizado para tal, o kit *Templiphi*, da GE Life Science.

A partir do DNA extraído na etapa anterior, foi retirada uma alíquota de 1 μL e colocada em novo microtubo de 200 μL , onde foram também adicionados 5 μL de tampão de desnaturação. Em seguida os tubos foram levados para o termociclador onde foram aquecidos a 95°C durante 3 minutos, sendo colocados no gelo imediatamente ao final deste período. Ainda no gelo, foi realizada a adição de 0,2 μL de enzima, juntamente com 5 μL de tampão de reação a cada tubo. Novamente no termociclador, os tubos permaneceram a uma temperatura de 30°C durante 4 a 18 horas. Ao final foram então aquecidos a 65°C durante 10 minutos para inativação da enzima, e então colocados no gelo. Após o resfriamento, os tubos foram armazenados a -20°C. Para verificar os produtos da amplificação, 2 μL da amostra foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%.

3.3 SEQUENCIAMENTO DE DNA

As amostras de DNA obtidas a partir de RCA foram liofilizadas e enviadas à empresa BGI (San Jose, EUA), onde foram sequenciadas através do método de sequenciamento por síntese, utilizando a plataforma X Ten (Illumina).

3.4 ANÁLISES DOS DADOS

Com o objetivo de avaliar a qualidade das sequências obtidas foi utilizado o software FastQC (Andrews, 2010). Foram avaliadas a presença de sequências de contaminantes (adaptadores) e a qualidade das bases sequenciadas. A partir dessas avaliações foram tomadas as decisões quanto ao controle de qualidade, implementado pelo software Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Foram retiradas as sequências dos adaptadores utilizados para o sequenciamento, bem como regiões com sequências de baixa qualidade, para que não interferissem no processo de montagem e identificação viral.

Os dados de sequenciamento de cada uma das amostras, separadamente, foram submetidos ao *assembly de novo*, pela ferramenta *metaviral* do software SPAdes (Antipov,

2020). Os *contigs* obtidos foram submetidos à anotação preliminar utilizando-se o *blastn* (Altschul et al., 1990), contra o banco de dados *nt* do NCBI. Dentre as sequências virais detectadas nos *contigs* de todas as amostras, só foram identificadas sequências virais de BGMV (DNA-A e DNA-B). A partir dos *contigs* referentes ao DNA-A de cada uma das amostras, obteve-se uma sequência consenso que foi utilizada como sequência de referência para o genoma correspondente ao DNA-A de BGMV.

De modo análogo às estratégias utilizadas nas análises de RNAseq e de metagenômica, em que os dados de cobertura de alinhamento são utilizados para se quantificar os níveis de expressão gênica e de abundância de unidades taxonômicas, respectivamente, as frequências dos alelos presentes nos sítios polimórficos do genoma do DNA-A de BGMV foram estimadas com base nos dados de cobertura de alinhamento à sequência de referência. Sendo assim, para fins de genotipagem das populações de BGMV presentes em cada uma das amostras, os *reads* de cada uma delas foram alinhados à referência utilizando-se o software BWA (Li & Durbin, 2009). Após as etapas intermediárias de remoção de *reads* duplicados e ordenação dos arquivos BAM, foi utilizado o módulo *HaplotypeCaller* do software GATK, que resultou em um arquivo *.vcf* contendo os sítios polimórficos (SNPs) e as coberturas de cada um dos alelos presentes em cada uma das amostras. Seguindo-se as recomendações do software (*GATK Best Practices*), foram removidos os SNPs de baixa qualidade.

Para cada um dos SNPs identificados, as frequências alélicas em cada amostra foram estimadas utilizando-se a expressão:

$$\hat{p}_u = \frac{n_u}{n_u + n_v}$$

em que:

\hat{p}_u é a estimativa da frequência do alelo u , na população de BGMV na amostra considerada; n_u é o número de *reads* da amostra considerada alinhados à referência contendo o alelo u ; n_v é o número de *reads* da amostra considerada alinhados à referência contendo o alelo v .

As frequências alélicas obtidas foram então utilizadas para se calcular as medidas de diversidade genética de Nei (1973) e a proporção de sítios polimórficos. Em cada amostra, foram considerados como polimórficos os sítios com frequências alélicas máximas inferiores a 0,95. Os níveis de diversidade genética foram então comparados entre localidades de coleta, entre os tipos de ensaios, entre os tipos de linhagens e entre gerações de linhagens, utilizando-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon (*Rank Sum*). Os níveis de

diversidade entre experimentos e entre linhagens elite foram comparados pelo teste não-paramétrico de Kruskal Wallis, seguido do procedimento de Dunn, para comparação dos níveis de cada fator dois-a-dois, utilizando-se a correção FDR. Ainda com base nas frequências alélicas foram realizadas análises de estrutura genética, AMOVA, buscando-se avaliar o grau de estruturação da diversidade genética encontrada em diferentes níveis.

A divergência genética das amostras foi avaliada pela análise de componentes principais utilizando as frequências alélicas como descritores. A representatividade do gráfico obtido com base nos dois primeiros componentes principais foi avaliada pelo teste de correlação matricial de Mantel. Com base nas distâncias euclidianas entre as amostras foi construído ainda um dendrograma para se avaliar os padrões de agrupamento das amostras, pelo algoritmo de UPGMA. As consistências dos nós do dendrograma obtido foram avaliadas pelo procedimento de *bootstrap*, utilizando-se 10.000 repetições. A representatividade do dendrograma foi também avaliada pelo teste de correlação matricial de Mantel.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO DO DNA VIRAL

A partir da extração de DNA obteve-se uma concentração média de DNA nas amostras de cerca de 600 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, na avaliação realizada com o equipamento Nanodrop, sendo que as concentrações variaram aproximadamente de 9 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ a 2.000 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$. Quanto à avaliação da relação A260/A280, esta variou de 0,5 a 2,7.

Após a amplificação seletiva por RCA obteve-se amplificação para todas as amostras, como é possível se visualizar nas Figuras 8, 9, 10 e 11.

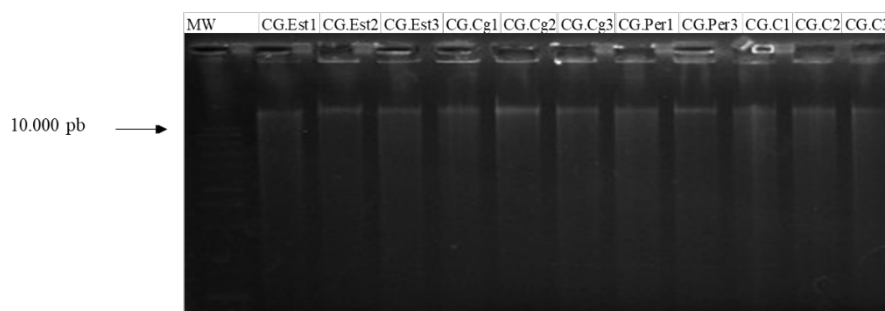


Figura 8. Imagem do gel de agarose 1% marcado com brometo de etídeo. Nas canaletas estão os produtos de RCA obtidos com as amostras coletadas no ensaio VCN54, coletado em Santo Antônio de Goiás. Amostras: CG.Est 1 a 3: Estilo; CG.Cg 1 a 3: Campos Gerais; CG.Per 1 e 3: Pérola; CG.C 1 a 3: CNFC16561.

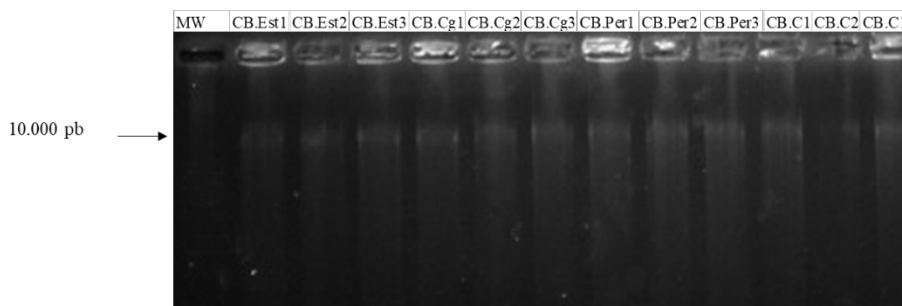


Figura 9. Imagem do gel de agarose 1% marcado com brometo de etídeo. Nas canaletas estão os produtos de RCA obtidos com as amostras coletadas no ensaio VCN56, coletado em Brasília. Amostras: CB.Est 1 a 3: Estilo; CB.Cg 1 a 3: Campos Gerais; CB.Per 1 e 3: Pérola; CB.C 1 a 3: CNFC16561

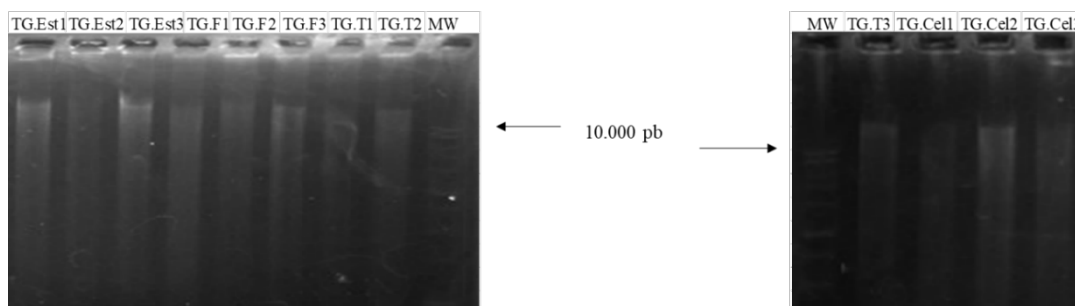


Figura 10. Imagem do gel de agarose 1% marcado com brometo de etídeo. Nas canaletas estão os produtos de RCA obtidos com as amostras coletadas no ensaio VCT24, coletado em Santo Antônio de Goiás. Amostras: TG.Est 1 a 3: Estilo; TG.F 1 a 3: FC401RMD; TG.T1 e 2: CNFCT 19119; TG.T3: CNCFT19119; TG.Cel 1 a 3: Celeiro.

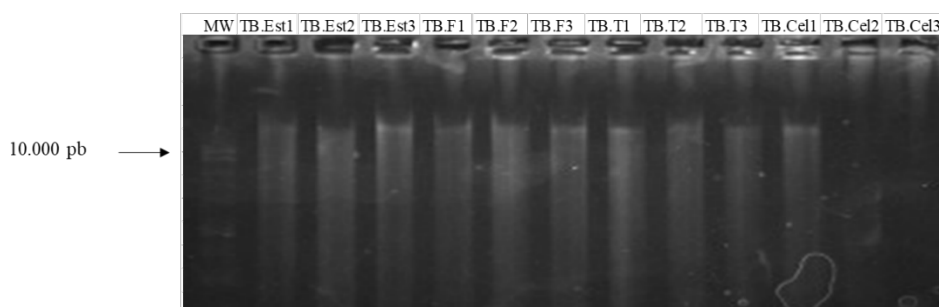


Figura 11. Imagem do gel de agarose 1% marcado com brometo de etídeo. Nas canaletas estão os produtos de RCA obtidos com as amostras coletadas no ensaio VCT25, coletados em Brasília. Amostras: TB.Est 1 a 3: Estilo; TB.F 1 a 3: FC401RMD; TB.T1 e 2: CNFCT 19119; TB.T3: CNCFT19119; TB.Cel 1 a 3: Celeiro.

4.2 ANÁLISE DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO

4.2.1 Obtenção das sequências genômicas de BGMV

Para todas as amostras foram obtidos *contigs* no *assembly de novo*, que foram anotados preliminarmente pelo blastn, e apresentaram identidade com BGMV. Foram obtidas sequências completas tanto para o DNA-A quanto para o DNA-B, com identidades acima de 94%. Após obter-se uma sequência consenso, entre todos os *contigs* de DNA-A, esta foi utilizada como referência para a genotipagem pelo GATK. Como resultado dos alinhamentos dos *contigs* à sequência referência foram obtidas as coberturas apresentadas na Tabela 4.

Foram observados valores discrepantes no número de *reads* alinhados entre amostras (Figura 12), onde o menor número de *reads* alinhados foi de 310, enquanto o maior

foi de 1.678.349, sendo a média de 488.310. As amostras obtidas nas linhagens transgênicas, em ambos os locais, apresentaram, como esperado, as menores taxas de alinhamento, como pode ser visto no exemplo apresentado na Figura 13. No entanto, em Santo Antônio de Goiás, as linhagens elite convencionais: Estilo, Pérola e CNFC16561, no ensaio de VCN também apresentaram taxas de alinhamento baixas, fruto provavelmente de escape. Logo, apesar do genoma completo do BGMV ter sido recuperado em ambos os tipos de linhagens (convencionais e transgênicas), o evento da transgenia, que confere resistência ao BGMV, diminuiu drasticamente a presença do vírus na planta, impedindo a sua replicação e acúmulo nos tecidos foliares.

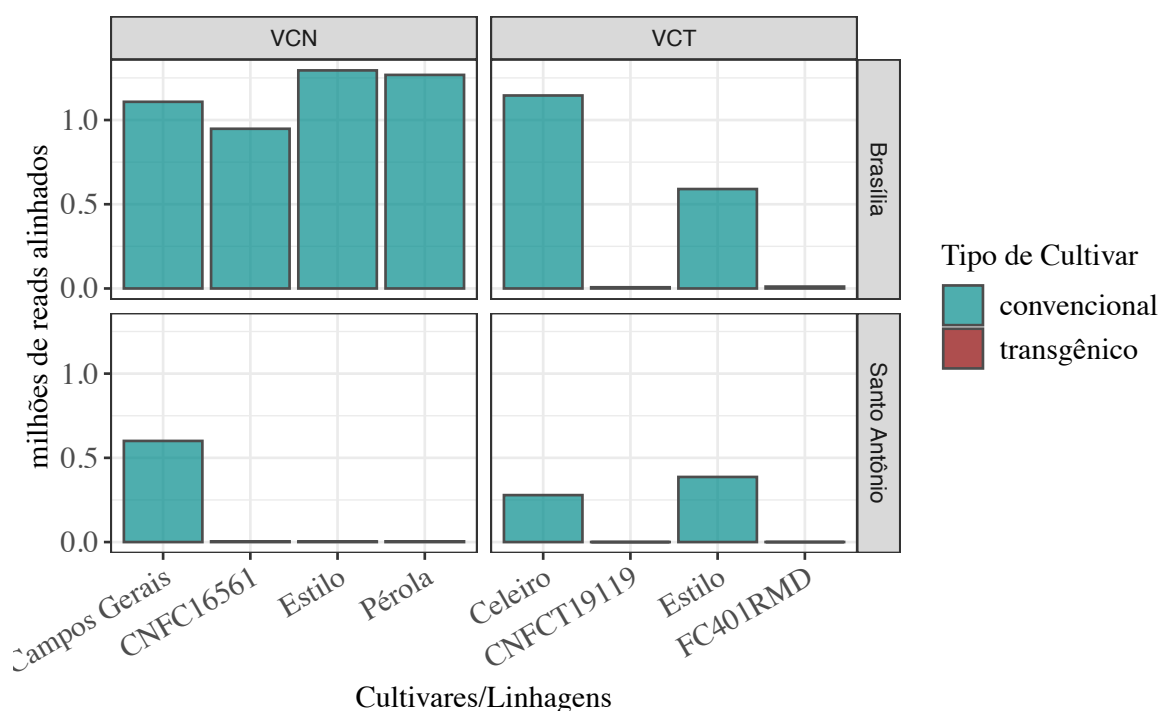


Figura 12. Gráfico representativo do número médio de *reads*, obtidos nas amostras de cada linhagem elite, que foram alinhados na sequência consenso de referência do genoma de BGMV.

Tabela 4. Resultados dos alinhamentos das sequências obtidas em cada amostra na sequência consenso de referência do genoma de BGMV.

Amostra	Número de <i>reads</i> alinhados	% de <i>reads</i> alinhados	Amostra	Número de <i>reads</i> alinhados	% de <i>reads</i> alinhados
CG.Est1	5.485	0,12	TG.Est1	604.294	12,71
CG.Est2	3.394	0,07	TG.Est2	358	0,01
CG.Est3	2.742	0,06	TG.Est3	554.853	11,66
CG.Cg1	352.060	8,80	TG.F1	378	0,01
CG.Cg2	1.436.085	30,48	TG.F2	399	0,01
CG.Cg3	12.915	0,28	TG.F3	382	0,01
CG.Per1	3.892	0,08	TG.T1	330	0,01
CG.Per2	-	-	TG.T2	310	0,01
CG.Per3	4.778	0,10	TG.T3	402	0,01
CG.C1	4.915	0,10	TG.Cel1	378	0,01
CG.C2	4.126	0,09	TG.Cel2	832.447	17,70
CG.C3	3.334	0,07	TG.Cel3	3.192	0,07
CB.Est1	1.462.949	30,69	TB.Est1	3.667	0,08
CB.Est2	1.320.797	28,11	TB.Est2	818.046	17,25
CB.Est3	1.099.774	27,67	TB.Est3	949.142	20,05
CB.Cg1	951.852	23,82	TB.F1	28.146	0,60
CB.Cg2	1.076.456	27,06	TB.F2	1.195	0,03
CB.Cg3	1.296.392	27,35	TB.F3	4.611	0,10
CB.Per1	1.351.392	28,43	TB.T1	2.931	0,06
CB.Per2	1.454.540	31,08	TB.T2	18.162	0,38
CB.Per3	997.501	21,08	TB.T3	432	0,01
CB.C1	956.661	23,98	TB.Cel1	499.962	10,70
CB.C2	1.272.083	31,93	TB.Cel2	1.258.582	27,21
CB.C3	615.480	15,39	TB.Cel3		

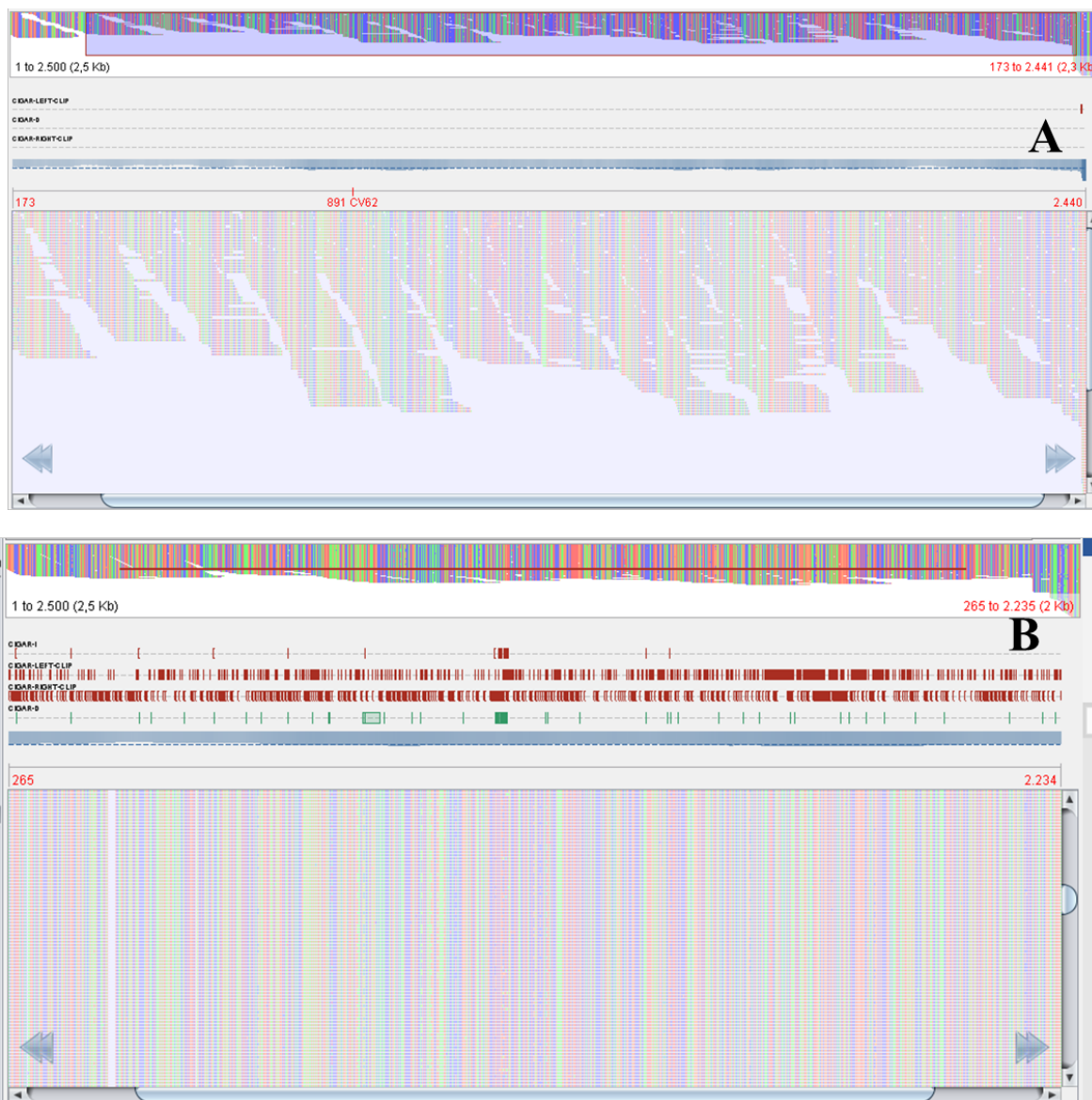


Figura 13. Visão geral dos *assemblies* obtidos com os dados de sequenciamento de duas amostras. A) Amostra TG.F1 (linhagem transgênica FC401RMD), com 1.152 *reads* montados ao longo de 2.619 pb de comprimento. B) Amostra CB.Per1 (linhagem convencional Pérola), com 3.521.996 *reads* montados ao longo de 2.616 pb de comprimento.

4.2.2 Análise de diversidade genética

Utilizando as estimativas de frequências alélicas das populações de BGMV em cada amostra, foram estimadas as medidas de diversidade genética de Nei (1973) e a proporção de sítios polimórficos para cada uma das condições avaliadas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5. A média de proporção de sítios polimórficos obtida

foi de 0,008, variando de 0,000 a 0,016. Já a para a diversidade genética de Nei (1973) a média obtida foi de 0,137, variando de 0,000 a 0,269. Na Figura 14 pode-se observar que ambas as formas de se medir a diversidade são correlacionadas. Ramos-Sobrinho et al. (2010) analisando o DNA-A de BGMV isolado de *P. lunatus*, encontrou 251 sítios polimórficos em um genoma de 2.616 pb, o que corresponde a uma proporção média de 0,095, que é superior a encontrada neste trabalho. Também Faria & Maxwell (1999) encontraram maior diversidade em BGMV isolado de feijão fava e sugeriram classificá-lo como um novo vírus. Da mesma forma, Reis et al. (2020b) sugere que, de acordo com os critérios atuais de classificação, este deve ser classificado como uma nova espécie.

Tabela 5. Características gerais de cada uma das amostras obtidas e estimativas obtidas dos parâmetros de diversidade (S – proporção de sítios polimórficos e h – diversidade genética de Nei, 1973).

Amostra	S	h	Tipo de linhagem ¹	Tipo de ensaio ²	Exp. ³	Geração	Linhagem	Local ⁴
CG.Est1	0,013	0,203	convenc.	VCN	III	clássica	Estilo	SAG
CG.Est2	0,014	0,234	convenc.	VCN	III	clássica	Estilo	SAG
CG.Est3	0,013	0,222	convenc.	VCN	III	clássica	Estilo	SAG
CG.Cg1	0,000	0,001	convenc.	VCN	III	clássica	Campos Gerais	SAG
CG.Cg2	0,000	0,000	convenc.	VCN	III	clássica	Campos Gerais	SAG
CG.Cg3	0,007	0,084	convenc.	VCN	III	clássica	Campos Gerais	SAG
CG.Per1	0,012	0,196	convenc.	VCN	III	clássica	Pérola	SAG
CG.Per3	0,013	0,204	convenc.	VCN	III	clássica	Pérola	SAG
CG.C1	0,012	0,186	convenc.	VCN	III	recente	CNFC16561	SAG
CG.C2	0,013	0,213	convenc.	VCN	III	recente	CNFC16561	SAG
CG.C3	0,013	0,223	convenc.	VCN	III	recente	CNFC16561	SAG
CB.Est1	0,007	0,149	convenc.	VCN	IV	clássica	Estilo	BSB
CB.Est2	0,008	0,165	convenc.	VCN	IV	clássica	Estilo	BSB
CB.Est3	0,006	0,125	convenc.	VCN	IV	clássica	Estilo	BSB
CB.Cg1	0,000	0,004	convenc.	VCN	IV	clássica	Campos Gerais	BSB
CB.Cg2	0,008	0,186	convenc.	VCN	IV	clássica	Campos Gerais	BSB
CB.Cg3	0,008	0,117	convenc.	VCN	IV	clássica	Campos Gerais	BSB
CB.Per1	0,007	0,130	convenc.	VCN	IV	clássica	Pérola	BSB
CB.Per2	0,000	0,002	convenc.	VCN	IV	clássica	Pérola	BSB

Amostra	<i>S</i>	<i>h</i>	Tipo de linhagem ¹	Tipo de ensaio ²	Exp. ³	Geração	Linhagem	Local ⁴
CB.Per3	0,000	0,006	convenc.	VCN	IV	clássica	Pérola	BSB
CB.C1	0,002	0,046	convenc.	VCN	IV	recente	CNFC16561	BSB
CB.C2	0,005	0,079	convenc.	VCN	IV	recente	CNFC16561	BSB
CB.C3	0,000	0,001	convenc.	VCN	IV	recente	CNFC16561	BSB
TG.Est1	0,000	0,000	convenc.	VCT	I	clássica	Estilo	SAG
TG.Est2	0,015	0,221	convenc.	VCT	I	clássica	Estilo	SAG
TG.Est3	0,000	0,000	convenc.	VCT	I	clássica	Estilo	SAG
TG.F1	0,015	0,231	transg.	VCT	I	recente	FC401RMD	SAG
TG.F2	0,015	0,258	transg.	VCT	I	recente	FC401RMD	SAG
TG.F3	0,015	0,224	transg.	VCT	I	recente	FC401RMD	SAG
TG.T1	0,015	0,242	transg.	VCT	I	recente	CNFCT19119	SAG
TG.T2	0,014	0,269	transg.	VCT	I	recente	CNFCT19119	SAG
TG.T3	0,014	0,246	transg.	VCT	I	recente	CNFCT19119	SAG
TG.Cel1	0,015	0,241	convenc.	VCT	I	clássica	Celeiro	SAG
TG.Cel2	0,011	0,217	convenc.	VCT	I	clássica	Celeiro	SAG
TG.Cel3	0,013	0,226	convenc.	VCT	I	clássica	Celeiro	SAG
TB.Est1	0,004	0,031	convenc.	VCT	II	clássica	Estilo	BSB
TB.Est2	0,000	0,000	convenc.	VCT	II	clássica	Estilo	BSB
TB.Est3	0,000	0,002	convenc.	VCT	II	clássica	Estilo	BSB
TB.F1	0,008	0,185	transg.	VCT	II	recente	FC401RMD	BSB
TB.F2	0,015	0,259	transg.	VCT	II	recente	FC401RMD	BSB
TB.F3	0,010	0,198	transg.	VCT	II	recente	FC401RMD	BSB
TB.T1	0,007	0,069	transg.	VCT	II	recente	CNFCT19119	BSB
TB.T2	0,008	0,162	transg.	VCT	II	recente	CNFCT19119	BSB
TB.T3	0,016	0,240	transg.	VCT	II	recente	CNFCT19119	BSB
TB.Cel1	0,000	0,008	convenc.	VCT	II	clássica	Celeiro	BSB
TB.Cel2	0,002	0,010	convenc.	VCT	II	clássica	Celeiro	BSB
TB.Cel3	0,008	0,155	convenc.	VCT	II	clássica	Celeiro	BSB

¹ convenc. – linhagem convencional; transg. – linhagem transgênica.

² VCN – ensaios conduzidos com linhagens elite convencionais; VCT – ensaios conduzidos com linhagens elite transgênicas.

³ Exp. – experimento.

⁴ SAG – Santo Antônio de Goiás (GO); BSB – Brasília (DF).

sugerem a ocorrência de uma condição em que há pressão seletiva para se superar a resistência das linhagens transgênicas.

Tabela 5. Estimativas dos parâmetros de diversidade (S – proporção de sítios polimórficos e h – diversidade genética de Nei, 1973), obtidas para diferentes níveis dos fatores avaliados. São também apresentados os p -valores (p) obtidos nas comparações realizadas pelo teste de Wilcoxon.

Fator	Nível	S	p	h	p
Tipo de linhagem	Convencional	0,007	0,0005	0,111	0,0002
	Transgênica	0,012		0,215	
Tipo de Ensaio	VCN	0,007	0,1237	0,121	0,0950
	VCT	0,009		0,154	
Local	Brasília	0,005	0,0015	0,097	0,0033
	Santo Antônio de Goiás	0,011		0,180	
Geração	Clássica	0,006	0,0052	0,108	0,0033
	Recente	0,011		0,185	

Quanto ao local, as amostras coletadas em Santo Antônio de Goiás apresentaram uma maior diversidade populacional de BGMV, em relação às amostras obtidas em Brasília (Figura 15). Considerando-se que, em campo, os ensaios coletados em Brasília apresentavam sintomas típicos de mosaico-dourado de forma generalizada (com exceção dos genótipos transgênicos), diferente do que foi observado em Santo Antônio de Goiás. Pode-se inferir que numa situação epidêmica, poucos isolados se sobressaem, enquanto que em locais com poucos focos de doença, existam mais variantes atuando.

Para os fatores experimentos e linhagens, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, o qual, apesar de fornecer um p -valor significativo, para proporção de sítios polimórficos (0,0335), não foi capaz de captar a diferença entre as linhagens.

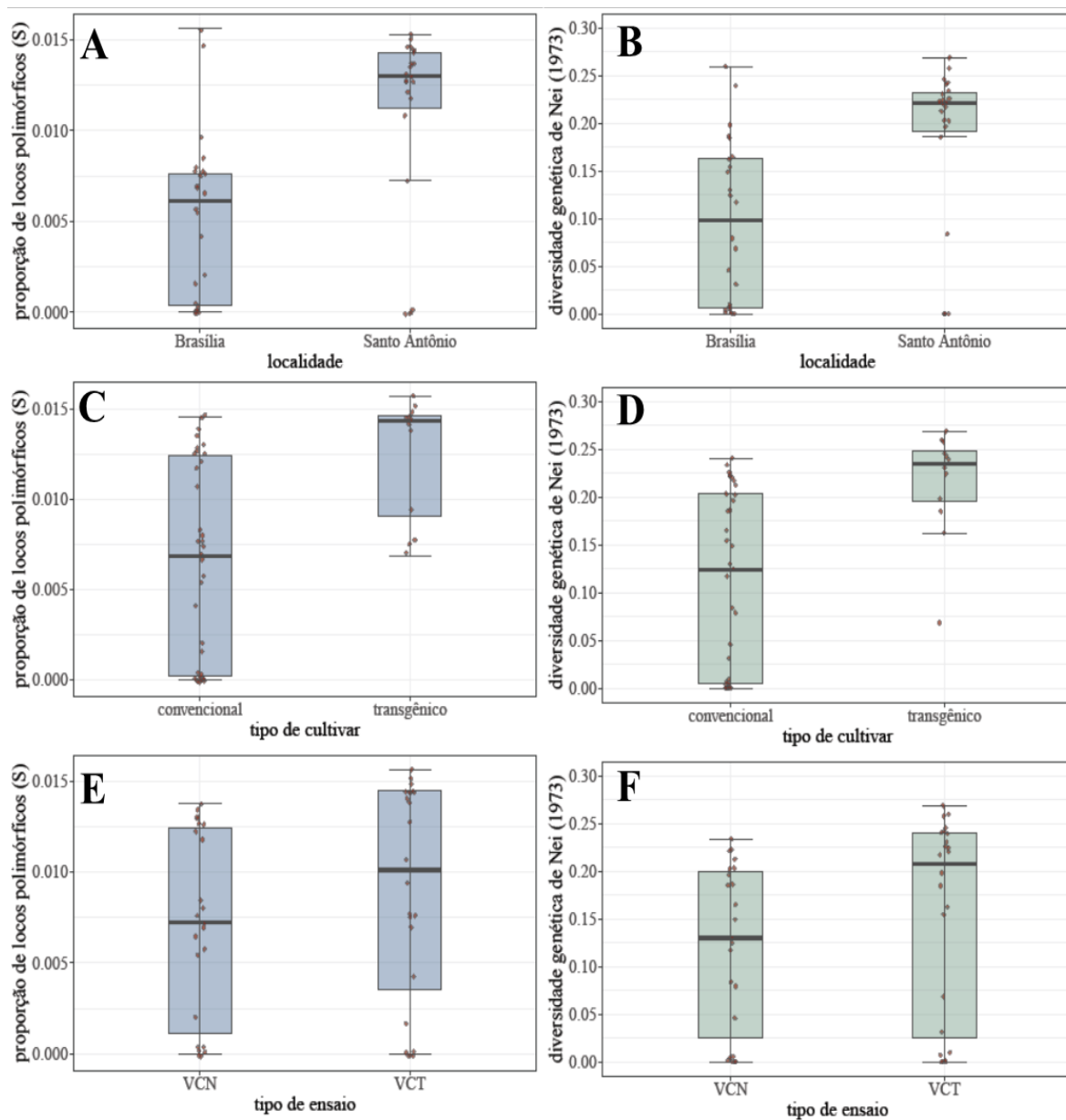


Figura 15. *Boxplots* representativos das distribuições das estimativas dos parâmetros de diversidade em função dos fatores localidade, tipo de cultivar, e tipo de ensaio. Coluna da esquerda: proporção de sítios polimórficos; coluna da direita: diversidade genética de Nei (1973).

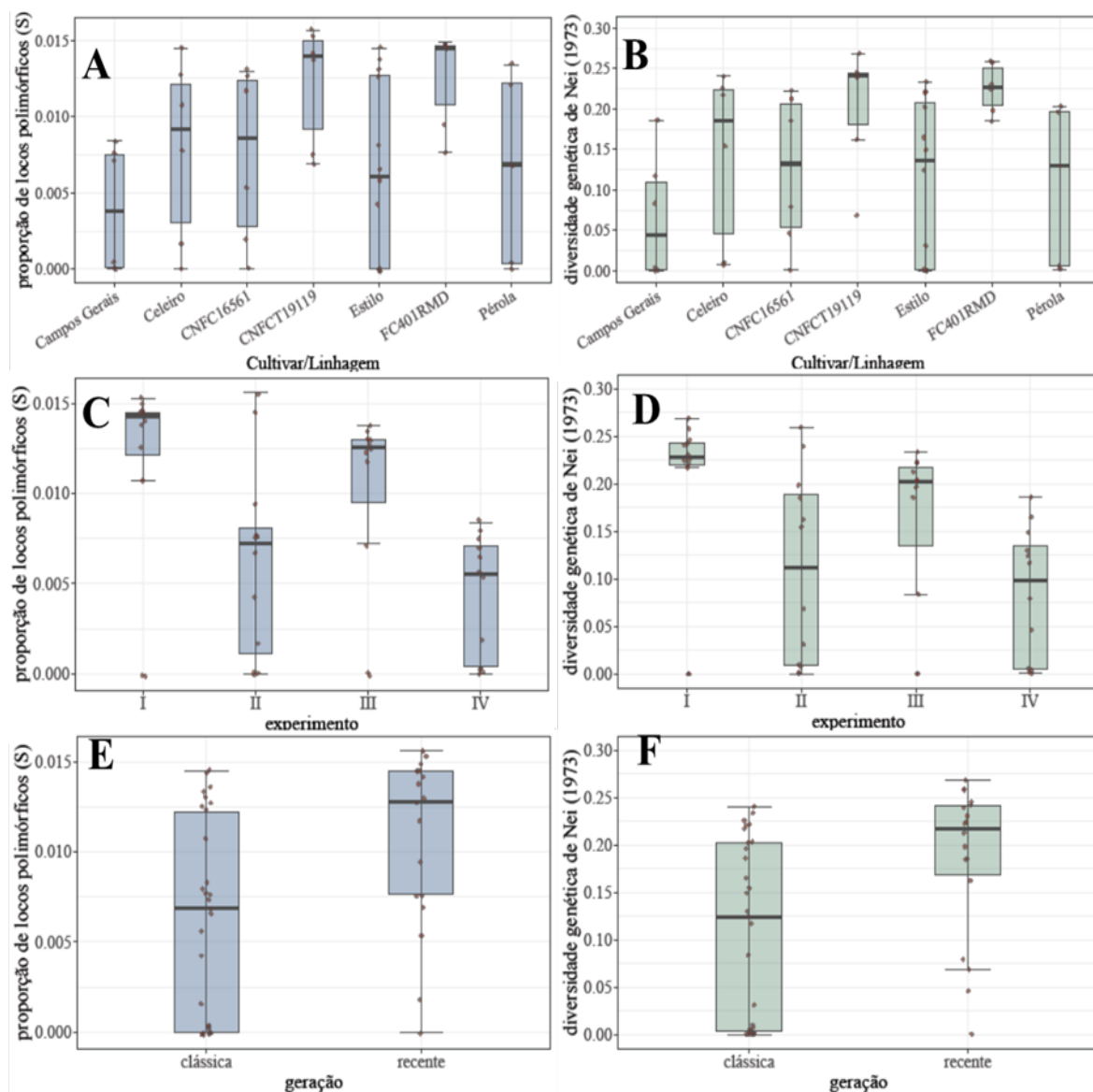


Figura 6. *Boxplots* representativos das distribuições das estimativas dos parâmetros de diversidade em função dos fatores linhagens, experimento e geração. Coluna da esquerda: proporção de sítios polimórficos; coluna da direita: diversidade genética de Nei (1973).

Para a diversidade genética de Nei ($p = 0,0151$) obteve-se diversidade estatisticamente superior de FC401RMD em relação a Campos Gerais, sendo que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de diversidade genética das populações de BGMV amostradas nas demais linhagens. A linhagem FC401RMD é a cultivar, transgênica e resistente ao BGMV, lançada pela Embrapa, recomendada para a região central do Brasil; enquanto a cultivar Campos Gerais foi registrada pelo IAPAR em 2011, sendo indicada como adaptada ao cultivo na região Sul.

Já em relação aos experimentos, tanto para a diversidade genética de Nei ($p = 0,0106$), quanto para a proporção de sítios polimórficos ($p = 0,0061$), encontrou-se superioridade estatística na diversidade do experimento I em relação aos experimentos II e IV, enquanto o experimento III não diferiu dos demais. O Experimento I foi um VCT conduzido em Santo Antônio de Goiás onde um mesmo número de genótipos convencionais e transgênicos foi analisado, enquanto os experimentos II (VCT) e IV (VCN) foram conduzidos em Brasília. Considerando-se que as populações de BGMV amostradas nas linhagens transgênicas apresentaram maiores valores de diversidade, bem como as amostras coletadas em Santo Antônio de Goiás, os resultados superiores encontrados para experimento parecem ser uma convergência de fatores já explicados anteriormente.

4.2.3 Análise de estrutura genética

Para se avaliar a distribuição da diversidade genética realizou-se uma AMOVA, cujos resultados encontram-se na Tabela 6. Foram considerados como fatores na análise os locais, os tipos de ensaios, os tipos de linhagens, e as próprias linhagens.

Tabela 6. Resultados da análise de estrutura genética entre amostras de BGMV.

Fontes de variação	$\hat{\sigma}_g^2$	%	IC _{95%} (%)	
Locais	0,0033	5,83	3,68	7,72
Tipos de ensaio	0,0046	8,05	4,38	11,27
Tipos de genótipo	0,0001	0,33	-0,04	0,58
Linhagens	0,0014	2,59	1,03	3,93
Resíduo	0,0475	83,18	79,54	87,01

Os fatores que apresentaram proporção significativa na variância genética total foram locais (5,83%) e tipos de ensaios (8,05%), com menor contribuição das linhagens (2,59%). É reportado na literatura (Ramos-Sobrinho et al., 2014) que há estruturação da diversidade genética em populações de BGMV obtidas em diferentes locais, o que é corroborado pelos dados obtidos.

Quanto à estruturação da diversidade genética relacionada aos tipos de ensaios, VCT e VCN, houve diferença de manejo para o controle de mosca-branca nestes ensaios, o que poderia alterar as frequências alélicas das populações dos diferentes ensaios, ainda que dentro de um mesmo local. Apesar do tipo de ensaio ter apresentado proporção significativa

na variância genética total, o tipo de genótipo não apresentou. Isto pois, apesar de os ensaios conterem, em sua maioria, tipos de genótipos diferentes (VCT avalia genótipos transgênicos enquanto VCN avalia genótipos convencionais) as amostras transgênicas coletadas dentro de VCT eram apenas metade do total, devido a coleta de cultivares testemunhas do ensaio que eram convencionais, de forma que este efeito foi mitigado.

4.2.4 Análise de divergência genética

As frequências alélicas foram utilizadas para se realizar a Análise de Componentes Principais, cujos primeiros dois componentes explicaram cerca de 56% da variação total (Figura 17). O coeficiente de correlação matricial (Teste de Mantel) obtido para o gráfico foi de 0,91, sugerindo uma boa representação gráfica dos padrões de distância entre as populações de BGMV. Na análise deste gráfico, ao se observar os pontos coloridos por localidade, pode-se sugerir a ocorrência de estruturação por local, observando-se a tendência de comportamento dos pontos na Figura 17. O mesmo pode-se afirmar do dendrograma (Figura 18), obtido por UPGMA a partir dos mesmos valores de frequências alélicas: verifica-se agrupamento por local, entre amostras de Brasília e entre amostras de Santo Antônio de Goiás. É amplamente descrito que populações de *Begomovirus* apresentem estrutura genética de acordo com a sua localização geográfica (Brown et. al., 2015), o que também tem sido observado em BGMV (Ramos-Sobrinho, et al., 2014).

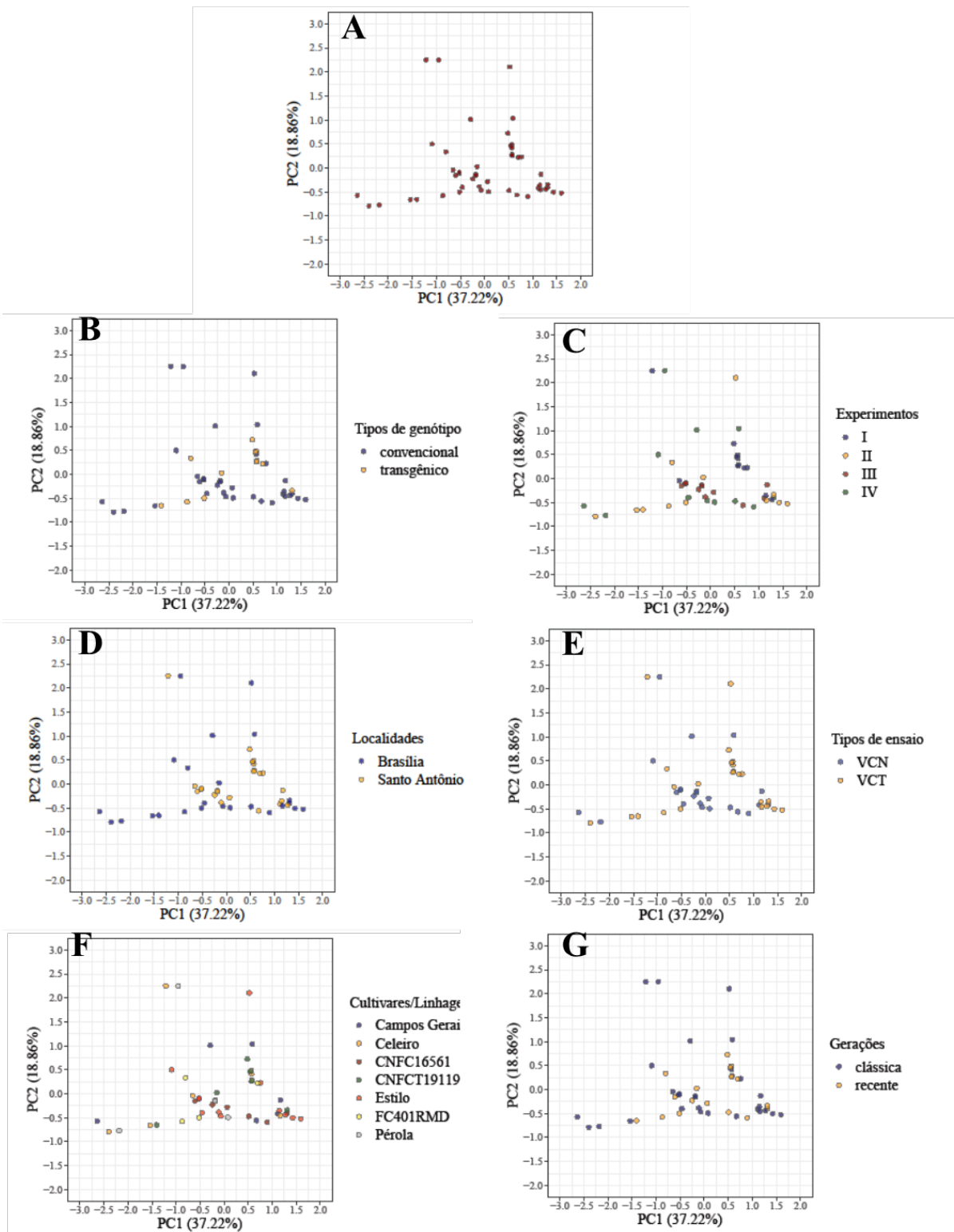


Figura 17. Gráficos de dispersão representativos dos resultados da Análise de Componentes Principais realizada sobre as frequências alélicas dos 54 marcadores SNPs, genotipados em cada uma das 47 amostras avaliadas. Nos diferentes gráficos, os pontos são coloridos utilizando-se diferentes critérios.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As populações de BGMV apresentam diversidade intrapopulacional.
- Pode-se observar diversidade maior em Santo Antônio de Goiás e em plantas transgênicas.
- Apesar de recuperados os genomas completos em plantas transgênicas, estas apresentaram menor abundância de vírus, o que está de acordo com a eficácia do evento de transgenia que impede a replicação do BGMV na planta.
- A diversidade genética observada nas populações de BGMV, aqui estudadas, encontra-se estruturada de acordo com local.
- A hipótese de que haja influência do manejo de controle de mosca-branca sobre os níveis de diversidade viral detectados merece ser melhor investigada.
- Existe maior diversidade nas plantas transgênicas, o que não implica em divergência genética entre estas populações virais, que se comportam como uma única população.

6 REFERÊNCIAS

ADAMS, I. P.; FOX, A.; BOONHAM, N.; MASSART, S.; JONGHE, K. The impact of high throughput sequencing on plant health diagnosis. **European Journal of Plant Pathology**, v. 152, p. 909 – 919, 2018.

ANDREWS, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. 2010. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>.

ANTIPOV, D.; RAIKO, M.; LAPIDUS, A.; PEVZNER, P. A. Metaviralspades: Assembly of Viruses From Metagenomic Data. **Bionformatics**, v. 36, n. 14, p. 4126–4129, 2020.

ARAGÃO FJL, FARIA JC. First Transgenic Geminivirus-resistant plant in the field. **Nature Biotechnology**, v. 27, p. 1086-1088, 2009.

ARAGÃO, F. J. L.; BRASILEIRO, A. C. M.; RIBEIRO, S. G.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Inoculation of Bean and Soybean with Cloned *Bean golden mosaic virus* (BGMV) DNA Using Particle Acceleration. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p. 642- 644, 1995.

ARAGÃO, F. J. L.; GROSSI DE SÁ, M. F.; DAVEY, M. R.; BRASILEIRO, A. C. M.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Factors influencing transiente gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an eletrical particle acceleration device. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 483-493, 1993.

ARAGÃO, F. J. L.; NOGUEIRA, E. O. P. L.; TINOCO, M. L. P.; FARIA, J. C. Molecular characterization of the first comercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus. **Journal of Biotechnology**, v. 166, p. 42-50, 2013.

BARBOSA, L. F.; YUKI, V. A.; MARUBAYASHI, J. M.; MARCHI, B. R.; PERINI, F. L.; PAVAN, M. A.; BARROS, D. R.; GHANIM, M.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. AND KRAUSE-SAKATEA, R. First report of Bemisia tabaci Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. **Pest Management Science**, v.71, n.4, p. 501-504, 2015.

Beam, K. & Ascencio-Ibañez, J. T. Geminivirus Resistance: A Minireview. **Frontiers in Plant Science**, v.11, n. 1131, 2020.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. *In: Manual de Fitopatologia. Doenças do feijoeiro (Phaseolus vulgaris)*. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2., p. 333.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. **Bioinformatics**, btu170. 2014.

BONFIM, K.; FARIA, J. C.; NOGUEIRA, E. O. P. L.; MENDES, E. A.; ARAGÃO, F. J. L. RNAi-Mediated Resistance to *Bean golden mosaic virus* in Genetically Engineered

Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). **The American Phytopathological Society**, v. 20, p. 717-726, 2007.

Companhia Nacional de Abastecimento. Compêndio de Estudos Conab / Companhia Nacional de Abastecimento. – v. 1, 2016.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Safra 2019/2020. Primeiro levantamento. v. 7, n. 1, 2020.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Safra 2020/2021. Décimo levantamento. v. 8, n. 10, 2021.

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

FARIA J.C.; MAXWELL D.P. Variability in Geminivirus Isolates Associated with *Phaseolus* spp. In Brazil. **The American Phytopathological Society**, v.89, p. 262-268,1999.

FARIA, J. C.; ARAGÃO, F. J. L.; QUINTELA, E. D.; SOUZA, T. L. P. O.; KITAHIMA, E. W.; RIBEIRO, S. G. Golden Mosaic of Common Beans in Brazil: Management with a Transgenic Approach. **American Phytopathological Society**, 2016. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/GoldenMosaic.aspx>> Acesso em 20/04/2017.

FARIA, J. C.; OLIVEIRA, M. N.; YOKOYAMA, M. Resposta Comparativa de Genótipos de Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) à Inoculação com o Virus do Mosaico Dourado no Estágio de Plantulas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p. 566-572, 1994.

FIALLOS, F. R. G. Doenças causadas por vírus na cultura de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). **Ciencia y Tecnologia**, v.2, n.3, p.1-6, 2010.

GARCIA-ARENAL, F.; FRAILE, A.; MALPICA, J. M. Variability And Genetic Structure of Plant Virus Populations. **Annual Review Phytopathology**, v. 39, P.157–86, 2001.

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

GEPTS, P.; ARAGÃO, F. J. L.; BARRIS, E.; BLAIR, M.; BRONDANI, R.; BROUGHTON, W. Genomics of *Phaseolus* Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics. **Genomics of Tropical Crop Plants**, p.113-143, 2008.

GILBERTSON, R. L.; FARIA, J. C.; LEONG, A. S.; AHLQUIST, P. G.; MAXWELL, D. P. Molecular Causal characterization of a Brazilian Isolate of *Bean golden mosaic virus*. **Annual Report of the bean Improvement Cooperative**, v. 32, p. 92-93, 1989.

GOODMAN, R. M.; HOWARTH AJ, CATON J, BOSSERT M. Nucleotide sequence of *Bean golden mosaic virus* and a model for gene regulation in geminiviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, p. 3372-3576, 1985.

GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews**, v. 17, p.333-351, 2016.

GUO, J.; XU, N.; LI, Z.; ZHANG, S.; WU, J.; KIM, D.H, et al. Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides. **PNAS**, v. 105, n. 27, p. 9145- 9150, 2008.

HANLEY-BOWDOIN L, BERJANO ER, ROBERTSON D, MANSOOR S. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. **Nature Reviews Microbiology**, p.1-12, 2013.

HSIEH, C. H.; WANG, H. Y.; CHENC, Y. F.; KO, C. C. Loop-mediated isothermal amplification for rapid identification of biotypes B and Q of the globally invasive pest *Bemisia tabaci*, and studying population dynamics. **Pest Management Science**, v. 68, n. 8, p. 1206 – 1213, 2011.

HULL R. **Matthews' Plant Virology**. Elsevier. Colney, 2002.

IBGE. Indicadores IBGE: Estatística da Produção Agrícola. 2021.

INOUE-NAGATA A.K.; LIMA M.F.; GILBERTSON R.L. A review of geminivirus (begomovirus) diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. **Horticultura Brasileira**, v. 34, p. 08-18, 2016.

INOUE-NAGATA, A. K.; ALBUQUERQUE, L. C.; ROCHA, W. B.; NAGATA, T.A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, v. 116, n. 2, p. 209-211, 2004.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, p.357-359, 2012.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P. CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A. MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948. 2007.

LIMA, A. T. M.; SILVA, J. C. F.; SILVA, F. N.; CASTILLO-URQUIZA, G. P.; SILVA, F. F.; SEAH, Y. M.; MIZUBUTI, E. S. G.; DUFFY, S.; ZERBINI, F. M. The diversification of begomovirus populations is predominantly driven by mutational dynamics. **Virus Evolution**, v.3, n.1, 2017.

MARCHANT, W. G.; GAUTAM, S., HUTTON, S. F.; SRINIVASAN, R. Tomato Yellow Leaf Curl Virus-Resistant and -Susceptible Tomato Genotypes Similarly Impact the Virus Population Genetics. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

MCLEISH, M. J.; FRAILE, A.; GARCIA-ARENAL, F. Population Genomics of Plant viruses: The Ecology and Evolution of Virus Emergence. **The American Phytopathological Society**, 2020.

MEDEIROS, R. B.; RESENDE, R. O.; CARVALHO, R. C. P.; DIANESE, E. C.; COSTA, C. L.; SGRO, J.Y. **Virologia Vegetal: Conceitos, fundamentos, classificação e controle**. Editora UNB. Brasília, 2015. 765 p.

METZKER, M. L. Sequencing technologies – the next generation. **Nature Reviews**, v. 11, p. 31-46, 2010.

MEZIADI, C.; BLANCHET, S.; GEFFROY, V.; PFLIEGER, S. Genetic resistance against viruses in *Phaseolus vulgaris* L.: state of the art and the future prospects. **Plant Science**, v. 265, p. 39-50, 2017.

MORALES, F. Common Beans. In : LOEBENSTEIN, G. & CARR, J. P. (Ed). Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses. Netherlands: Springer, 2006(b), p. 367-382.

MORALES, F. J. History and Current Distribution of Begomoviruses in Latin America. **Advices in Virus Research**, v. 67, p. 127-162, 2006(a).

MORINAGA, T.; IKEGAMI, M.; MIURA, K. Infectivity of the Cloned DNAs from Multiple Genome Components of *Bean golden mosaic virus*. **Proc. Japan Academic**, v. 59, p. 363-367, 1983.

MORINAGA, T.; IKEGAMI, M.; SHIMOTOHNO, K.; MIURA, K. Total Nucleotide Sequences of the Infectious Clones DNAs of *Bean golden mosaic virus*. **Microbiology Immunology**, v. 31, p. 147-154, 1987.

MOURY, B.; DESBIEZ, C.; JACQUEMOND, M.; LECOQ H. genetic diversity of plant virus populations: towards hypothesis testing in molecular epidemiology. **Advances in Virus Research**, v. 67, 2006.

NICAISE, V. Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 2014.

OROZCO, B. M.; HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA Structure is Required for Geminivirus Replication Origin Function. **Journal of Virology**, v. 70, p. 148-158, 1996.

QUINTELA, E. D.; ABREU, A. G.; LIMA, J. F.S.; MASCARIN, G. M.; SANTOS, J. B.; BROWND, J. K. Reproduction of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) B biotype in maize fields (*Zea mays* L.) in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n. 11, 2016.

RAMOS-SOBRINHO, R. Estrutura genética de uma população de Begomovírus *Bean Golden Mosaic Virus* (BGMV) que infecta fava (*Phaseolus lunatus* L.) no Estado de Alagoas. 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal e Proteção de Plantas) - Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2010.

RAMOS-SOBRINHO, R.; XAVIER, C. A. D.; PEREIRA, H. M. B.; LIMA, G. S. A.; ASSUNÇÃO, I. P.; MIZUBUTI, E. G. S.; *et al.* Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous hosts. **Journal of General Virology**, v. 95, p. 2540-2552, 2014.

RÊGO, C. M. **Diversidade genômica de begomovírus em tomateiros resistente (BRS Sena) e susceptível.** 2016. 101 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

REIS, A. N. L. Metagenomic analysis of the begomovirus diversity in tomatoes in Central Brazil and impact of the *Ty-1* tolerance gene on viral evolutionary dynamics. 2020. 205 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2020a.

REIS, L. N. A.; FONSECA, M. E. N.; RIBEIRO, S. G.; NAITO, F. Y. B.; BOITEUX, L. S.; PEREIRA-CARVALHO, R. C. Metagenomics of Neotropical Single-Stranded DNA Viruses in Tomato Cultivars with and without the *Ty-1* Gene. **Viruses**, v. 12, n. 819, 2020b.

ROCHA C.S.; CASTILLO-URQUIZA G.P.; LIMA A.T.M.; SILVA F.N.; XAVIER C.A.D.; HORA-JUNIOR B.T.; et al. Brazilian Begomovirus Populations Are Highly Recombinant Rapidly Evolving, and Segregated Based on Geographical Location. **Journal of Virology**, v. 87, p. 5784-5799, 2013.

ROSSI, G. B.; VALENTIM-NETO, P. A.; BLANK, M.; FARIA, J. C.; ARISI, A. C. M. Comparison of Grain Proteome Profiles of Four Brazilian Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.65, p. 7588-7597, 2017.

ROOSSINCK, M. J.; MARTIN, D. P.; ROUMAGNAC, P. Plant Virus Metagenomics: Advances in virus discovery. **Phytopathology**, v. 105, n. 6, 2015.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc National Academy of Science USA**, v.74, n.12, p. 5463-5467, 1977.

SILVA, S. J. C. ; CASTILLO-URQUIZA, G. P. ; HORA-JUNIOR, B. T. ; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A.; PIO-RIBEIRO, G. ; MIZUBUTI, E. S. G; ZERBINI, F. M. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 61, p. 457–467, 2012.

TARTARIN, B. B. G.; BARROS, W. S.; SOUZA, L. C. D. Principais Pragas da Cultura do Feijoeiro-comum. **Conexão Eletrônica**, v. 13, 2016.

VALENTINI, G.; GONÇALVES-VIDGAL, M. C.; HURTADO-GONZALES, O. P.; CASTRO, S. A. L.; CREGAN, P. B.; SONG, Q.; PASTOR-CORRALES, M. A. High-resolution mapping reveals linkage between genes in common bean cultivar Ouro Negro conferring resistance to the rust, anthracnose, and angular leaf spot diseases. **Theoretical and Applied Genetics**, v.130, p. 1705-1722, 2017.

WENDLAND, A.; LOBO-JÚNIOR, M.; FARIA, J.C. **Manual de Identificação das principais doenças do Feijoeiro-comum.** Embrapa, Brasília, 2018.

WOSULA, E.N.; CHEN, W.; FEI, Z.; LEGG, J. P. Unravelling the Genetic Diversity among Cassava Bemisia tabaci Whiteflies Using NextRAD Sequencing. **Genome Biology and Evolution**, v.9, n.11, p.2958–2973, 2017.

ZERBINI, F. M., RIBEIRO, S. G. Bean Golden Mosaic Virus and Bean Golden Yellow Mosaic Virus (Geminiviridae). **Encyclopedia of Virology**. 2008.

ZERBINI, F. M.; BRIDDON, R. W.; IDRIS, A.; MARTIN, D. P.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. A.; *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: *Geminiviridae*. **Journal of General Virology**, v. 98, p. 131-133, 2017.