**DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA GENÉTICA DA METAPOPULAÇÃO DE BEGOMOVÍRUS COM BASE NA SEQUÊNCIA CODIFICADORA DA PROTEÍNA REP**

**BORGES, Giovanna Resende1,2;** SANTOS, Matheus de Morais3; ROCHA, Felipe Santos 1,2; MORAIS JÚNIOR, Ivair José3; MEDEIROS, Ludyellen Cristina1,2; SILVA, Caroline Lemes da1,2; SOARES, Tais Viana1; SILVA, Polyanna Silveira de1; LIMA, Alison Talis Martins4

1 Graduando em Agronomia, UFU, Uberlândia, MG; 2 Bolsista PET MEC; 3 Mestrando em Agronomia, UFU, Uberlândia, MG; 4 Professor Adjunto A-I/Doutor em Fitopatologia, UFU, Uberlândia, MG; E-mail: giovannar3b@gmail.com

**RESUMO**

Os begomovírus (gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*) apresentam grande importância econômica pelos danos causados a plantas dicotiledôneas. Há apenas uma proteína essencial para a replicação, a proteína de iniciação da replicação (Rep). Em trabalhos que estudam a metapopulação dos begomovirus, a subdivisão das subpopulações foi feita a partir de análises do DNA-A completo, tornando impossível aferir qual a importância da sequência codificadora da Rep na subdivisão destes grupos. Neste trabalho, foi determinada a estrutura genética da metapopulação de begomovírus a partir das sequências codificadoras da Rep utilizando-se a Análise Discriminante de Componentes Principais no pacote Adegenet do R project, e comparada à estrutura genética determinada por outros pesquisadores utilizando-se o genoma viral completo. Os resultados obtidos neste estudo indicam que a estrutura genética da metapopulação global de begomovírus determinada com base no genoma completo difere-se daquela determinada a partir de sequências genômicas completas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Geminivírus, evolução, bioinformática.

**INTRODUÇÃO**

O gênero *Begomovirus* é o único da família Geminiviridae a apresentar vírus com genomas bipartidos, com a presença de duas moléculas circulares de DNA de fita simples, denominados DNA-A e DNA-B. Porém, esse mesmo gênero também apresenta espécies com genomas monopartidos, ou seja, compreendidos por apenas uma molécula de DNA, em sua maioria presentes no Velho Mundo (Europa, África, Ásia e Oceania). Os bipartidos codificam seis ou sete proteínas, enquanto os monopartidos, cinco ou seis. No DNA-A, são codificadas: proteína de iniciação da replicação (*replication initiation protein* - Rep); *replication enhancer protein* (REn); proteína ativadora de transcrição (*transcriptional activator protein -* TrAP); proteína capsidial (*coat protein* - CP); proteína de movimento (*movement protein* - MP); e proteína AC4. No DNA-B, ainda são codificadas as proteínas MP e *nuclear shuttle protein* (NSP)

Os begomovírus representam um grande risco para a agricultura por infectar diversas plantas dicotiledôneas de importância econômica. Por serem transmitidos por um complexo de espécies crípticas de moscas-brancas, denominado *Bemisia tabaci*, apresentam limitada capacidade de dispersão. Consequentemente, a metapopulação global dos begomovírus é distribuída em grandes subpopulações com certo grau de isolamento geográfico. Desta forma, a metapopulação de begomovírus é composta por subpopulações que apresentam profundas diferenças genéticas. Identificar essas diferenças é de extrema importância para compreender o processo evolutivo de isolados virais do gênero e características específicas das subpopulações.

Para isso, foram empregadas análises *in silico* de sequências codificadoras da proteína de iniciação da replicação, (Rep). A Rep é a única proteína viral essencial para a replicação e, dentre as sequências codificadoras, é uma das maiores (~1.043 nucleotídeos) (ELMER *et al*, 1988). Inicia a replicação ao ligar-se com os iterons da região intergênica e introduzir um corte à sequência comum TAATATT↓AC conservada em todos os geminivírus (ZERBINI *et al,* 2017). A proteína Rep apresenta elevado grau de variabilidade genética, seja devido à ocorrência frequente de mutações ou devido à recombinação entre vírus distintos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar se a segregação genética baseada na sequência codificadora da proteína Rep apresenta diferenças quando comparada à segregação baseada no genoma completo utilizando-se como referência o estudo publicado por Prasanna *et al.* (2010).

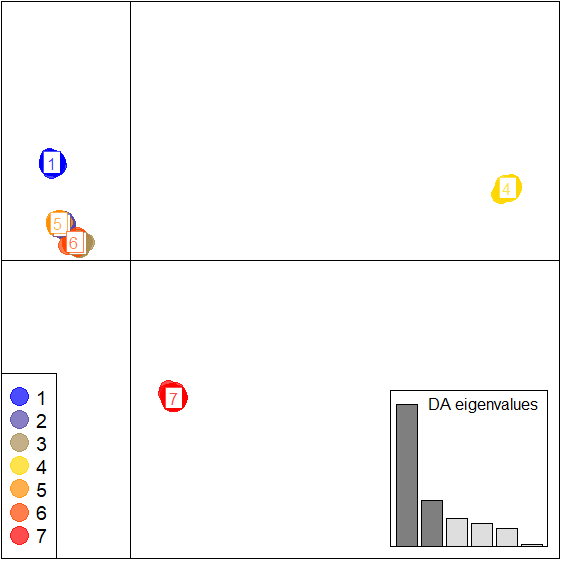
**MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Vegetal (LAVIV) da Universidade Federal de Uberlândia no campus Umuarama. Foram baixados genomas completos de isolados referentes às 388 espécies de begomovírus (totalizando 3.583 sequência de isolados distintos) a partir do banco de dados online GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) utilizando a ferramenta Taxonomy Browser. As espécies foram demarcadas como estabelecido pelo grupo de estudos da família *Geminiviridae* do Comitê Internacional de taxonomia de Vírus (ICTV) (BROWN et al., 2015). A partir das sequências completas obtidas do Genbank, foram extraídas as sequências codificadoras da proteína Rep utilizando-se o ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>). As sequências foram alinhadas com auxílio do software MEGAX (KUMAR et al. 2018) utilizando-se o módulo MUSCLE (EDGAR, 2004).

Os alinhamentos múltiplos de sequências codificadoras foram submetidos à Análise Discriminante de Componentes Principais (do inglês *Discriminant Analysis Principal Components*, DAPC), utilizando-se o pacote Adegenet do software R Project (JOMBART, 2008). Foi feita a subdivisão da população em 2 e 7 grupos, sendo, respectivamente k=2 e k=7. As subpopulações foram identificadas de acordo com a região geográfica de origem dos isolados virais.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Para a divisão em dois grupos, k=2, a metapopulação de begomovírus foi dividida entre begomovírus do “Novo Mundo” (Americas) e “Velho Mundo” (Europa, Ásia, África e Oceania), em conformidade com os resultados obtidos por Prasanna *et al.* (2010).



**Figura 1.** Metapopulação de begomovírus subdividida pela DAPC com k=7. À direita, subpopulações 4 e 7 originadas do “Novo Mundo”. À esquerda, subpopulações 1, 2, 3, 5 e 6 originadas do “Velho Mundo”.

Quando a metapopulação global foi subdividida em 7 grupos, ou seja k=7, a subpopulação 1 foi composta por 227 isolados pertencentes à espécie *African cassava mosaic virus* (ACMV). Os países de origem são todos do continente Africano, em sua maioria Madagascar e República Central Africana, pertencentes ao “Velho Mundo”. No trabalho de Prasanna *et al.* (2010), a subpopulação denominada *African-Mediterranean begomoviruses* (Af-Med) abrigava os vírus desta espécie, dentre outras. No presente trabalho, a subpopulação composta, exclusivamente, por isolados da espécie ACMV.

A subpopulação 2 foi compreendida principalmente por isolados das espécies *East African cassava mosaic virus* (EACMV), *East African cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV) e *East African cassava mosaic Malawi virus* (EACMMV), totalizando 135 isolados. Os países de origem são todos do continente africano, pertencentes também ao “Velho Mundo”. O resultado obtido é semelhante ao de Prasanna *et al.* (2010), no qual houve a divisão do EACMV em uma subpopulação específica, denominada *East African Cassava Mosaic Viruses* (eAf-CAS).

A subpopulação 3 apresentou maior número de isolados dentre todas, totalizando 1.318 dos 3.583 analisados neste estudo. Os países de origem foram principalmente do Sudeste Asiático, Extremo Oriente e Ásia Meridional, não deixando de mencionar, em menor expressão, países da África e Oriente Médio. Os países com maior número de isolados foram a Índia, com 329 isolados, a China, com 209 isolados e o Paquistão, com 154 isolados.

Com base nos resultados obtidos foi ainda possível comparar as subpopulações determinadas por Prasanna *et al.* (2010) *Indo-Pak cotton-South Indian tomato begomoviruses* (IPC-SIT), na qual ele agrupa vírus que infectam algodão e tomate; dos vírus de Nova Deli que infectam tomate, denominada *New Delhi tomato-Asian cucurbit Begomoviruses* (NDT-ACU); e dos vírus que infectam batata doce e plantas do gêneto *Dolichos* denominada *Swepoviruses-Asian legumoviruses* (S-AL). No presente trabalho, três subpopulações do autor mencionado foram agrupadas em apenas uma.

A subpopulação 4, com 317 sequências, abrigou isolados principalmente das espécies *Euphorbia yellow mosaic virus*, *Euphorbia mosaic virus*, *Pepper golden mosaic virus* e *T*o*mato common mosaic virus*. Estes isolados foram encontrados no Brasil, Costa Rica, Cuba, Guatemala, Estados Unidos, Jamaica, México, Peru, Uruguai e Venezuela, todos pertencentes às Américas, podendo atribuir à subpopulação do Novo Mundo.

A subpopulação 5, com 236 sequências, é representada por isolados da espécie *East African cassava mosaic Kenya virus* e *South African cassava mosaic virus*. Todos os isolados são originados da África do Sul, Comoros, Madagascar, Mayotte, Quênia e Zimbábue, do sudeste ou oriente do continente africano.

A subpopulação 6, com 662 isolados, é representada pelos vírus da espécie *Tomato yellow leaf curl virus*, originados da Austrália, China, Coréia do Sul, Estados Unidos, alguns países da América Central, México, Irã e Jordânia, É possível aferir que a subpopulação seja majoritariamente referente ao oeste da Ásia, do Velho Mundo (com exceção dos isolados obtidos nos Estados Unidos).

A subpopulação 7, com 687 isolados, compreendeu diversas espécies de vírus oriundas de países da América, em sua maioria da América Latina, podendo ser classificada como a subpopulação desta região. No trabalho de Prasanna *et al.* (2010), houve o agrupamento de todos os vírus do Novo Mundo em uma só subpopulação, ao contrário do presente trabalho que subdividiu o grupo em duas subpopulações.

**CONCLUSÕES**

As subpopulações determinadas foram compreendidas por vírus das espécies ACMV; EACMV; vírus que infectam Solanáceas, Malváceas e swepovírus; vírus do Novo Mundo que infectam *Euphorbia*, pimenta e tomate; SACMV e EACMKV; TYLCV; vírus da América Latina. Nesse contexto, pode-se perceber diferenças marcantes entre os resultados obtidos neste estudo e aqueles relatados por Prasanna *et al.* (2010).

**AGRADECIMENTOS**

Ao Programa Educacional Tutorial do Curso de Agronomia da UFU, ao Ministério da Educação (MEC) e ao Programa de Estudos Avançados em Virologia (PROVIRUS) por todo o apoio prestado à execução deste trabalho.

**REFERÊNCIAS**

CASTILLO, A. G. et al. Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (Ren) and viral replication protein (Rep). Virology, [s.l.], v. 312, n. 2, p.381-394, ago. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/s0042-6822(03)00234-4>.

EDGAR, R. C.. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 32, n. 5, p.1792-1797, 8 mar. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh340>.

FAUQUET, C. M. et al. Virology division news: Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. **Archives Of Virology**, [s.l.], v. 148, n. 2, p.405-421, 1 jan. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-002-0957-5>.

JOMBART, T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics, v. 24, n. 11, p. 1403-1405, 2008.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K.. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology And Evolution**, [s.l.], v. 33, n. 7, p.1870-1874, 22 mar. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

LIMA, A. T. M. et al. The diversification of begomovirus populations is predominantly driven by mutational dynamics. **Virus Evolution**, [s.l.], v. 3, n. 1, jan. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ve/vex005>.

PRASANNA, H. C. et al. The population genomics of begomoviruses: global scale population structure and gene flow. **Virology Journal**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.7-220, 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422x-7-220>.

ROMBEL, I. T. et al. ORF-FINDER: a vector for high-throughput gene identification. Gene, v. 282, n. 1, p. 33-41, 2002.

ZERBINI, F. M. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. **Journal Of General Virology**, [s.l.], v. 98, n. 2, p.131-133, 1 fev. 2017. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.000738>.