



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA**

CARLOS HENRIQUE MACHADO DIAS DE BRITO

**RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO
OBRIGATÓRIO: ESTUDO DA DIVERSIDADE BEGOMOVIRAL EM
LEGUMINOSAS ORIUNDAS DA REGIÃO NORTE E NORDESTE DO
BRASIL
BACHARELADO EM AGRONOMIA**



**RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES DO ESTÁGIO
SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO: ESTUDO DA
DIVERSIDADE BEGOMOVIRAL EM LEGUMINOSAS ORIUNDAS
DA REGIÃO NORTE E NORDESTE DO BRASIL.**

BACHARELADO EM AGRONOMIA

Relatório de Estágio
Supervisionado Obrigatório
apresentado à Universidade
Federal Rural de
Pernambuco como parte das
exigências para obtenção do
título de Bacharel em
Agronomia.

Orientador: Prof^a. Dr^a.
Rosana Blawid



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PROGRAMAS ESPECIAIS

1. IDENTIFICAÇÃO

ALUNO (A): Carlos Henrique Machado Dias de Brito

CURSO: Agronomia

PROGRAMA: (X) PIBIC

ORIENTADOR (A): Profa. Rosana Blawid, Ph.D.

DEPARTAMENTO/UNIDADE ACADÊMICA: Departamento de Agronomia /UFRPE-

SEDE RELATÓRIO: (X) FINAL

2. TÍTULO DO PROJETO:

**ESTUDO DA DIVERSIDADE BEGOMOVIRAL EM LEGUMINOSAS ORIUNDAS DA
REGIÃO NORTE E NORDESTE DO BRASIL**

3. RESUMO DO RELATÓRIO

O feijão (*Phaseolus sp.*) é uma cultura de grande importância socioeconômica em todo o Brasil e é cultivada tanto por grandes como pequenos agricultores. A cultura tem sido amplamente estudada no intuito de obter variedades geneticamente melhoradas para caracteres de produtividade e resistência ou tolerância a doenças. Dentre as principais doenças que acometem a cultura do feijão no Brasil estão as causadas por vírus. Os vírus relatados infectando a cultura do feijão no Brasil correspondem aos gêneros *Begomovirus*, *Potyvirus*, *Comovirus*, *Carlavirus* e *Sobemovirus*. Dentre os vírus pertencentes aos gêneros estudados, os begomovírus são considerados os mais importantes pois podem causar perdas de até 100% da produção na cultura do feijão. Além disso, os begomovírus infectam uma ampla gama de hospedeiros, incluindo as plantas forrageiras e daninhas, que podem servir como fonte de inóculo viral. Este projeto teve como objetivo o estudo da diversidade de begomovírus em leguminosas de importância socioeconômica, especialmente nas culturas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), caupi (*Vigna unguiculata*) e feijão-fava (*Phaseolus lunatus*), encontradas nas regiões Norte e Nordeste

brasileiro. Portanto, este projeto visou contribuir com a agricultura Brasileira da região Nordeste e Norte através da diagnose, estudos moleculares e epidemiológicos de begomoviroses na cultura do feijão. Para tanto, duas instituições nacionais (UFRPE, UFPE) e uma instituição internacional (DSMZ, Coleção Alemã de Microorganismos e Culturas de Células, Alemanha) trabalharam em conjunto no estudo da diversidade begomoviral em leguminosas de importância socioeconômica visando no futuro estabelecer medidas eficazes de manejo e controle de doenças virais.

4. INTRODUÇÃO GERAL:

4.1 Aspectos Gerais da Cultura do feijão:

Pertencente à família das Fabáceas, o feijoeiro(2n) é uma planta anual herbácea conhecida por suas vagens verdes e grãos secos. De provável origem Mesoamericana, acredita-se que há cerca de mais de 100.000 anos um ancestral comum divergiu geneticamente em duas variações distintas, a mesoamericana e a andina, que foram domesticadas separadamente (BITOCCHI *et al.*, 2013). Achados arqueológicos indicam que o feijão foi domesticado na América do Sul e enviado para a América do Norte (FREITAS, 2006), e que sua chegada na Europa ocorreu nos séculos XVI e XVII, desde o início das expedições de Colombo (GEPTS e BLISS, 1988). É considerada a leguminosa mais importante no mundo para o consumo humano direto (MAPA, 2020). A cultura tem como os maiores produtores do mundo a Índia, Mianmar, Brasil e China, responsáveis por 60% da produção mundial do grão (FAO, 2020). Ao mesmo tempo, os maiores importadores de feijão são Índia, Quênia e Brasil (FAO, 2020).

Dentre as espécies de feijoeiro, a mais cultivada é a do gênero *Phaseolus* sendo o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) correspondente a cerca de 80% do feijão consumido no mundo. O feijão comum é reconhecidamente uma fonte importante de proteínas (20 a 33%) e carboidratos (cerca de 340 cal/100g) de baixo custo, além de servir como fonte importante de ferro, fibras e vitaminas (CÂMARA *et al.*, 2013; PETRY *et al.*, 2015), sendo um constituinte primordial na dieta alimentar de diversos países do continente Africano e América Latina (PETRY *et al.*, 2015). Portanto, a cultura do feijão é um alimento básico e essencial na alimentação brasileira, sendo a principal fonte de proteína vegetal para inúmeras famílias (FAO, 2007). O Brasil destaca-se como o maior produtor e consumidor de *P. vulgaris* L. do mundo (VIEIRA *et al.*, 2006), com uma produção total de 3,1 milhões de toneladas na safra de 2021, dentre os quais 1,9 milhões de toneladas de feijão comum, 500 mil toneladas de feijão preto e 686 mil toneladas de Caupi (*Vigna unguiculata* L.) (CONAB, 2020). O estado de Minas Gerais foi o maior produtor de feijão comum cores (feijão-carioca), com

produção de 536 mil toneladas de acordo com dados da safra de 2019/2020 (CONAB, 2020). Segundo dados da safra de 2019/20, estimada em agosto de 2020, dentre os estados nordestinos produtores de feijão comum cores, ocupam a primeira posição a Bahia com 231,9 mil toneladas, seguidos por Pernambuco, com 62,4 mil toneladas, e Paraíba com 10,8 mil toneladas (CONAB, 2020). A região Nordeste embora seja a que possui a segunda maior área cultivada de feijão comum cores, ficando apenas atrás da região Sudeste, é ao mesmo tempo a de menor produtividade (CONAB, 2020).

A produção de *P. vulgaris* L. no Nordeste é em sua maioria via a agricultura familiar onde o produtor é geralmente descapitalizado e carente de assistência técnica especializada para o manejo da cultura e controle de pragas e doenças de maneira eficiente (VIEIRA *et al.*, 2006). No estado de Pernambuco é amplamente usado as cultivares BR IPA 10 para o grupo comercial preto, BRS Marfim para o grupo comercial mulatinho, IPA 11- Brígida e Princesa para o grupo comercial carioca (RIBEIRO e DEL PELOSO, 2009). O Estado concentra o polo produtivo do feijão na região Agreste, em especial nos municípios de Angelim, Calçado, Canhotinho, Jucati, Jupi, Jurema, Garanhuns, Lajedo, São João, Ibirajuba e São Bento do Una (MELO e SOUSA, 2018). A produção do feijoeiro constitui fonte de renda para a população de vários municípios do estado de Pernambuco, reafirmando sua importância socioeconômica. Portanto, este projeto visa identificar os principais agentes fitopatológicos de origem viral em leguminosas de importância socioeconômica visando contribuir para o desenvolvimento de técnicas de diagnose e manejo e controle de doenças virais.

4.3 Principais Vírus que infectam a cultura do feijão

As principais espécies virais relatadas em *Phaseolus* sp. no Brasil são: o *Bean common mosaic virus* (BCMV, família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*), *Bean golden mosaic virus* (BGMV, família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*), *Bean rugose mosaic virus* (BRMV, família *Secoviridae*, gênero *Comovirus*), *Cowpea mild mottle virus* (CpMMV, família *Betaflexiviridae*, gênero *Carlavirus*) e *Southern bean mosaic virus* (SBMV, Família *Solemoviridae*, gênero *Sobemovirus*) (ALVES-FREITAS *et al.*, 2019; GARCÉS FIALLOS, 2010; SOBRINHO *et al.*, 2014). Outras espécies de begomovírus reportados que infectam tanto o feijão comum quanto leguminosas não cultivadas em forma natural são *Macroptilium yellow spot virus* (MaYSV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (SOBRINHO *et al.*, 2014). Além disso, segundo trabalhos recentes, foram detectadas

as espécies *Phaseolus vulgaris alphaendornavirus 1*, e *Phaseolus vulgaris alphaendornavirus 2*, ambos da família *Endornaviridae*, gênero *Alphaendornavirus* (ALVES-FREITAS *et al.*, 2019).

Dentre as espécies citadas, o BGMV é considerado como o mais importante fitopatógeno que infecta o feijão (*Phaseolus sp.*) (COSTA, 1976; FARIA; MAXWELL, 1999; GILBERTSON, 1991), podendo causar perdas de 40 a 100 % (MORALES, 2006). No Nordeste do Brasil, especificamente no estado de Alagoas, mais de seis espécies de begomovírus foram detectados em *P. lunatus* e *P. vulgaris* por pirosequenciamento, onde, o vírus do mosaico dourado do feijão (BGMV) foi o mais prevalente (90% de incidência) (WYANT *et al.*, 2012). O BGMV pode variar geneticamente dependente de vários eventos de recombinação, do tipo de hospedeiro e da sua distribuição geográfica. (SOBRINHO *et al.*, 2014). Em 2005, o BGMV foi o vírus predominante em *P. lunatus* no Nordeste do Brasil, entretanto, em 2011, o begomovírus MaYSV também foi notificado pelo aumento de sua importância, encontrado infectando diversos tipos de leguminosas no estado do Alagoas (SOBRINHO *et al.*, 2014).

4.4 O gênero *Begomovirus*

Os begomovírus pertencem à família *Geminiviridae*, uma das maiores famílias virais e que compreende mais de 520 espécies distribuídas em quatorze gêneros (*Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Citlodavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Maldovirus*, *Mastrevirus*, *Mulcrilevirus*, *Opunvirus*, *Topilevirus*, *Topocuvirus*, *Turncurtovirus*) (ICTV, 2022).

Os begomovírus são transmitidos pelo inseto vetor *Bemisia tabaci* (ADAMS; ANTONIW; BEAUDOIN, 2005; ISLAM *et al.*, 2018; SURUTHI *et al.*, 2018). A transmissão é em sua maioria, de modo circulativo não-propagativo, e inicia quando o inseto se alimenta de uma planta infectada. O vírus é transportado pelo intestino médio e a partir deste chega à hemolinfa, até infectar as glândulas salivares primárias, onde são secretados na saliva (COLVIN *et al.*, 2006; CZOSNEK *et al.*, 2017). A proteína do capsídeo (CP), no processo de transmissão é um fator fundamental e determinante na circulação do vírus no corpo do inseto (CZOSNEK *et al.*, 2017). O capsídeo viral é geminado podendo o genoma ser monopartido (uma única molécula de DNA, DNA-A) ou bipartido (duas moléculas, DNA-A e DNA-B). O genoma de DNA viral é circular de fita simples (ssDNA) de aproximadamente 2500-3000 nucleotídeos (nt) (BROWN *et al.*, 2015; ROJAS 1993; SURUTHI *et al.*, 2018). O DNA-A no sentido viral possui a ORF (*Open Reading Frame*) AV1/V1, que codifica para a proteína do capsídeo (CP) viral (CANTÚ-IRIS *et al.*, 2019; GARDINER *et al.*, 1988), e a AV2/V2, que é envolvida no movimento viral nos isolados de Velho Mundo. No sentido

complementar existem quatro ORFs. A AC1/C1 codifica a Rep, proteína iniciadora da replicação viral que não possui similaridade com nenhuma outra polimerase conhecida, mas possui similaridade com iniciadores de proteína de replicação de plasmídeos bacteriais que tem sua replicação realizada via círculo rolante (KOONIN; ILYINA, 1992; PEI *et al.*, 2020). A ORF AC2/C2 codifica a proteína TrAP, que é ativadora da transcrição de genes tardios que são necessários para a encapsidação viral (ROSHAN *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2003). Já foi observado que a proteína TrAP possui a atividade de suprimir gene de silenciamento transcricional (TGS) e/ou gene de silenciamento pós-transcricional (PTGS) (DONG *et al.*, 2003; BUCHMANN *et al.*, 2009; HANLEY-BOWDOIN *et al.*, 2013) (KUMAR *et al.*, 2015). A AC3/C3 codifica a proteína REn, que é uma proteína que potencializa a expressão viral (CASTILLO *et al.*, 2003; KAMAL *et al.*, 2019). Essa proteína interage com a proteína Rep além de homo-oligomerizar e interagir com ao menos duas proteínas do hospedeiro, a “proliferating cell nuclear antigen” (PCNA) que é um DNA-clamp (complexo de proteínas com fator promotor na replicação de DNA e que tem a função de se ligar à DNA polimerase e prevenir que a mesma se desassocie da fita molde de DNA) e a “retinoblastoma-related protein” (pRBR), que tem a importante função em plantas de regular o processo de progressão do ciclo celular e transcrição pela via de modificação de cromatinas e consequentemente no processo de diferenciação celular (SETTLAGE *et al.*, 1996; CASTILLO *et al.*, 2003; VUOSKU *et al.*, 2015). A AC4/C4 é responsável pela severidade de sintomas em begomovírus monopartidos e no movimento viral (CARLUCCIO *et al.*, 2018; FONDONG, 2019; JUPIN *et al.*, 1994), além de atuar na supressão da maquinaria de silenciamento gênico do hospedeiro (ZHAI *et al.*, 2022). Adicionado à essas características, a AC4/C4 é também responsável pela sinalização de brassinoesteroides (KIM, E.J, RUSSINOVA, E, 2020), que é um esteroide vegetal envolvido na adaptação da planta ao estresse causado por condições climáticas adversas, alongamento das células e consequentemente crescimento da planta, além de resistência à patógenos, e está envolvida na regulação do mecanismo CLAVATA “CLAVATA pathway”. A proteína CLAVATA, expressa no meristema apical, traduz a percepção de um sinal celular peptídico não autônomo CLAVATA3 num destino alterado das células tronco. A CLAVATA participa da otimização do processo de diferenciação das células troncos por meio da inibição de WUSCHEL(WUS) e FANTASTIC FOUR2(FAF2) que são responsáveis pela manutenção da não-diferenciação das células tronco (ISMAYIL *et al.*, 2018; LAI *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2018; MEI *et al.*, 2018; CHOU *et al.*, 2016). A presença da AC4/C4 não é necessária para que ocorra infecção de begomovírus bipartidos (MAR *et al.*, 2017).

O DNA-B possui duas ORFs, uma no sentido viral, a BV1, que codifica a proteína NSP (*Nuclear Shuttle Protein*) e atua no transporte do DNA viral do núcleo para o citoplasma da célula (BORNANCINI *et al.*, 2020; NOUEIRY; LUCAS; GILBERTSON, 1994), e outra no sentido complementar, a BC1, que codifica para a proteína de movimento (MP) (ETESSAMI *et al.*, 1988; SOHRAB; HAQ, 2020). Os componentes DNA-A e DNA-B possuem uma região comum (RC) altamente conservada e não codante de aproximadamente 200 nt com alta identidade de sequência nucleotídica (entre 80-100%) entre membros da mesma espécie (FIALLO-OLIVÉ; NAVAS-CASTILLO, 2020; HARRISON, 1985), que separam as unidades de transcrição bidirecional nos componentes A e B. Esta região contém nove nucleotídeos, TAATATT|AC, altamente conservados que formam uma estrutura secundária (*stem loop-structured nonanucleotide*), e que são responsáveis pelo reconhecimento da proteína Rep e do sítio de início da replicação via círculo rolante (RCR). A RC também contém elementos *cis* (iterons, CA, TATA e G-box) envolvidos nos processos de replicação e transcrição viral (BRIDDON *et al.*, 2010; BROWN *et al.*, 2015; EAGLE; HANLEY-BOWDOIN, 1997; EAGLE; OROZCO; HANLEY-BOWDOIN, 1994; QADIR *et al.*, 2019).

Segundo análises filogenéticas, os begomovírus são divididos em begomovírus do “Velho Mundo” (Europa, Ásia e África), que são em sua maioria monopartidos e são geralmente acompanhados de DNA satélites (alphasatélites, betasatélites e deltasatélites) e os begomovírus do “Novo Mundo” (Américas), que apresentam maior frequência de genomas bipartidos (BRIDDON *et al.*, 2010). A relativamente alta variabilidade genética dos begomovírus é devido à alta taxa de recombinação, mutação e pseudorecombinação (troca de segmentos virais inteiros) (DUFFY; HOLMES, 2009; SILVA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2020; SOBRINHO *et al.*, 2014). No Brasil existem relatos de begomovírus compostos pelos mais diversos tipos de recombinantes como, por exemplo, os begomovírus monopartidos encontrados em batata doce, entre outros (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012; BORNANCINI *et al.*, 2020; BROWN *et al.*, 2015; FARIA; MAXWELL, 1999; LIMA *et al.*, 2017; QUADROS *et al.*, 2019).

A replicação do begomovírus inicia-se com o processo de desencapsidação no citoplasma do hospedeiro, seguida da migração da fita simples de DNA (ssDNA) em direção ao núcleo ligado ao CP (complexo CP-ssDNA), onde ocorre a replicação viral com o auxílio da polimerase do hospedeiro (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012). A replicação ocorre por duas vias: replicação por círculo rolante (*Rolling Circle Replication* – RCR), e a replicação dependente de recombinação (*Recombination-Dependent Replication* - RDR). Na RCR, a proteína Rep se liga e cliva uma das fitas

de DNA, no sítio de replicação viral (TAATATT↓AC), que se encontra em uma estrutura em forma de grampo “hairpin” dentro da região intergênica. A “forma replicativa” (RF) serve como molde para sucessivas sínteses de ssDNA (YADAVA; SUYAL; MUKHERJEE, 2010). A RDR ocorre através de uma interação de uma molécula de ssDNA incompleta com um DNA circular covalentemente fechado (*covalently closed circular* - cccDNA), dentro de um sítio de recombinação homólogo. O cccDNA atua como molde e base para a síntese de ssDNA completo. Esta fita servirá como molde para a síntese da fita complementar.

Os sintomas causados por begomovírus variam de acordo com a espécie do vírus, isolado, estado fisiológico da planta e condições ambientais (MACEDO *et al.*, 2015) podendo resultar em folhas com mosaico amarelo forte, amarelecimento nerval ou interneval, encarquilhamento, redução do tamanho foliar, enrugamento, nanismo, e flores com abscisão floral (CHAUHAN *et al.*, 2018; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016; MACEDO *et al.*, 2020; MUBIN *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2018). Os sintomas ocasionados por begomovírus monopartidos incluem deformação foliar, encrespamento e clorose internerval difusa (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012; FIALLO-OLIVÉ; NAVAS-CASTILLO, 2020).

5. OBJETIVOS:

5.1 Geral:

O objetivo geral deste projeto consiste no estudo da diversidade de begomovírus em leguminosas, especialmente as do gênero *Phaseolus* sp. oriundas de campos de plantações das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Este trabalho consiste na caracterização molecular de novos vírus encontrados em sequenciamento de alto desempenho (HTS) e/ou por Sanger em plantações de feijão e leguminosas. Portanto, este projeto tem como alvo o estudo da biodiversidade viral e da caracterização genética dos vírus que infectam o feijão, e contribuirá no futuro para estabelecer medidas de manejo e controle das doenças virais que acometem a cultura do feijão.

5.2 Específicos:

- Determinar as sequências completas dos principais genomas virais associados a doenças no feijão através do sequenciamento de última geração (NGS) e sequenciamento Sanger.

Este projeto faz parte da rede de cooperação entre o DSMZ (Coleção Alemã de Microorganismos e Cultura de Tecidos, Alemanha) e a Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os resultados de sequenciamento de última geração de apenas uma coleta (2020) de amostra já estão disponíveis.

- Validar os resultados obtidos do NGS por sequenciamento direto de amplicons gerados por PCR

A validação do sequenciamento NGS foi realizada no Laboratório de Fitovirologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) através da técnica de PCR. Portanto, a PCR foi realizada a partir de DNA extraído de feijão com sintomas virais, utilizando primers degenerados e específicos para detecção do begomovírus em estudo.

- Estudar a gama de hospedeiras com as espécies virais encontradas nas amostras

O objetivo desta etapa é conhecer a gama de hospedeiras dos begomovírus de feijão. Esta etapa está em andamento. Moléculas de DNA foram amplificadas pela metodologia de amplificação por círculo rolante e serão inoculadas por biolística em plantas de *Phaseolus vulgaris* (Cultivares Azeitona, Preto 153, Comum, Mulato BR14), *Phaseolus lunatus* (cultivares Fava Itambé, Olho de peixe, Fava IPA-2), *Vigna unguiculata* (cultivares Caupí NC 0434 e Caupí TVU 2331) e *Glycine max* (cultivares Soja BMX dorça e Soja FT 1045), todas pertencentes à família Fabaceae.

6. METODOLOGIA

6.1 Coleta de material

Nesta etapa, folhas secas preservadas a 4°C de *Pueraria phaseoloides* oriundas de coleta realizada no ano de 2020 no município de Sena Madureira, estado do Acre, que apresentavam sintomas de mosaicos severos típicos de begomovírus, foram utilizadas para análise de sequenciamento de última geração (HTS), por PCR e sequenciamento Sanger. O material foliar apresentando sintomas virais foi imediatamente processado e armazenado em um recipiente com sílica gel para evitar a degradação do material genético até chegar ao laboratório de Fitovirologia da UFRPE. As amostras coletadas no ano de 2020 estão catalogadas no laboratório de Fitovirologia da UFRPE, e preservadas em tubos do tipo Falcon contendo cloreto de cálcio e armazenadas em geladeira a 4°C. Estas amostras foram utilizadas para extração de DNA total e sequenciadas pelo Instituto DSMZ, Alemanha.

6.2 Extração de ácido nucléico total

O DNA total foi extraído de acordo com o método do CTAB 2X a partir de folhas secas de plantas de *Pueraria phaseoloides* oriundas do Acre e catalogadas no Laboratório de Fitovirologia da UFRPE, utilizando o seguinte protocolo: cerca de 100 mg de tecido vegetal foi transferido para um saco de plástico estéril e macerado em 2 mL de tampão de extração (100mM Tris pH 8.0; 2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA, 0,2% β -mercaptoethanol). 500 μ L do material macerado foi transferido para

um tubo de 2 mL, e em seguida foi adicionado 50 µL de SDS (20%), e incubado a 65°C por 10 minutos. Foi adicionado 500 µL de solução de fenol clorofórmio (1:1) e misturado por inversão. Posteriormente, o material foi centrifugado em centrífuga refrigerada a 4°C e velocidade de 13.000 rpm por 10 minutos. 400µL do sobrenadante foram cuidadosamente retirados e transferidos para um tubo eppendorf estéril de 1,5mL. Um total de 160 µL de acetato de potássio 5M (KoAc) gelado foram adicionados a solução, misturado e incubado em gelo por 20 min. Logo em seguida a solução foi centrifugada por 10 min a 13.000 rpm. O sobrenadante (~300 µL) foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 1 volume de isopropanol (300µL), incubado a -20°C por 30 min, e posteriormente centrifugado por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 500 µL de EtOH 75%, centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos, descartado e secado por aproximadamente 15 min a temperatura ambiente. O material genético foi ressuscitado em 50 µL de H₂O livre de RNase e DNase. Para amplificação de moléculas de DNA de fita simples virais (ssDNA), a técnica de amplificação por círculo rolante (RCA) foi realizada segundo o método descrito por Inoue-Nagata et al. (2004). O material amplificado será utilizado para a inoculação por biolística em diferentes espécies de plantas.

6.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR foi realizada para detectar a presença de begomovírus. Foram desenhados pares de primers específicos com o software Geneious R11 baseados nos resultados do HTS, e, com intuito de detectar as diferentes moléculas de DNA viral comparados às sequências da base de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Os primers específicos foram desenhados a partir do software Geneious R11 usando também sequências de genomas completos de Bean bushy stunt virus (BeBSV) depositados no GenBank (NCBI). Os primers desenhados para a amplificação total das moléculas foram: BeBSV-A-HindIII-F(CCAAGCTTTCATCTCATCGGGC) e BeBSV-A-HindIII-R (TGAAAGCTTGGGTGGAGGATTA) para o DNA-A e BeBSV-B-HindIII-F (AAGAAGCTTGTAAGGATTCAGAG) e BeBSV-B-HindIII-R (TACAAGCTTCTTGGACCTTCC) para o DNA-B.

Esses primers foram utilizados na reação de PCR tendo como molde o produto de RCA feito a partir de DNA extraído da *Pueraria. sp* e seguindo o seguinte protocolo: para uma reação de 25µL, foi usado 1 µL de produto de RCA purificado com kit Wizard® da Promega, 0,5 µL de dNTP 10 mM, 0,1 µL de Taq DNA polimerase (Platinum™, ThermoScientific), 17,15 µL de H₂O livre de DNase e

RNase, 1,5 µL (10 mM) do primer BeBSV-A-HindIII-F(CCAAGCTTTCATCTCATCGGGC) e 1,5 µL (10 mM) do primer BeBSV-A-HindIII-R (TGAAAGCTTGGGTGGAGGATTA) para amplificar o DNA A e 1,5 µL (10 mM) do primer BeBSV-B-HindIII-F (AAGAAGCTTGTAAGGATTCAGAG) e 1,5 µL (10 mM) do primer BeBSV-B-HindIII-R (TACAAGCTTCTTGGACCTTCC) para amplificar o DNA B.

Os parâmetros do termociclador foram como seguidos: denaturação de DNA, 3 min a 95°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, anelamento dos primers, 1 min a 53°C, e extensão, 3 min a 72°C com uma extensão final a 72°C por 10 minutos

6.4 Purificação de produto de PCR e sequenciamento Sanger

Os amplicons gerados por PCR de DNA-A e DNA-B utilizando os primers específicos desenhados para o BeBSV foram purificados utilizando o kit de purificação Ludwig® (<https://ludwigbiotec.com.br/loja/categoria/kits-purificacao-e-extracao/3/1>) e extraídos do gel de agarose conforme recomendação do provedor, sendo a seguinte para o produto amplificado por PCR do DNA-A e DNA-B:

Para o DNA-A foram realizadas três reações de 25 µL cada, foi colocado em eletroforese em um gel de agarose (0.8%w/v) de 25 mL corado com 1,5 µL de *SYBR® safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, USA). Foi utilizado um total de 65 µL do produto da PCR e 15 µL de *loading dye* (tampão de corrida) colocado 40µL em cada poço do gel. Seguindo o protocolo determinado pelo kit, foi cortado do gel de agarose as bandas que se desejava purificar. O material cortado com bisturi estéril foi transferido para um tubo estéril de 2 mL e posteriormente pesado (peso de 0,2g). Os seguintes passos foram realizados: primeiramente foram adicionados 600 µL do solução DD (3 volumes solução: 1 de gel) em um tubo eppendorf e incubados em banho maria a 60° C por 10 minutos. O conteúdo foi misturado por inversão a cada 3 minutos. Em seguida, a solução de agarose dissolvida foi transferida para uma coluna EC, e centrifugada por 1 min. a 13.000 rpm. Esta etapa foi repetida e o conteúdo foi centrifugado mais uma vez por 1 min. a 13.000 rpm. O conteúdo foi descartado e adicionou-se 600 µL da solução de lavagem (DNA *Wash Buffer*, WB) na coluna, que foi centrifugada por 1 min. a 13.000 rpm. O conteúdo foi descartado e o processo repetido. A coluna foi centrifugada por 2 min a 13.000 rpm para retirada de todo o resíduo na coluna. Por último, o DNA foi eluído com 35 µL de solução (EB) a 65°C. O DNA foi visualizado em gel de eletroforese (0.8% w/v) corado com 1 µL de *SYBR® safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, USA).

Para o DNA-B foram realizadas três reações de amplificação (25µL cada). Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose (0.8% w/v) (resultado, **Figura 5**) utilizando-se um total de 65 µL do produto da PCR e 15 µL de tampão de corrida. Cerca de 40 µL foram transferidos para cada poço do gel de agarose (resultado, **Figura 5**), e em seguida, o material contendo DNA viral foi cortado com bisturi estéril do gel de agarose e transferido para um tubo estéril de 2 mL e posteriormente pesado (peso de 0,13 g). A purificação foi realizada como descrito acima para o DNA A.

O DNA foi sequenciado de acordo as exigências do laboratório de Bioinformática e Genética Evolutiva do Departamento de Genética da UFPE. Foram fornecidos 10 µL do produto de PCR purificado e aliquotados em tubo de 0,2 mL com concentrações entre 5 e 20 ng/µL. Além disso, 10 µL de cada primer foram fornecidos para o sequenciamento na concentração de 5 pmol/µL.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

7.1 **Resultado da coleta de material:** No final do ano de 2020, folhas de plantas de *Pueraria phaseoloides* apresentando sintomas de mosaico severo foram coletadas no município de Sena Madureira, estado do Acre. As folhas foram secas em cloreto de cálcio, catalogadas e armazenadas a 4°C para futuro processamento (**Figura 1**).



Fig.1: Folhas secas em sílica gel e devidamente armazenadas em tubo *Falcon* contendo cloreto de cálcio e armazenadas a temperatura de 4°C.

7.2 Resultados da extração de ácido nucléico total:

A extração de ácido nucléico total seguiu o protocolo CTAB 2X descrito nos materiais e métodos do presente relatório. A integridade do material genético foi verificada por eletroforese em gel de agarose na concentração de 0,8% e corado com 1 μ L de *SYBR® safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, USA) para 20 mL de gel de agarose (**Figura 2**).

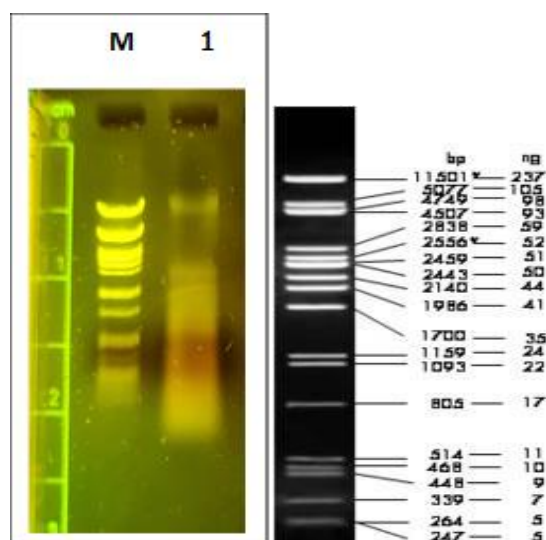


Fig.2: Resultado da extração total de ácido nucleico vista por eletroforese em gel de agarose (0,8%), onde podemos verificar a integridade do material extraído pela presença de bandas de DNA bem marcadas. No primeiro poço temos o marcador (Lambda DNA digesto com *Pst*I, M), e no segundo poço (1) foram adicionados 5 μ L do DNA extraído e 5 μ L de *loading dye* (tampão de corrida).

7.3 Resultados da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

Os resultados da PCR utilizando os produtos de RCA foram verificados por eletroforese em gel de agarose (0,8%). Os fragmentos amplificados, com os tamanhos de ~2500pb para DNA-A e ~2500pb para DNA-B, indicam a presença das moléculas de DNA-A e DNA-B de begomovírus em amostras de *Pueraria.phaseoloide* (**Figura 3**).

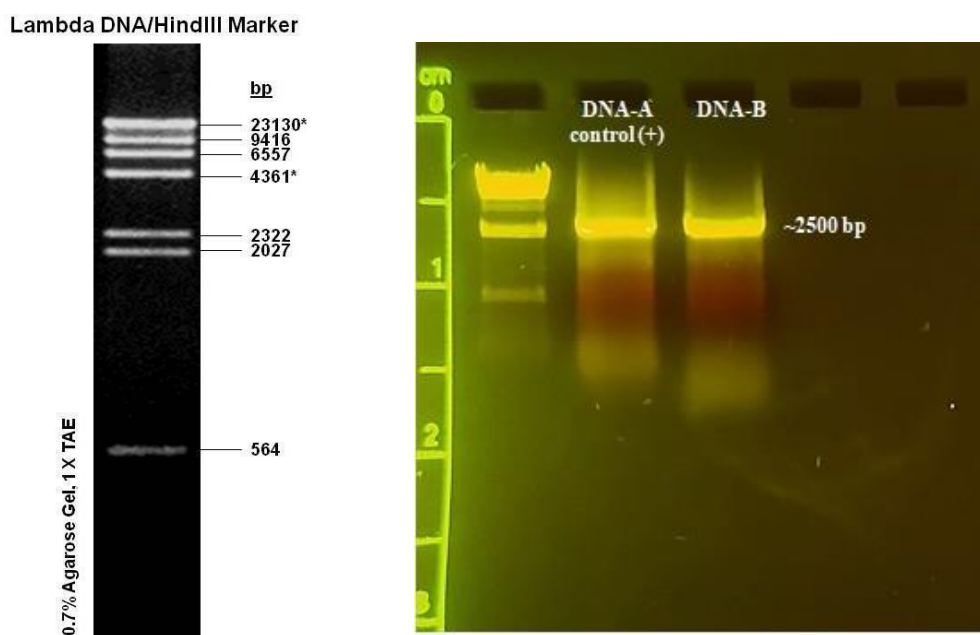


Fig 3: Eletroforese em gel de agarose (0.8%w/v) corado com 1 μ L SYBR® *safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, USA) em 20 mL de gel de agarose. DNA-A: fragmento amplificado com os primers BeBSV-A-HindIII-F/R (~2500pb); e DNA-B: fragmento amplificado com os primers BeBSV-B-HindIII-F/R (~2500pb) . M: Marcador Lambda DNA digerido com enzima de restrição *HindIII*.

7.4 Resultado da purificação do produto de PCR e sequenciamento Sanger:

O resultado das purificações dos três produtos de PCR (fragmentos de DNA-A e DNA-B utilizando os primers BeBSV-A-HindIII-F/R e BeBSV-B-HindIII-F/R, repesctivamente) está demonstrado na **Figura 4 e Figura 5**.

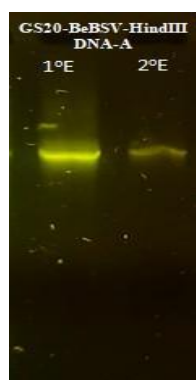


Fig.4: Eletroforese em gel de agarose (0.8% w/v) corado com 1 μ L de SYBR® *safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, USA) para 20 mL de gel. A figura mostra os fragmentos amplificados do DNA-A de BeBSV, primeira (1^{ra}) e a segunda (2^{da}) eluição. O fragmento purificado da primeira eluição foi utilizado para o sequenciamento Sanger.

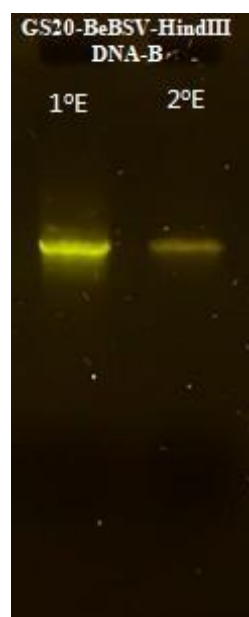


Fig5: Eletroforese em gel de agarose (0.8%w/v) corado com 1 µL de SYBR® *safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, USA) para 20 mL de gel. A figura mostra os fragmentos amplificados do DNA-B de BeBSV, primeira (1ª) e segunda (2ª) eluição. O fragmento purificado da primeira eluição foi utilizado para o sequenciamento Sanger

O resultado do sequenciamento foi visualizado através do Software Geneious R11 (**Figura 6, Figura 8**). A ferramenta Blastn (alinhamento local básico em nível de nucleotídeos, NCBI) foi utilizada contra a base de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os resultados de Blastn utilizando sequências do DNA-A pode ser visualizada na **Figura 7 e Figura 9**.

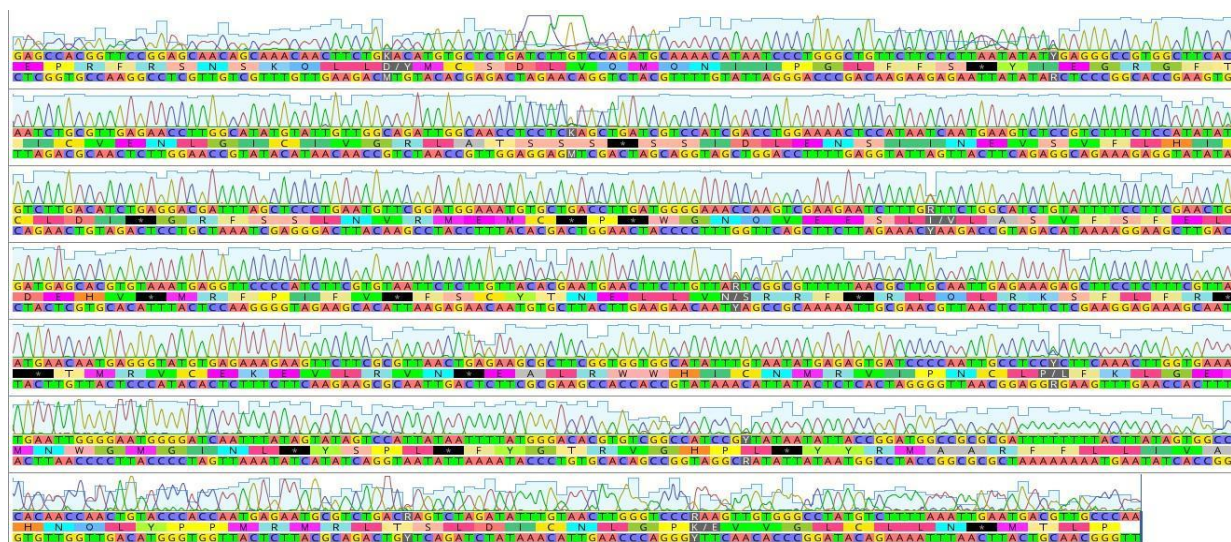


Fig.6: Representação gráfica de cromatograma obtido com o sequenciamento Sanger (GS20 RCA-HindIII-Purif : primer, BeBSV-A-HindIII-F) utilizando o primers no sentido senso (*Forward*).

Bean bushy stunt virus segment A, complete sequence

Sequence ID: [NC_055594.1](#) Length: 2572 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins \(PG\)](#)

Range 1: 1898 to 2572 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1138 bits(616)	0.0	653/675(97%)	0/675(0%)	Plus/Plus
Query 2	AGCCACGGTTCGGAGCAACAGCAAAACAACCTCTGKACATGTGCTCTGATCTTGTCCAGA	61		
Sbjct 1898	AGCCACGGTTCGGAGCAACAGCAAAACAACCTCTGKACATGTGCTCTTATTTTGTCCAGA	1957		
Query 62	TGC AAAACATAAATCCCTGGGCTGTTCTCTCTTAATATATYAGGGGCCGTGGCTTCACAA	121		
Sbjct 1958	TGC AAAACATAATCTCTTGGCTGTTCTCTCTTAATATATTAGGGGCCGTGGCTTCACAA	2017		
Query 122	TCTGGCTTGAGAACCTTGGCATATGTATTGTTGGCAGATTGGCAACCTCCTCAGCTGAT	181		
Sbjct 2018	TCTGGCTTGAGAACCTTGGCATATGTATCGTTGGCAGATTGGCAACCTCCTCAGCTGAA	2077		
Query 182	CGTCCATCGACCTGGAAAACCCATAATCAATGAAGTCTCCGCTTTTCCATATATGTC	241		
Sbjct 2078	CGTCCATCGACCTGGAAAACCCATAATCAATGAAGTCTCCGCTTTTCCATATAGGTC	2137		
Query 242	TTGACATCTGAGGACGATTAGCTCCCTGAATGTTGGATGGAAAATGCTGACCTTGAT	301		
Sbjct 2138	TTGACATCTGAGGACGATTAGCTCCCTGAATGTTGGATGGAAAATGCTGACCTTGAT	2197		
Query 302	GGGGAACCAAGTCSAAGAAATCTTTGRTTCTGGCATCTGTATTTCCCTTCGAACCGATG	361		
Sbjct 2198	GGGGAACCAAGTCSAAGAAATCTTTGATCTGGCATCTGTATTTCCCTTCGAACCGATG	2257		
Query 362	AGCACGTGTAAATGAGGTTCCCCATCTCGTGTAAATCTCTTGTACACGAATGAACCTC	421		
Sbjct 2258	AGCACGTGTAAATGAGGTTCCCCATCTCGTGTAAATCTCTTGTACACGAATGAACCTC	2317		
Query 422	TTGTTARTCGCGGTTTTAAACGCTTGCAATTGAGAAAAGAGCTTCCTCTTTGGTTAATGAA	481		
Sbjct 2318	TTATTAGTCCGCGTTTTAAACGCTTGCAACTGAGAAAAGAGCTTCCTCTTTGGTTAATGAA	2377		
Query 482	CAATGAGGGTATGTGAGAAAAGAAAGTTCTTCGGTTAACTGAGAAAGCCTTCGGTGGTGGC	541		
Sbjct 2378	CAATGAGGGTATGTGAGAAAAGAAAGTTCTTCGGTTAACTGAGAAAGCCTTCGGTGGTGGC	2437		
Query 542	ATATTTGTAAATGAGAGTGATCCCCAATTGCCTCCCTTCAGAACTTGGTGAATGAATT	601		
Sbjct 2438	ATATTTGTAAATGAGAGTGATCCCCAATTGCCTCCCTTCAGAACTTGGTGAATGAATT	2497		
Query 602	GGGGAATGGGATCAATTTATAGTATAGTCCATTATAATTTATGGGACACGTGTGGGCC	661		
Sbjct 2498	GGGGAATGGGATCAATTTATAGTATAGTCCATTATAATTTATGGGACACGTGTGGGCC	2557		
Query 662	ATCCGYTATAATATT	676		
Sbjct 2558	ATCCGCTATAATATT	2572		

Fig.7: Resultado da análise de Blastn. Visualização de alinhamento do segmento sequenciado por Sanger. A sequência estudada demonstrou ser 97% idêntica a sequência do begomovirus bean bushy stunt virus segmento A, código de acesso GenBank (NC_055594).

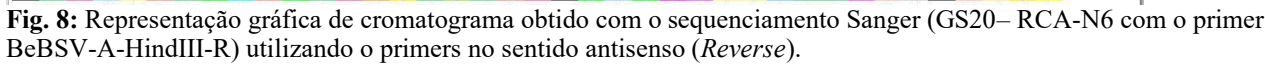


Fig. 8: Representação gráfica de cromatograma obtido com o sequenciamento Sanger (GS20– RCA-N6 com o primer BeBSV-A-HindIII-R) utilizando o primers no sentido antisenso (*Reverse*).

Bean bushy stunt virus segment A, complete sequence

Sequence ID: [NC_055594.1](#) Length: 2572 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins \(PG\)](#)

Range 1: 878 to 1750 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1515 bits (820)	0.0	854/874 (98%)	3/874 (0%)	Plus/Plus
Query 1	TCGGATCTATTTTATGATTCGATCACCATTAAATAATTTTGAATTTATTCATGAT	89		
Sbjct 878	TCGGATCTATTTCTATGATTCGATCACCATTAAATAA- TTTTGAATTTATTCATGAT	936		
Query 61	TCTCAAGTACAAATTT-ACATAAG- TTTGTCTGTTCGAAACTAACAGCTCTATTAAGAT	118		
Sbjct 937	TCTCAAGTACAAAGATTACATAAGTTTGTCTGTTCGAAACTAACAGCTCTGATAAGAT	996		
Query 119	TGTTAATACAAATGAC/CCTAGACGATCTAAATACAAATGACCAATCTTAAATCTAT	178		
Sbjct 997	TGTTAATACAAATAGACCTTAAGCGATCTAAATACAAATGACCAATCTTAAATCTAT	1056		
Query 179	TTAAATATGTGCGCCAGAACTGTCTCAATGTCTCCAGACTTGGAAATTGAPATAAG	238		
Sbjct 1057	TTAAATATGTGCTCCAGAACTGTCTCAATGTCTCCAGACTTGGAAATTGAGATAAG	1116		
Query 239	CCTTGTGGAGGCCAAGCCTTTCCCTCAGGTGTGGTTGAAACCGGATCTGGACCTGGAAAG	298		
Sbjct 1117	CCTTGTGGAGGCCAAGCCTTTCCCTCAGGTGTGGTTGAAACCGGATCTGGACCTGGAAAA	1176		
Query 299	TCCTCGTCTCGTGTATACCTGGTCTCTACGTGGTATATCTGAAATAGAGGGGATTTT	358		
Sbjct 1177	TCCTCGTCTCGTGTATACCTGGTCTCTACGTGGTATATCTGAAATAGAGGGGATTTT	1236		
Query 359	CTATCTCCAGATATATACGCCACTCTCTGCTTGATGCGAGTGTATGGTTCCCGGTGC	418		
Sbjct 1237	CTATCTCCAGATATATACGCCACTCTCTGCTTGATGCGAGTGTATGGTTCCCGGTGC	1296		
Query 419	GTAAATCCATGCTCCAGCAGTTGATGTGACGTAAATAGAGCAGCCACAGGAAAGTCT	478		
Sbjct 1297	GTAAATCCATGCTCACTGCAGTTGATGTGAACTAAATAGAGCAGCCACAGGAAAGTCT	1356		
Query 479	ATCCTTCTACGACGTGTGCTCTCTTTAGCTGCTCTGTGCTGTGCTTTGATAGAGGGG	538		
Sbjct 1357	ATCCTTCTACGACGTGTGCTCTCTTTAGCTGCTCTGTGCTGTGCTTTGATAGAGGGG	1416		
Query 539	GGCGTGGAGGAAGATAAATTTCCGATTATGAAGTGTCCACGATTTGAGAGATGCGTTTTC	598		
Sbjct 1417	GGCGTGGAGGAAGATAAATTTCCGATTATGAAGTGTCCACGATTTGAGAGATGCGTTTTC	1476		
Query 599	CTCTCTCTCAAGGAAATCTTTATAACTGGCCCCCTCTCTCGATTGACAGCAGATGGA	658		
Sbjct 1477	CTCTCTCTCAAGGAAATCTTTATAACTGGCCCCCTCTCTCGATTGACAGCAGATGGA	1536		
Query 659	TGGGATCCCTCCTTTAATTGAACTGGCTTCCGTAATTTGAGATTGATTCGAGTCTCT	718		
Sbjct 1537	TGGGATCCCTCCTTTAATTGAACTGGCTTCCGTAATTTGAGATTGATTCGAGTCTCT	1596		
Query 719	TTGGGCCCCAATCAACTCTTTCCAAATGCTTCAGCTTTAAATATTGGGAGCTGACATGTC	778		
Sbjct 1597	TTGGGCCCCAATCAACTCTTTCCAAATGCTTCAGCTTTAAATATTGGGAGCTGACATGTC	1656		
Query 779	AATGACGTTATACCTCACTGCATTGGAATAGACCTTTGAGTTAAAGTCGAGATGACCACT	838		
Sbjct 1657	AATGACGTTATACCTCACTGCATTGGAATAGACCTTTGAGTTAAAGTCGAGATGACCACT	1716		
Query 839	CAAAATTAATTATGTGGGCTTAAAGCACGTGCCAC	872		
Sbjct 1717	CAAAATTAATTATGTGGGCTTAAAGCACGTGCCAC	1750		

Fig.9: Resultado de análise do Blastn. Visualização de alinhamento do segmento sequenciado por Sanger. A sequência estudada demonstrou ser 98% idêntica a sequência do begomovirus bean bushy stunt virus segmento A, código de acesso GenBank (NC_055594).

Os resultados dos sequenciamentos junto com o do alinhamento local mostram que a sequência estudada demonstrou ser 98% idêntica à sequência de DNA-A do begomovírus bean bushy stunt vírus (NC_055594). Na **Figura 10** observa-se a representação gráfica realizada com o software Geneious. Foram observados seis ORFs, sendo quatro no sentido antiviral e dois no sentido viral. Interessantemente, a ORF que codifica a AV1 (CP) apresenta uma extremidade mais prolongada na região 5' em comparação a sequência depositada no NCBI (NC_055594).

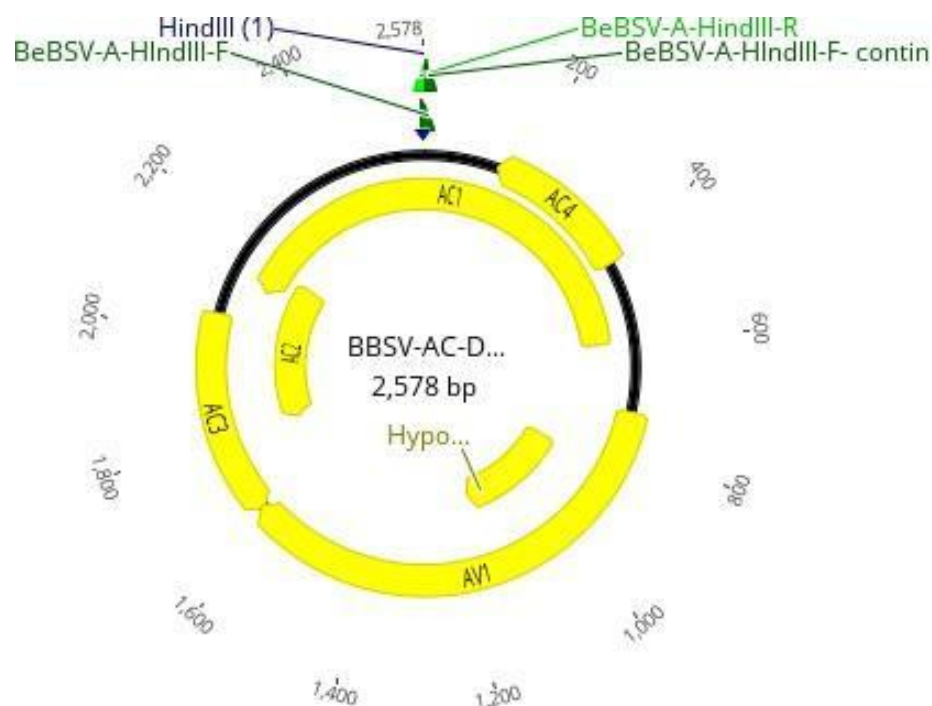


Fig.10: Representação gráfica da molécula do DNA-A de BeBSV, que apresenta identidade de 98% (nt) com a sequência do bean bushy stunt virus segment A depositada no GenBank da Argentina (NC_055594.1, REYNAS *et al.* 2022).

Em relação ao DNA-B, o resultado do sequenciamento foi visualizado através do Software Geneious R11 (**Figura 11, Figura 13**). A ferramenta Blastn (alinhamento local básico a nível de nucleotídeos) foi utilizada contra a base de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os resultados do Blastn utilizando a sequências de BeBSV DNA-B podem ser visualizados nas **Figuras 12 e 14**.

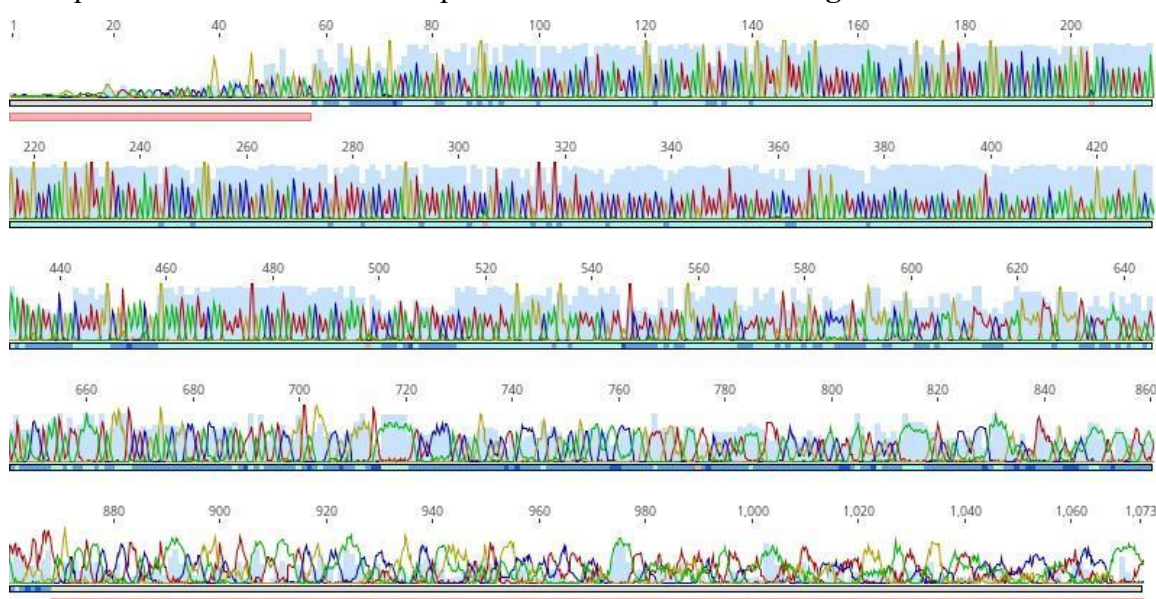


Fig.11: Representação gráfica de cromatograma obtido com o sequenciamento Sanger BeBSV-B-F_A08_01.ab1 na orientação sentido senso.



Fig.12: Resultado da análise de Blastn. Visualização de alinhamento do segmento sequenciado por Sanger. A sequência amplificada demonstrou ser 93% idêntica a sequência do DNA-B do begomovírus bean bushy stunt virus, código de acesso no GenBank (NC_060095).

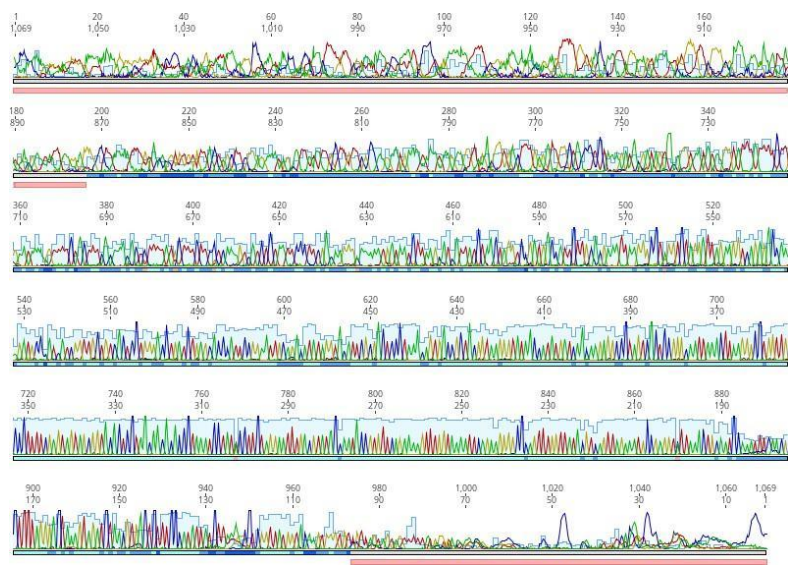


Fig.13: Representação gráfica de cromatograma obtido com o sequenciamento Sanger BeBSV-B R_G05_07.ab1 no sentido antisenso.

Bean bushy stunt virus segment B, complete sequence

Sequence ID: [NC_060095.1](#) Length: 2522 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 815 to 1773 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1373 bits(743)	0.0	897/974(92%)	18/974(1%)	Plus/Plus
Query 22	TTTGTGGCGAG-ATACTCAGTCATGTTAATTCTGACCATTACTCCTGCATTCAAAGAGCG	80		
Sbjct 815	TTTGGTGGCGAGAATACACAGTCATGGTAA-TCTGGCCATTACTCCTGCATTCAAAGAACG	873		
Query 81	ATATTTACCATTAGCCCATGTTTTAAAACCGKTKC-TGTCCTGTGAAAAGGAGTCCTT	139		
Sbjct 874	TTATT-A-CATAAG-GCATGTTTT-AAA-CG-TGTCCTGTCTGTTGAGAAGGAGTCGCT	927		
Query 140	AATGGTTGATTTTASAGGGAACGRGCGTTTCTTGCTAATAGTCGTTATAATTGGTGGGC	199		
Sbjct 928	AATGGTTGA-CTTAGAGGGGACG-GCG-TTCTTGCTAATAGTCGTTATAATTGGTGGGC	984		
Query 200	CAATTTTAAAGATCTCGAGAGAGAATCATGCAACGGTGTTTATGCTAATATAAGCAAGAA	259		
Sbjct 985	CTCTTTTAAAGATCTCGAAAGAGAATCATGCAACGGTGTTATAGGTAAATATAAGCAAGAA	1044		
Query 260	CGCCTTGTTAGTTTATTTATTGTTGGATGTCGGAGTCAAAGTGAAGGCATCCACATTT	319		
Sbjct 1045	CGCGTTGTTAGTTTA-TTATTGTTGGATGTCGGAGTCAAAGTGAAGGCAT-CCACATTT	1102		
Query 320	GTATCGTATGATCTGGATTATATTGGATAAATAAAACAAGTTATTTTGAAAACATCAAC	379		
Sbjct 1103	GTATCATATGATCTGGATTATATTGGATAAATAAAACAAGTTATTTTG--AACATCAAC	1160		
Query 380	TCTTCTCASAATAARCAACAACSACTTTGACTACACATTAACCCAACGCTCTGGGYT	439		
Sbjct 1161	TCTTCTCACAAAATAACAACAACAACCTTTGACTAAATCTTAACCAACGCTCTGGGCT	1220		
Query 440	TTTTAGTATTACAATTGCTACTAATACATTCATGGACCGTAGTCCTAACAGCTCGTTTA	499		
Sbjct 1221	TATGAGTATTACAATTGCTATTAAATACATTCATGGACCGTAGTCCTAACAGCTCGTTTA	1280		
Query 500	ATTGGGCCAKGGACATGGTAATGTTGGACTGTGTCTTTGTAGCCCTACTACGGAAGCAG	559		
Sbjct 1281	ATTGGGCCATGGACATGGTGATTTAGATTGTGTTCTTTGTAGCCCTACTACTGATGCAG	1340		
Query 560	ACTCACCAGGGTCCAGTACAGTGCTCCCTAACCGGTTAAGCTGTCTATATGGATCTAACG	619		
Sbjct 1341	ACTCACCAGGGTCCAGTACTGTGCTCCCTAACCGGTTAAGCTCTCTATATGGATGTAAACG	1400		
Query 620	CGTCACCCATTTCTGAGTCCGCATCGGATTGGGATATTCCTATAGTACTTCTTGCGGCC	679		
Sbjct 1401	CGTCACCCATTTCTGAGTCCGCATCGGATTGGGATATTCCTATAGTACTTCTACTAGCCC	1460		
Query 680	ATGACTCACCGGGCTTAATTTCAATTGGGCCAGGAAGCCAAAACGTGATGATGCGGATC	739		
Sbjct 1461	ATGACTCACCGGGCTTAATTTCAATTGGGCCAGGAAGCCAAAACGTGATGATGCGGATC	1520		
Query 740	TCACCATTCTTCTCTCCATTTACCATATWCCAACATGGTTAAAGTCGATATCCTTATCCG	799		
Sbjct 1521	TCACCATTCTTCTCTCCATTTACCATATCCAACATGGTTAAAGTCGATATCCTTATCCG	1580		
Query 800	AGAACTGTTTTGAAAGGATTTTAACTGTTGGGGCCCTGAAAGGAATATCGACTGAATGTT	859		
Sbjct 1581	AAAATTGTTTAGAAAGGATTTTAACTGTTGGGGCCCTGAAAGGAATATCGACTGAATGTT	1640		
Query 860	TAGCCGTGGAYAATTTACGCTTACCTTTAACTTCGCAAAATGGGTCAATTTGATGTACAT	919		
Sbjct 1641	TAGCCGTGGATTAATTTACGCTTACCTTTAACTTCGCAAAATGGGTCAATTTGATGTACAT	1700		
Query 920	TGAGTACAAACCCTATAATACAATTTGCCACGGAATAGGATC-TTAGAGGGAGAMGAAT	978		
Sbjct 1701	TGGAGTACAAACCCTATAATATAATTT-CCACGGAATAGGATCTTTGAGGGAGAAGAAT	1759		
Query 979	GATGATGAAAAATA	992		
Sbjct 1760	GATGATGAAAAATA	1773		

Fig.14: Resultado do Blastn. Visualização de alinhamento do segmento sequenciado por Sanger. A sequência amplificada demonstrou ser 92% idêntica a sequência do DNA-B do begomovírus bean bushy stunt virus, código de acesso no GenBank (NC_060095).

Abaixo (**Figura 15**) está a representação gráfica da sequência montada do DNA-B de BeBSV. Um total de duas ORFs foram anotadas, sendo uma a ORF que codifica para a proteína de movimento (BC1) e a outra a proteína de transporte nuclear (BV1).

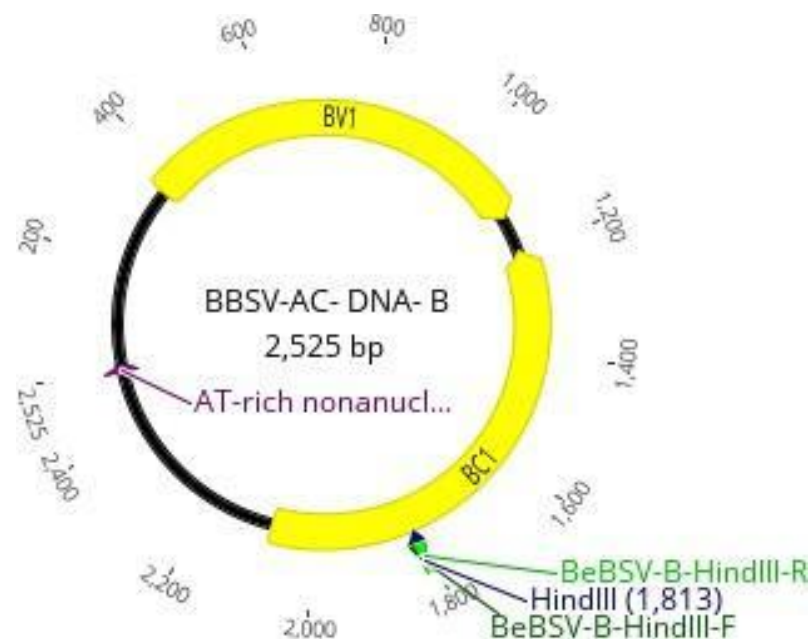


Fig.15: Representação gráfica da molécula do DNA-B de BeBSV, que apresenta identidade de 92% (nt) com a sequência de bean bushy stunt virus segment B depositada no GenBank, código NC_060095 (REYNAS *et al.* 2022).

Com esses resultados temos argumentos que sugerem que o begomovírus bean bushy stunt virus (BeBSV), primeiramente identificado em plantas de feijão comum no Nordeste da Argentina, está presente em plantas de *Pueraria* na região Norte do Brasil. Este vírus pode futuramente no Brasil passar a infectar leguminosas de importância agrônômica no Brasil.

8. CRONOGRAMA DA EXECUÇÃO (correspondente ao de Plano de Trabalho submetido no processo seletivo)

Atividades*	2021					2022						
	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J
Detecção Viral:Extração de DNA, gel eletroforeses, PCR, purificação de fragmentos virais Sequenciamento Sanger	R e a l i z a d o	R e a l i z a d o	R e a l i z a d o	R e a l i z a d o								
Desenho de primers específicos			R e a l i z a d o	R e a l i z a d o	R e a l i z a d o	R e a l i z a d o	R e a l i z a d o					
Extração de DNA, PCR e sequenciamento Sanger							R e a l i z a d o	R e a l i z a d o	R e a l i z a d o			
Publicação dos resultados e entrega dos relatórios, Participação do JEPEX e Congressos nacionais e internacionais			R e a l i z a d o	R e a l i z a d o							R e a l i z a d o	R e a l i z a d o
Determinação da gama de hospedeiros, Inoculação viral por Biolística					E m a n d a m e n t o	E m a n d a m e n t o	E m a n d a m e n t o	E m a n d a m e n t o				

*Justificar a não realização de atividades apresentadas no plano de trabalho.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

As fortes chuvas que acometeram Pernambuco nos meses de junho e julho, e que se estenderam até meados de agosto prejudicaram o andamento deste trabalho. Esse foi um fator que nos impossibilitou realizarmos coletas em áreas de plantação de feijões, principalmente na Zona da

Mata de Pernambuco. No entanto, todas as etapas foram realizadas cronograma planejado pelo plano de trabalho com exceção da última etapa que se encontra em andamento. Iremos fazer novas coletas de amostras infectadas com vírus de feijões nas regiões Norte e Nordeste para sabermos a incidência viral, e comprovar por biolística a capacidade deste vírus infectar uma ampla gama de hospedeiras de plantas leguminosas.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; BEAUDOIN, F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. *Molecular Plant Pathology*, 2005. v. 6, n. 4, p. 471–487.
- ALBUQUERQUE, L.C. et al. Genetic diversity and recombination analysis of sweepoviruses from Brazil. *Virology Journal*, 2012. v. 9:241. doi: 10.1186/1743-422X-9-241.
- ALVES-FREITAS, D.M.T. et al. Double-stranded RNA high-throughput sequencing reveals a new cytorhabdovirus in a bean golden mosaic virus-resistant common bean transgenic line. *Viruses*, 2019. v. 11, n. 1. doi: 10.3390/v11010090.
- BANKEVICH, A., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 2012. v. 10, p. 455-477.
- BITOCCHI E., BELLUCCI E., GIARDINI A., RAU D., RODRIGUEZ M., BIAGETTI E., et al. (2013). Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *New Phytol.* 197, 300–313. 10.1111/j.1469-8137.2012.04377.x
- BLAWID, R., SILVA, J.M.F., NAGATA, T. Discovering and sequencing new plant viral genomes by next-generation sequencing: description of a practical pipeline. *Annals of Applied Biology*, 2017. v. 170, p. 301-314.
- BORNANCINI, V.A. et al. Reconstruction and characterization of full-length begomovirus and alphasatellite genomes infecting pepper through metagenomics. *Viruses*, 2020. v. 12, n. 2. doi: 10.3390/v12020202.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. Portaria nº 33, de 22 de Abril de 2020. Disponível em MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E (www.gov.br). Acesso em: 23/06/2021
- BRIDDON, R.W. et al. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evolutionary Biology*, 2010. v. 10, n. 1. doi: 10.1186/1471-2148-10-97.
- BROWN, J.K. et al. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of virology*, 2015. v. 160, n. 6, p. 1593–1619.
- BUCHMANN, RC. et.al (2009) Geminivirus AL2 and L2 proteins suppress transcriptional gene silencing and cause genome-wide reductions in cytosine methylation. *J Virol* 83:5005–5013
- CÂMARA C., URREA C., SCHLEGEL V. (2013). Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a functional food: implications on human health. *Agriculture* 3, 90–111. 10.3390/agriculture3010090

- CANTÚ-IRIS, M. et al. Analysis of a new begomovirus unveils a composite element conserved in the CP gene promoters of several Geminiviridae genera: Clues to comprehend the complex regulation of late genes. *PLoS ONE*, 2019. v. 14, n. 1, p. 1–24.
- CARLUCCIO, A.V. et al. S-acylation mediates Mungbean yellow mosaic virus AC4 localization to the plasma membrane and in turns gene silencing suppression. *PLoS Pathogens*, 2018. v. 14, n. 8, p. 1–26.
- CASTILLO, A.G. et al. Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (REn) and viral replication protein (Rep). *Virology*, 2003. v. 312, n. 2, p. 381–394.
- CHAUHAN, S. et al. Isolation and sequence characterization of DNA-A genome of a new begomovirus strain associated with severe leaf curling symptoms of *Jatropha curcas* L. *Gene*, 2018. v. 664, n. April, p. 37–43. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.062>>.
- CHOU, H., ZHU, Y., MA, Y., & BERKOWITZ, G. A. (2016). The CLAVATA signaling pathway mediating stem cell fate in shoot meristems requires Ca(2+) as a secondary cytosolic messenger. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 85(4), 494–506. <https://doi.org/10.1111/tpj.13123>
- COLVIN, J. et al. Host-Plant Viral Infection Effects on Arthropod-Vector Population Growth, Development and Behaviour: Management and Epidemiological Implications. *Advances in Virus Research*, 2006. v. 67, n. 6, p. 419–452.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Séries históricas. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras?start=30>. Acesso em: 23/06/2021
- COSTA, A.S. Whitefly-transmitted plant diseases. *Annual Reviews Phytopathol*, 1976. v. 14, p. 429–449.
- CUI X, LI G, WANG D, HU D, ZHOU X (2005) A begomovirus DNA-β encoded protein binds DNA functions as a suppressor of RNA silencing, and targets the cell nucleus. *J Virol* 79:10764–10775
- CZOSNEK, H. et al. The incredible journey of Begomoviruses in their whitefly vector. *Viruses*, 2017. v. 9, n. 10.
- DONG, X. et al. Functional characterization of the nuclear localization signal for a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol*, 2003 , 77:7026–7033
- DUFFY, S.; HOLMES, E.C. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: Phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *Journal of General Virology*, 2009. v. 90, n. 6, p. 1539–1547.
- EAGLE, P.A.; HANLEY-BOWDOIN, L. cis elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication. *Journal of Virology*, 1997. v. 71, n. 9, p. 6947–6955.
- EAGLE, P.A.; OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN, L.A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *Plant Cell*, 1994. v. 6, n. 8, p. 1157–1170.

- ETESSAMI, P. et al. Delimitation of essential genes of cassava latent virus DNA 2. *Nucleic Acids Research*, 1988. v. 16, n. 11, p. 4811–4829.
- FARIA, J.C.; MAXWELL, D.P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology*, 1999. v. 89, n. 3, p. 262–268.
- FIALLO-OLIVÉ, E.; NAVAS-CASTILLO, J. Molecular and Biological Characterization of a New World Mono-/Bipartite Begomovirus/Deltasatellite Complex Infecting *Corchorus siliquosus*. *Frontiers in Microbiology*, 2020. v. 11, n. July, p. 1–14.
- FONDONG, V.N. The Ever-Expanding Role of C4/AC4 in Geminivirus Infection: Punching above Its Weight? *Molecular Plant*, 2019. v. 12, n. 2, p. 145–147. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.12.006>>.
- FREITAS, F.O. Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n.7, p.1199-1203, 2006.
- GARCÉS FIALLOS, F.R. DOENÇAS CAUSADAS POR VÍRUS NA CULTURA DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ciencia y Tecnología*, 2010. v. 3, n. 2, p. 1–6.
- GARDINER, W.E. et al. Coat protein is not required for systemic spread or symptom development. *EMBO Journal*, 1988. v. 7, n. 4, p. 899–904.
- GEPTS P., BLISS F.A. (1988). Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II Europe and Africa. *Econ. Bot.* 42, 86–104. 10.1007/BF02859038
- GILBERTSON, R.L. Differentiation of Bean-Infecting Geminiviruses by Nucleic Acid Hybridization Probes and Aspects of Bean Golden Mosaic in Brazil. *Plant Disease*, 1991. v. 75, n. 4, p. 336.
- GLADMAN, S., SEEMANN, T. VelvetOptimiser, 2.1. 7. Monash University, Victoria, Australia, 2008.
- HANLEY-BOWDOIN, L. et al. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11:777–788
- HARRISON, B.D. Advances in Geminivirus Research. *Annual Review of Phytopathology*, 1985. v. 23, n. 1, p. 55–82.
- INOUE-NAGATA, A.K. et al. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods*, 2004. v. 116, n. 2, p. 209–211.
- INOUE-NAGATA; A.K.; LIMA, M.F.; GILBERTSON, L. Uma revisão de geminivíroses (begomovíroses) em hortaliças e outras culturas: Situação atual e estratégias de manejo. *Horticultura Brasileira*, 2016. v. 34, n. 1, p. 8–18.
- ISLAM, W. et al. Genetic diversity of begomoviruses in Pakistan captured through a vector based survey. *Microbial Pathogenesis*, 2018. v. 118, p. 91–97. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.019>.
- JUPIN, I. et al. Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): Involvement of the protein encoded by ORF C4. *Virology*, 1994. v. 204, p. 82-90.
- KAMAL, H. et al. β C1, pathogenicity determinant encoded by Cotton leaf curl Multan betasatellite, interacts with calmodulin-like protein 11 (Gh-CML11) in *Gossypium hirsutum*. *PLoS ONE*, 2019. v. 14, n. 12, p. 1–19.

- KIM, E.J. RUSSINOVA, E. Brassinosteroid signalling. *Curr Biol.* 2020 Apr 6;30(7):R294-R298. doi: 10.1016/j.cub.2020.02.011. PMID: 32259497.
- KOONIN, E.V.; ILYINA, T.V. Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. *Journal of General Virology*, 1992. v. 73, n. 10, p. 2763–2766.
- LEITÃO, S.T. et al. “Establishing the Bases for Introducing the Unexplored Portuguese Common Bean Germplasm into the Breeding World.” *Frontiers in Plant Science*, 2017. v. 8, 1296. doi:10.3389/fpls.2017.01296.
- LIMA, A.T.M. et al. The diversification of begomovirus populations is predominantly driven by mutational dynamics. *Virus Evolution*, 2017. v. 3, n. 1, p. 1–14.
- MACEDO, M.A. et al. Complete sequence of a new bipartite begomovirus infecting *Sida* sp. in Northeastern Brazil. *Archives of Virology*, 2020. v. 165, n. 1, p. 253–256. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00705-019-04458-9>>.
- MACEDO, M.A. et al. Host range and whitefly transmission efficiency of Tomato severe rugose virus and Tomato golden vein virus in tomato plants. *Tropical Plant Pathology*, 2015. v. 40, n. 6, p. 405–409.
- MAR, T.B. et al. Interaction between the new world begomovirus Euphorbia yellow mosaic virus and its associated alphasatellite: Effects on infection and transmission by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of General Virology*, 2017. v. 98, n. 6, p. 1552–1562.
- MELO, A.B.; SOUSA, J.E. Planejamento Territorial de Redes Produtivas. *Revista Práticas de Administração Pública*, v.1, n. 2, p. 41-58. 2018.
- MORALES, F.J. History and Current Distribution of Begomoviruses in Latin America. *Advances in Virus Research*, 2006. v. 67, n. 06, p. 127–162.
- MUBIN, M. et al. Journey of begomovirus betasatellite molecules: from satellites to indispensable partners. *Virus Genes*, 2020. v. 56, n. 1, p. 16–26. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11262-019-01716-5>>.
- NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, 1994. v. 76, n. 5, p. 925–932.
- PEI, S. et al. Classification of genomic components and prediction of genes of Begomovirus based on subsequence natural vector and support vector machine. *PeerJ*, 2020. v. 8, p. 1–15.
- PETRY N., BOY E., WIRTH J., HURRELL R. (2015). Review: The potential of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) as a vehicle for iron biofortification. *Nutrients* 7, 1144–1173. 10.3390/nu7021144
- POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 2008. v. 25, p. 1253-1256.
- QADIR, R. et al. Diversity and recombination analysis of Cotton leaf curl Multan virus: A highly emerging begomovirus in northern India. *BMC Genomics*, 2019. v. 20, n. 1, p. 1–13.

- REYNA, et al. (2021). Biological and molecular characterization of bean bushy stunt virus, a novel bipartite begomovirus infecting common bean in northwestern Argentina. *Archives of virology*. 166. 10.1007/s00705-021-05002-4.
- RIBEIRO, F.E.; DEL PELOSO, M.J. (Ed.). *Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum nas regiões norte/nordeste brasileiras 2006-2008*. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. 122 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 129)
- ROJAS, M.R. Use of Degenerate Primers in the Polymerase Chain Reaction to Detect Whitefly-Transmitted Geminiviruses. *Plant Disease*, 1993. v. 77, n. 4, p. 340.
- RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetics inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 2012. v. 61, p. 539-542.
- ROSHAN, P. et al. AV2 protein of tomato leaf curl Palampur virus promotes systemic necrosis in *Nicotiana benthamiana* and interacts with host Catalase2. *Scientific Reports*, 2018. v. 8, n. 1, p. 1–15. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19292-3>>.
- SETTLAGE, S. B., SEe, R. G., & HANLEY-BOWDOIN, L. (2005). Geminivirus C3 protein: replication enhancement and protein interactions. *Journal of virology*, 79(15), 9885–9895. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.15.9885-9895.2005>
- SILVA, S.J. C. DA et al. High genetic variability and recombination in a begomovirus population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil. *Archives of Virology*, 2011. v. 156, n. 12, p. 2205–2213.
- SILVA, W. DA et al. Transmission modes affect the population structure of potato virus Y in potato. *PLoS Pathogens*, 2020. v. 16, n. 6 June, p. 1–23. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008608>>.
- SOBRINHO, R.R. et al. Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous hosts. *Journal of General Virology*, 2014. v. 95, p. 2540–2552.
- SOHRAB, S.S.; HAQ, Q.M.I. Begomovirus research in Saudi Arabia: current status and future prospects. [S.l.]: INC, 2020.
- SOUSA, G. et al. Establishment of a bank of positive controls for diagnosis of quarantine viruses and viroids in Brazil through PCR and RT-PCR. *Crop Protection*, 2016. v. 86, p. 31–41.
- SURUTHI, V. et al. Evidence of seed transmission of dolichos yellow mosaic virus, a begomovirus infecting lablab-bean in India. *Virus Disease*, 2018. v. 29, n. 4, p. 506–512. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13337-018-0494-9>>.
- VIEIRA, C.; JÚNIOR, T.J.P.; BORÉM, A. *Feijão*. 2 ed. Viçosa: UFV - Universidade Federal de Viçosa, 2006. 600p
- VUOSKU, J. et al. Expression of catalase and retinoblastoma-related protein genes associates with cell death processes in Scots pine zygotic embryogenesis. *BMC Plant Biol*. 2015 Mar 15;15:88. doi: 10.1186/s12870-015-0462-0. PMID: 25887788; PMCID: PMC4396594.
- WANG, H. et al. Adenosine Kinase Is Inactivated by Geminivirus AL2 and L2 Proteins. *Plant Cell*, 2003. v. 15, n. 12, p. 3020–3032.
- WYANT, P.S. et al. Circular DNA genomics (circomics) exemplified for geminiviruses in bean crops and weeds of northeastern Brazil. *Virology*, 2012. v. 427, n. 2, p. 151–157. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.02.007>>.

- QUADROS, A.F.F. et al. Two new begomoviruses infecting tomato and Hibiscus sp. in the Amazon region of Brazil. Archives of Virology, 2019. v. 164, n. 7, p. 1897–1901. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00705-019-04245>

- YADAVA, P.; SUYAL, G.; MUKHERJEE, S.K. Begomovirus DNA replication and pathogenicity. *Current Science*, 2010. v. 98, n. 3, p. 360–368.
- XIA, X. DAMBE6: New tools for microbial genomics, phylogenetics and molecular evolution. *Journal of Heredity*, v. 108, p. 431-437, 2017.
- ZERBINO, D.R., BIRNEY, E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, v. 18, n. 5, p. 821-829, 2008.
- ZHAI, Y. et al. Identification and Functional Analysis of Four RNA Silencing Suppressors in Begomovirus Croton Yellow Vein Mosaic Virus. *Front. Plant Sci*, 2022. 12:768800. doi: 10.3389/fpls.2021.768800
- ZHAO, L. et al. Complete genome sequence of a new bipartite begomovirus infecting *Boehmeria leiophylla* in China. *Archives of Virology*, 2018. v. 163, n. 7, p. 1989–1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3802-1>.

11. ATIVIDADES RELEVANTES DESENVOLVIDAS PELO BOLSISTA

Participações em Congressos:

- XI Simpósio Sobre Atualidades em Fitopatologia & V Jornada Professor Chaves de Iniciação Científica
- XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa. 2021
- XIII Congresso Argentino de Virologia, 2021
- 52º Congresso Brasileiro de Fitopatologia
- I Webnário MEPS: Microbiologia e Enzimologia do Sistema Planta Solo
- 6th Brazilian Student Council Symposium: Omics and Data Science
- IV Colóquios em Fitopatologia Tropical

Seminários:

- I Ciclo de Palestras dos Grupos de Estudos em Fitopatologia da UFV: Novas Tecnologias Aplicadas à Fitopatologia, 2021.

Cursos:

- Introdução à Programação: Python aplicado em Bioinformática. (Carga horária: 8h). Universidade Federal de Viçosa, UFV, Brasil
- Desenho de primers para PCR convencional e qPCR. (Carga horária: 3h). Sociedade Brasileira de Fitopatologia, SBF, Brasil
- Diagnóstico de doenças bacterianas. (Carga horária: 4h), Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Brasil
- Minicurso PCR em tempo Real: uma abordagem prática (Carga horária: 3h), Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Brasil

Trabalhos apresentados e publicados em eventos científicos:

- XIII Congresso Argentino de Virologia, 2021. “A New Putative Badnavirus Sequence In *Dioscorea bulbifera* From Brazil”
- XI Simpósio Sobre Atualidades em Fitopatologia & V Jornada Professor Chaves de Iniciação Científica. “Transmissão de um isolado de cowpea aphid-borne mosaic virus obtido de *Passiflora alata* a maracujazeiro e feijoeiros, 2021”
- XI Simpósio Sobre Atualidades em Fitopatologia & V Jornada Professor Chaves de Iniciação Científica. “Detecção de BGMV em plantações de Feijão-Lima no estado de Alagoas”

12. DIFICULDADES ENCONTRADAS:

Em virtude das fortes chuvas que atingiram o estado de Pernambuco no ano de 2022, as visitas de campo para coleta de materiais foram extremamente prejudicadas. No entanto, todas as etapas com exceção da última foram realizadas pelo bolsista.

13. PARECER DO ORIENTADOR:

O estudante Carlos Henrique Machado Dias de Brito mostrou-se extremamente interessado na área da Virologia Vegetal e tem contribuído enormemente com as atividades de pesquisa dentro do laboratório de Fitovirologia da UFRPE. Não somente cumpriu com o horário de 20 horas semanais do PIBIC, mas tem dedicado todo o tempo livre para aprender o máximo possível dentro da área da Fitopatologia. Neste contexto, o estudante também tem ajudado outros estudantes do laboratório no andamento de suas atividades. Neste período realizou cursos na área da Fitopatologia, Bionformática e Virologia e apresentou resumos em Congressos Científicos Nacionais e Internacionais como primeiro e co-autor. Além de considerar o aluno extremamente dedicado, é amigável com seus colegas e de fácil convívio.

Recife, 09 de setembro de 2022.