



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**Caracterização de uma nova espécie de
rhabdovírus transmitida por *Bemisia
tabaci* MEAM1 em feijão (*Phaseolus vulgaris*)**

BRUNA PINHEIRO DE LIMA

Brasília – DF
2017

BRUNA PINHEIRO DE LIMA

Caracterização de uma nova espécie de rhabdovírus transmitida por *Bemisia tabaci* MEAM 1 em feijão (*Phaseolus vulgaris*)

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília
como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre
em Fitopatologia pelo
Programa de Pós Graduação
em Fitopatologia

Orientador

Prof. Dra. Rita de Cássia Pereira Carvalho

Co-orientador

Dra. Simone da Graça Ribeiro

BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Bruna Pinheiro de. Lima, B. P. Pinheiro-Lima, B. Caracterização de uma nova espécie de rhabdovírus transmitida por *Bemisia tabaci* MEAM1 em feijão (*Phaseolus vulgaris*). / Bruna Pinheiro de Lima. Brasília, 2017.

Número de páginas p.: 88

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. *Phaseolus vulgaris* – *Cytorhabdovirus*.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Caracterização de uma nova espécie de rhabdovírus transmitida por *Bemisia tabaci* MEAM1 em feijão (*Phaseolus vulgaris*).

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FAP/DF, CENARGEN e INCTIPP por financiarem o presente projeto de pesquisa.

Ao Laboratório de Proteção de Plantas III, na Embrapa CENARGEN e, especialmente, à Dra. Simone da Graça Ribeiro que tornou a realização do trabalho possível.

À Prof. Dra. Rita de Cássia Pereira Carvalho por esses mais de três anos de orientação e amizade.

À Dra. Dione Alves, minha mentora, por toda paciência, ensinamentos, boa vontade e parceria.

Aos Drs. Fernando Lucas Melo e Cristiano Lacorte, por todos ensinamentos, críticas e excelentes sugestões.

Aos meus amigos do LPPIII, em especial, Ana Luiza Lacerda, Ageu Santos, Natalia Lamas e Rafaela Fontenele por estarem sempre dispostos a me ajudar e por tornarem tudo mais agradável.

Aos meus pais Antonio e Maria Lúcia, à minha amada irmã Talita, e à minha avó Zulmira por todo apoio, incentivo e inspiração.

Ao meu melhor colega de turma, companheiro nesses sete anos de UnB e meu marido, Pedro Brant.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da **Professora Rita de Cássia Pereira Carvalho**, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Interações Planta-Praga (INCTIPP).

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA ESPÉCIE DE
RHABDOVÍRUS TRANSMITIDA POR *BEMISIA TABACI* MEAM1 EM
FEIJÃO (*PHASEOLUS VULGARIS*).**

BRUNA PINHEIRO DE LIMA

DISSERTAÇÃO APROVADA em 23/02/2017 por:

Prof. Dr. Fernando Lucas Melo
Biologia Celular, UnB (Examinador Externo)

Prof. Dr. Leonardo Silva Boiteux
Embrapa Hortaliças (Examinador Interno)

Prof. Dra. Rita de Cássia Pereira Carvalho
Orientador (Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2017

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO GERAL	11
GENERAL ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO GERAL	14
OBJETIVOS	16
1.1. Objetivo geral	16
1.2. Objetivos específicos	16
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1. A cultura do feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	17
1.1. O feijão e sua importância	17
1.2. As doenças que acometem o feijoeiro comum	18
3. A família <i>Rhabdoviridae</i>	24
3.2 A transcrição e replicação de rhabdovírus.....	29
3.3 Os gêneros da família <i>Rhabdoviridae</i> que infectam plantas	30
3.3.1 Os gêneros <i>Cytorhabdovirus</i> e <i>Nucleorhabdovirus</i> com vírus de genoma monopartido	30
3.3.2 Os gêneros <i>Dichorhavirus</i> e <i>Varicosavirus</i> com vírus de genoma bipartido.....	34
3.4 Genética reversa e a obtenção de um clone infeccioso de vírus ssRNA senso negativo: Sonchus yellow net cytorhabdovirus (SYNV)	36
4. Transmissão de vírus que infectam plantas via vetores.....	37
CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DO BEAN ASSOCIATED CYTORHABDOVIRUS (BAC).....	42
1. INTRODUÇÃO.....	42
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1. Estabelecimento de um isolado do Bean associated cytorhabdovirus – BaC.....	44
2.2. Detecção do Bean associated cytorhabdovirus – Bac em amostras de campo.....	45
2.2.1. Infecção pelo Bean associated cytorhabdovirus – BaC em feijoeiros em plantios em Goiás e Distrito Federal	45
2.3. Caracterização molecular do Bean associated cytorhabdovirus – Bac.....	50
2.3.1. Recuperação do genoma completo do Bean associated cytorhabdovirus – BaC e análises filogenéticas.....	50

2.3.1.1.	Identificação da extremidade 3' do Bean associated cytorhabdovirus – BaC por meio do RACE (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>).....	50
2.3.1.2.	Identificação da extremidade 5' do Bean associated cytorhabdovirus – BaC por meio do RACE (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>).....	51
2.3.1.3.	Obtenção do genoma completo do Bean associated cytorhabdovirus – BaC e análise filogenética da nucleoproteína (N).....	52
2.4.1.	Ensaio de transmissão mecânica do Bean associated cytorhabdovirus – BaC via extrato vegetal tamponado.....	53
2.4.2.	Ensaio piloto de transmissão do Bean associated cytorhabdovirus – BaC por mosca branca (<i>Bemisia tabaci</i> , <i>Middle East Asia Minor 1</i> – MEAM 1).....	54
2.4.3.	Detecção do Bac em moscas brancas (<i>Bemisia tabaci</i> , <i>Middle East Asia Minor 1</i> – MEAM 1) utilizadas nos ensaios	55
2.4.4.	Ensaio de transmissão do Bean associated cytorhabdovirus – BaC por mosca branca (<i>Bemisia tabaci</i> , <i>Middle East Asia Minor 1</i> – MEAM 1) em condições controladas	56
3.	RESULTADOS	58
3.1.	Detecção do Bean associated cytorhabdovirus – Bac em amostras de campo.....	58
3.1.1.	Infecção pelo Bean associated cytorhabdovirus – BaC em feijoeiros em plantios em Goiás e Distrito Federal	59
3.2.	Caracterização molecular do Bean associated cytorhabdovirus – Bac.....	60
3.2.1.	Obtenção do genoma completo do Bean associated cytorhabdovirus – BaC e análises filogenéticas	60
3.3.	Caracterização biológica do Bean associated cytorhabdovirus – Bac.....	66
3.3.1.	Ensaio de transmissão mecânica do Bean associated cytorhabdovirus – BaC via extrato vegetal tamponado.....	66
3.3.2.	Ensaio piloto de transmissão do Bean associated cytorhabdovirus – BaC por mosca branca (<i>Bemisia tabaci</i> , <i>Middle East Asia Minor 1</i> – MEAM 1).....	67
3.3.3.	Detecção do Bac em moscas brancas (<i>Bemisia tabaci</i> , <i>Middle East Asia Minor 1</i> – MEAM 1) utilizadas nos ensaios	68
3.3.4.	Ensaio de transmissão do Bean associated cytorhabdovirus – BaC por mosca branca (<i>Bemisia tabaci</i> , <i>Middle East Asia Minor 1</i> – MEAM 1) em condições controladas	69
4.	DISCUSSÃO	71
5.	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vírus relatados em feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i>), suas respectivas classificações segundo o <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> – ICTV de acordo com Família, Gênero, acrônimo e maneiras de transmissão.	20
Tabela 2. Gêneros aceitos pelo <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (ICTV) e classificados na família <i>Rhabdoviridae</i> , suas espécies tipo, hospedeiros e tipos de transmissão.	26
Tabela 3. Vírus da família <i>Rhabdoviridae</i> atualmente reconhecidos pelo <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (ICTV) e classificados nos gêneros <i>Cytorhabdovirus</i> e <i>Nucleorhabdovirus</i> , bem como os tipos de plantas que infectam e seus insetos vetores (quando já conhecidos).	33
Tabela 1. Sequências dos <i>primers</i> específicos empregados nas reações em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i> – PCR) para detecção de seis vírus em amostras de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i>), tamanho do <i>amplicon</i> (em pares de bases – pb) e condições da PCR.	48
Tabela 2. Sequências de vírus dos gêneros <i>Nucleorhabdovirus</i> e <i>Cytorhabdovirus</i> utilizados nas análises filogenéticas para a nucleoproteína e seus respectivos números de acesso no GenBank*.	53
Tabela 3. Detecção de vírus de RNA e DNA em feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i>) na região Central do Brasil.	60
Tabela 4. Características das seis ORFs (<i>open reading frames</i>) presentes no genoma do Bean associated cytorhabdovirus (BaC).	62
Tabela 5. Transmissão mecânica do Bean associated cytorhabdovirus - BaC.	67
Tabela 6. Ensaio de transmissão do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) por mosca branca (<i>Bemisia tabaci</i> , <i>Middle East Asia Minor 1</i> – MEAM 1) feijoeiros ‘Pérola’ e ‘Jalo Precoce’ BRS FC 401 RMD.	68
Tabela 7. Transmissão do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) por mosca branca (<i>Bemisia tabaci</i> , <i>Middle East Asia Minor 1</i> – MEAM 1).	70

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Organização genômica típica da família *Rhabdoviridae* em que *l* e *t* são as regiões não transcritas (*l* = *leader* e *t* = *trailer*) e N, P, M, G e L são, respectivamente, os genes estruturais que codificam a nucleoproteína, fosfoproteína, proteína matriz, glicoproteína e polimerase. Modelo de transcrição do tipo *start-stop* com a produção decrescente dos mRNAs monocistrônicos apresentando o 5'cap e a cauda poli (A)..... 27
- Figura 2.** Plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) ‘Pérola’ apresentando sintomas típicos induzidos por vírus como mosaico, epinastia, nanismo e bolhosidade. Plantas coletadas em Luziânia (A) e (B), Cristalina, GO (C) e Brasília, DF (D). 46
- Figura 3.** Ensaio de transmissão do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) via inseto vetor mosca branca (*Bemisia tabaci*, *Middle East Asia Minor* 1 – MEAM 1) a partir de feijoeiros (*Phaseolus vulgaris*) coletados em Luziânia – GO, Brasil..... 55
- Figura 4.** Ensaio de transmissão do Bean associated cytorhabdovirus (BaC). Foi permitido a grupos de adultos de moscas brancas (*Bemisia tabaci*, *Middle East Asia Minor* 1 – MEAM 1) avirulíferos (com 1 a 3 dias de vida) um período de acesso de aquisição (PAA) de sete dias em feijoeiro não-infectados ou infectados. Entre 25 a 30 adultos foram transferidos para uma folha de cada planta teste, para um período de acesso de inoculação (PAI) de sete dias. No oitavo dia, as plantas foram pulverizadas com o inseticida sistêmico Imidacloprid e mantidas protegidas dentro das gaiolas até a coleta de material foliar para detecção do BaC. 57
- Figura 5.** Amplificação do gene N do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) presente em amostra de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) utilizando-se *primers* específicos. (1) planta infectada (C-) o controle negativo da reação (1 kb) marcador 1Kb Plus Ladder. 58
- Figura 6.** Amplificação do gene N do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) utilizando-se *primers* específicos e de genes plastidial e mitocondrial de plantas. (1kb) 1Kb Plus Ladder. Reações a partir de cDNA (1) e RNA total do feijoeiro infectado com os *primers* para o gene N do BaC (2), gene plastidial (3) e mitocondrial (5) de plantas. Controles negativos das reações (4) e (6). 59
- Figura 7.** Genoma do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) com seus genes canônicos que codificam (N) nucleoproteína, (P) fosfoproteína, (mp) provável proteína de movimento, (M) proteína matriz, (G) glicoproteína e (L) polimerase. Acima estão representados os posicionamentos dos *primers forward* e abaixo, *reverse*. (A) Fragmentação do genoma em seis *amplicons*. 61
- Figura 8.** Recuperação das extremidades do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) por meio da técnica de *Rapid Amplification of cDNA Ends* – RACE. (A e B) *Amplicons* obtidos para as extremidade 3' e 5'. Géis de agarose a 1%..... 61
- Figura 9.** Matriz de identidade entre sequências de aminoácidos do gene N (nucleoproteína) do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) (sequência obtida por NGS e do isolado BaC_Luz) e sequências de diferentes rhabdovírus depositadas no GenBank. As comparações e matriz foram geradas pelo programa SDT. 63
- Figura 10.** Árvore filogenética construída segundo algoritmo de *Maximum likelihood* no programa MEGA 7, com base no alinhamento global de sequências de aminoácidos referentes ao gene N dos vírus da família *Rhabdoviridae* e as sequências do Bean associated cytorhabdovirus (BaC). 65
- Figura 11.** *Amplicons* obtidos após PCR para detecção do gene N de BaC em plantas inoculadas mecanicamente. (A) *Pools* formados por cinco indivíduos das espécies: (1) *Datura stramonium*, (2) *Capsicum annum*, (3) *Solanum lycopersicum*, (4) *Chenopodium quinoa*, (5) *C. amaranticolor*, (6) *N. benthamiana*, (7) *N. rustica*, (8) *N. glutinosa*, (9)

<i>N. tabacum</i> , (10) <i>C. chinense</i> , (11) e (12) <i>Phaseolus vulgaris</i> ‘Jalo Precoce’. (B) Amplicons do BaC obtidos a partir de plantas dos <i>pools</i> 11 e 12. (1) e (5) plantas <i>mock</i> inoculadas. (C+) e (C-) controles positivo e negativo da reação.....	66
Figura 12. Sintoma de mosqueado em feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i>) ‘Jalo Precoce’, vinte e um dias após inoculação mecânica com o Bean associated cytorhabdovirus – BaC.....	67
Figura 13. Amplicons do gene N do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) adultos de moscas brancas (<i>Bemisia tabaci</i> , <i>Middle East Asia Minor</i> 1 – MEAM 1). (1) insetos avirulíferos coletados na criação da Estação Experimental de Biologia (EEB) da Universidade de Brasília – UnB; de (2) adultos coletados em plantas de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i>) oriundas de plantios comerciais em Luziânia (GO). C- = controle negativo da reação. C+ = controle positivo. Marcador 1 Kb plus (Invitrogen).....	68
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos amplicons obtidos nas reações de PCR para o gene N do BaC a partir do RNA total dos insetos virulíferos (1) e avirulíferos (2); Amplicon do gene N utilizando cDNA obtido de RNA de moscas brancas (<i>Bemisia tabaci</i> , <i>Middle East Asia Minor</i> 1 – MEAM 1) virulíferas (4) Controles negativos (3) e (5) (6) reações de PCR com os primers para o gene citocromo oxidase I (mtCOI) (1kb) marcador de peso molecular, Invitrogen.	69
Figura 15. Plantas de <i>Vigna unguiculata</i> ‘BRS Imponente’ apresentando sintomas de infecções virais trinta dias após o término do Período de Acesso de Inoculação do isolado do Bean associated cytorhabdovirus – BaC de Luziânia (GO) por adultos de mosca branca (<i>Bemisia tabaci</i> , <i>Middle East Asia Minor</i> 1 – MEAM 1). (A) e (B) plantas distintas com sintomas de amarelecimento e pontos necróticos. (C) trifólio com sintoma de mosqueado. (D) trifólio com intenso amarelecimento e pontos necróticos (seta).....	70

RESUMO GERAL

Lima, Bruna Pinheiro de. Lima, B. P. Pinheiro-Lima, B. P. **Caracterização de uma nova espécie de rhabdovírus transmitida por *Bemisia tabaci* MEAM 1 em feijão (*Phaseolus vulgaris*)**. 2017. (88 p). Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O feijoeiro, *Phaseolus vulgaris* L., (família Fabaceae) é amplamente cultivado e compõe a dieta dos povos nas Américas Central e do Sul e África. No Brasil, grande produtor (3,2 milhões de toneladas), o tipo preferido varia de acordo com a região do país, mas predomina o grupo varietal ‘Carioca’. A produção é fortemente afetada por viroses e o *Bean golden mosaic virus* – BGMV (gênero *Begomovirus* e família *Geminiviridae*) é o vírus mais comumente relatado causando grandes perdas. Um conjunto de amostras de feijoeiro foi coletado no Estado de Goiás e os ácidos nucleicos purificados foram sequenciados pela plataforma *Illumina* MiSeq. Foram encontrados *contigs* referentes a vírus classificados em quatro gêneros, incluindo um cytorhabdovírus, (família *Rhabdoviridae*) que apresenta partículas envelopadas, genoma de ssRNA (-) e hospedeiros vegetais, normalmente transmitidos por afídeos e cigarrinhas. Este vírus foi provisoriamente denominado Bean associated cytorhabdovirus (BaC). Neste estudo, foi confirmada a infecção por BaC nas amostras originais e em 69,3% dos feijoeiros coletados em Brasília-DF, Cristalina-GO e Luziânia-GO, em infecção mista com vírus transmitidos por mosca branca (*Bemisia tabaci*), o BGMV e o Cowpea mild mottle virus (gênero *Carlavirus* e família *Betaflexiviridae*). Amostras de feijoeiro provenientes de Luziânia-GO foram utilizadas para caracterização molecular de um isolado denominado BaC_Luz, bem como fonte de inóculo para os ensaios biológicos. As extremidades 3’ e 5’ do BaC foram identificadas por RACE (*Rapid Amplification cDNAs Ends*). O genoma completo do BaC_Luz foi recuperado por amplificação da sequência em seis fragmentos e possui 13.449 nt. Foram identificados os cinco genes essenciais comuns aos vírus da família *Rhabdoviridae*, (N: nucleoproteína, P: fosfoproteína, M: proteína matriz, G: glicoproteína e L: polimerase) flanqueados por duas regiões não transcritas a *leader* (*l*) e a *trailer* (*t*), além de um gene situado entre P e M (3) que codifica uma provável proteína de movimento. Análises filogenéticas conduzidas com a sequência de aminoácidos da nucleoproteína mostraram que o BaC se agrupou em um clado junto com os membros do gênero *Cytorhabdovirus* e comparações par a par apresentaram maior identidade com os vírus que infectam monocotiledôneas e são transmitidos por cigarrinhas, o Northern cereal mosaic virus e Barley yellow striate mosaic virus, porém em um ramo diferente do clado. A transmissão do BaC_Luz foi, primeiramente, realizada mecanicamente ao feijoeiro ‘Jalo’ e resultou em 25% de plantas positivas. O BaC_Luz foi utilizado como fonte de inóculo em ensaio de transmissão por adultos de mosca branca provenientes do mesmo campo a feijoeiros ‘Jalo’, ‘Pérola’ e ‘BRS FC 401 RMD’ por um período de acesso de inoculação (PAI) de 14 dias resultando em 100% de eficiência. Em condições controladas, o mesmo isolado, após período de acesso de aquisição (PAA) de 7 dias do vírus por adultos avirulíferos e posterior PAI de 7 dias, resultou em 25, 50 e 75% de transmissão a soja (*Glycine max*) ‘BR16’, caupi (*Vigna unguiculata*) e feijoeiro ‘BRS FC 401 RMD’, respectivamente. Este estudo apresenta dados inéditos, pois relata a identificação do primeiro rhabdovírus infectando feijoeiro e também, pela primeira vez

apresenta evidências que um membro da família *Rhabdoviridae* pode ser transmitido por *Bemisia tabaci*.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, *Cytorhabdovirus*, mosca branca, *Bemisia tabaci*.

Orientador – Rita de Cássia Pereira Carvalho – UnB

Co-orientador – Simone da Graça Ribeiro – Embrapa CENARGEN

GENERAL ABSTRACT

Lima, Bruna Pinheiro de. Lima, B. P. Pinheiro-Lima, B. P. **Characterization of a new rhabdovirus transmitted by *Bemisia tabaci* MEAM 1 in common bean (*Phaseolus vulgaris*)**. 2017. (88 p). Dissertation (Master in Plant Pathology – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil).

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) (Fabaceae family) is widely cultivated and is an important food in the diet in different countries in Central and South America and Africa. In Brazil, a large producer (3.2 million tons), the Carioca type of bean is preferred. The bean yield may be affected by the incidence of viruses and Bean golden mosaic virus - BGMV (genus *Begomovirus* and family *Geminiviridae*) is the most commonly reported as responsible for large losses in bean production. Samples of common beans were collected in State of Goiás, sequenced by the Illumina MiSeq platform and *contigs* of viruses belonging to four genera were identified, including a cytorhabdovirus, (*Rhabdoviridae* family). Cytorhabdoviruses have enveloped particles, ssRNA (-) genome, infect plant hosts and are usually transmitted by aphids and leafhoppers. The new cytorhabdovirus was denominated Bean associated cytorhabdovirus (BaC). In this work, the infection by BaC was confirmed in the original samples and in 69,3% of samples from Brasília, Cristalina and Luziânia in mixed infections with other whitefly transmitted viruses, BGMV and Cowpea mild mottle virus (genus *Carlavirus* and family *Betaflexiviridae*). Bean samples from Luziânia (isolate BaC_Luz) were used for molecular characterization and as inoculum source in biological assays. The 3' and 5' ends of BaC were identified by RACE (Rapid Amplification cDNAs Ends). The complete BaC_Luz genome was recovered by PCR amplification of six fragments and is 13.449 nt long. The genome presents the five essential genes common to rhabdoviruses, (N: nucleoprotein, P: phosphoprotein, M: matrix protein, G: glycoprotein and L: polymerase) flanked by two non-transcribed *leader* (1) and *trailer* (T) regions, in addition to a gene located between P and M (3) encoding a likely movement protein. Phylogenetic analyzes conducted with the amino acid sequence of the nucleoprotein showed that BaC clustered together with members of the genus *Cytorhabdovirus*, and pairwise comparisons showed greater identity with Northern cereal mosaic virus and Barley yellow striate mosaic virus that infect monocotyledons and are transmitted by leafhoppers, but are clustered in different branch of the clade. BaC is mechanically transmitted to bean 'Jalo' at a rate of 25% and by whitefly. BaC_Luz was used as an inoculum source in a whitefly transmission test from field infected plant to 'Jalo', 'Pérola' and 'BRS FC 401 RMD' beans with an inoculation access period (IAP) of 14 days resulting in 100% of transmission efficiency. Under controlled conditions, after a seven-day acquisition access period (AAP) in infected plants by aviruliferous adults and subsequent seven-day IAP, resulted in 25, 50 and 75% transmission to soybean (*Glycine max*) 'BR16', cowpea (*Vigna unguiculata*) and common bean 'BRS FC 401 RMD', respectively. This study presents novel data reporting the identification of the first rhabdovirus infecting beans also for the first time a virus member of the family *Rhabdoviridae* being transmitted by *Bemisia tabaci*.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, *Cytorhabdovirus*, whitefly, *Bemisia tabaci*.

Advisor – Rita de Cássia Pereira Carvalho – UnB

Co-advisor – Simone da Graça Ribeiro – Embrapa CENARGEN

INTRODUÇÃO GERAL

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma planta da família Fabaceae caracterizada por ser autógama, diplóide, com 22 cromossomos ($2n=2x=22$) e apresentar dois grupos genéticos de domesticação, o da América Central e o dos Andes, que apesar de apresentarem diferenças na composição genômica, têm em comum um mesmo ancestral selvagem (Schmutz et al., 2014, Singh et al., 1991).

O feijoeiro foi introduzido na Europa no século XVI através de espanhóis e portugueses que coletaram amostras nas Américas Central e do Sul. O feijão foi, posteriormente, levado à África. Hoje, a cultura apresenta grande importância, principalmente, em países latinos e africanos, onde seu consumo ocorre tanto na forma de vagens, grãos verdes e secos que apresentam elevados teores de proteínas, vitaminas e minerais. Na Europa e América do Norte, basicamente, consomem-se as vagens como vegetais frescos ou enlatados (Nassar et al., 2010). O Brasil é atualmente um dos principais produtores do grão, com cerca de 3 milhões de toneladas. Os principais grupos varietais são feijão tipo carioca, preto e o caupi (*Vigna unguiculata*) (CONAB, 2017).

Um grande número de viroses acomete a cultura do feijoeiro, mas entre elas merece destaque o mosaico dourado causado pelo Bean golden mosaic virus – BGMV, um begomovírus (família *Geminiviridae*) transmitido pelo inseto vetor mosca branca (*Bemisia tabaci*) e capaz de ocasionar perdas totais na produção do grão devido aos sintomas de amarelecimento e deformação foliar e de vagens, além de nanismo das plantas (Faria et al., 2014).

A suscetibilidade do caupi a viroses é elevada com mais de 100 espécies de vírus sendo relatadas infectando a cultura e um trabalho recente realizado na África mostrou que os principais vírus para o caupi são aqueles pertencentes ao gênero *Potyvirus* (família *Potyviridae*). Além dos potyvírus, três novas espécies foram detectadas em plantas coletadas em áreas com diferentes tipos de clima por meio do *Next Generation Sequencing* (NGS): Cowpea polerovirus 1 e 2 (semelhantes a espécies virais classificadas no gênero *Polerovirus* e família *Luteoviridae*); Cowpea tombusvirid 1 e 2 (semelhantes a espécies virais classificadas no gênero *Tombusvirus* e família *Tombusviridae*) e Cowpea associated mycotymovirid 1 (semelhante a vírus do gênero *Mycotymovirus* e família *Tymoviridae*) (Palanga et al., 2016).

A técnica de NGS é uma ferramenta que desde 2009 vem sendo bastante empregada na Virologia Vegetal, tanto em estudos de detecção, como análise de

diversidade, caracterização molecular, além de método facilitador para análises quarentenárias (Roossinck, 2012). Após o emprego dessa técnica para sequenciamento do RNA de fita dupla de amostras de feijoeiros coletadas na Embrapa Arroz e Feijão (Goiânia, GO) foram detectados *contigs* virais referentes ao genoma de uma nova espécie de cytorhabdovírus, que foi provisoriamente denominado como Bean associated cytorhabdovirus (BaC).

O gênero *Cytorhabdovirus* pertence à família *Rhabdoviridae* e assim como os membros dos gêneros *Nucleorhabdovirus*, *Dichorhavirus* e *Varicosavirus*, tem as plantas como seus hospedeiros. Na família, estão classificados 13 gêneros com vírus de genoma de RNA fita simples senso negativo envoltos, em sua maioria, por um envelope de glicoproteínas em conformação de partícula do tipo baciliforme, ou em formato de bala. Em toda a família, o genoma é constituído pela presença de cinco genes essenciais que codificam no sentido 3' para 5' a nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína matriz (M), glicoproteína (G) e polimerase (L) e, excetuando-se as espécies que compõem os gêneros *Dichorhavirus* e *Varicosavirus*, todas as demais são monosegmentadas. Além dos genes N, P, M, G e L, podem ser encontrados genes acessórios como o sc4 e P3, que codificam proteínas de movimento nos genomas de *Sonchus yellow net nucleorhabdovirus* (SYNV) e *Lettuce necrotic yellows cytorhabdovirus* (LNYV), respectivamente. (Dietzgen et al., 2017).

A partir da descoberta de um novo rhabdovírus, o Bean associated cytorhabdovirus (BaC), infectando o feijoeiro comum, um hospedeiro até então não relatado entre a gama descrita para os vírus da família, torna-se imperativo o desenvolvimento de estudos de caracterização molecular e biológica dessa espécie, que possam contribuir para a elucidação do tipo de transmissão, gama de hospedeiras e geração de ferramentas de diagnose que futuramente possam ser utilizadas para definir a sua dispersão e incidência no território nacional.

OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

O trabalho tem como principal objetivo realizar a caracterização molecular e biológica de uma nova espécie de rhabdovírus em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) coletadas no Estado de Goiás, Brasil, denominada Bean associated Cytorhabdovirus – BaC.

1.2. Objetivos específicos

- Estabelecer um isolado que possibilite realizar ensaios para a caracterização viral do BaC;
- Recuperar o genoma completo da nova espécie proposta identificada no isolado obtido e comparar com a sequência proveniente do *Next Generation Sequencing*;
- Realizar levantamento da presença do BaC em plantios comerciais e experimentais em cidades próximas à Goiânia onde o vírus foi detectado;
- Caracterizar biologicamente a espécie por meio de ensaios de transmissão para feijoeiros saudáveis e demais espécies botânicas a fim de se definir a gama de hospedeiras do BaC.

1. A cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*)

1.1. O feijão e sua importância

No Brasil, o termo feijão refere-se, tecnicamente, aos grãos provenientes de duas espécies da família Fabaceae e é subdividido em dois grupos. O Grupo I em que estão classificados aqueles da espécie *Phaseolus vulgaris* L. conhecida por feijão comum e o Grupo II da espécie *Vigna unguiculata* vulgarmente denominada feijão-caupi, feijão-de-corda ou feijão-macassar (MAPA, 2008).

Vigna unguiculata tem como centro de origem a África onde seu cultivo possui grande importância para a alimentação humana no consumo dos grãos secos ou das vagens frescas e ainda como planta forrageira. O feijão-caupi (assim como o *P. vulgaris*) tem ainda importância na fixação de nitrogênio atmosférico e consequente enriquecimento do solo com esse nutriente, devido à associação com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas, como as do gênero *Rhizobium*. A cultura também é importante na Ásia, nos Estados Unidos da América e América do Sul, principalmente em regiões de clima semi-árido (Munoz-Amatriain et al., 2016).

Phaseolus vulgaris possui como centro de origem a América Central e sua domesticação ocorreu em dois eventos independentes, tanto na região originária no sul do México, como nos Andes (sul da Bolívia e norte da Argentina) gerando, então, dois *pools* genéticos distintos (Rodriguez et al., 2016). Características como insensibilidade ao fotoperíodo, aumento do tamanho das folhas, perda da deiscência das vagens, bem como a supressão da dormência das sementes foram agregadas à espécie por meio da domesticação e assim, seu cultivo passou a ter grande importância, principalmente para os povos africanos e latino-americanos (Singh et al., 1991, Bitocchi et al., 2012).

Mundialmente, o feijão representa mais de 50% do consumo de grãos na alimentação humana e, devido às suas características nutricionais, é responsável por até 36% da ingestão diária de proteínas, bem como o fornecimento de carboidrato (15% de calorias), fibras, vitaminas como A1, complexo B, C e E, além de minerais como ferro, zinco, cobre e fósforo (Kumar et al., 2015, Schmutz et al., 2014). Compostos químicos com ação antioxidante como flavonoides, isoflavonas e antocianinas (presente no grão preto) também estão presentes no feijão que tem se mostrado um excelente aliado na prevenção de doenças como câncer, diabetes, obesidade, além de problemas cardíacos. Devido a este

conjunto de nutrientes, a 8ª edição do *Dietary Guidelines for Americans* recomendou o consumo de pelo menos 1 xícara e 1/2 de feijão por semana (Hayat et al., 2014, Agriculture, 2015-2020).

No Brasil, segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) a cada dez brasileiros, sete consomem feijão diariamente, totalizando 19 kg por pessoa ao ano. O tipo carioca é o preferido nacionalmente, representando mais de 50% da área cultivada com feijoeiro comum, seguido do grão preto que é produzido em 21% da área cultivada e consumido principalmente nos Estados da região sul, Minas Gerais e Espírito Santo. Já o feijão-caupi tem sua produção e principal sítio consumidor concentrados nos Estados das regiões Norte e Nordeste, com uma representatividade de menos de 10% na área cultivada com feijoeiros em todo o país (MAPA, 2015).

Em 2012, Mianmar ocupou o posto de maior produtor de feijão com cerca de 3,9 milhões de toneladas, seguido da Índia que teve uma produção de 3,7 e o Brasil em ficou em terceiro lugar com 2,8 (FAO, 2015). Já na safra 2014/2015 a produção total no país incluindo as três safras usuais da cultura foi de 3,2 milhões de toneladas do grão e agora em 2016/2017, estima-se que será de 3,1 milhões. A região Sul foi responsável por 30% da produção nacional, enquanto Sudeste, Centro Oeste, Nordeste e Norte responsáveis por 25,7%, 23,7%, 18,2%, e 2,4%, respectivamente. Estima-se que a produção de feijões para a safra 2016/2017 será representada pelo carioca, caupi e preto nas seguintes proporções: 65%, 19% e 16%, respectivamente (CONAB, 2017).

1.2. As doenças que acometem o feijoeiro comum

A produção do grão pode ser fortemente afetada pela incidência de doenças responsáveis não somente pela queda de produtividade, como também pela redução do valor comercial dos grãos devido aos danos ocasionados. No Brasil, dentre as doenças provocadas por fungos merecem destaque: antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), mancha angular (*Pseudocercospora griseola*), murcha de fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*), mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e oídio (*Erysiphe polygoni*). Dentre as bactérias destacam-se, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* causadoras do crestamento bacteriano e da murcha de curtobacterium, respectivamente. São também comumente relatadas na cultura nematóides dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus* (Embrapa, 2003).

Dentre as doenças que acometem o feijoeiro, as viroses apresentam grande relevância no Brasil e no Mundo (**Tabela 1**). No Brasil, vários vírus já foram relatados pelos grupos

de pesquisa liderados pelo Dr. Álvaro Santos Costa, Elliot W. Kitajima e Irineu J. B. de Camargo em publicações e resumos em anais de congressos. Dentre eles podemos citar o Bean common mosaic virus – BCMV, Bean yellow mosaic virus – BYMV (de Camargo et al., 1968) Bean golden mosaic virus – BGMV (Costa, 1965), Bean rugose mosaic virus – BRMV (de Camargo et al., 1976), Cowpea mild mottle virus – CPMMV (Costa et al., 1983), Bean necrotic mosaic virus – BeNMV e o Southern bean mosaic virus – SBMV (de Oliveira et al., 2012).

Tabela 1. Vírus relatados em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*), suas respectivas classificações segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses* – ICTV de acordo com Família, Gênero, acrônimo e maneiras de transmissão.

Família	Gênero	Vírus	Acrônimo	Transmissão
-	<i>Sobemovirus</i>	Southern bean mosaic virus	SBMV	Besouros
<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Carlavirus</i>	Cowpea mild mottle virus	CPMMV	Mosca branca (<i>Bemisia tabaci</i>)
<i>Closteroviridae</i>	<i>Crinivirus</i>	Bean yellow disorder virus	BYDV	Mosca branca (<i>Bemisia tabaci</i>)
<i>Endornaviridae</i>	<i>Endornavirus</i>	Phaseolus vulgaris endornavirus 1	PvEV-1	Gametas (infecção assintomática)
		Phaseolus vulgaris endornavirus 2	PvEV-2	Gametas (infecção assintomática)
<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus</i>	Bean dwarf mosaic virus	BDMV	Mosca branca (<i>Bemisia tabaci</i>)
		Bean golden mosaic virus	BGMV	
		Bean calico mosaic virus	BCaMV	
		Bean chlorosis virus	BeanCV	
		Bean yellow mosaic Mexico virus	BYMMexV	
		French bean leaf curl virus	FbLCV	
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	Bean common mosaic necrosis virus	BCMNV	Mecânica, afídeos e sementes
		Bean common mosaic virus	BCMV	
		Bean yellow mosaic virus	BYMV	
<i>Secoviridae</i>	<i>Comovirus</i>	Bean pod mottle virus	BPMV	Besouros e sementes
		Bean rugose mosaic virus	BRMV	Besouros
		Cowpea mosaic virus	CMV	Besouros
		Cowpea severe mosaic virus	CPSMV	Besouros

O mosaico dourado do feijoeiro causado pelo Bean golden mosaic virus – BGMV (gênero *Begomovirus* e família *Geminiviridae*) foi relatado pela primeira vez por Costa (1965) no Brasil e mais tarde na América Central por Galvez (1989). Após estudos filogenéticos e biológicos foi estabelecida uma subdivisão na espécie agrupando em BGMV tipo I isolados brasileiros não transmitidos mecanicamente e no II isolados da América Central e Flórida com transmissão mecânica. Posteriormente os tipos I e II foram reclassificados como espécies distintas, sendo que o primeiro se manteve como BGMV e o segundo foi definido como Bean golden yellow mosaic virus (BGYMV) (Garrido-Ramirez et al., 2000).

O BGMV pode ocasionar perdas totais na produção do grão e é considerado o vírus de maior importância nos cultivos tropicais da cultura. Além do feijoeiro comum, a espécie também já foi relatada infectando feijão de rola - *Macroptilium lathyroides* (Lima et al., 2013) e soja - *Glycine max* (Fernandes et al., 2009). A disseminação do vírus é feita por mosca branca (*Bemisia tabaci*), o que dificulta o controle da doença no campo devido à baixa eficiência do controle químico do vetor, além da ausência de genótipos de *Phaseolus* resistentes ao BGMV e por isso pesquisadores da Embrapa desenvolveram um feijão transgênico evento 5.1 da variedade ‘Olathe Pinto’ portando resistência ao vírus por meio da expressão de RNAs interferentes – RNAi (Faria et al., 2014).

Outros vírus têm sido detectados infectando feijoeiro comum por todo mundo e no Brasil, em 2011 foi feito o primeiro relato do Sida micrantha mosaic virus (SimMV), um begomovírus ocasionando mosaico e deformação foliar em amostras coletadas no Estado de Goiás (Fernandes-Acioli et al., 2011). Na Espanha, o begomovírus Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) foi relatado, em 1999, associado à doença do enrugamento da folha do feijoeiro, em plantios na região sul, além do crinivírus Lettuce chlorosis virus, em 2014, provocando sintomas de amarelecimento e mosaico internerval em *P. vulgaris* (Navas-Castillo et al., 1999, Ruiz et al., 2014). Outro begomovírus, o *Macroptilium yellow spot virus* (MaYSV) que infecta plantas daninhas do gênero *Macroptilium*, *Calopogonium* e *Canavalia* também já foi relatado em feijoeiro comum e feijão-lima (*P. lunatus*) na região nordeste do Brasil (Sobrinho et al., 2014).

2. Next Generation Sequencing (NGS) – sequenciamento de alto desempenho e abordagens de metagenômica

Uma nova era na microbiologia iniciou-se quando linhas de pesquisas foram desenvolvidas para demonstrar que apenas os organismos cultivados artificialmente não

representavam, de maneira adequada, toda a diversidade existente e que a diversidade dos microrganismos não cultiváveis poderia ser objeto de estudo. Neste contexto, surgiu a metagenômica tendo como ferramenta de análise sequências genômicas de diferentes microrganismos presentes em um dado ambiente (Handelsman, 2004). Em 1991, um trabalho pioneiro possibilitou conhecer a diversidade genética de organismos não cultiváveis, como plânctons marinhos por meio da clonagem direta de DNA extraído de amostras coletadas no Oceano Pacífico. A biblioteca de cDNA foi analisada por meio do sequenciamento de *amplicons* da subunidade ribossomal 16S gerados por meio da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) a partir dos fagos recombinantes previamente selecionados (Schmidt et al., 1991).

Microrganismos, populações e comunidades previamente desconhecidas e não caracterizadas têm sido minuciosamente estudados nos mais diversos tipos de ambientes, como oceanos, solos, drenagens de minas e intestinos de mamíferos. A metagenômica que surgiu como uma ferramenta capaz de trazer à luz da Ciência a diversidade permitiu também que questionamentos acerca da funcionalidade gênica desses novos microrganismos fossem respondidos, como o estabelecimento de rotas metabólicas, descoberta de genes responsáveis pela resistência a diferentes antibióticos, além da identificação de novas enzimas e antibióticos (Handelsman, 2004).

Os vírus não apresentam um gene em comum, ou marcadores filogenéticos tais como o 16S rRNA e, portanto, a metagenômica é viabilizada por meio de um enriquecimento viral das amostras e do sequenciamento randômico dos genomas presentes. Em 2002 publicou-se o primeiro trabalho empregando tal ferramenta em um estudo de diversidade em virologia através da análise de comunidades virais marinhas em San Diego, Califórnia, EUA (Breitbart et al., 2002).

Os estudos de diversidade viral acompanharam a microbiologia como um todo e passaram a ser feitos nos mais diferentes ambientes (solos, águas, intestino humano, sedimentos marinhos, entre outros). Graças às inovações tecnológicas que permitiram sequenciamentos massivos e de alta geração que dispensam a clonagem e a obrigatoriedade da análise somente de dsDNA, a metagenômica viral avançou muito nos últimos anos (Mokili et al., 2012).

O sequenciamento de alto rendimento, *Next Generation Sequencing* (NGS) é definido pelo emprego de plataformas que permitem o sequenciamento massal de amostras, gerando uma enorme quantidade de *reads* (sequências) em um curto intervalo de tempo. A necessidade de tal inovação surgiu pela urgência de métodos que permitissem o

sequenciamento, inclusive de genomas, de uma maneira mais econômica, eficaz e rápida em comparação com o sequenciamento automatizado nos modelos de Sanger de “primeira geração” (Barba et al., 2014).

Em 2004, foi lançada a primeira plataforma, a 454 Life Sciences que prometia custos até seis vezes menores em comparação com o sequenciamento de primeira geração. Após a aquisição da empresa pela Roche Company, diversas alterações foram feitas de modo que a cada novo lançamento tornava-se possível a obtenção de uma maior quantidade de dados, que inicialmente era de 20 milhões de pares de bases até chegar em 600 milhões na plataforma 454 GS-FLX + Titanium. Em 2005, foi desenvolvida a plataforma Solexa Genome Analyzer (GA) e posteriormente adquirida pela Illumina que após 2007, lançou a GAIIx com uma geração de mais de 50 bilhões de pares de bases por corrida. Desde então, a Illumina disponibilizou no mercado diferentes plataformas cada vez mais eficientes, garantindo cada vez maior quantidade de *reads* em menores tempos de corrida (Barba et al., 2014).

Diversas técnicas de diagnose podem ser empregadas para a detecção de vírus em plantas, como as moleculares (PCR, hibridização e microarranjo) e sorológicas (modalidades do *Enzyme linked immunosorbent assay* – ELISA), desde que se conheça previamente as espécies capazes de infectar a hospedeira em estudo. Além da necessidade desse conhecimento prévio, muitas dessas ferramentas apresentam especificidade de modo que não permitem a detecção de outras estirpes ou espécies presentes em uma dada amostra biológica (Adams et al., 2009).

Com o advento das novas tecnologias de sequenciamento *Next Generation Sequencing*-NGS (ou *high throughput sequencing*) esse obstáculo foi superado e permitiu também uma precisa detecção viral em casos de infecções mistas, já que com as metodologias tradicionais é comum que apenas as espécies mais abundantes ou de partículas mais facilmente visualizadas sejam identificadas (Adams et al., 2009).

Desde 2009 o NGS vem sendo empregado na virologia vegetal como ferramenta de estudo de replicação, transcrição, epidemiologia e principalmente identificação e caracterização como em trabalhos realizados com videira, *citrus* e batata-doce que resultaram na detecção de novos vírus, entre eles o Grapevine Syrah 1 virus (gênero *Marafivirus* e família *Tymoviridae*) (Al Rwahnih et al., 2009), Citrus chlorotic dwarf-associated virus (família *Geminiviridae*) (Loconsole et al., 2012), Citrus leprosis virus cytoplasmic type 2 (gênero *Cilevirus*) e Citrus vein enation virus (gênero *Enamovirus* e família *Luteoviridae*) (Vives et al., 2013).

Essa ferramenta de sequenciamento é caracterizada por apresentar um número massivo de dados, com alta qualidade, rápido desempenho e custo relativamente inferior ao de outras técnicas, como Sanger e por fornecer sequências dos mais diversos microrganismos presentes na amostra (Mokili et al., 2012, Adams et al., 2009). Além do emprego no estudo de diversidade e comportamento viral, o NGS pode ser adotado em medidas de controle de viroses em programas de certificação de material propagativo, bem como em análises quarentenárias (Barba et al., 2014).

Em 2016, a técnica foi empregada para detecção e estudo da diversidade viral existente no feijão caupi em amostras coletadas em áreas úmidas e secas em Burkina Faso. Os resultados mostraram a predominância de potyvírus, detectados em mais de 65% das amostras. Além disso, três novas espécies relacionadas aos gêneros *Polerovirus* (família *Luteoviridae*), *Tombusvirus* (família *Tombusviridae*) e *Mycotymovirus* (família *Tymoviridae*) foram encontradas (Palanga et al., 2016).

3. A família *Rhabdoviridae*

3.1 Características gerais e organização genômica da família *Rhabdoviridae*

A família *Rhabdoviridae* em conjunto com outras sete famílias (*Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Myonnaviridae*, *Nyamiviridae*, *Paramyxoviridae*, *Pneumoviridae* e *Sunviridae*) e cinco gêneros (*Anphevirus*, *Arlivirus*, *Chengtivirus*, *Crustavirus* e *Wastrivirus*) compõem a ordem *Mononegavirales* que apresenta vírus de importância para a agricultura, bem como saúde humana e animal e é caracterizada por genomas de RNA fita simples de senso negativo (ssRNA-) de 8.9 a 19 kb, monopartidos ou segmentados (Afonso et al., 2016).

Dentre os rhabdovírus (**Tabela 2**) existe uma grande diversidade de hospedeiros relatados, como plantas, animais aquáticos, artrópodes e mamíferos. O Indiana vesiculovirus, denominado anteriormente como Vesicular stomatitis virus – VSV (gênero *Vesiculovirus*) é um dos mais conhecidos por afetar gado, porcos e cavalos e vem sendo utilizado como um modelo preferencial de estudo. Outro vírus de grande importância, é o Rabies lyssavirus – RABV (gênero *Lyssavirus*), que o agente causal da raiva, responsável por mais de 25.000 mortes ao ano, em todo mundo, mesmo com a existência de vacinas eficazes (Blondel et al., 2015, Walker et al., 2015).

Recentemente estes vírus foram classificados em 13 diferentes gêneros aceitos pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* – ICTV, sendo nove reportados

infectando vertebrados e artrópodes: *Ephemerovirus*, *Lyssavirus*, *Novirhabdovirus*, *Perhabdovirus*, *Sigmavirus*, *Sprivirus*, *Tibrovirus*, *Tupavirus* e *Vesiculovirus* e quatro que infectam plantas: *Cytorhabdovirus*, *Dichorhavirus*, *Nucleorhabdovirus* e *Varicosavirus*. De modo geral os rhabdovírus apresentam genomas de 11 a 14.8 kb, sem poliadenilação, em sua maioria não segmentados e envelopados, com partículas de 100 a 430 nm de comprimento por 45 a 100 nm de diâmetro em formato de bala ou baciliformes (**Figura 1**) (Dietzgen et al., 2011, Dietzgen et al., 2017).

Em 2015, após a análise filogenética de uma das proteínas virais, a proteína L, (polimerase viral) propôs-se a criação de outros sete novos gêneros, que se comportaram como grupos monofiléticos distintos, com o objetivo de classificar alguns vírus que infectam morcegos, roedores, répteis, mosquitos e humanos sendo eles: *Almendravirus*, *Bahivírus*, *Curiovirus*, *Hapavirus*, *Ledantevirus*, *Sawgravivirus* e *Sripuvirus* que ainda não foram oficialmente aceitos pelo ICTV (Walker et al., 2015).

Tabela 2. Gêneros aceitos pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) e classificados na família *Rhabdoviridae*, suas espécies tipo, hospedeiros e tipos de transmissão.

Gênero	Espécie tipo	Hospedeiro	Transmissão
<i>Cytorhabdovirus</i>	Lettuce necrotic yellows cytorhabdovirus	Plantas	Afídeos e cigarrinhas
<i>Dichorhavirus</i>	Orchid fleck dichorhavirus	Plantas	Ácaros (<i>Brevipalpus</i> spp.)
<i>Ephemerovirus</i>	Bovine fever ephemerovirus	Gado	Mosquitos
<i>Lyssavirus</i>	Rabies lyssavirus	Morcegos e carnívoros	Ferimentos por animais infectados
<i>Novirhabdovirus</i>	Oncorhynchus 1 novirhabdovirus	Peixes	Água
<i>Nucleorhabdovirus</i>	Potato yellow dwarf nucleorhabdovirus	Plantas	Afídeos e cigarrinhas
<i>Perhabdovirus</i>	Perch perhabdovirus	Peixes	Água
<i>Sigmavirus</i>	Drosophila melanogaster sigmavirus	<i>Drosophila</i> spp.	Transmissão vertical
<i>Sprivivirus</i>	Carp sprivirus	Peixes	Água
<i>Tibrovirus</i>	Tibrogargan tibrovirus	Gado e bubalinos	Mosquitos
<i>Tupavirus</i>	Durham tupavirus	Ave e pequeno mamífero arborícola	-
<i>Varicosavirus</i>	Lettuce big-vein associated varicosavirus	Plantas	Fungos (<i>Olpidium</i> spp.)
<i>Vesiculovirus</i>	Indiana vesiculovirus	Mamíferos, peixes e insetos	Mosquitos, flebotomíneos e água (peixes)

Os vírus da família *Rhabdoviridae* têm seu RNA genômico (gRNA) composto por cinco genes canônicos dispostos na ordem 3'-N-P-M-G-L-5' e responsáveis por codificar as proteínas estruturais nucleoproteína, fosfoproteína, proteína matriz, glicoproteína e a polimerase, respectivamente. Nas extremidades, encontram-se duas regiões não transcritas a *leader* (*l*) a montante do gene N e a *trailer* (*t*) logo após o gene L que, além de apresentarem complementariedade nas porções mais terminais, possuem sequências que podem ser altamente conservadas dentre os rhabdovírus (**Figura 1**) (Jackson & Li, 2016).

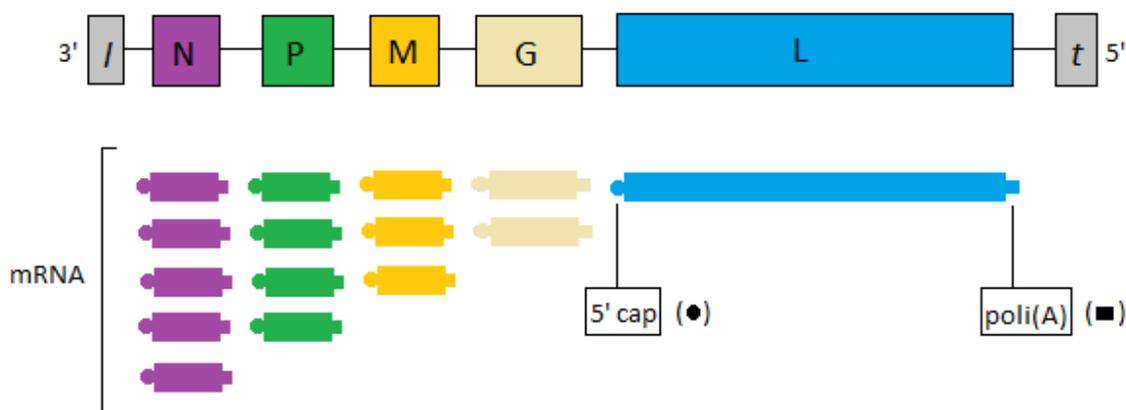


Figura 1. Organização genômica típica da família *Rhabdoviridae* em que *l* e *t* são as regiões não transcritas (*l* = *leader* e *t* = *trailer*) e N, P, M, G e L são, respectivamente, os genes estruturais que codificam a nucleoproteína, fosfoproteína, proteína matriz, glicoproteína e polimerase. Modelo de transcrição do tipo *start-stop* com a produção decrescente dos mRNAs monocistronicos apresentando o 5' cap e a cauda poli (A).

A proteína N (nucleoproteína) é a mais abundante no nucleocapsídeo (NC: capa proteica e ácidos nucléicos virais formado pelas três proteínas essenciais N, P e L) e está relacionada com a regulação entre transcrição e replicação do vírus através de alterações na conformação do NC e conseqüente exposição do genoma à atuação da polimerase (L). Além disso, pode ser responsável pela ativação de mecanismos de defesa nas células hospedeiras, como a produção de anticorpos. A funcionalidade da proteína é garantida devido à ligação que é imediatamente formada com a fosfoproteína (P) a fim de que não se forme o complexo N-N nem com proteínas celulares do hospedeiro. A fosfoproteína, ao se fundir com a polimerase, promove a correta ligação dessa enzima ao RNA garantindo que todo o processo ocorra adequadamente. Desta forma, a fosfoproteína é considerada um cofator da proteína L. A polimerase é a proteína viral sintetizada em menor quantidade em comparação às demais. Suas funções consistem na síntese da cauda poli (A) e do 5' capping durante a transcrição e em sua atividade de RNA polimerase dependente de RNA (RNA-

dependent RNA polymerase: RdRp) na replicação viral (Jackson & Li, 2016, Dietzgen et al., 2011).

O gene M codifica a proteína matriz que, além de regular o processo de replicação, garante a morfogênese viral atuando na formação e condensação do NC, que ao passar pela membrana plasmática celular adquire o envelope e as glicoproteínas. A glicoproteína está fortemente relacionada à patogenicidade, tendo em vista que sua presença é de suma importância para a penetração (por endocitose) da partícula de vírus nas células animais e no reconhecimento vírus-vetor (Dietzgen et al., 2017, Jackson & Li, 2016, Dietzgen et al., 2011).

Em 2015, após o desenvolvimento do primeiro clone infeccioso de vírus de planta de senso negativo, o *Sonchus yellow net virus* – SYNV (gênero *Nucleorhabdovirus* e família *Rhabdoviridae*) ficou demonstrado que a glicoproteína aparenta ser essencial para a morfogênese, pois quando essa proteína foi deletada do clone muitas partículas pequenas, não envelopadas e de formato divergente foram observadas nos viroplasmatas (Wang et al., 2015).

Além dos genes essenciais, existem os acessórios cuja presença varia dentre os gêneros ou espécies. Esses genes acessórios situam-se, geralmente, entre N-P, P-M, M-G ou G-L (Jackson & Li, 2016). Mais de 35 genes acessórios já foram relatados na família e são caracterizados por codificarem proteínas que apresentam diferentes funções, mas que são dispensáveis à replicação viral, como a regulação de vias metabólicas, supressores de silenciamento gênico ou de defesa inata do hospedeiro, além do movimento viral a curta distância, ou célula-a-célula (Walker et al., 2011). Muitos desses genes ainda não foram funcionalmente caracterizados, porém dentre os rhabdovírus que infectam plantas vêm sendo estudados e alguns já foram caracterizados como codificadores de proteínas de movimento, como o P3 em *Lettuce necrotic yellows cytorhabdovirus* (LNYV) e *Alfalfa dwarf cytorhabdovirus* (ADV) e o sc4 presente em *Sonchus yellow net nucleorhabdovirus* (SYNV) (Wang et al., 2015, Mann et al., 2016).

Espécies de rhabdovírus possuem o mecanismo *start-stop* que consiste na transcrição de genes individualmente, pois cada região intergênica consiste em três porções: **(1)** uma sequência de nucleotídeos rica em uracila responsável pela síntese da cauda poli(A) no RNA mensageiro (AUUNUUUUU) e consequente parada da transcrição; **(2)** uma pequena e variável sequência que não é transcrita (GNN) e **(3)** a região (UUG) que sinaliza o início da transcrição que consequentemente formará as primeiras bases no mRNA (Dietzgen et al., 2011).

3.2 A transcrição e replicação de rhabdovírus

Vírus de RNA senso negativo carregam, em suas partículas, proteínas estruturais essenciais (N, P e L) que em associação com o genoma que formam o nucleocapsídeo, dos rhabdovírus. Para que ocorra o início do processo de transcrição e consequente síntese do mRNA (apresenta sequência nucleotídica complementar ao genoma e servirá como molde para a tradução e formação das proteínas virais). Tal característica difere dos vírus de senso positivo, pois esses possuem RNAs genômicos (gRNA) que podem ser traduzidos imediatamente após a desencapsidação uma vez que apresentam a mesma sequência que o mRNA e assim serem prontamente infectivos (Jackson & Li, 2016, Mann & Dietzgen, 2014).

Conforme mencionado anteriormente, a transcrição dos rhabdovírus ocorre por meio de um mecanismo conhecido como *start-stop* estudado que consiste na síntese de mRNAs monocistrônicos (ou seja, codifica apenas uma proteína) individuais para cada gene. Uma forma transcriptase da polimerase liga-se, primeiramente, à região 3' *leader* e inicia a síntese do mRNA do gene N e posteriormente dos demais genes em quantidades decrescentes, com 5' cap e cauda poli (A) em todos eles. Após a formação da cauda poli (A), o complexo da polimerase perde aproximadamente 30% de suas moléculas e com isso a síntese de mRNA torna-se decrescente ao longo do genoma viral (**Figura 1**) (Schnell et al., 1996, Jackson & Li, 2016).

A replicação viral inicia-se após a detecção da elevação nos níveis das proteínas N e P, quando então a forma replicativa da polimerase é ativada e liga-se à região 3' do genoma sintetizando a fita de RNA antígenômico (agRNA). Em seguida à produção dos agRNAs, ocorre a encapsidação desses por meio da ação do complexo proteico N:P:L e uma consequente redução nas taxas dessas proteínas solúveis (que passam a ser recuperadas após novas etapas de transcrição). Durante esse processo, o excesso de nucleocapsídeos promove a formação de viroplasmas, bem como a acumulação da proteína M que passa a enovelar os gRNAs formados (Jackson & Li, 2016, Mann & Dietzgen, 2014).

De modo geral, a transcrição e a replicação ocorrem de maneira semelhante entre os vírus da família. As diferenças consistem no sítio de replicação e enovelamento da partícula que pode ser citoplasmático (todos os gêneros exceto *Nucleorhabdovirus* e *Dichorhavirus*) ou nuclear. Os nucleorhabdovírus são transcritos e replicados no interior do núcleo, porém o mRNA é liberado no citoplasma, onde ocorre a tradução e síntese das proteínas e essas retornam, então, ao núcleo por meio de vias de ação de importinas α / β que são proteínas

envolvidas no movimento de moléculas entre núcleo e citoplasma através dos poros nucleares (Lott & Cingolani, 2011, Mann & Dietzgen, 2014, Dietzgen et al., 2017).

A morfogênese (momento em que a partícula recebe o envelope) varia de acordo com o gênero, podendo ocorrer na membrana plasmática (no caso de vírus como VSV); no entorno do retículo endoplasmático (cytorhabdovírus); ou no núcleo (em nucleorhabdovírus). Após a maturação do vírus, seu movimento no hospedeiro pode ocorrer por meio de lise celular (quando se trata dos vírus que infectam animais), pela alimentação de insetos vetores em células de plantas infectadas e transmissão para plantas saudáveis, ou ainda por meio da ação de proteínas de movimento que permitem o transporte de partículas virais para as células adjacentes por meio dos plasmodesmas (canais presentes nas paredes celulares de plantas que permitem a conexão entre células vizinhas) (Mann & Dietzgen, 2014).

3.3 Os gêneros da família *Rhabdoviridae* que infectam plantas

3.3.1 Os gêneros *Cytorhabdovirus* e *Nucleorhabdovirus* com vírus de genoma monopartido

Dois são os gêneros de *Rhabdoviridae*, nos quais se encontram espécies não segmentadas capazes de infectar plantas, o *Cytorhabdovirus* e o *Nucleorhabdovirus*. De modo geral, ambos possuem espécies vegetais (monocotiledôneas e dicotiledôneas) como hospedeiros e o envolvimento de artrópodes como insetos vetores. A transmissão natural dessas espécies ocorre, de maneira geral, pela ação de afídeos e cigarrinhas. Não existem evidências da propagação por sementes. Algumas espécies podem ser artificialmente transmitidas via inoculação mecânica. O genoma desses vírus apresenta de 12 a 14,5 kb com seis a dez genes distintos: os cinco canônicos (N, P, M, G e L) e outros acessórios, como P3 e sc4, dependendo da espécie (Dietzgen et al., 2011, Jackson et al., 2005).

A diferenciação entre os gêneros estabeleceu-se com base nos locais de replicação viral, formação e maturação das partículas nas células hospedeiras podendo ser no citoplasma para os vírus classificados em *Cytorhabdovirus*, ou no núcleo para aqueles agrupados em *Nucleorhabdovirus*. Aspectos moleculares como a hibridização de ácidos nucleicos e análises de sequências genômicas desses vírus vêm corroborando com a distinção entre os gêneros segundo seus efeitos citopatológicos (Dietzgen et al., 2011, Dietzgen et al., 2017).

Atualmente, cada gênero comporta dez espécies distintas aceitas pelo ICTV, (**Tabela 3**), sendo Lettuce necrotic yellows cytorhabdovirus (LNyV) e Potato yellow dwarf

nucleorhabdovirus (PYDV) as espécies tipo. A distinção entre as espécies em cada gênero é feita seguindo critérios biológicos como a gama de hospedeiras e insetos vetores, porém análises filogenéticas realizadas a partir de sequências parciais ou totais dos genomas têm auxiliado nessa diferenciação, embora ainda não representem critérios suficientes para a demarcação de espécies. Oito espécies de *Cytorhabdovirus* e nove de *Nucleorhabdovirus* tiveram seus RNAs completamente sequenciados, o que dificulta a classificação e taxonomia dos gêneros que infectam plantas exclusivamente por meio das análises moleculares (Dietzgen et al., 2017, Dietzgen et al., 2011).

A espécie tipo LNYV é transmitida, principalmente, pelo afídeo *Hyperomyzus lactucae* além do *H. carduellimus* e é responsável pelo surgimento de sintomas de necroses, escurecimento das nervuras, amarelecimento e nanismo em plantas de alface na Austrália e Nova Zelândia, onde foi inicialmente relatado, bem como em alguns países europeus. Naturalmente, o vírus pode infectar outras espécies botânicas de interesse econômico como alho (*Allium sativum*) e grão de bico (*Cicer arietinum*) e ainda a espécie espontânea serralha (*Sonchus oleraceus*). O genoma viral de 12.8 kb apresenta uma ORF entre os genes P e M, a 4b que codifica uma provável proteína de movimento (Higgins et al., 2016b).

Em 2010, em campos de alfafa (*Medicago sativa*) na Argentina, foi detectada a presença de um vírus de partícula baciliforme que em associação com o Alfalfa mosaico vírus – AMV (gênero *Alfamovirus* e família *Bromoviridae*) induzia sintomas de nanismo e enrugamento foliar ocasionando, juntos, perdas de produtividade de até 30%. Após a detecção, o vírus foi caracterizado e aceito pelo ICTV, em 2015, como um *Cytorhabdovirus* por meio de análises filogenéticas baseadas em sequências parciais dos genes N e L. O novo vírus, Alfalfa dwarf cytorhabdovirus (ADV) transmitido por *Aphis craccivora* apresenta um genoma de 14.5 kb com dois genes acessórios, P3 (proteína de movimento) e P6 (proteína de função desconhecida) situados entre P-M e G-L, respectivamente. O sítio de expressão das proteínas de ADV em células de *Nicotiana benthamiana*, foi o citoplasma, enquanto a proteína P mostrou-se presente somente no núcleo, resultado esse diferente do obtido para a mesma proteína de LNYV e semelhante ao de PYDV, indicando assim que esse vírus possui características relativas aos dois gêneros (Bejerman et al., 2015).

O RNA de PYDV apresenta ≈ 12.9 kb e é composto pelos genes essenciais, as ORFs X (proteína de função desconhecida situada entre N e P) e Y (localizada entre P e M codifica uma proteína de movimento) e as regiões não transcritas 3' *leader* e 5' *trailer*

com baixa taxa de complementariedade e tamanhos de 149 e 97 nucleotídeos, respectivamente. O vírus que é transmitido por cigarrinhas das espécies *Agallia constricta* e *Aceratagallia sanguinolenta*, ao infectar plantas de batata (*Solanum tuberosum*), provoca na parte apical um intenso amarelecimento e nos tubérculos podem ocorrer deformações e rachaduras (Dietzgen et al., 2011, Bandyopadhyay et al., 2010). Embora seja PYDV a espécie tipo de *Nucleorhabdovirus*, *Sonchus yellow net nucleorhabdovirus* (SYNV) tornou-se o vírus mais estudado do gênero (Mann & Dietzgen, 2014). Até 2015 não se tinha relatos de clonagens bem sucedidas de cDNA de vírus de planta de senso negativo, quando então um clone infectivo de SYNV foi obtido (Wang et al., 2015). Células de *Agrobacterium* foram infiltradas em *N. benthamiana* após serem utilizadas para a transcrição do agRNA e expressão de proteínas virais como, L, N e P (Wang et al., 2015).

Tabela 3. Vírus da família *Rhabdoviridae* atualmente reconhecidas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) e classificadas nos gêneros *Cytorhabdovirus* e *Nucleorhabdovirus*, bem como os tipos de plantas que infectam e seus insetos vetores (quando já conhecidos).

Gênero	Vírus	Hospedeira	Inseto Vetor
<i>Cytorhabdovirus</i>	Alfalfa dwarf cytorhabdovirus	Dicotiledônea	Aphididae: <i>Aphis craccivora</i>
	Broccoli necrotic yellows cytorhabdovirus		Aphididae: <i>Brevicoryne brassicae</i>
	Lettuce necrotic yellows cytorhabdovirus		Aphididae: <i>Hyperomyzus lactucae</i> e <i>H. carduellimus</i>
	Lettuce yellow mottle cytorhabdovirus		-
	Sonchus cytorhabdovirus 1		-
	Strawberry crinkle cytorhabdovirus		Aphididae: <i>Chaetosiphon spp</i>
	Wheat American striate mosaic cytorhabdovirus		Cicadellidae: <i>Elymana virescens</i> , <i>Endria inimica</i>
	Barley yellow striate mosaic cytorhabdovirus	Monocotiledônea	Delphacidae: <i>Laodelphax striatellus</i>
	Festuca leaf streak cytorhabdovirus		-
	Northern cereal mosaic cytorhabdovirus		Delphacidae: <i>Laodelphax</i> , <i>Muellrianella</i> , <i>Ribautodelphax</i> , <i>Unkanodes</i>
<i>Nucleorhabdovirus</i>	Datura yellow vein nucleorhabdovirus	Dicotiledônea	-
	Eggplant mottled dwarf nucleorhabdovirus		Cicadellidae: <i>Agallia vorobjevi</i>
	Potato yellow dwarf nucleorhabdovirus		Cicadellidae: <i>Agallia constricta</i> , <i>A. quadripunctata</i> , <i>Aceratagallia sanguinolenta</i>
	Sonchus yellow net nucleorhabdovirus		Aphididae: <i>Aphis coreopsis</i>
	Sowthistle yellow vein nucleorhabdovirus		Aphididae: <i>Hyperomyzus lactucae</i>
	Maize fine streak nucleorhabdovirus	Monocotiledônea	Cicadellidae: <i>Graminella nigrifrons</i>
	Maize Iranian mosaic nucleorhabdovirus		<i>Ribautodelphax notabilis</i> e <i>Pregrinus maidis</i>
	Maize mosaic nucleorhabdovirus		Delphacidae: <i>Peregrinus maidis</i>
	Rice yellow stunt nucleorhabdovirus		Cicadellidae: <i>Nephotettix spp.</i>
	Taro vein chlorosis nucleorhabdovirus		-

3.3.2 Os gêneros *Dichorhavirus* e *Varicosavirus* com vírus de genoma bipartido

A leprose dos citrus é caracterizada pelo surgimento de sintomas localizados como lesões nas folhas, frutos e ramos; perda na produção devido à queda prematura e intensa de frutos e folhas e também pela seca ou morte de ramos e até da planta como um todo. O Citrus leprosis virus foi definido como agente causal da doença e foi diferenciado em duas espécies: Citrus leprosis virus N (CiLV-N) e o Citrus leprosis virus C (CiLV-C). A subdivisão foi estabelecida devido à diferença na severidade de sintomas e no local de replicação viral e acúmulo de partículas: núcleo ou citoplasma. Após o sequenciamento do genoma completo de CiLV-C (um vírus de RNA fita simples, bipartido e de senso positivo) esse foi classificado dentro do gênero *Cilevirus* (Kitajima et al., 2011).

No 9th Report of the *International Committee on Taxonomy of Viruses* – ICTV o CiLV-N era sequer mencionado na relação de espécies virais. Em 2014, foi proposta a criação do gênero *Dichorhavirus* na família *Rhabdoviridae* com a finalidade de agrupar vírus baciliformes de RNA fita simples, bipartido e de senso negativo transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* (Tenuipalpidae) como o Orchid fleck virus (OFV), Coffee ringspot virus (CoRSV), Clerodendrum chlorotic spot virus (CICSV) e o tipo nuclear do Citrus leprosis virus (CiLV-N). Após o sequenciamento de um isolado mexicano, o CiLV-N passou a ser definido como uma estirpe do OFV com identidade de ácidos nucleicos acima de 90% e de aminoácidos acima de 93% (Dietzgen et al., 2014, Roy et al., 2013). O OFV é caracterizado por induzir sintomas de manchas e anéis cloróticos a necróticos em orquídeas. OFV é conhecido desde 1969, quando foi descrito no Japão infectando plantas do gênero *Cymbidium*. A transmissão do vírus é feita por ninfas e adultos de *B. phoenicis* e *B. californicus*, infectando mais de 50 espécies de orquídeas em todo mundo. O genoma do OFV é composto pelo RNA 1 com 6,4 kb que codifica o nucleocapsídeo (N), fosfoproteína (P), uma provável proteína de movimento (3), proteína matriz (M) e uma glicoproteína (G) e o RNA 2 com 6 kb responsável pela síntese da polimerase (L). Diferentemente dos demais rhabdovírus, o OFV e o CoRSV apresentam partículas menores e sem envelope aparente. Análises dos genes N e L de OFV mostram que o vírus é filogeneticamente mais próximo aos *Nucleorhabdovirus*, bem como as análises citológicas em que é possível detectar a presença de viroplasmas no núcleo das células hospedeiras (Peng et al., 2013, Dietzgen et al., 2014).

O CoRSV foi relatado primeiramente no Brasil, em 1938, ocasionando lesões locais como anéis cloróticos em folhas e frutos de cafeeiros. Atualmente, o CoRSV encontra-se amplamente disperso no país, principalmente, em campos de café arábica (*Coffea arabica*)

(Ramalho et al., 2016). A incidência do CoRSV tem aumentado nos últimos anos devido a predominância de clima seco nas regiões produtoras o que favorece o desenvolvimento do ácaro vetor *B. phoenicis*. A multiplicação mais intensa do vetor também influencia na ampliação da gama de plantas espontâneas hospedeiras.

Em 2016, uma atualização taxonômica feita na ordem *Mononegavirales* no ICTV oficializou a criação do gênero *Dichorhavirus* a fim de classificar o CoRSV e OFV. OFV foi definida como a espécie tipo do gênero por ter sido a primeira a ser completamente sequenciada e pelo maior volume disponível de informações sobre características biológicas e moleculares. Além disso, definiu-se também o critério para diferenciação entre espécies no gênero: diferença acima de 25% na sequência nucleotídica do gene L (Afonso et al., 2016).

O gênero *Varicosavirus* possui apenas um vírus, Lettuce big-vein associated virus (LBVaV) encontrada em infecções latentes em pés de alface e geralmente em infecções mistas com o Mirafiori lettuce big-vein virus (MiLBVV), um *Ophiovirus* (*Ophioviridae*) de ssRNA senso negativo com quatro segmentos e responsável pela doença em que as plantas crescem mais lentamente e suas nervuras assumem uma forma dilatada e descolorida. Ambos os vírus são transmitidas por zoósporos do gênero *Olpidium* nos quais os vírus podem permanecer indefinidamente, ou enquanto os esporos remanescentes no solo forem viáveis (Verbeek et al., 2013).

O genoma do LBVaV está inserido em partículas virais flexuosas não envelopadas e apresenta dois segmentos, o RNA 1 (6,8 kb) com duas ORFs, sendo a segunda codificadora da polimerase (L) de 232 kDa e o RNA 2 (6,1 kb) com 5 ORFs, sendo a primeira referente à proteína capsidial e as demais com funções ainda desconhecidas. O vírus possui uma estirpe capaz de infectar plantas de fumo, Tobacco stunt virus (TSStV), definida segundo análises filogenéticas de identidades de ácidos nucleicos e aminoácidos. A espécie pode ser transmitida mecanicamente em baixas taxas de eficiência e não é transmitida por sementes (Dietzgen et al., 2011).

O gênero *Varicosavirus* (que até pouco tempo não havia sido alocado em nenhuma família) aparece no ICTV Taxonomy Release (2015) inserido na família *Rhabdoviridae* devido às suas características moleculares como a presença de sinais para síntese da cauda poli (A) nos mRNAs (conforme modelo de transcrição predominante entre os rhabdovirus), além dos aminoácidos codificados pelos genes N e L se mostrarem semelhantes aos demais vírus da família, em especial os cytorhabdovírus (Anonymous, Afonso et al., 2016).

3.4 Genética reversa e a obtenção de um clone infeccioso de vírus ssRNA senso negativo: *Sonchus yellow net cytorhabdovirus* (SYNV)

A estratégia denominada de “genética reversa” tem sido empregada, desde o surgimento da técnica do DNA recombinante na década de 1970, na geração de vírus contendo genomas oriundos de clones de cDNA. Genética reversa foi também empregada para vírus de RNA senso negativo das famílias *Bunyaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae* e *Rhabdoviridae* (Neumann et al., 2002). Os primeiros trabalhos não obtiveram o vírus completamente originado da clonagem do cDNA, como no caso do Influenza A virus (gênero *Influenzavirus A* e família *Orthomyxoviridae*) que além dos oito segmentos característicos da espécie foi adicionado outro contendo uma região do gene NS flanqueada com a ORF (*open reading frame*) do gene do chloramphenicol acetyltransferase (CAT) na fita antisenso (Luytjes et al., 1989).

Em 1994, produziu-se o primeiro vírus completamente formado de um cDNA clonado, o Rabies lyssavirus (gênero *Lyssavirus* e família *Rhabdoviridae*). Plasmídeos distintos expressando as proteínas N, P, L, o cDNA total, bem como um recombinante Vaccinia virus (gênero *Orthopoxvirus* e família *Poxviridae*) portador da polimerase T7 foram cotransferidos para células de hamster (BHK-21) e a replicação e transcrição viral ocorreram com sucesso (Schnell et al., 1994). No ano seguinte, a partir da utilização de uma estratégia similar, obteve-se o Indiana vesiculovirus (gênero *Vesiculovirus* e família *Rhabdoviridae*) (Whelan et al., 1995).

Ao mudar o campo de estudo da clonagem de vírus que infectam animais para aqueles que têm plantas como hospedeiros, o cenário também muda. Além das dificuldades inerentes à recuperação de vírus originados de cDNA, as plantas possuem características próprias que dificultam os procedimentos da clonagem, como a presença de parede celular, ausência do sistema de expressão da polimerase T7 e a deficiência de culturas de células ideais para a replicação viral (Wang et al., 2015). Apesar dessas limitações, para algumas espécies virais de RNA têm-se relatado sucesso na obtenção de clones infecciosos. O primeiro clone de cDNA desse tipo de vírus foi obtido com a espécie Brome mosaic virus (gênero *Bromovirus* e família *Bromoviridae*) que tem genoma senso positivo de RNA (Ahlquist & Janda, 1984). Posteriormente, obteve-se o clone de Tobacco mosaic virus – TMV (gênero *Tobamovirus* e família *Virgaviridae*) (Dawson et al., 1986); Apple chlorotic leaf spot virus – ACLSV (gênero *Trichovirus* e família *Betaflexiviridae*) (Youssef et al., 2011); Grapevine Algerian latent virus – GALV (gênero *Tombusvirus* e

família *Tombusviridae*) (Lovato et al., 2014); Lettuce mosaic virus – LMV (gênero *Potyvirus* e família *Potyviridae*) (Bordat et al., 2015); Tomato blistering mosaic virus – ToBMV (gênero *Tymovirus* e família *Tymoviridae*) (Blawid & Nagata, 2015), todos de RNA senso positivo.

Até 2015 não havia relatos de clones infecciosos para vírus de plantas com genoma ssRNA negativo. Recentemente, Wang et al. (2015) obtiveram um de clone infeccioso do nucleorhabdovírus *Sonchus yellow net virus* – SYNV. Para a obtenção de infecção sistêmica em *N. benthamiana*, foi necessário a co-infiltração de culturas de *Agrobacterium* com vetores binários contendo o genoma completo do SYNV e as “core proteins” virais L (polimerase viral), N (nucleoproteína) e P (fosfoproteína) e vetor contendo um cassete de expressão de um gene viral de proteína supressora de silenciamento gênico heteróloga (no caso TBSVp19, BSMV γ b e TEV P1/HC-Pro). Entretanto, para obtenção de eficiência maior que 20% de infecção, foram necessários também que os três cassetes de expressão de L, N e P estivessem em um mesmo vetor, co-infiltração com vetor contendo apenas L, vetores contendo TBSVp19, BSMV γ b e TEV P1/HC-Pro, e vetor com genoma completo do vírus. O desenvolvimento de clone infeccioso e sistema de genética reversa para o rhabdovírus SYNV permitiu a investigação de aspectos fundamentais da biologia e patogênese do vírus e mutagênese dos genes sc4, M e G geraram informações importantes sobre os efeitos destes genes no movimento e morfogênese deste vírus.

Atualmente, o conhecimento acerca de vírus de RNA que infectam plantas é mais amplo e concreto quando se trata daqueles de genoma positivo, tendo em vista que os estudos conduzidos com os de gRNA negativo são baseados em comparações com vírus de animais, além de análises de genes ou proteínas isoladas que geralmente são superexpressas em células vegetais. No estudo da biologia de um determinado vírus, do ponto de vista molecular, é altamente desejável que um clone infeccioso seja disponível, de forma que permita a mutação de regiões específicas, permitindo o estudo da função destas regiões assim como estudos moleculares da interação com o hospedeiro (Jackson & Li, 2016).

4. Transmissão de vírus que infectam plantas via vetores

A transmissão dos vírus que infectam plantas, de modo geral, ocorre pela ação de vetores como fungos, nematóides e artrópodes (ácaros e insetos). As relações estabelecidas entre vírus-vetores podem, primeiramente, ser classificadas em dois tipos,

circulativa e não circulativa, que diferem entre si pelo nível de penetração das partículas virais nos tecidos e órgãos dos insetos (Blanc & Michalakis, 2016).

Os vírus que se mantêm restritos à cutícula do aparelho bucal de artrópodes vetores, ou mais especificamente, no estilete podem ser definidos como não circulativos. Vetores deste grupo estão associados com a transmissão de vírus das famílias *Potyviridae* e *Caulimoviridae* (dentre os que infectam plantas) e *Caliciviridae* e *Poxviridae* (infectando vertebrados). Por mais que as partículas não ultrapassem as barreiras mais externas ao corpo do artrópode, essa relação entre ambos não ocorre ao acaso e é mediada pela ação de proteínas codificadas pelo vírus que favorecem à ligação com o vetor, como a P2 em Cauliflower mosaic virus (gênero *Caulimovirus* e família *Caulimoviridae*), um vírus não circulativo que pode permanecer no estilete de afídeos por horas (Drucker & Then, 2015).

Quando um inseto vetor insere seu estilete em uma planta infectada e ingere, juntamente à seiva, partículas virais que são encaminhadas para o aparelho digestivo, circulam na hemolinfa, se acumulam na glândula salivar e por fim retornam ao aparelho bucal, a relação entre esse e o vírus é denominada circulativa. Tal classificação apresenta ainda uma subdivisão que consiste na diferenciação entre os vírus capazes de se replicarem ou não no vetor podendo, então, serem propagativos ou não-propagativos, respectivamente (Blanc & Michalakis, 2016).

Vírus das famílias *Geminiviridae*, *Luteoviridae* e *Nanoviridae* são conhecidos por não se replicarem nem serem transcritos em células de seus vetores. Os luteovírus circulam pelo corpo do afídio vetor envoltos em vesículas, que garantem que não haja o contato com a maquinaria citoplasmática e consequente transcrição e/ou replicação viral. Porém esse mecanismo, até o momento, não foi demonstrado para as outras duas famílias, instigando assim o debate sobre a possibilidade desses vírus serem propagativos (Sicard et al., 2015).

Um trabalho recente apontou que o begomovírus monopartido originário do Velho Mundo Tomato yellow leaf curl virus – TYLCV (um vírus de DNA de fita simples responsável por grandes perdas no cultivo do tomateiro) é capaz de se replicar em seu vetor *B. tabaci* (Pakkianathan et al., 2015). Em 2016, outro trabalho demonstrou que o TYLCV não se replica em *B. tabaci*, tendo em vista que novos testes foram empregados para quantificar a acumulação do genoma viral e antiviral no corpo do inseto por meio do método *two-step* qPCR. Os resultados mostraram que, após 96 horas do início do período de aquisição viral, não ocorre uma elevação do acúmulo de partículas na mosca branca (Sanchez-Campos et al., 2016).

A grande maioria dos vírus que infectam células animais apresenta relação caracterizada como circulativa propagativa com seus insetos vetores como moscas, mosquitos e flebotomíneos. No entanto, dentre aqueles que infectam plantas, tal característica é menos frequente. Transmissão propagativa foi constatada em vírus com genoma de RNA trisegmentado, com fita simples negativa ou *ambisense* pertencente as famílias *Bunyaviridae* (gênero *Tospovirus*) (transmitidos por tripes), *Reoviridae* (vírus de fita dupla de RNA com genoma segmentado em 9 a 12 fragmentos classificados nos gêneros *Fijivirus*, *Oryzavirus* e *Phytoreovirus* e que são transmitidos por cigarrinhas) e *Rhabdoviridae* (Blanc & Michalakakis, 2016, Dietzgen et al., 2011).

A transmissão de rhabdovírus que infectam plantas ocorre por meio da ação de artrópodes vetores como afídeos, cigarrinhas e ácaros (exceto no gênero *Varicosavirus* em que os vetores são fungos do gênero *Olpidium*) (**Tabelas 2 e 3**). Nesses casos, existe uma relação de grande especificidade em que apenas um tipo ou espécie de vetor é capaz de transmitir um determinado vírus. Desta forma, é possível estabelecer uma forte correlação entre a detecção viral com a presença de seu vetor no campo (Jackson et al., 2005). A hipótese de alta especificidade obteve evidências mais fortes após estudos que sugerem a integração de sequências de rhabdovírus que infectam animais nos genomas dos seus vetores (Fort et al., 2012). A integração de vírus de planta ao genoma do vetor ainda não foi estabelecida, mas existem relatos de sequências gênicas semelhantes a rhabdovírus integradas em genomas de solanáceas (Mann & Dietzgen, 2014, Chiba et al., 2011).

O principal vírus da cultura do feijoeiro comum no Brasil é o BGMV que tem como vetor uma de suas principais pragas, a mosca branca. Em 2014, a Instrução Normativa nº 15, de 16 de junho do MAPA definiu o estabelecimento do vazio sanitário anual, que consiste na total ausência de qualquer planta de *P. vulgaris* por um período de 30 dias (iniciando em 5 de setembro nos municípios do norte de Goiás e a partir de 20 de setembro no Distrito Federal, diversos municípios do estado de Minas Gerais e parte sul de Goiás) com o intuito de reduzir a população de mosca branca e conseqüentemente reduzir os prejuízos ocasionados pelo BGMV nas safras subsequentes.

A mosca branca, *B. tabaci* é um inseto classificado na ordem Hemiptera, família Aleyrodidae e se caracteriza por indivíduos medindo menos que 3 mm, de corpo amarelo, asas brancas cobertas com uma cera pulverulenta branca e por apresentar dimorfismo sexual. As fêmeas são maiores que os machos e, dependendo das condições ambientais, podem ovipositar até 300 ovos por ciclo agrupados na face abaxial das folhas. Após a

eclosão, os estádios sucessores são os ninfais de 1º, 2º, 3º e 4º ínstaes e por fim, a fase adulta que é a única capaz de se locomover entre plantas distintas, seja a curta distância por meio do voo, ou à longa por meio da ação do vento ou em material propagativo contaminado (Navas-Castillo et al., 2011).

Muito se questionou acerca da possibilidade da *B. tabaci* representar um grupo de espécies ou uma espécie complexa. Hoje, o que se sabe é que há um complexo contendo aproximadamente 36 espécies crípticas que não diferem morfológicamente entre si e sendo assim, a diferenciação entre esses diversos biótipos pode ser feita no âmbito genético, comportamental, na eficiência como vetor, além da colonização por endossimbiontes (van Brunschot et al., 2014, da Fonseca Barbosa et al., 2015).

A mosca branca apresenta um grande número de hospedeiras, mais de 500 espécies, cultivadas ou não, em regiões tropicais e subtropicais. A maioria das plantas hospedeiras encontra-se nas famílias Euphorbiaceae, Solanaceae, Malvaceae, Fabaceae e Compositae (Sottoriva et al., 2014, Chen et al., 2016, Gilbertson et al., 2015). Por apresentar hábito alimentar sugador, o inseto insere seu aparelho bucal nos tecidos de sua hospedeira de modo a alcançar a seiva elaborada no floema e desse modo, ocasiona uma depauperação da planta. Além da sucção, a mosca branca pode estimular o crescimento de fumagina devido à substância açucarada por ela liberada e, conseqüentemente reduzir a área fotossintética. Apesar disso, os danos indiretos são os que mais afetam as culturas, tendo em vista que as viroses são capazes de reduzir significativamente as produções (Navas-Castillo et al., 2011).

Em muitas regiões do mundo, a presença dos biótipos nativos de *B. tabaci* tornou-se menos significante a partir da invasão de *B. tabaci Middle East Asia Minor 1* (MEAM1 ou antigo biótipo B) e *B. tabaci Mediterranean* (MED ou antigo biótipo Q) (van Brunschot et al., 2014). No Brasil, MEAM1 foi introduzido em 1990 e, desde então, tem se mostrado como importante praga em espécies hortícolas, sendo responsável tanto pelos danos diretos ocasionados por sua alimentação, como os indiretos pela transmissão de espécies de begomovirus que ocasionam clorose, nanismo, amarelecimento, mosaico e alterações na conformação foliar (Inoue-Nagata et al., 2016). O biótipo Q foi relatado pela primeira vez no país, em 2015, em coletas realizadas na área de fronteira entre o Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai (da Fonseca Barbosa et al., 2015).

A mosca branca atua como vetor de mais de 300 espécies virais de genomas de fita simples de DNA como os begomovirus (*Geminiviridae*) e de ssRNA positivo classificadas, atualmente, em quatro diferentes gêneros: *Ipomovirus* (família

Potyviridae), *Crinivirus* (família *Closteroviridae*), *Carlavirus* (família *Betaflexiviridae*) e *Torradovirus* (família *Secoviridae*) que infectam de modo geral, com maior importância, tomate, mandioca, batata doce e algodão (Gilbertson et al., 2015). Algumas das espécies transmitidas já foram listadas como os vírus de maior importância dentre os que infectam plantas, como os begomovírus TYLCV, African cassava mosaic virus (ACMV), East African cassava mosaic virus (EACMV) e South African cassava mosaic virus (SAMV) (Scholthof et al., 2011, Rybicki, 2015). No entanto, não existem relatos formais da mosca branca atuando como inseto vetor de membros da família *Rhabdoviridae*.

CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DO BEAN ASSOCIATED CYTORHABDOVIRUS (BAC)

1. INTRODUÇÃO

A produção do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) pode ser fortemente afetada pela incidência de doenças, sendo o Bean golden mosaic virus – BGMV (gênero *Begomovirus* e família *Geminiviridae*) o um dos patógenos responsáveis por grandes perdas na produção (Faria et al., 2014).

A diagnose de vírus baseia-se em técnicas clássicas que utilizam, círculo de hospedeiras, transmissão por vetor, sorologia e princípios moleculares já pré-estabelecidos. No entanto, recentemente, as ferramentas de detecção e identificação de novos vírus foram ampliadas com o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento massivos (*Next Generation Sequencing* – NGS, ou *high throughput sequencing*) (Mokili et al., 2012, Barba et al., 2014).

Na tentativa de identificar os vírus causando sintomas de encarquilhamento, rugosidade foliar e mosaico em feijoeiros no Estado de Goiás, Alves-Feitas et al. (dados não publicados) realizaram um levantamento de amostras de feijoeiros coletadas em condições de cultivo em campo aberto foram sequenciadas pelo método massivo de alto rendimento (*high throughput sequencing*), pela plataforma *Illumina* MiSeq. Dentre as sequências virais detectadas após análise, foi possível obter cinco genomas completos de espécies conhecidas, como Cowpea mild mottle virus – CPMMV (gênero *Carlavirus* e família *Betaflexiviridae*), *Phaseolus vulgaris* endornavirus (PvEv-1), *Phaseolus vulgaris* endornavirus – PvEv-2 (gênero *Endornavirus* e família *Endornaviridae*), Bean rugose mosaic virus RNA 1 – BRMV e Bean rugose mosaic virus RNA 2 – BRMV (gênero *Comovirus* e família *Secoviridae*).

Além disso, o genoma quase completo de um vírus novo também foi obtido e, ao realizar o *Blastx*, este apresentou identidade parcial com a polimerase do Northern cereal mosaic virus (NCMV), um vírus de RNA fita simples negativo classificado no gênero *Cytorhabdovirus*, na família *Rhabdoviridae*. Este *contig* também apresentou identidade com uma sequência identificada em um transcriptoma de mosca branca (*Bemisia tabaci*) depositado em banco de dados público. De acordo com alguns critérios, que serão discutidos adiante, referentes à taxonomia e classificação para a família *Rhabdoviridae* foi possível sugerir uma provável espécie nova, cujo nome proposto até o momento é

Bean associated cytorhabdovirus (BaC) (**Figura 1**). Esses dados produzidos por nossa equipe encontram-se em fase de publicação.

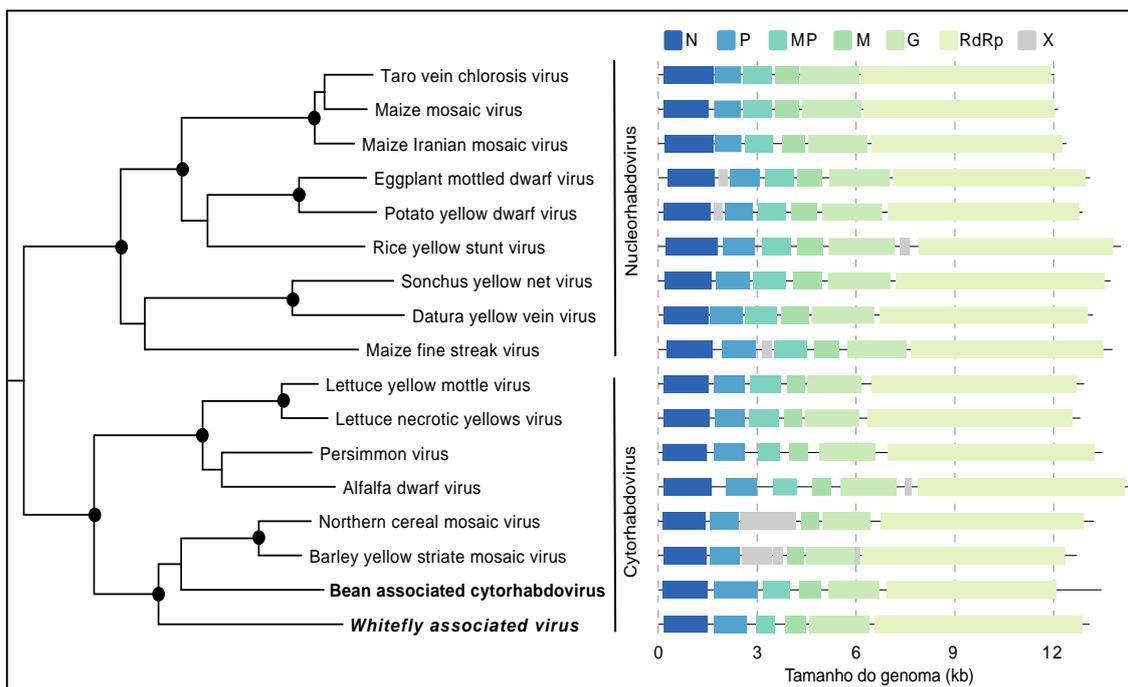


Figura 1. Cladograma representando relações filogenéticas e organização genômica de diferentes vírus dos gêneros *Nucleorhabdovirus* e *Cytorhabdovirus*. Em negrito dois vírus identificados por nosso grupo (dados não publicados). N: nucleoproteína, P: fosfoproteína, MP: proteína de movimento, M: proteína matriz, G: glicoproteína, RdRp: RNA polimerase dependente de RNA, X: gene acessório, kb: kilo bases.

A família *Rhabdoviridae* é composta, atualmente, por 13 gêneros que de modo geral apresentam partículas virais envelopadas em forma de bala ou baciliformes, genoma de ssRNA (*single strand* – fita simples) senso negativo e possui hospedeiros em diferentes reinos incluindo Animal e Vegetal. Os rhabdovírus que infectam plantas pertencem a dois gêneros de vírus monosegmentados, *Cytorhabdovirus* e *Nucleorhabdovirus* (que são transmitidos por afídeos e cigarrinhas) e dois bissegmentados, *Dichorhavirus* e *Varicosavirus* (que são transmitidos por ácaros e fungos) (Dietzgen et al., 2017).

Os rhabdovírus apresentam em seus genomas cinco genes essenciais 3'-N-P-M-G-L-5' que codificam nessa ordem a nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína matriz (M), glicoproteína (G) e uma RNA polimerase dependente de RNA (L). A unidade mínima para que o vírus seja infectivo consiste na presença dos genes N, P e L que formam o nucleocapsídeo. Além disso é comum a presença de genes acessórios, que dentre os vírus que infectam plantas, geralmente, são responsáveis por codificarem proteínas de movimento (Dietzgen et al., 2011, Dietzgen et al., 2017).

A transcrição dos rhabdovírus ocorre por meio de um mecanismo do tipo *start-stop* em que cada gene é usado como molde para a síntese de um RNA mensageiro (mRNA) individual portando 5' cap e cauda poli (A) na extremidade 3'. A cada etapa de transcrição a enzima polimerase perde algumas de suas subunidades e assim, à medida em que a transcrição ocorre, as concentrações de mRNAs diminuem do sentido 3' para o 5' do genoma viral. O gene N, além de sua grande importância devido ao fato de compor o nucleocapsídeo, é o que apresenta maior concentração sintetizada de mRNAs, uma vez que o primeiro gene a partir da extremidade 3'. Tanto a nucleoproteína como a polimerase são frequentemente utilizadas para análises filogenéticas na família *Rhabdoviridae* (Jackson & Li, 2016).

Baseado no genoma do BaC obtido por NGS, *primers* específicos foram sintetizados para realização da RT-PCR e confirmação da presença do vírus nas amostras iniciais de campo e, devido à similaridade na sequência do transcriptoma de mosca branca, em moscas brancas coletadas no mesmo campo (Alves-Freitas e colaboradores, dados não publicados).

A identificação de um cytorhabdovírus associado com o tecido de feijoeiros é inédita e dados preliminares indicavam que esse vírus poderia ser transmitido por mosca branca, o que tornaria esse vírus ainda mais peculiar, tendo em vista que os cytorhabdovírus já identificados são transmitidos por afídeos ou cigarrinhas de maneira circulativa propagativa, em que o vírus se replica também no inseto vetor (Dietzgen et al., 2017, Jackson & Li, 2016).

Neste contexto, este estudo teve como foco uma ampla caracterização molecular e biológica desse novo vírus tendo em vista que na família *Rhabdoviridae* não há relatos de feijoeiros como hospedeiros naturais, bem como de mosca branca atuando como inseto vetor de vírus desta família. Desta forma, este estudo representa uma contribuição relevante, expandindo o conhecimento científico sobre os rhabdovírus que infectam plantas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Estabelecimento de um isolado do Bean associated cytorhabdovirus – BaC

Amostras de feijoeiro cv. Pérola exibindo fortes sintomas de mosaico, nanismo, encarquilhamento foliar e bolhosidades e com alta infestação de moscas brancas foram coletadas em plantios em Luziânia-GO, transplantadas para vasos e mantidas em gaiolas revestidas de tecido *voil* com o objetivo de manter as colônias de mosca branca

estabelecidas nessas plantas. Plântulas de feijoeiro (produzidas na ausência de insetos) foram introduzidas na gaiola com o objetivo manter o possível vírus bem como as moscas brancas virulíferas.

Testes posteriores utilizando *primers* específicos (**Tabela 1**) confirmaram a infecção por BaC. Este isolado foi denominado BaC_Luz e foi mantido e utilizado para caracterização molecular e na maioria dos testes biológicos.

2.2. Detecção do Bean associated cytorhabdovirus – Bac em amostras de campo

Primers específicos para o gene que codifica a nucleoproteína (N) do BaC (**Tabela 1**) foram desenhados a partir da sequência nucleotídica obtida via NGS para a detecção do vírus em plantas e na mosca branca.

As reações de PCR para testar a eficiência dos *primers* foram feitas utilizando-se o cDNA cedido por DMT Alves-Freitas e obtido das amostras sequenciadas por NGS. Cada reação foi realizada em um volume total de 25 µL contendo 2,5 µL de Tampão 10X da enzima *Taq* Polymerase (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 e 500 mM KCl, Invitrogen), 1 µL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 0,5 µL dNTPs (10 mM, Invitrogen), 1 µL de cada *primer* (10 uM), 0,3 µL da enzima *Taq* Polimerase (5 unidades/µL, Invitrogen), 17,7 µL de água Milli-Q e 1 µL de cDNA. A PCR foi conduzida com desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 61°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 40 segundos (**Tabela 1**). Os produtos de PCR (*amplicons*) foram visualizados em gel de agarose a 1% e após eluição dos fragmentos e clonagem em vetor pCRII Topo TA, o DNA foi sequenciado via Sanger.

Como o BaC é uma nova espécie e pouco se conhece sobre ele, foi verificada a possibilidade de o vírus estar integrado ao genoma do feijoeiro, tendo em vista que existem relatos de sequências de rhabdovírus integradas ao genoma de plantas, como por exemplo, na família Solanaceae (Mann & Dietzgen, 2014). Para tanto, foram feitas reações de PCR (vide protocolo acima) com os *primers* para o gene N do vírus e para os genes mitocondrial e plastidial de plantas que codificam a maturase K (matK_F e matK_R) e a ribulose bifosfato carboxilase (rbcl_F e rbcl_R) a partir do cDNA viral e o RNA total extraído da planta no qual o BaC foi inicialmente detectado.

2.2.1. Infecção pelo Bean associated cytorhabdovirus – BaC em feijoeiros em plantios em Goiás e Distrito Federal

Oitenta e oito amostras de feijoeiros apresentando sintomas típicos de infecção por vírus, como mosaico, epinastia, nanismo e bolhosidade (**Figura 2**) foram coletadas durante a safra de inverno em plantios comerciais nos municípios de Cristalina e Luziânia, em Goiás, e em campos experimentais da Embrapa Arroz e Feijão em Goiânia, GO e Estação Experimental de Biologia – Universidade de Brasília (DF). As amostras foliares foram armazenadas a -80 °C até o processamento.

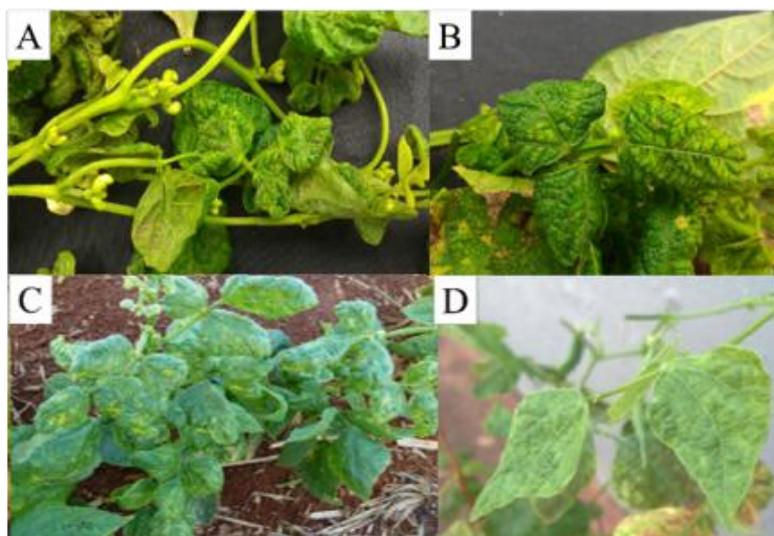


Figura 2. Plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) ‘Pérola’ apresentando sintomas típicos induzidos por vírus como mosaico, epinastia, nanismo e bolhosidade. Plantas coletadas em Luziânia (A) e (B), Cristalina, GO (C) e Brasília, DF (D).

O RNA total das amostras foi extraído utilizando-se o reagente Trizol[®]. O material vegetal (100 mg) foi pulverizado em N₂ líquido e homogeneizado em 1 mL de Trizol[®]. Após cinco minutos de incubação em temperatura ambiente, adicionou-se 200 uL de clorofórmio 100%, agitou-se vigorosamente os tubos por 15 segundos e os mesmos foram mantidos em temperatura ambiente por 2-3 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa (aproximadamente 600 uL) foi transferida para um novo tubo, ao qual adicionou-se 500 uL de isopropanol para precipitação do RNA. Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugação (4 °C) a 12.000 x g pelo mesmo tempo, o *pellet* foi lavado com álcool 70%, centrifugado a 7500 x g por 5 minutos e seco. O precipitado foi ressuscitado em água Milli-Q e incubado em banho-maria a 60 °C por 10-15 minutos. A qualidade e concentração dos RNAs extraídos foram analisadas por visualização de 3 uL de cada RNA em gel de agarose a 1%.

O RNA purificado foi utilizado como molde para a síntese do cDNA. Inicialmente, 5 uL do RNA total (aproximadamente 200 ng/uL), 0,5 uL de *primer* Oligo dT (50 mM) e 0,5 uL de *primer* randômico (50 mM) foram desnaturados a 65 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriados em gelo por 3 minutos para garantir que qualquer estrutura secundária não se formasse novamente. Posteriormente, adicionou-se um mix contendo 1 uL de dNTP (10 mM), 4 uL do tampão 5x, 2 uL de DTT (0.1 M), 5 uL de água Milli-Q, 1 uL de RNase out (40 unidades/uL) e 1 uL de transcriptase reversa M-MLV (Moloney murine leukemia virus) (Promega) (200 unidades/uL). Após incubação a 37 °C por uma hora, a enzima foi inativada a 75 °C por 15 minutos.

O DNA total foi extraído pelo método CTAB (Doyle & Doyle, 1987) iniciando-se pela maceração dos tecidos foliares em nitrogênio líquido com auxílio de um pistilo plástico para tubos de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se 800 uL da solução de extração (100 mM de Tris-HCl pH 8; 1,4 M de NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB e 0,2% 2-mercaptoetanol). Adicionou-se 400 uL de clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico; 24:1 v:v), agitou-se os tubos que em seguida, foram aquecidos em banho-maria por 10 minutos a 54 °C. Em seguida, o material foi centrifugado a 13.000 rpm durante 10 minutos para promover a separação das fases. Ao volume da fase aquosa recuperada, foi acrescentado 1,2 do volume de isopropanol 100%. Após centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos, o *pellet* formado foi lavado com 500 uL de etanol 70% e centrifugado por 13.000 rpm por 10 minutos. O álcool foi vertido do tubo e o *pellet*, após seco, foi ressuscitado em 50 uL de tampão TE com RNase (10 ug/mL) e incubado a 37 °C durante 10 minutos para atuação da enzima. Após visualização em gel de agarose a 1% e leitura em nanodrop o DNA foi armazenado a -20 °C até realização das reações de PCR.

Após obtenção do DNA e cDNA das amostras, os mesmos foram usados como molde para detecção, usando *primers* específicos, de alguns vírus capazes de infectar o feijoeiro comum, como os begomovírus BGMV, Macrotidium yellow net virus – MaYNV e Macrotidium yellow spot virus – MaYSV e os de RNA CPMMV, BRMV e BaC. As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 µL seguindo-se o mesmo protocolo descrito no ítem **2.2.1**, nas seguintes condições: temperatura inicial de 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento de 55-65°C (dependendo dos *primers* usados, vide **Tabela 1**) por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos a 1 minuto e 40 segundos (dependendo do tamanho do *amplicon*, vide **Tabela 1**).

Tabela 1. Sequências dos *primers* específicos empregados nas reações em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) para detecção de seis vírus em amostras de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), tamanho do *amplicon* (em pares de bases – pb) e condições da PCR.

Vírus ¹ /Região	<i>Primers</i> ²	<i>Amplicon</i> <i>pb</i> ³	Condições – PCR ⁴
BaC	Gene N: BaC_1F e BaC_1579R (sequência não mostrada – aguardando publicação)	1579	TA: 61°C Extensão: 1'40"
CPMMV	CPMMV_4000F: 5'-AACTTGGCCTTAGTGAAGTCTACA-3' CPMMV_4500R: 5'-ATTAGCTCTGTGCCTGGGGT-3'	500	TA: 61°C Extensão: 45"
BRMV RNA 1	BRMV1_76F: 5'-CTTGACTTGGTTGAAATACACCT-3' BRMV1_521_R: 5'-GCCCTCAGCTTGACTAGGCC-3'	445	TA: 62°C Extensão: 45"
BGMV	BGMV_HPXHO: 5'-CCTCGAGATAGTGCGGTGCGA-3' BGMV_HPKN: 5'-AGGTACCATGCGGCATCCGAAGC-3'	400	TA: 65°C Extensão: 45"
MaYSV	MaYSV_249F: 5'-GGTTTCCCGCAATAACAA-3' MaYSV-1083R: 5'-CATGTTGTAAGTACTAGAACGAA-3'	834	TA: 55°C Extensão: 1'
MaYNV	MaYNV_1035F: 5'-CKCCTAAYTGATCWAGATACAAGTGA-3' MaYNV_2068R: 5'-CCTCAACGCAGGATCAGTCA-3'	1033	TA: 55°C Extensão: 1'15"
Maturase K	matK_F: 5'-CGTACAGTACTTTTTGTGTTTACGAG-3' matK_R: 5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-3'	500	TA: 55°C Extensão: 45"
Ribulose	rbcl_F: 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' rbcl_R: 5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3'	1000	TA: 55°C Extensão: 1'15"

cDNA	M10Pa-clT50VN: 5'-AAGCAGTGTTATCAACGCAGATTAATTAAT ₅₀ VN-3'	-	-
RACE 3'	M10: 5'-AAGCAGTGTTATCAACGCAGA-3' BaC_GSP (sequência não mostrada – aguardando publicação)	400	TA: 61°C Extensão: 45''
RACE 5'	AAP: 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' BaC_546_R (sequência não mostrada – aguardando publicação)	600	TA: 61°C Extensão: 1'
RACE 5'	AUAP: 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' BaC_321_R (sequência não mostrada – aguardando publicação)	400	TA: 61°C Extensão: 45''

¹ Bean associated cytorhabdovirus (BaC), Cowpea mild mottle virus (CPMMV), Bean rugose mosaic virus (BRMV), Bean golden mosaic virus (BGMV), Macroptilium yellow spot virus (MaYSV) e Macroptilium yellow net virus (MaYNV). ²F: Forward, R: Reverse. ³: pb: pares de bases. ⁴:Condições das reações de PCR, em que “TA” é a temperatura de anelamento dos *primers* e “Extensão” o tempo utilizado para a etapa de extensão na PCR.

Os resultados de todas as reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%, corados em brometo de etídio. Os fragmentos virais obtidos foram eluídos com o kit PureLink (Invitrogen) e clonados no vetor PCR 2.1 TOPO TA (Invitrogen). As transformações foram feitas utilizando-se 40 uL de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH10B e 2 uL da reação. As células foram plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido (5 g de extrato de levedura, 10 g de triptona, 10 g de NaCl e 1,6 % de ágar) contendo canamicina (100 mg/mL), IPTG (100 mM) e XGAL (20 mg/mL). As placas foram incubadas a 37°C *overnight*. Colônias brancas foram selecionadas e crescidas *overnight* a 37°C em 3 mL de meio LB líquido com 3 uL de canamicina (100 mg/mL). Os clones recombinantes foram purificados com o QIAprep Miniprep Kit (Qiagen), de acordo com o manual do fabricante, e foram avaliados para a presença do inserto de interesse por meio de digestão com a enzima *Eco* RI e visualização em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Os clones positivos foram enviados para sequenciamento na empresa Macrogen, Coréia do Sul.

2.3. Caracterização molecular do Bean associated cytorhabdovirus – Bac

2.3.1. Recuperação do genoma completo do Bean associated cytorhabdovirus – BaC e análises filogenéticas

2.3.1.1. Identificação da extremidade 3' do Bean associated cytorhabdovirus – BaC por meio do RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)

Com o objetivo de facilitar a síntese do cDNA, adicionou-se pela ação da enzima *E. coli* Poly (A) Polymerase (NEB) uma cauda poli (A) ao RNA total extraído. Essa enzima é capaz de adicionar uma cauda poli (A) de pelo menos 100 bases. A reação consistiu em 1 uL (5 unidades/uL) da polimerase, 2uL de tampão de reação 10x, 2uL de ATP (10 mM) e 2 ug de RNA e foi incubada a 37°C por 30 minutos.

Para obtenção da extremidade 3' utilizou-se, inicialmente, um *primer* oligo dT com um adaptador, o M10Pa-clT50VN (Nicolini et al., 2012) de modo a permitir a síntese da primeira fita de cDNA. A reação iniciou com 5 uL (2 ug) do RNA com cauda poli (A), 1,5 uL do *primer* M10Pa (10 mM) e 1,5 uL de dNTP (10 mM) que foram incubados a 65°C por 5 minutos, seguidos por 3 minutos em gelo. Em seguida, foram adicionados 4 uL do tampão 5x da enzima, 2 uL de DTT (0.1 M), 1 uL da enzima Super Script III (Invitrogen) (200 unidades/uL) e 5 uL de água Milli-Q e incubados a 53°C por 40 minutos. A inativação da enzima foi realizada pela incubação a 70°C durante 15 minutos.

Posteriormente, realizou-se um primeiro ciclo de PCR com um *primer* gene específico (GSP) desenhado com orientação para a região 5' do cDNA do BaC e um *primer* âncora M10 (Nicolini et al., 2012). O M10 capaz de se ligar ao adaptador do oligo dT. Foram utilizados 5 uL do tampão 5x da enzima, 0,75 uL de dNTP (10 mM), 1 uL de cada *primer* (10 mM), 1 uL do cDNA, 15,25 uL de água Milli-Q e 1 uL da enzima LongAmp (NEB) (2,5 unidades/uL). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: temperatura de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos; anelamento de 60°C por 40 segundos e extensão a 65°C por 45 segundos e uma extensão final de 15 minutos a 65°C.

Em seguida, visando aumentar a especificidade do *amplicon* gerado, foi conduzido um segundo ciclo de PCR (com *template* obtido do primeiro ciclo) empregando o *primer* âncora M10 e outro *primer* mais externo em relação ao GSP, o GSP1. Para tanto, foram utilizados 2,5 uL do tampão 10x da enzima, 0,5 uL de dNTP (10 mM), 0,5 uL de cada *primer* (10 mM), 1 uL da primeira reação de PCR, 18,7 uL de água Milli-Q e 0,3 uL da enzima Platinum *Taq* High Fidelity (5 unidades/uL). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: temperatura de desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento de 60°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 45 segundos e uma extensão final de 5 minutos a 68°C.

2.3.1.2. Identificação da extremidade 5' do Bean associated cytorhabdovirus – BaC por meio do RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)

Para a obtenção da extremidade 5', primeiramente o cDNA foi sintetizado a 52°C por 1 hora, a partir de 10 uL de RNA total, 1 uL do *primer* reverso sintetizado a partir do último nucleotídeo obtido para o vírus pelo NGS (10 mM), 1 uL de dNTP (10 mM), 2 uL de DTT (0.1 M), 4 uL de tampão 5x da enzima, 1 uL da enzima Super Script III (Invitrogen) e 1 uL de RNase out (Invitrogen) (40 unidades/uL). Após inativação da enzima por temperatura, adicionou-se 1 uL de RNase H e 0,5 uL de RNase A (10 mg/ mL) e em seguida, incubou-se por 20 minutos a 37°C. Previamente à adição da cauda por meio da enzima TdT, o cDNA foi purificado com a utilização do kit PureLink (Invitrogen) com um volume final em 30 uL do tampão de eluição. A adição da cauda foi feita por meio da adição de 5 uL do tampão 5x da enzima, 2,5 uL de dctp (2 mM) e 1 uL da enzima TdT (20 unidades/uL) aos 19 uL do cDNA purificado e incubação a 37°C durante 30 minutos.

Com o cDNA já apresentando a cauda C, realizou-se a primeira PCR a partir do mesmo protocolo empregado na 2ª PCR como descrito no item **2.3.1.1** (alterando a temperatura de anelamento dos *primers* de 60 para 62°C) com a enzima Platinum *Taq* High Fidelity (5 unidades/uL) utilizando-se 0,5 uL do *primer* específico (546R) para o BaC (10 mM) e 0,5 uL do AAP. A segunda PCR foi conduzida da mesma maneira que a primeira, apenas alterando os *primers* que foram adicionados à reação: AUAP e o *primer* específico (321R) desenhado mais próximo à extremidade 5' do BaC.

2.3.1.3. Obtenção do genoma completo do Bean associated cytorhabdovirus – BaC e análise filogenética da nucleoproteína (N)

Inicialmente, *primers* específicos foram desenhados de modo a amplificar o genoma do BaC em seis fragmentos, todos apresentando uma sobreposição de pelo menos 150 nucleotídeos para facilitar a formação dos *contigs* (**Figura 7** do item **2.3.2**)

Para as reações de PCR foram utilizados 10 uL do tampão 5x da enzima, 1,5 uL de dNTP (10 mM), 2 uL de cada *primer* (10 mM), 1 uL do cDNA, 31,5 uL de água Milli-Q e 2 uL da enzima LongAmp (2,5 unidades/uL). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: temperatura de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos; anelamento de 60 °C por 40 segundos e extensão a 65 °C por 3 minutos e extensão final de 15 minutos a 65 °C. Os *amplicons* obtidos foram observados em gel de agarose a 1%, eluídos, clonados e sequenciados como descrito no item **2.2.2**.

Após sequenciamento, foi feita a montagem dos seis fragmentos do genoma viral completo e análise de cada uma das ORFs. As análises filogenéticas foram realizadas utilizando-se a nucleoproteína do isolado BaC_Luz, bem como as sequências referentes à mesma região para o isolado de BaC obtido via NGS (BaC_NGS) e todos os demais cytorhabdovírus e nucleorhabdovírus com sequências disponíveis no GenBank (**Tabela 2**).

Tabela 2. Sequências de vírus dos gêneros *Nucleorhabdovirus* e *Cytorhabdovirus* utilizados nas análises filogenéticas para a nucleoproteína e seus respectivos números de acesso no GenBank*.

Gênero	Vírus	Acesso
<i>Nucleorhabdovirus</i>	Datura yellow vein virus	YP_009176972.1
	Eggplant mottled dwarf virus	YP_009094352.1
	Maize fine streak virus	YP_052843.1
	Maize Iranian mosaic virus	YP_002308454.1
	Maize mosaic virus	YP_052850.1
	Potato yellow dwarf virus	YP_004927965.1
	Rice yellow stunt virus	NP_620496.1
	Sonchus yellow net virus	NP_042281.2
	Taro vein chlorosis virus	YP_224078.1
<i>Cytorhabdovirus</i>	Alfalfa dwarf virus	YP_009177015.1
	Barley yellow striate mosaic virus	YP_009177222.1
	Lettuce necrotic yellows virus	YP_425087.1
	Lettuce yellow mottle virus	YP_002308371.1
	Northern cereal mosaic virus	NP_057954.1

* GenBank: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Foi realizado por meio do programa ClustalW (EMBL-EBI) um alinhamento múltiplo de sequências (*multiple sequence alignment* – MAS) de aminoácidos disponíveis para a proteína N de diferentes rhabdovírus (**Tabela 2**), bem como das duas sequências obtidas do BaC. Além disso, realizou-se um alinhamento entre os aminoácidos da proteína N do BaC_NGS e o BaC_Luz. A matriz de identidade foi produzida pelo *software Sequence Demarcation Tool* versão 1.2. Um alinhamento múltiplo de sequências foi utilizado para a montagem da árvore filogenética. Foi empregado o algoritmo de *Maximum likelihood* com 1000 repetições de *bootstrap* implementado no programa MEGA 7.

2.4. Caracterização biológica do Bean associated cytorhabdovirus – Bac

2.4.1. Ensaio de transmissão mecânica do Bean associated cytorhabdovirus – BaC via extrato vegetal tamponado

Para o ensaio de transmissão mecânica, foi utilizado um isolado obtido na Estação Experimental de Biologia – Universidade de Brasília (BaC_BSB). Seis folíolos da planta infectada por BaC foram destacados e macerados em um cadinho de porcelana com o auxílio de um pistilo, em presença de tampão fosfato de potássio (0,5 M, pH 7,0) refrigerado contendo sulfito de sódio a 1%. Ao macerado, foi adicionado carborundum (400 mesh). Folhas de plântulas de *Datura stramonium*, *Capsicum annuum*, *S.*

lycoperscicum, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Nicotiana benthamiana*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *Capsicum chinense* e *P. vulgaris* foram friccionadas com o macerado e em seguida enxaguadas com água. O mesmo procedimento foi realizado em uma planta de cada espécie como controle negativo utilizando-se apenas tampão (plantas *mock* inoculadas). Previamente à inoculação, folhas e folíolos de cada indivíduo foram coletadas e armazenadas a -80 °C.

Trinta e quatro dias após a inoculação, amostras foliares foram coletadas e acondicionadas em microtubos de 1,5 mL, individualmente. Foram também coletadas em *pools*, um por espécie vegetal inoculada contendo um disco foliar de cada planta inoculada. Todas as amostras foram armazenadas a -80 °C até a extração de RNA com o reagente Trizol[®], síntese do cDNA e realização de PCR com *Taq* Polimerase (Invitrogen) utilizando-se os *primers* para detecção do gene N, conforme condições na **Tabela 1**. Os *amplicons* obtidos foram eluídos, clonados e sequenciados da mesma maneira que aqueles obtidos no tópico **2.2.2**.

2.4.2. Ensaio piloto de transmissão do Bean associated cytorhabdovirus – BaC por mosca branca (*Bemisia tabaci*, *Middle East Asia Minor 1* – MEAM 1)

Os testes preliminares de transmissão foram feitos com moscas brancas obtidas em campo e estabelecidas na Embrapa Cenargen como descrito no item **2.1**. Sementes das cultivares de feijão ‘Jalo Precoce’, ‘Pérola’ e da linhagem de feijoeiro transgênico com resistência ao mosaico dourado do feijoeiro ‘BRS FC 401 RMD’ (oito plantas de cada) foram semeadas e mantidas em casa de vegetação. Plântulas apresentando as duas folhas simples tiveram amostras foliares coletadas e armazenadas a -80 °C e foram alocadas na gaiola com os feijoeiros oriundos do campo, fontes de inóculo do isolado BaC_Luz, infestados de moscas brancas *B. tabaci* MEAM1 virulíferas. Após um período de 14 dias, amostras foram coletadas e analisadas por PCR com os *primers* para detecção do gene N, conforme condições na **Tabela 1**. O experimento foi feito em duplicata (**Figura 3**).

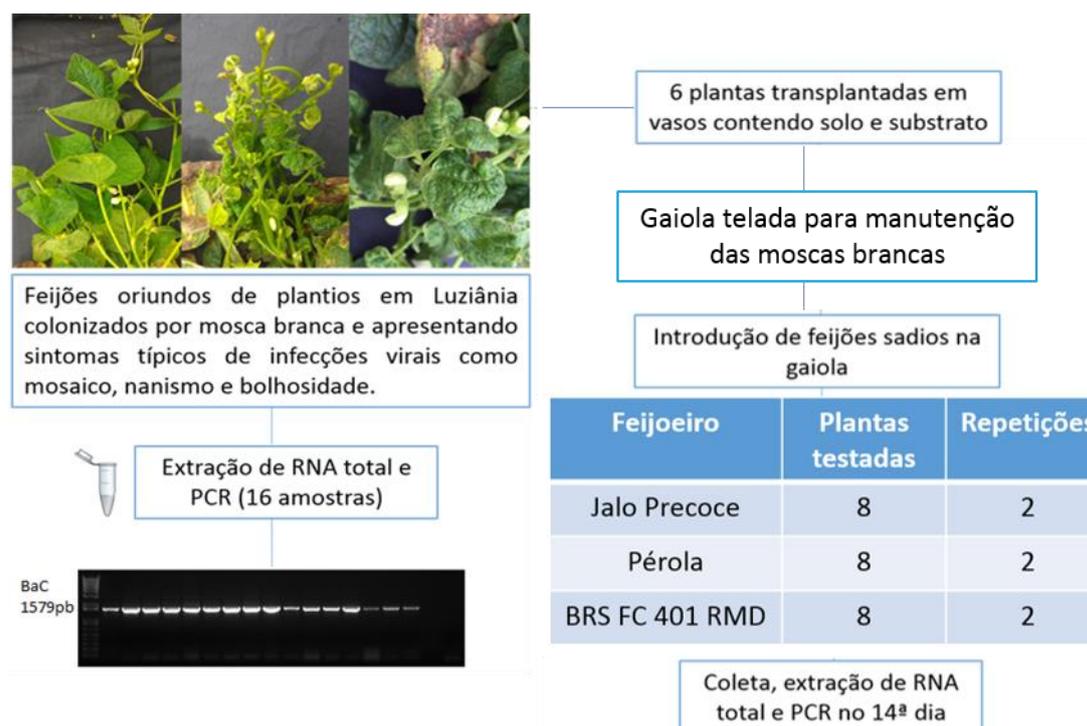


Figura 3. Ensaio de transmissão do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) via inseto vetor mosca branca (*Bemisia tabaci*, *Middle East Asia Minor 1* – MEAM 1) a partir de feijoeiros (*Phaseolus vulgaris*) coletados em Luziânia – GO, Brasil.

2.4.3. Detecção do Bac em moscas brancas (*Bemisia tabaci*, *Middle East Asia Minor 1* – MEAM 1) utilizadas nos ensaios

Cerca de 50 moscas brancas adultas presentes na gaiola foram coletadas por sucção e transferidas para microtubos de 1,5 mL e tiveram seu RNA total extraído com reagente Trizol[®], com adaptações. As moscas foram maceradas em 250 uL do reagente com o auxílio de um pistilo plástico, em seguida, adicionou-se 25 uL de solução clorofórmio – álcool isoamílico (24:1), agitou-se em agitador para tubos e resfriou-se em gelo por 5 minutos. O macerado foi centrifugado a 4 °C por 15 minutos a 12.000 rpm. A fase aquosa resultante foi transferida para um novo tubo e a ela, foi adicionado isopropanol 100% em volume equivalente. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante resultante foi descartado. Em seguida, a lavagem do *pellet* formado foi realizada com 500 uL de etanol 70% e centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. O álcool foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 30 uL de água Milli-Q. Em seguida, o cDNA foi sintetizado e a PCR realizada para detecção do gene N do BaC nessas moscas. Os *amplicons* obtidos foram eluídos, clonados e sequenciados da mesma maneira que aqueles obtidos no tópico 2.2.2.

A possibilidade de o vírus estar integrado ao genoma do inseto foi investigada uma vez que o BaC é uma potencial nova espécie e pouco se conhece sobre sua relação com a mosca branca. Para tanto, reações de PCR foram conduzidas (vide protocolo em **2.2.1**) utilizando os *primers* para o gene N do vírus (**Tabela 1**) e para o gene mitocondrial de moscas brancas citocromo oxidase I (mtCOI). Dois templates foram utilizados nesses ensaios, o cDNA viral e o RNA total (ambos provenientes da extração de insetos adultos nos quais o BaC foi detectado).

2.4.4. Ensaio de transmissão do Bean associated cytorhabdovirus – BaC por mosca branca (*Bemisia tabaci*, *Middle East Asia Minor 1* – MEAM 1) em condições controladas

Colônias de moscas brancas avirulíferas mantidas em plantas de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) em casa de vegetação na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília – UnB foram utilizadas no experimento de transmissão de BaC em condições controladas. Inicialmente, foi feita uma amostragem da colônia para confirmar a ausência do vírus, seguindo os mesmos procedimentos adotados no ensaio piloto (ítem **2.4.2**). Após a confirmação da ausência do BaC nas moscas amostradas, adultos da mesma criação com idade variando de 1 a 3 dias foram colocados para se alimentarem em planta infectada ou não infectada proveniente do ensaio descrito no ítem **2.4.2**. As plantas foram alocadas em gaiolas distintas BugDorm-2120F, por um período de acesso de aquisição (PAA) de sete dias (**Figura 4**).

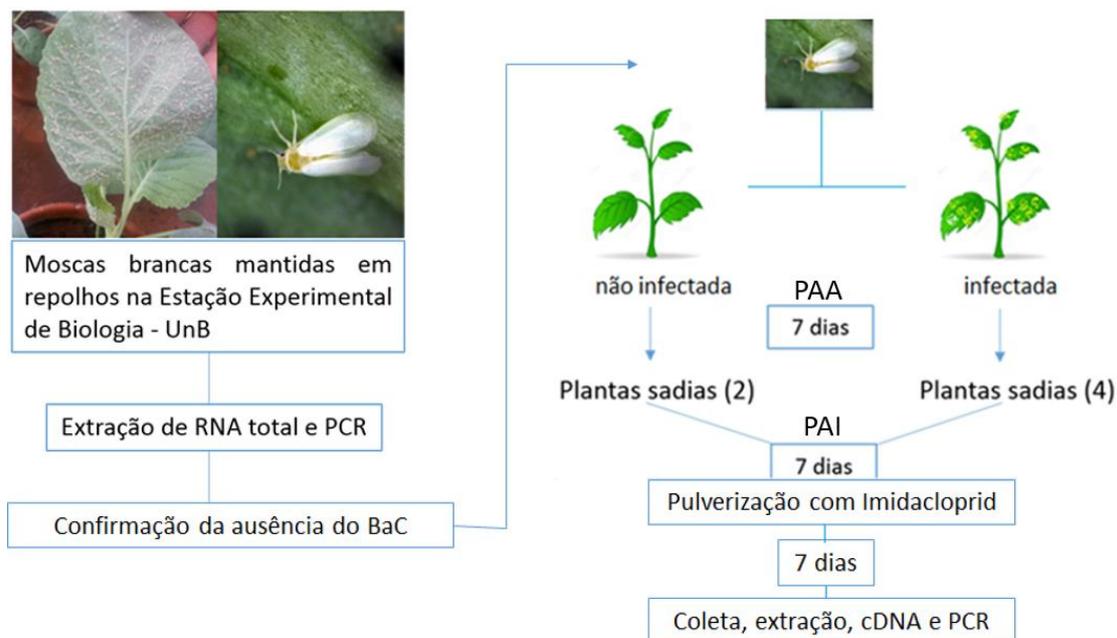


Figura 4. Ensaio de transmissão do Bean associated cytorhabdovirus (BaC). Foi permitido a grupos de adultos de moscas brancas (*Bemisia tabaci*, *Middle East Asia Minor 1* – MEAM 1) avirulíferos (com 1 a 3 dias de vida) um período de acesso de aquisição (PAA) de sete dias em feijoeiro não-infectados ou infectados. Entre 25 a 30 adultos foram transferidos para uma folha de cada planta teste, para um período de acesso de inoculação (PAI) de sete dias. No oitavo dia, as plantas foram pulverizadas com o inseticida sistêmico Imidacloprid e mantidas protegidas dentro das gaiolas até a coleta de material foliar para detecção do BaC.

Ao término do PAA de sete dias, as gaiolas tiveram suas laterais e fundos cobertos por um pano preto e expostas à luz, induzindo a migração de insetos adultos para a parte frontal para que fossem, em seguida, cuidadosamente succionados. Esse procedimento minimiza possíveis danos ao aparelho bucal e consequentes dificuldades na alimentação e transmissão do vírus em ensaios subsequentes.

De 25 a 30 moscas brancas foram sugadas e colocadas em sacos confeccionados em tecido *voil* envolvendo uma folha basal de cada planta teste (*P. vulgaris* ‘BRSFC 401 RMD’; *N. benthamiana*; *S. lycopersicum* ‘Santa Clara’; *Vigna unguiculata* ‘BRS Imponente’ e *Glycine max* ‘BR16’, ‘BRS7780’ e ‘Williams’). As moscas brancas assim permaneceram por sete dias (período de acesso de inoculação – PAI). Duas plantas de cada espécie receberam moscas brancas que se alimentaram previamente em feijoeiro não infectado (*mock* inoculação), enquanto outras quatro receberam adultos que se alimentaram por sete dias em feijoeiro infectado. Todo o experimento foi conduzido em gaiolas BugDorm-2120F confeccionadas pela empresa MegaView Science em poliéster e tela em náilon com malha de 150 x 150 mesh que impedem até mesmo a passagem de insetos diminutos, como os tripses. Amostras foliares de cada planta teste foram coletadas

individualmente e armazenadas a -80 °C anteriormente ao início do PAI. Ao final desse período, os sacos de tecido foram retirados e as plantas pulverizadas com o inseticida sistêmico Imidacloprid.

Após sete dias, amostras foram coletadas e analisadas quanto à presença do vírus por RT-PCR conduzida utilizando-se os *primers* para detecção do gene N, conforme condições na **Tabela 1**. Os *amplicons* obtidos foram eluídos, clonados e sequenciados da mesma maneira que aqueles obtidos no tópico **2.2.2**.

3. RESULTADOS

3.1. Detecção do Bean associated cytorhabdovirus – Bac em amostras de campo

Os *primers* sintetizados para amplificação do gene N do BaC com base na sequência produzida pelo sequenciamento via NGS mostraram-se eficientes e adequados para a detecção do vírus, tendo em vista que foi possível amplificar o fragmento de banda única com tamanho esperado de 1579 pb a partir do cDNA obtido a partir do RNA total de planta sabidamente infectada (**Figura 5**).

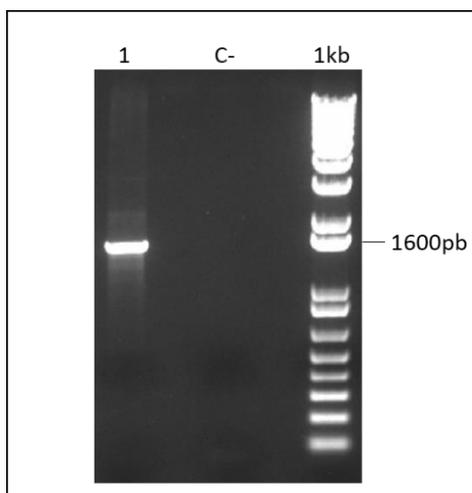


Figura 5. Amplificação do gene N do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) presente em amostra de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) utilizando-se *primers* específicos. (1) planta infectada (C-) o controle negativo da reação (1 kb) marcador 1Kb Plus Ladder.

A possibilidade do BaC estar integrado ao genoma do feijoeiro foi avaliada por meio de reações de PCR com os *primers* específicos para o vírus e *primers* específicos para os genes mitocondriais e plastidiais de plantas. Somente foi amplificada a ORF da nucleoproteína do vírus a partir de seu cDNA. Os genes mitocondriais e plastidiais do feijoeiro foram somente amplificados a partir do RNA total, o que indica a presença de

DNA do feijoeiro na amostra e excluindo a possibilidade da sequência do BaC estar integrada ao genoma do feijoeiro (**Figura 6**).

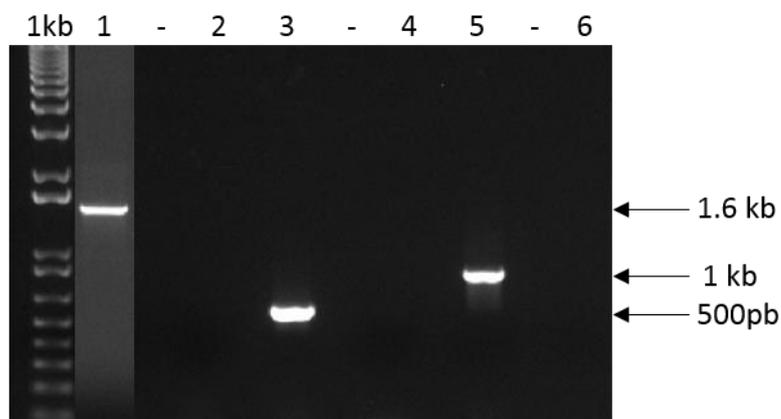


Figura 6. Amplificação do gene N do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) utilizando-se *primers* específicos e de genes plastidial e mitocondrial de plantas. (1kb) 1Kb Plus Ladder. Reações a partir de cDNA (1) e RNA total do feijoeiro infectado com os *primers* para o gene N do BaC (2), gene plastidial (3) e mitocondrial (5) de plantas. Controles negativos das reações (4) e (6).

3.1.1. Infecção pelo Bean associated cytorhabdovirus – BaC em feijoeiros em plantios em Goiás e Distrito Federal

Utilizando *primers* específicos para BaC, CPMMV, BRMV, BGMV, MaYSV, MaYNV em reações de PCR, foi possível verificar alta incidência do BaC com 93,75% de infecção em Luziânia, e cerca de 60% em Cristalina-GO e Brasília-DF. O BaC somente não foi detectado em Goiânia-GO. Foi também observada a alta ocorrência de infecções virais mistas com BaC, CPMMV e BGMV nos feijoeiros coletados no Distrito Federal e Goiás. Todas as amostras oriundas de Goiânia-GO, Brasília-DF e Luziânia-GO mostraram-se positivas para o CPMMV e BGMV. Por outro lado, o BRMV foi detectado em apenas uma amostra coletada em Cristalina-GO e os begomovírus MaYSV e MaYNV não foram encontrados em nenhuma das localidades (**Tabela 3**).

Tabela 3. Detecção de vírus de RNA e DNA em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) na região Central do Brasil

	Vírus	Número de plantas positivas*/Número de plantas avaliadas por localidade**				Positivo /Total	Incidência (%)
		Goiânia	Brasília	Luziânia	Cristalina		
RNA	BaC	0/4	6/10 (60%)	30/32 (93,75%)	25/42 (59,52%)	61/88	69,3%
	CPMMV	4/4 (100%)	10/10 (100%)	32/32 (100%)	33/42 (83,33%)	79/88	89,7%
	BRMV	0/4	0/10	0/32	1/42	1/88	1,1%
DNA	BGMV	4/4	10/10 (100%)	32/32 (100%)	40/42 (95,23%)	86/88	97,7%
	MaYSV	0/4	0/10	0/32	0/42	0/88	0
	MaYNV	0/4	0/10	0/32	0/42	0/88	0

(*) Número de plantas positivas para os vírus (**) Número de amostras coletadas por localidade: 4, 10, 32 e 42 para Goiânia-GO, Brasília-DF, Luziânia-GO e Cristalina-GO, respectivamente. (BaC) Bean associated cytorhabdovirus. (CPMMV) Cowpea mild mottle virus. (BRMV) Bean rugose mosaic virus. (BGMV) Bean golden mosaic virus. (MaYSV) Macroptilium yellow spot virus. (MaYNV) Macroptilium yellow net virus.

3.2. Caracterização molecular do Bean associated cytorhabdovirus – Bac

3.2.1. Obtenção do genoma completo do Bean associated cytorhabdovirus – BaC e análises filogenéticas

Após a realização das reações de PCR para obtenção das extremidades 3' e 5', bem como das seis sequências em que o genoma total foi dividido em fragmentos de 1.578, 2.813, 2.874, 2.242, 2.654 e 2.522 pb com os *primers* 1F/1579R; 1248F/4061R; 3645F/6519R; 6369F/8611R; 8495F/11149R e 10947F/13469R, respectivamente. Os *amplicons* obtidos foram clonados e sequenciados resultando na recuperação de toda a sequência viral para o isolado BaC_Luz (**Figura 7**).

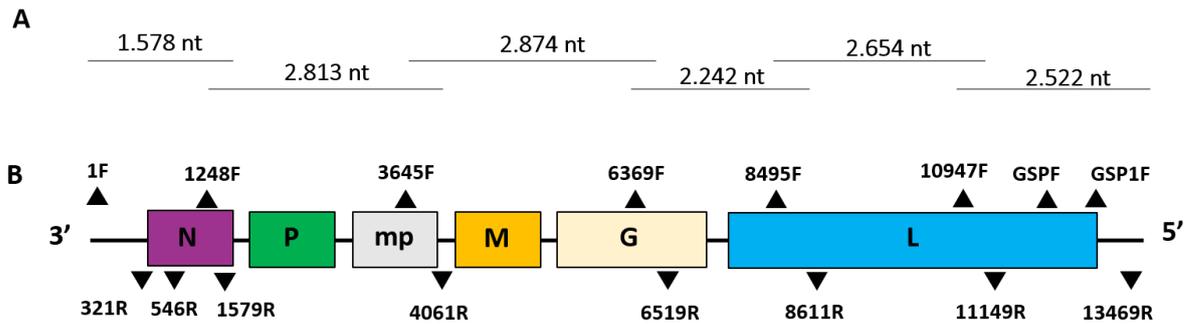


Figura 7. Genoma do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) com seus genes canônicos que codificam (N) nucleoproteína, (P) fosfoproteína, (mp) provável proteína de movimento, (M) proteína matriz, (G) glicoproteína e (L) polimerase. Acima estão representados os posicionamentos dos *primers forward* e abaixo, *reverse*. (A) Fragmentação do genoma em seis *amplicons*.

Após o sequenciamento das extremidades amplificadas por meio do RACE (**Figura 8**), foi possível a obtenção das sequências não traduzidas 5' e 3' e verificar que na sequência do BaC obtida pelo sequenciamento NGS estavam faltando 21 nucleotídeos e que a sequência completa do genoma do BaC possui 13.469 nucleotídeos compondo seis ORFs, conforme **Tabela 4**.

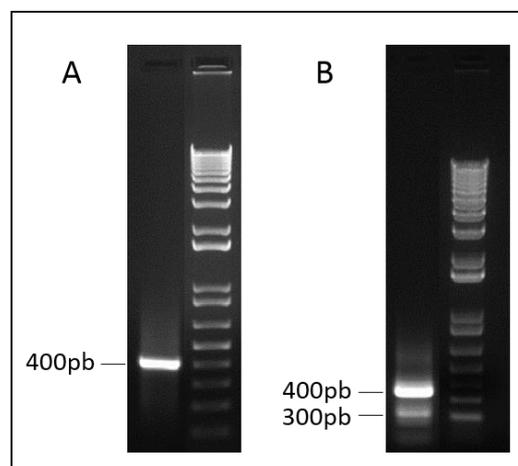


Figura 8. Recuperação das extremidades do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) por meio da técnica de *Rapid Amplification of cDNA Ends* – RACE. (A e B) *Amplicons* obtidos para as extremidade 3' e 5'. Géis de agarose a 1%.

Tabela 4. Características das seis ORFs (*open reading frames*) presentes no genoma do Bean associated cytorhabdovirus (BaC).

ORF	Gene	Provável função	Posição*	Tamanho**
1	N	Nucleoproteína	187-1543	1356
2	P	Fosfoproteína	1733-3071	1338
3	3	Proteína de movimento	3213-4342	1129
4	M	Proteína matriz	4330-5144	814
5	G	Glicoproteína	5205-6764	1559
6	L	Polimerase	7007-13348	6341

*Início e término da ORF**Tamanho do gene em nucleotídeos (nt).

O alinhamento múltiplo de sequências produzido pelo SDT, mostrou uma porcentagem de identidade de 98,89% entre aminoácidos dos genes N do BaC_NGS e do BaC_Luz. Por sua vez, o alinhamento entre BaC_Luz e BaC_NGS com os demais rhabdovírus, apresentou níveis de identidade inferiores a 28% para as sequências de aminoácidos da proteína N (**Figura 9**), indicando a alta divergência entre o BaC e os os rhabdovírus caracterizados até o presente momento.

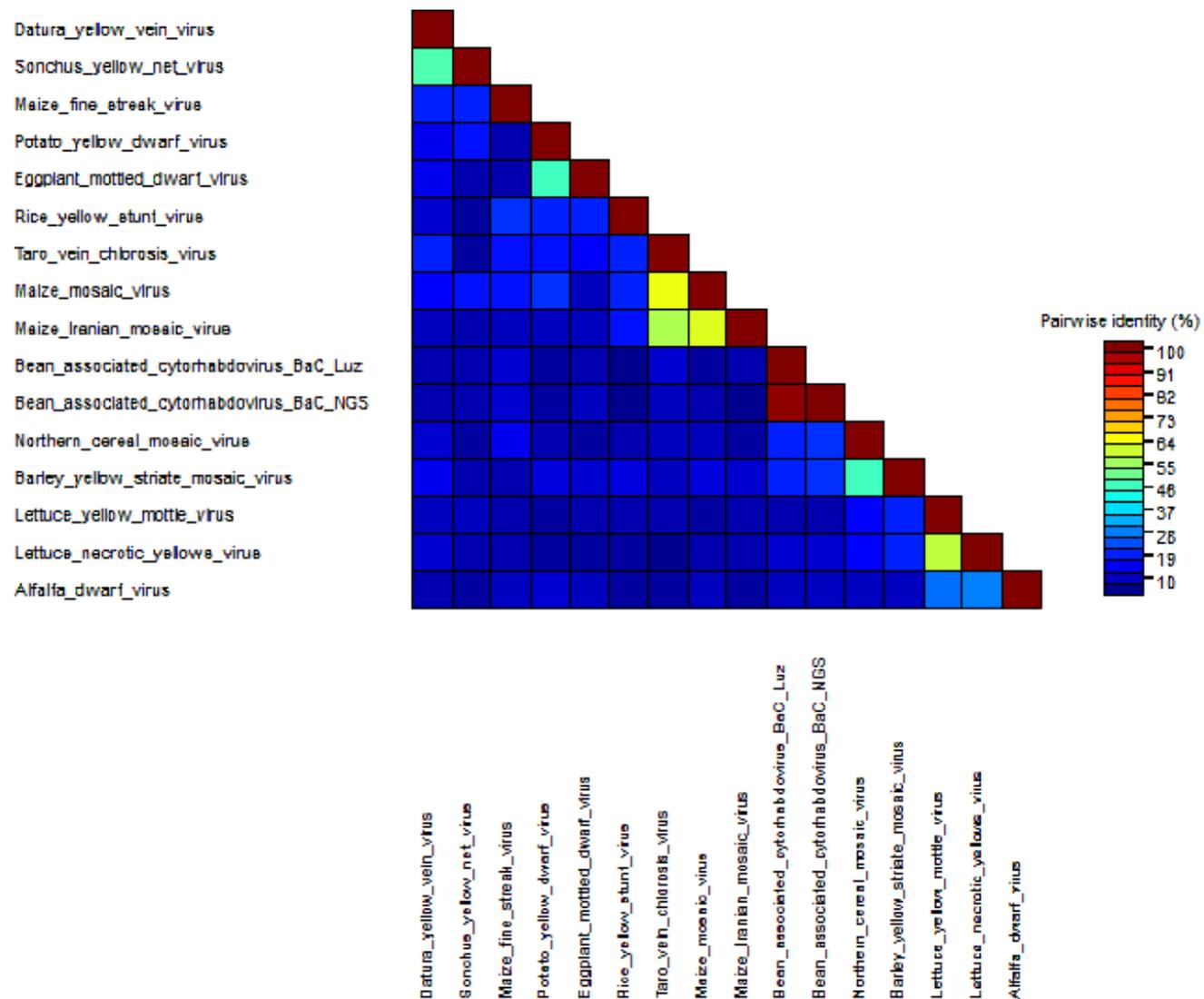


Figura 9. Matriz de identidade entre seqüências de aminoácidos do gene N (nucleoproteína) do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) (seqüência obtida por NGS e do isolado BaC_Luz) e seqüências de diferentes rhabdovírus depositadas no GenBank. As comparações e matriz foram geradas pelo programa SDT.

A árvore filogenética baseada no alinhamento global das sequências de aminoácidos do gene N do BaC e de diversos rhabdovírus pode ser visualizada na **Figura 10**. A partir da proteína N, foi possível separar os vírus em dois clados iniciais referentes aos dois gêneros nos quais essas espécies encontram-se classificadas (*Nucleorhabdovirus* e *Cytorhabdovirus*). Especificamente para os cytorhabdovírus é possível notar a distinção de dois clados separando vírus que infectam dicotiledôneas e são transmitidos por afídeos e os que infectam monocotiledôneas e são transmitidos por cigarrinhas. O BaC agrupou-se próximo ao Northern cereal mosaic virus e ao Barley yellow striate mosaic virus, embora em um ramo distinto. No cladograma, evidenciou-se que o BaC_NGS e o isolado de Luziânia (BaC_Luz) não se distinguem quanto à nucleoproteína.

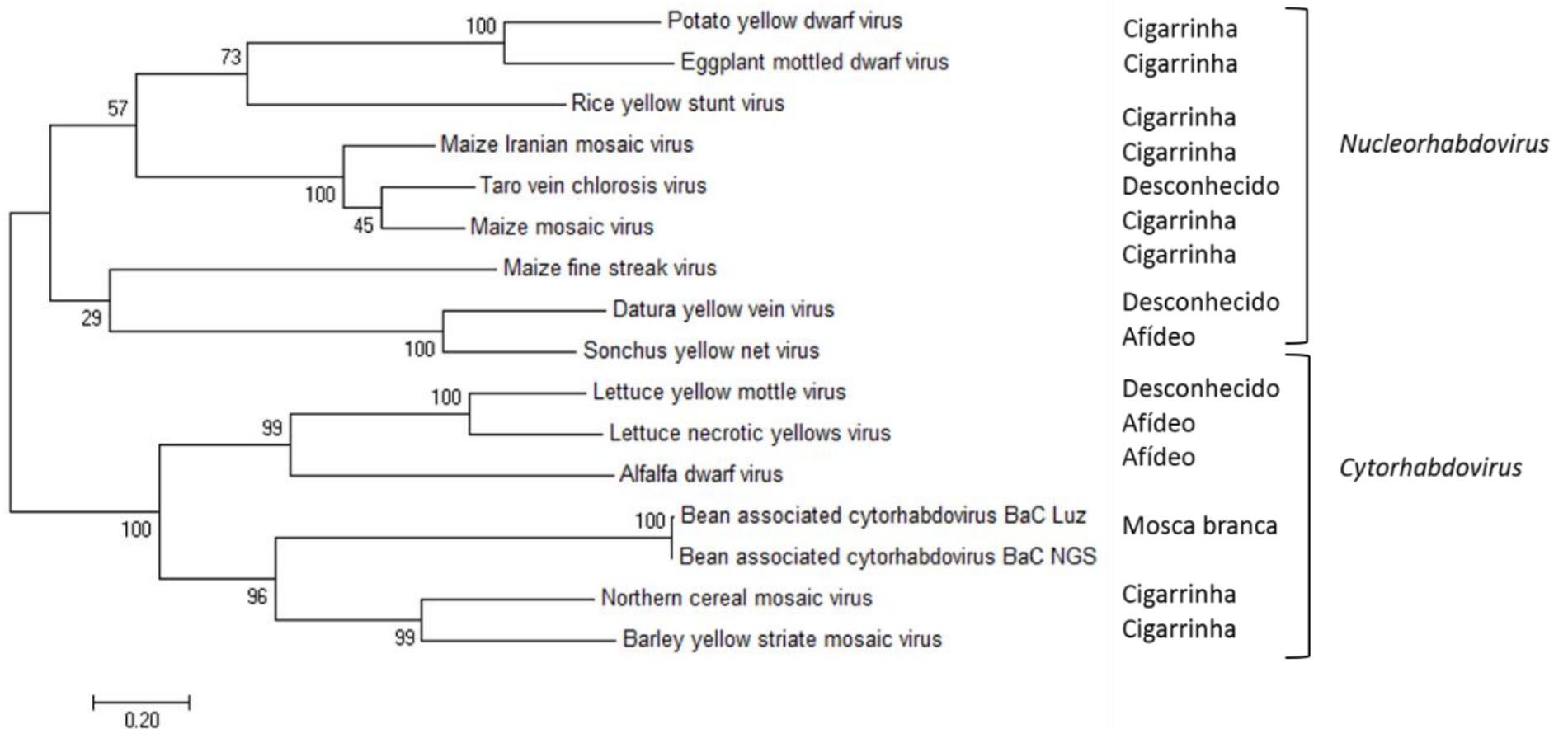


Figura 10. Árvore filogenética construída segundo algoritmo de *Maximum likelihood* no programa MEGA 7, com base no alinhamento global de sequências de aminoácidos referentes ao gene N dos vírus da família *Rhabdoviridae* e as sequências do Bean associated cytorhabdovirus (BaC).

3.3. Caracterização biológica do Bean associated cytorhabdovirus – BaC

3.3.1. Ensaio de transmissão mecânica do Bean associated cytorhabdovirus – BaC via extrato vegetal tamponado

A transmissão mecânica via extrato vegetal tamponado foi obtida apenas empregando plantas de *P. vulgaris* ‘Jalo Precoce’ (Tabela 5). Trinta e quatro dias após a inoculação mecânica, foi possível detectar a presença do *amplicon* de 1579 pb, referente ao gene N do BaC, apenas nos *pools* 11 e 12 das amostras de *P. vulgaris* ‘Jalo Precoce’ (Figura 11A). Ao analisar as amostras individualmente, detectou-se a presença do vírus na planta 2 do *pool* 11 e planta 6 do *pool* 12. Essas plantas (Figura 12) apresentavam sintomas de mosqueado, desde o vigésimo primeiro dia após inoculação, compatíveis com aqueles provocados pelo CPMMV que foi detectado na amostra por meio de RT-PCR com os *primers* específicos que constam na Tabela 1.

Os feijoeiros *mock* inoculados 1 e 5 mostraram-se negativos para a presença do BaC (Figura 11). Os clones obtidos a partir da PCR para os feijoeiros 2 e 6 apresentaram a sequência nucleotídica referente ao gene N do BaC.



Figura 11. *Amplicons* obtidos após PCR para detecção do gene N de BaC em plantas inoculadas mecanicamente. (A) *Pools* formados por cinco indivíduos das espécies: (1) *Datura stramonium*, (2) *Capsicum annum*, (3) *Solanum lycopersicum*, (4) *Chenopodium quinoa*, (5) *C. amaranticolor*, (6) *N. benthamniana*, (7) *N. rustica*, (8) *N. glutinosa*, (9) *N. tabacum*, (10) *C. chinense*, (11) e (12) *Phaseolus vulgaris* ‘Jalo Precoce’. (B) *Amplicons* do BaC obtidos a partir de plantas dos *pools* 11 e 12. (1) e (5) plantas *mock* inoculadas. (C+) e (C-) controles positivo e negativo da reação.



Figura 12. Sintoma de mosqueado em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) ‘Jalo Precoce’, vinte e um dias após inoculação mecânica com o Bean associated cytorhabdovirus – BaC.

Tabela 5. Transmissão mecânica do Bean associated cytorhabdovirus - BaC

Espécie botânica	Cultivar	Positivas/Testadas*
<i>Datura stramonium</i>	-	0/5
<i>Capsicum annum</i>	Ikeda	0/5
<i>Solanum lycopersicum</i>	Santa Clara	0/5
<i>Chenopodium quinoa</i>	-	0/5
<i>C. amaranticolor</i>	-	0/5
<i>Nicotiana benthamniana</i>	-	0/5
<i>N. rustica</i>	-	0/5
<i>N. glutinosa</i>	-	0/5
<i>N. tabacum</i>	TNN	0/5
<i>C. chinense</i>	PI 159236	0/5
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Jalo Precoce	2/6

*. Número de plantas positivas após realização de reações de PCR utilizando-se *primers* específicos para o gene N do (BaC)/número de plantas inoculadas

3.3.2. Ensaio piloto de transmissão do Bean associated cytorhabdovirus – BaC por mosca branca (*Bemisia tabaci*, *Middle East Asia Minor 1* – MEAM 1)

No ensaio piloto onde plantas infectadas e infestadas por moscas brancas oriundas do campo serviram de fonte de inóculo, aos quatorze dias após a introdução na gaiola de plantas ‘Pérola’, ‘Jalo Precoce’ BRS FC 401 RMD, foi possível a detecção do BaC_Luz em 100% das plantas teste. O ensaio foi repetido com plantas de feijoeiro ‘Pérola’ e ‘Jalo Precoce’ com resultados idênticos de 100% de infecção (**Tabela 6**).

Tabela 6. Ensaio de transmissão do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) por mosca branca (*Bemisia tabaci*, *Middle East Asia Minor 1* – MEAM 1) a feijoeiros ‘Pérola’ e ‘Jalo Precoce’ BRS FC 401 RMD.

Feijoeiro	Positivas/Testadas*	Repetições	% de plantas positivas
Pérola	8/8	2	100
Jalo Precoce	8/8	2	100
BRS FC 401 RMD	10/10	1	100

*. Número de plantas positivas após realização de reações de RT-PCR utilizando-se *primers* específicos para o gene N (Nucleoproteína) do (BaC)

3.3.3. Detecção do Bac em moscas brancas (*Bemisia tabaci*, *Middle East Asia Minor 1* – MEAM 1) utilizadas nos ensaios

A análise de adultos de mosca branca mostrou que os insetos da colônia estavam livres de vírus enquanto que nas moscas coletadas em plantas infectadas foi possível a obtenção do *amplicon* do gene N do BaC por RT-PCR (**Figura 13**). A presença do genoma viral foi confirmada após sequenciamento do *amplicon*.

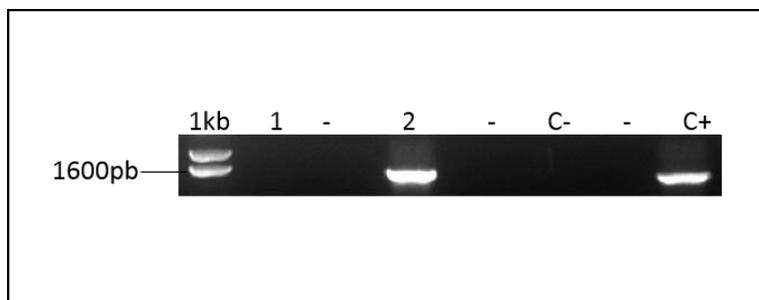


Figura 13. *Amplicons* do gene N do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) adultos de moscas brancas (*Bemisia tabaci*, *Middle East Asia Minor 1* – MEAM 1). (1) insetos avirulíferos coletados na criação da Estação Experimental de Biologia (EEB) da Universidade de Brasília – UnB; de (2) adultos coletados em plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) oriundas de plantios comerciais em Luziânia (GO). C- = controle negativo da reação. C+ = controle positivo. Marcador 1 Kb plus (Invitrogen).

Ao avaliar a possibilidade de o BaC estar integrado ao genoma dos adultos de mosca branca, por meio da realização de reações de PCR com os *primers* específicos para o gene N do vírus e para o gene mitocondrial mtCOI de *B. tabaci* somente foi amplificada o gene da nucleoproteína do vírus a partir de cDNA obtido de RNA de um grupo de insetos e o mtCOI, a partir da extração de RNA total dos insetos (**Figura 14**).

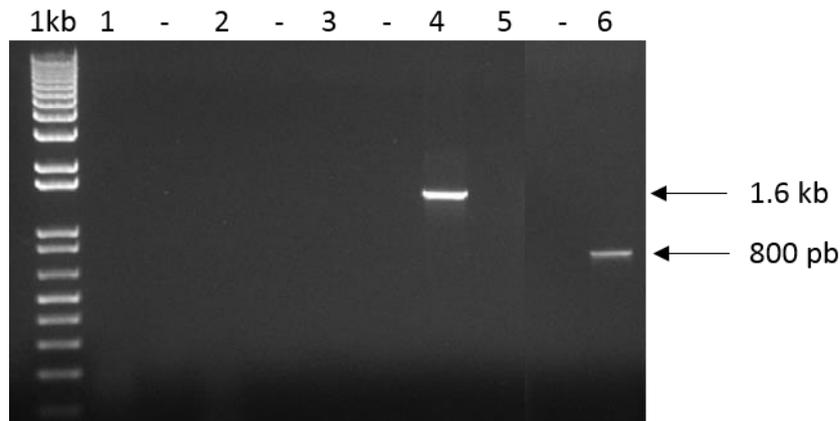


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos *amplicons* obtidos nas reações de PCR para o gene N do BaC a partir do RNA total dos insetos virulíferos (1) e avirulíferos (2); *Amplicon* do gene N utilizando cDNA obtido de RNA de moscas brancas (*Bemisia tabaci*, *Middle East Asia Minor 1* – MEAM 1) virulíferas (4) Controles negativos (3) e (5) (6) reações de PCR com os *primers* para o gene citocromo oxidase I (mtCOI) (1kb) marcador de peso molecular, Invitrogen.

3.3.4. Ensaio de transmissão do Bean associated cytorhabdovirus – BaC por mosca branca (*Bemisia tabaci*, *Middle East Asia Minor 1* – MEAM 1) em condições controladas

No sétimo dia após o término do PAI, a PCR resultante da extração de RNA total das amostras foliares coletadas mostrou que plantas que receberam moscas virulíferas (que se alimentaram previamente por sete dias em um feijoeiro infectado), *P. vulgaris*, *V. unguiculata* e *G. max* ‘BR 16’ comportaram-se como hospedeiras do BaC (**Tabela 7**). Trinta dias após o PAI, as plantas apresentavam sintomas de mosqueado, amarelecimento e em alguns casos, pontos necróticos, característicos em infecções por CPMMV conforme observado nas plantas de caupi na **Figura 15**.

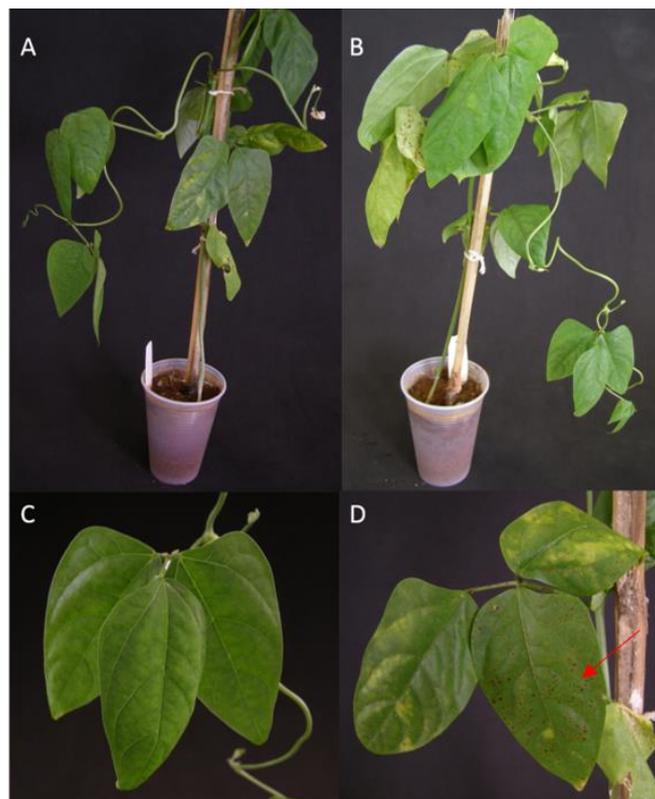


Figura 15. Plantas de *Vigna unguiculata* ‘BRS Imponente’ apresentando sintomas de infecções virais trinta dias após o término do Período de Acesso de Inoculação do isolado do Bean associated cytorhabdovirus – BaC de Luziânia (GO) por adultos de mosca branca (*Bemisia tabaci*, *Middle East Asia Minor 1* – MEAM 1). (A) e (B) plantas distintas com sintomas de amarelecimento e pontos necróticos. (C) trifólio com sintoma de mosqueado. (D) trifólio com intenso amarelecimento e pontos necróticos (seta).

Tabela 7. Transmissão do Bean associated cytorhabdovirus (BaC) por mosca branca (*Bemisia tabaci* MEAM 1)

Espécie botânica	Cultivar	Positivas/ Testadas*	% de plantas infectadas
<i>Phaseolus vulgaris</i>	BRSFC 401 RMD	3/4	75
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-	0/4	0
<i>Solanum lycopersicum</i>	Santa Clara	0/4	0
<i>Vigna unguiculata</i>	BRS Imponente	2/4	50
<i>Glycine max</i>	BR16	1/4	25
	BRS7780	0/4	0
	Williams	0/4	0

*. Número de plantas positivas após realização de reações de PCR utilizando-se *primers* específicos para o gene N (Nucleoproteína) do (BaC) em um total de quatro plantas testadas de cada espécie botânica ou cultivar.

Já as plantas *mock* inoculadas, ou seja, que receberam 25 a 30 moscas que se alimentaram previamente por sete dias em um feijoeiro sadio, nenhuma possuía o vírus ao final do experimento. Após a detecção do vírus, as folhas que foram coletadas e armazenadas a -80 °C antes do processo de inoculação foram avaliadas quanto à presença viral e todas elas mostraram-se negativas para o BaC.

Após a realização da PCR dos cinquenta adultos de mosca branca avirulíferos (coletados na criação mantida em casa de vegetação na Estação Experimental de Brasília – UnB) constatou-se a ausência do BaC, como pode ser observado no gel da **Figura 13**, em que o número 1 corresponde à amostragem dessas moscas, em comparação com as que estavam colonizando os feijoeiros oriundos do campo de Luziânia – GO (2).

4. DISCUSSÃO

Em um trabalho inicial de levantamento, um potencial novo genoma viral foi identificado por meio da técnica de NGS em amostras de feijoeiros comuns provenientes de plantios em Goiás. A análise inicial dessa sequência indicou uma baixa identidade com o gene codificador da polimerase (L) do Northern cereal mosaic virus – NCMV, um cytorhabdovírus (família *Rhabdoviridae*) que infecta plantas monocotiledôneas e que é transmitido por cigarrinhas. Esses resultados indicaram que o genoma presente em tecido foliar de feijoeiro poderia representar uma nova espécie de cytorhabdovírus, que foi tentativamente denominada de Bean associated cytorhabdovirus – BaC.

Sequências relacionadas à nucleoproteína de cytorhabdovírus e varicosavírus já foram previamente identificadas como estando integradas ao genoma de plantas das famílias Solanaceae, Leguminosae, Brassicaceae e Phrymaceae. A partir do emprego de *primers* específicos sintetizados para o gene N foi possível demonstrar que o BaC não se encontra integrado ao genoma do feijoeiro comum. Desta forma, o BaC se mostra distinto do Lettuce necrotic yellows virus e do NCMV onde sequências semelhantes à nucleoproteína foram encontradas no genoma de *Nicotiana tabacum*, do Lettuce yellow mottle virus com sequências integradas no genoma de *Populus trichocarpa* e do Lettuce big-vein associated virus integrada em *Brassica carpa*, *Lotus japonicus*, *Theobroma cacao* e *Cucumis sativus* (Chiba et al., 2011).

Além disso, com esses mesmos *primers* detectou-se a presença do vírus em campos de plantios experimentais e comerciais na região Central do Brasil, em três dos quatro locais de coleta: Brasília-DF, Cristalina-GO e Luziânia-GO com taxas de incidência de aproximadamente 60% para as duas primeiras e 93% para a última

localidade. O BaC foi detectado apenas em plantas de feijoeiro com infecções mistas de vírus de RNA e DNA, sendo comum a detecção do begomovírus BGMV (97,7% das amostras) e do carlavírus CPMMV (89,7% das amostras coletadas), ambos transmitidos por adultos de mosca branca.

Embora tenha sido detectada a presença dos três vírus nos feijoeiros, nada ainda se sabe sobre a relação existente entre eles seja na planta ou no inseto vetor. Portanto não foi possível ainda responder questionamentos sobre sinergismos virais ou ainda estabelecer, claramente, quais os efeitos dessa infecção mista nos sintomas ocasionados nas plantas e, principalmente, o potencial impacto na produtividade. Além disso, não se tem bem definida a correlação entre um vírus e os sintomas específicos que esse provoca na planta.

Os rhabdovírus de diferentes gêneros ou famílias que infectam plantas podem ser encontrados em infecções mistas. Embora os trabalhos sobre esse tema sejam poucos, temos como exemplo o nucleorhabdovírus Taro vein chlorosis virus detectado em plantas de taro (*Colocasia esculenta*, família Araceae) em associação com Dasheen mosaic virus (gênero *Potyvirus* e família *Potyviridae*) e o Colocasia bobone disease associated virus proposto dentro do gênero *Cytorhabdovirus* (Revill et al., 2005, Higgins et al., 2016a). Amostras de alho (*Allium sativum*) com sintomas de nanismo, clorose e enrugamento foliar foram coletadas na Austrália e, após emprego de microscopia eletrônica e testes sorológicos, foi possível detectar a presença do cytorhabdovírus Lettuce necrotic yellows virus, bem como do Leek yellow stripe virus (gênero *Potyvirus* e família *Potyviridae*) (Sward, 1990). Outro rhabdovírus comumente relatado em co-infecções virais é o Lettuce big-vein associated virus, caracterizado por causar infecção latente em alface (*Lactuca sativa*), enquanto o Mirafiori lettuce big-vein virus (gênero *Ophiovirus* e família *Ophioviridae*) é o causador dos sintomas de clareamento das nervuras foliares e crescimento retardado das plantas (Verbeek et al., 2013).

No presente estudo, foi obtida a sequência nucleotídica completa do genoma do isolado BaC_Luz coletado em campos de produção de feijoeiro da cultivar Pérola em Luziânia (GO). As extremidades 3' e 5' do genoma viral, que muitas vezes não são plenamente sequenciadas por NGS ou recuperadas durante o processo de montagem de genomas, foram identificadas por RACE 5' e RACE 3'. A sequência do genoma completo do BaC_Luz possui 13.469 nucleotídeos. Foram identificadas por *Blastx* seis ORFs compostas pelos cinco genes essenciais nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína matriz (M), glicoproteína (G) e polimerase (L), além de um gene acessório com provável

função de proteína de movimento (3), com uma organização genômica 3'-L-N-P-3-M-G-L-5'. As ORFs são flaqueadas por uma sequência *leader* 3' e uma sequência *trailer* 5' que são parcialmente complementares como é característico para os genomas de rhabdovírus (Dietzgen et al., 2011).

Devido ao fato de as sequências referentes ao gene N terem sido as primeiras a serem obtidas via Sanger para o BaC_Luz, optou-se por iniciar as análises filogenéticas para a nucleoproteína. De fato, os trabalhos de filogenia e diversidade dentro da família *Rhabdoviridae* tem empregado, preferencialmente, a informação de sequência da proteína N. Isso se deve a um conjunto peculiar de características dessa proteína que inclui o fato dela ser essencial para a formação da partícula viral, bem como ser a primeira a ser transcrita (e conseqüentemente ter maior quantidade de mRNA) e ser sintetizada com alta eficiência (Callaghan & Dietzgen, 2005).

A partir das análises filogenéticas realizadas para a sequência de aminoácidos da nucleoproteína, pôde-se confirmar o posicionamento do BaC entre os vírus do gênero *Cytorhabdovirus*, com maior proximidade do Northern cereal mosaic virus – NCMV e Barley yellow striate mosaic virus – BYSMV. O mesmo resultado já havia sido previamente demonstrado por meio de análises filogenéticas realizadas com a sequência da polimerase do BaC obtida via NGS **Figura 1, Capítulo 2** (Alves-Freitas e colaboradores, dados não publicados). Embora esses cytorhabdovírus sejam os mais próximos ao BaC, as identidades entre as sequências obtidas pelo alinhamento múltiplo ClustalW foi baixa, tendo em vista que não ultrapassaram valores de 25%.

Os alinhamentos entre BaC e NCMV, bem como BaC e BYSMV apresentaram identidades inferiores a 28%, no SDT. Dentre os resultados de alinhamento para os demais vírus, os que apresentaram maiores identidades para a nucleoproteína foram o Taro vein chlorosis virus – TVCV com o Maize mosaic virus – MMV e este com o Maize Iranian mosaic virus – MIMV, ambos com aproximadamente 64%. Uma elevada identidade (98,89%) foi observada ao comparar as sequências de aminoácidos do gene N entre os isolados BaC_NGS e BaC_Luz, indicando, muito provavelmente, que eles representam variantes do mesmo vírus. Essas diferenças entre as sequências entre BaC_NGS e BaC_Luz pode estar atrelada ao fato de não ter se obtido a amplificação do genoma completo em um só *contig* e com isso, durante as reações de PCR, ou mesmo no processo de clonagem, diferentes sequências de moléculas presentes numa mesma amostra podem ter sido amplificadas, inseridas nos plasmídeos e sequenciadas.

As análises filogenéticas conduzidas com os aminoácidos da proteína N, permitiram separar os vírus não somente em dois gêneros distintos, *Cytorhabdovirus* e *Nucleorhabdovirus*, como também segundo seu modo de transmissão. Vírus transmitidos por cigarrinhas e afídeos agruparam-se em dois clados distintos no gênero *Cytorhabdovirus*, o primeiro composto por Lettuce yellow mottle virus, Lettuce necrotic yellows virus e Alfalfa dwarf virus que possuem membros da família Aphididae como vetores. Em outro clado agruparam o Northern cereal mosaic virus e Barley yellow striate mosaic virus ambos transmitidos por cigarrinhas da família Delphacidae, como a espécie *Laodelphax striatellus*. Os mesmos resultados foram encontrados por Higgins et al. (2016), ao fazerem uma análise comparativa do gene da polimerase (L) desses rhabdovírus. O BaC foi posicionado mais próximo aos cytorhabdovírus transmitidos por cigarrinhas em plantas monocotiledôneas. No entanto, os isolados de BaC agruparam-se em um clado distinto, sugerindo que o vetor envolvido na transmissão viral pode ser uma característica determinante na diferenciação entre espécies em análises filogenéticas. Essa observação está de acordo com a determinação do ICTV que inclui o modo de transmissão entre os critérios taxonômicos para definição das espécies de rhabdovírus que infectam plantas (Dietzgen et al., 2011).

A separação no cladograma do BaC das espécies BYSMV e NCMV também está fortemente relacionada com o fato de os dois vírus apresentarem ORFs múltiplas entre os genes que codificam a fosfoproteína e proteína matriz, denominadas 3, 4, 5 e 6 e ainda uma ORF 9, entre o gene da glicoproteína e o da polimerase (3'-N-P-3-4-5-6-M-G-9-L-5'). O BaC, por sua vez, possui apenas uma ORF entre os genes P e M. Resultados semelhantes foram obtidos para um novo vírus com 12.193 nt proposto ao gênero, o Colocasia bobone disease-associated virus que infecta plantas de taro em Ilhas Salomão e Papua Nova-Guiné e possui apenas uma ORF, a P3, entre os genes P e M. Após análises filogenéticas para o gene da polimerase, o Colocasia bobone disease-associated virus mostrou-se agrupado em um clado próximo ao BYSMV (Higgins et al 2016).

Após os ensaios de transmissão viral, seja por método mecânico ou via inseto vetor, foi possível comprovar que esse novo rhabdovírus detectado em feijoeiro é capaz de ser transmitido de uma planta infectada para outra, embora ainda não se saiba o efeito isolado do vírus na hospedeira, tendo em vista a impossibilidade, no presente estudo, de detectá-lo livre de infecções mistas.

Ao se testar a transmissão mecânica por meio da provocação de micro lesões nas folhas de plantas sadias que permitissem a entrada das partículas virais presentes em

extrato vegetal infectado, 25% dos feijoeiros ‘Jalo Precoce’ apresentaram-se positivos para a presença do BaC. Vinte e um dias após a inoculação já era possível notar a presença de sintomas como mosaico semelhante ao ocasionado por infecções com o CPMMV observação que corrobora com a presença desse vírus nos feijoeiros utilizados como fonte de inóculo do BaC_Luz. Desta forma, é muito provável que o sintoma observado seja referente a esse carlavírus (Faria et al., 2016). Já as demais plantas avaliadas nas famílias Amaranthaceae e Solanaceae (*D. stramonium*, *C. annuum*, *C. chinense*, *S. lycopersicum*, *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *N. benthamniana*, *N. rustica*, *N. glutinosa* e *N. tabacum*) não apresentaram o vírus nas reações de PCR realizadas trinta e quatro dias após a inoculação.

Tais resultados mostram que, experimentalmente, o BaC pode ser mecanicamente transmitido de uma planta de feijoeiro infectada para outra sadia. Esse atributo também é observado em outros rhabdovírus, tais como o Lettuce necrotic yellows virus (LNyV) que pode ser transmitido de alface para *N. glutinosa*, *N. clevelandii*, *Petunia hybrida* e *D. stramonium* (Dietzgen et al., 2011, Higgins et al., 2016b).

Quando se trata da transmissão dos rhabdovírus por vetores, sabe-se que de modo geral os cytorhabdovírus e nucleorhabdovírus são transmitidos por meio da ação de insetos vetores como cigarrinhas e afídeos, enquanto os dichorhavírus por ácaros do gênero *Brevipalpus* e o *Varicosavirus*, por esporos de fungos pertencentes ao gênero *Olpidium*. (Dietzgen et al., 2014, Dietzgen et al., 2017).

Após a realização de um ensaio piloto de transmissão por adultos de mosca branca, foi possível mostrar que os insetos originários de colônias mantidas em feijoeiros infectados com o BaC são capazes de transmitir o vírus para plantas saudas ‘Jalo Precoce’ e ‘Pérola’ e da linhagem de feijoeiro transgênico com resistência ao BGMV (‘BRS FC 401 RMD’), quando essas encontram-se disponíveis para livre alimentação das moscas adultas por um período de 14 dias. A eficiência da transmissão viral, nessas condições, mostrou-se elevada tendo em vista que 100% das plantas em todas as repetições mostraram-se positivas quando avaliadas para a presença do BaC.

O ensaio com 25 a 30 adultos de mosca branca de um a três dias de vida crescidos em colônia em casa de vegetação sem a presença do BaC, que passaram sete dias se alimentando em feijoeiro infectado e que depois deles foram transferidos para plantas saudas, se mostrou eficiente para confirmação da capacidade desse inseto atuar como vetor do novo cytorhabdovírus. Para adoção dessa metodologia, em questão, trabalhos prévios realizados para avaliar ou comprovar a transmissão de vírus pertencentes à família

Rhabdoviridae foram utilizados como modelos (McGavin et al., 2011, Posthuma et al., 2002, Creamer et al., 1997), bem como de vírus que são conhecidamente transmitidos por mosca branca, como os begomovírus (Cañizares et al., 2015, Hassan et al., 2016, Kheyr-Pour et al., 2000) e crinivírus (Orilio et al., 2014, Orfanidou et al., 2016, Wintermantel et al., 2016).

Nesse ensaio, a taxa de transmissão viral foi de 75% para o feijoeiro comum e ainda foi possível ampliar a gama de hospedeiras para o BaC, tendo em vista que 50% das plantas avaliadas de feijão caupi (*V. unguiculata*) e 25% das plantas de soja (*G. max*) cultivar BR16 mostraram-se positivas para o vírus 14 dias após início do período de alimentação pelas moscas. A presença dos sintomas detectados nas plantas trinta dias após o PAI assemelha-se com aqueles descritos para o CPMMV e, assim como o feijoeiro fonte de inóculo utilizado no ensaio de transmissão mecânica, o BRS FC 401 RMD usado como fonte de aquisição do BaC_Luz pelas moscas brancas também estava infectado por carlavírus (dados não mostrados).

A transmissão do BaC nesse experimento apresentou uma taxa de eficiência 25% inferior ao ensaio piloto em que a transmissão ocorreu para 100% das plantas de todos os feijoeiros, incluindo o BRS FC 401 RMD. A redução constatada na eficiência de transmissão do vírus pela mosca branca pode estar relacionada com o período de acesso de inoculação (PAI) que nesse ensaio foi menor que no experimento piloto, sendo reduzido de 14 para 7 dias. Além disso, a quantidade de adultos que puderam se alimentar em cada planta foi limitada para o máximo de 30, enquanto no primeiro teste as moscas encontravam-se livres para se alimentar e, por consequência, cada planta pode ter recebido uma quantidade maior de partículas virais.

A detecção do BaC em plantas de soja e caupi e não detecção em tomateiro e *N. benthamiana* nos permite inferir que, muito possivelmente, existe uma especificidade hospedeira do vírus. Os resultados do presente trabalho indicam que BaC apresenta diferentes fabáceas como hospedeiras, mas não puderam infectar solanáceas nas condições testadas. O resultado da transmissão mecânica em que não se detectou o vírus em nenhuma solanácea corrobora com tal inferência sobre a gama de hospedeiras do BaC.

Amplificações realizadas utilizando-se o cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído de 50 adultos de mosca branca coletados em colônias provenientes de feijoeiros do campo sabidamente infectados pelo BaC e outros cinquenta daquelas mantidas em casa de vegetação em plantas de repolho, mostraram que partículas podem ser detectadas no corpo do inseto. Embora pelo método adotado não seja possível quantificar ou dosar

a presença do vírus nessas moscas, tais resultados são indícios que auxiliam na caracterização do inseto como vetor, principalmente, pela não detecção do BaC nas moscas avirulíferas criadas em plantas de repolho em casa de vegetação e ainda, pelo fato do genoma viral não se apresentar integrado ao genoma do inseto.

Primers degenerados para uma região do gene L da espécie tentativa do gênero *Cytorhabdovirus*, Raspberry vein chlorosis virus – RVCV, foram sintetizados com base nas sequências do SYNV, NCMV e do Strawberry virus – SCV e, ao serem utilizados em reações de PCR para amplificação em amostras foliares de framboesiras (*Rubus rosifolius*) infectadas com o vírus, mostraram-se ineficientes. Quando os mesmos *primers* foram empregados na RT-PCR com o RNA proveniente de cerca de cem afídeos (*Aphis idaei*) virulíferos que permaneceram duas semanas se alimentando em planta infectada, os fragmentos esperados de 693 e 286 pb foram amplificados, sequenciados e comparados com sequências de demais rhabdovirus comprovando a presença do RVCV em adultos de seu inseto vetor. A presença do vírus nas framboesiras utilizadas no ensaio de transmissão que receberam os afídeos foi, posteriormente, confirmada por meio da realização de RT-PCR com *primers* específicos desenhados com base no sequenciamento do dsRNA, bem como no dsRNA dos afídeos (McGavin et al., 2011).

O SCV foi detectado no RNA de adultos do afídeo vetor *Chaetosiphon fragaerolii*, após passarem de seis a dez dias se alimentando em folhas de morangueiro infectadas. Para a realização das reações de RT-PCR, *primers* degenerados haviam sido sintetizados com base nas sequências do gene L de rhabdovirus que apresentam mamíferos, peixes, insetos e plantas como hospedeiras: Rabies lyssavirus – RV, Indiana vesiculovirus (antigo Vesicular stomatitis virus – VSV), Snakehead novirhabdovirus – SHV, Oncorhynchus 1 novirhabdovirus (antigo Infectious hematopoietic necrosis virus – IHNV), Oncorhynchus 2 novirhabdovirus (antigo Viral hemorrhagic septicemia virus – VHSV) e Sonchus yellow net nucleorhabdovirus – SYNV. Pesquisadores concluem que a técnica pode ser útil para levantamento da presença de afídeos infectados em campos e, conseqüentemente, auxiliar no conhecimento da epidemiologia da doença (Posthuma et al., 2002).

(Dietzgen et al., 2013) afirmam também que a técnica de RT-PCR, empregada nos trabalhos acima relatados, pode ser útil para detecção e descoberta de potenciais vetores de Datura yellow vein nucleorhabdovirus – DYVV. Agora, a mesma técnica mostrou-se útil para, em conjunto com os ensaios de transmissão, detectar o BaC nos adultos de

mosca branca e assim ainda possibilitar um levantamento futuro da disseminação do vírus em diferentes regiões não só pela avaliação de fabáceas.

Até o presente momento, além das espécies de *Begomovirus*, *B. tabaci* também era tida como um eficiente vetor de vírus classificados nos gêneros *Ipomovirus* (família *Potyviridae*), *Crinivirus* (família *Closteroviridae*), *Carlavirus* (família *Betaflexiviridae*) e *Torradovirus* (família *Secoviridae*) e agora mais um gênero e família foram inseridos na lista de vírus transmitidos por esse inseto de grande importância para a agricultura devido, também, às suas características como praga (Navas-Castillo et al., 2011, Gilbertson et al., 2015).

Bemisia tabaci consiste em um complexo de espécies crípticas em que não apresentam diferenças morfológicas entre elas, somente em relação a características comportamentais, aos organismos endossimbiontes que elas abrigam e a eficiência com que são capazes de transmitir vírus (van Brunschot et al., 2014). A partir de 1980, dois biótipos foram amplamente disseminados (*B. tabaci* biótipo B, atualmente denominado de *Middle East Asia Minor 1* -MEAM1 e *B. tabaci* biótipo Q, atualmente *Mediterranean* – MED) e acredita-se que por consequência, tenha elevado o número de viroses no mundo (van Brunschot et al., 2014).

No Brasil, o biótipo B (=MEAM1) foi introduzido em 1990 e desde então tem se mostrado como importante praga em hortícolas. À essa maior colonização, tem sido associada uma ampla disseminação de viroses pelo mundo, tendo em vista que essas moscas além de serem vetores, podem apresentar elevada resistência à inseticidas (van Brunschot et al., 2014, Inoue-Nagata et al., 2016).

O controle químico da mosca branca no feijoeiro apresenta hoje, no Brasil, 48 produtos registrados, sendo que a maioria deles pertence à classe dos neonicotinóides ou ainda, misturas de piretróides com neonicotinóides (MAPA, 2017). O emprego de inseticidas consiste em um método muito utilizado para o controle da mosca branca, embora esse possa promover alterações ambientais e ocasionar perda da diversidade de insetos e demais artrópodes, bem como induzir a resistência aos produtos pelos indivíduos alvos.

Devido às grandes perdas ocasionadas pelo BGMV, o vírus de maior importância para o feijoeiro, no Brasil, muitos esforços de pesquisa foram mobilizados para o controle da virose, seja por métodos de controle do inseto vetor como o estabelecimento do vazio sanitário, seja pela busca de fontes de resistência ao vírus. Em 2014, o MAPA lançou uma portaria proibindo o plantio da cultura nos estados de Goiás, Minas Gerais e no Distrito

Federal por trinta dias (anualmente em setembro ou outubro, a depender do município). Neste contexto, após mais de vinte e cinco anos de trabalhos em busca de uma cultivar comercial com alta resistência por meio de métodos tradicionais de melhoramento de plantas não ter apresentado resultados satisfatórios, surgiu o feijão transgênico BRS FC 401 RMD imune ao vírus por meio da expressão de RNAs interferentes – RNAi e características agrônômicas superiores que já foi aprovado pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio (Faria et al., 2014).

A obtenção da cultivar BRS FC 401 RMD imune ao BGMV permitiu que maior ênfase fosse dada a outros vírus que, anteriormente, apresentavam sintomas mascarados quando em infecção mista com o begomovírus, como o carlavírus CPMMV que foi detectado em taxas de 17 a 69% de severidade nos campos testados com os feijoeiros resistentes ao BGMV (Faria et al., 2016). Além disso tornou possível, também, a descoberta do BaC, quando amostras desses feijoeiros foram sequenciadas via NGS.

A caracterização molecular e biológica desse rhabdovírus ainda continuará sendo investigada e, para tanto, pretende-se desenvolver um clone infeccioso a fim de possibilitar estudos sobre a relação vírus-planta (a exemplo, aspectos relacionados com indução e ou intensificação de sintomas em infecções simples e mistas) e vírus-vetor (*B. tabaci*). Além de definir o tipo de relação e transmissão do vírus pelo vetor mosca branca; os sítios de expressão das proteínas virais nas células vegetais, definir a função de genes do vírus ainda desconhecidos e ainda, estudar a variabilidade genética entre isolados coletados em diferentes regiões brasileiras, incluindo o Nordeste e Sul.

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho, cumpriu-se o objetivo geral de iniciar a caracterização molecular e biológica do novo cytorhabdovírus (denominado de Bean associated cytorhabdovirus – BaC) detectado em feijoeiro comum por meio do sequenciamento NGS.

O BaC mostrou-se disseminado na região Central do Brasil, tendo em vista que foi detectado em feijoeiros comuns em Brasília (DF), Cristalina e Luziânia (GO) e tem sido encontrado em associação com o BGMV e o CPMMV, dois vírus transmitidos por mosca branca.

O genoma completo do BaC detectado em Luziânia foi obtido e sequenciado via Sanger e mostrou-se compatível com aquele obtido via NGS a partir do RNA de amostras de feijoeiros resistentes ao BGMV produzidos na Embrapa Arroz e Feijão.

Foi comprovado que o BaC pode ser transmitido mecanicamente de um feijoeiro infectado para outro sadio da cultivar 'Jalo Precoce', bem como ser transmitido para feijoeiros 'Jalo Precoce', 'Pérola', transgênico BRS FC 401 RMD, feijão caupi 'BRS Imponente' e soja 'BR16', por meio da alimentação de adultos de mosca branca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams IP, Glover RH, Monger WA, *et al.*, 2009. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Mol Plant Pathol* **10**, 537-45.
- Afonso CL, Amarasinghe GK, Banyai K, *et al.*, 2016. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol* **161**, 2351-60.
- Agriculture USDOHaHSaUSDO, 2015-2020. *Dietary Guidelines for Americans*.
- Ahlquist P, Janda M, 1984. cDNA cloning and in vitro transcription of the complete brome mosaic virus genome. *Mol Cell Biol* **4**, 2876-82.
- Al Rwahnih M, Daubert S, Golino D, Rowhani A, 2009. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology* **387**, 395-401.
- Bandyopadhyay A, Kopperud K, Anderson G, Martin K, Goodin M, 2010. An integrated protein localization and interaction map for Potato yellow dwarf virus, type species of the genus Nucleorhabdovirus. *Virology* **402**, 61-71.
- Barba M, Czosnek H, Hadidi A, 2014. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses* **6**, 106-36.
- Bejerman N, Giolitti F, De Breuil S, *et al.*, 2015. Complete genome sequence and integrated protein localization and interaction map for alfalfa dwarf virus, which combines properties of both cytoplasmic and nuclear plant rhabdoviruses. *Virology* **483**, 275-83.
- Bitocchi E, Nanni L, Bellucci E, *et al.*, 2012. Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E788-96.
- Blanc S, Michalakis Y, 2016. Manipulation of hosts and vectors by plant viruses and impact of the environment. *Curr Opin Insect Sci* **16**, 36-43.
- Blawid R, Nagata T, 2015. Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a binary vector using one-step Gibson Assembly. *J Virol Methods* **222**, 11-5.
- Blondel D, Maarifi G, Nisole S, Chelbi-Alix MK, 2015. Resistance to Rhabdoviridae Infection and Subversion of Antiviral Responses. *Viruses* **7**, 3675-702.
- Bordat A, Houvenaghel MC, German-Retana S, 2015. Gibson assembly: an easy way to clone potyviral full-length infectious cDNA clones expressing an ectopic VPg. *Virol J* **12**, 89.
- Breitbart M, Salamon P, Andresen B, *et al.*, 2002. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14250-5.

- Callaghan B, Dietzgen RG, 2005. Nucleocapsid gene variability reveals two subgroups of Lettuce necrotic yellows virus. *Arch Virol* **150**, 1661-7.
- Cañizares MC, Rosas-Díaz T, Rodríguez-Negrete E, *et al.*, 2015. Arabidopsis thaliana, an experimental host for tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses by agroinoculation and whitefly transmission. *Plant Pathology* **64**, 265-71.
- Chen W, Hasegawa DK, Kaur N, *et al.*, 2016. The draft genome of whitefly Bemisia tabaci MEAM1, a global crop pest, provides novel insights into virus transmission, host adaptation, and insecticide resistance. *BMC Biol* **14**, 110.
- Chiba S, Kondo H, Tani A, *et al.*, 2011. Widespread endogenization of genome sequences of non-retroviral RNA viruses into plant genomes. *PLoS Pathog* **7**, e1002146.
- Conab, 2017. *Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Safra 2016/17*
- Costa AS, 1965. Three whitefly-transmitted diseases of beans in the State of São Paulo, Brazil. *FAO Plant Protection Bulletin* **13**, 121-30.
- Costa AS, Gaspar JO, Vega J, 1983. Mosaico angular do feijoeiro causada por um carlavirus transmitido pela mosca branca Bemisia tabaci. *Fitopatologia Brasileira* **8**, 325-37.
- Creamer R, He X, Styer WE, 1997. Transmission of Sorghum Stunt Mosaic Rhabdovirus by the Leafhopper Vector, Graminella sonora (Homoptera: Cicadellidae). *Plant Disease* **81**, 3.
- Da Fonseca Barbosa L, Yuki VA, Marubayashi JM, *et al.*, 2015. First report of Bemisia tabaci Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. *Pest Manag Sci* **71**, 501-4.
- Dawson WO, Beck DL, Knorr DA, Grantham GL, 1986. cDNA cloning of the complete genome of tobacco mosaic virus and production of infectious transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 1832-6.
- De Camargo IJB, Kitajima EW, Costa AS, 1968. Estudo ao microscópio eletrônico de tecidos de plantas infetadas pelo vírus do mosaico comum e mosaico amarelo do feijoeiro *Bragantia* **27**, 410-5.
- De Camargo IJB, Kitajima EW, Costa AS, 1976. Microscopia eletrônica do vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro in situ. *Fitopatologia Brasileira* **1**.
- De Oliveira AS, Melo FL, Inoue-Nagata AK, Nagata T, Kitajima EW, Resende RO, 2012. Characterization of bean necrotic mosaic virus: a member of a novel evolutionary lineage within the Genus Tospovirus. *PLoS One* **7**, e38634.
- Dietzgen RG, Calisher CH, Kurath G, *et al.*, 2011. Family Rhabdoviridae. In. *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses: Classification and Nomenclature of Viruses.*: Elsevier, 686-713.

- Dietzgen RG, Kondo H, Goodin MM, Kurath G, Vasilakis N, 2017. The family Rhabdoviridae: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins. *Virus Res* **227**, 158-70.
- Dietzgen RG, Kuhn JH, Clawson AN, *et al.*, 2014. Dichorhavirus: a proposed new genus for Brevipalpus mite-transmitted, nuclear, bacilliform, bipartite, negative-strand RNA plant viruses. *Arch Virol* **159**, 607-19.
- Dietzgen RG, Tan ER, Yong AHS, Feng CWA, 2013. Partial polymerase gene sequence, phylogeny and RT-PCR diagnostic assay for Datura yellow vein nucleorhabdovirus. *australasian Plant Disease Notes* **8**, 21-5.
- Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**, 11-5.
- Drucker M, Then C, 2015. Transmission activation in non-circulative virus transmission: a general concept? *Curr Opin Virol* **15**, 63-8.
- Embrapa, 2003. Sistemas de produção. Cultivo do feijoeiro comum. In.: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acesso em 24/10/2015.
- Fao, 2015. Statistical Databases. In.: <http://faostat.fao.org> Acesso em 24/10/2015.
- Faria JC, Aragão FJL, Souza TLPO, Quintela ED, Kitajima EW, Ribeiro SG, 2016. Golden Mosaic of Common Beans in Brazil: Management with a Transgenic Approach. *APS Features*.
- Faria JC, Valdisser PaMR, Nogueira EOPL, Aragão FJL, 2014. RNAi-based Bean golden mosaic virus-resistant common bean (Embrapa 5.1) shows simple inheritance for both transgene and disease resistance. *Plant Breeding* **133**, 649-53.
- Fernandes-Acioli NaN, Pereira-Carvalho RC, Fontenele RS, *et al.*, 2011. First Report of Sida micrantha mosaic virus in Phaseolus vulgaris in Brazil. *Plant Disease* **95**, 1196-.
- Fernandes FR, Cruz AR, Faria JC, Zerbini FM, Aragao FJ, 2009. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. *Arch Virol* **154**, 1567-70.
- Fort P, Albertini A, Van-Hua A, *et al.*, 2012. Fossil rhabdoviral sequences integrated into arthropod genomes: ontogeny, evolution, and potential functionality. *Mol Biol Evol* **29**, 381-90.
- Garrido-Ramirez ER, Sudarshana MR, Gilbertson RL, 2000. Bean golden yellow mosaic virus from Chiapas, Mexico: Characterization, Pseudorecombination with Other Bean-Infecting Geminiviruses and Germ Plasm Screening. *Phytopathology* **90**, 1224-32.
- Gilbertson RL, Batuman O, Webster CG, Adkins S, 2015. Role of the Insect Supervectors Bemisia tabaci and Frankliniella occidentalis in the Emergence and Global Spread of Plant Viruses. *Annu Rev Virol* **2**, 67-93.

- Handelsman J, 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 669-85.
- Hassan I, Orílio AF, Fiallo-Olive E, Briddon RW, Navas-Castillo J, 2016. Infectivity, effects on helper viruses and whitefly transmission of the deltasatellites associated with sweepoviruses (genus Begomovirus, family Geminiviridae). *Sci Rep* **6**.
- Hayat I, Ahmad A, Masud T, Ahmed A, Bashir S, 2014. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. *Crit Rev Food Sci Nutr* **54**, 580-92.
- Higgins CM, Bejerman N, Li M, *et al.*, 2016a. Complete genome sequence of Colocasia bobone disease-associated virus, a putative cytorhabdovirus infecting taro. *Arch Virol* **161**, 745-8.
- Higgins CM, Chang WL, Khan S, Tang J, Elliott C, Dietzgen RG, 2016b. Diversity and evolutionary history of lettuce necrotic yellows virus in Australia and New Zealand. *Arch Virol* **161**, 269-77.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) . 2015 Taxonomy Release In. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. (2017.)
- Inoue-Nagata AK, Lima MF, Gilbertson RL, 2016. A review of geminivirus (begomovirus) diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Horticultura Brasileira* **34**, 008-18.
- Jackson AO, Dietzgen RG, Goodin MM, Bragg JN, Deng M, 2005. Biology of plant rhabdoviruses. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 623-60.
- Jackson AO, Li Z, 2016. Developments in Plant Negative-Strand RNA Virus Reverse Genetics. *Annu Rev Phytopathol* **54**, 469-98.
- Kheyr-Pour A, Bananej K, Dafalla GA, *et al.*, 2000. Watermelon chlorotic stunt virus from the Sudan and Iran: Sequence Comparisons and Identification of a Whitefly-Transmission Determinant. *Phytopathology* **90**, 629-35.
- Kitajima EW, Chagas CM, Harakava R, *et al.*, 2011. Citrus leprosis in Florida, USA, appears to have been cause by the nuclear type of Citrus leprosis virus (CiLV-N). *Virus Reviews and Research* **16**, 23-7.
- Kumar MS, Chakravarthy SS, Babu PR, Rao KV, Reddy VD, 2015. Classification of cytochrome P450s in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Systematics and Evolution* **301**, 211-6.
- Lima AT, Sobrinho RR, Gonzalez-Aguilera J, *et al.*, 2013. Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. *J Gen Virol* **94**, 418-31.

- Loconsole G, Onelge N, Potere O, *et al.*, 2012. Identification and characterization of citrus yellow vein clearing virus, a putative new member of the genus Mandarivirus. *Phytopathology* **102**, 1168-75.
- Lott K, Cingolani G, 2011. The importin beta binding domain as a master regulator of nucleocytoplasmic transport. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 1578-92.
- Lovato A, Faoro F, Gambino G, *et al.*, 2014. Construction of a synthetic infectious cDNA clone of Grapevine Algerian latent virus (GALV-Nf) and its biological activity in *Nicotiana benthamiana* and grapevine plants. *Viol J* **11**, 186.
- Luytjes W, Krystal M, Enami M, Parvin JD, Palese P, 1989. Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell* **59**, 1107-13.
- Mann KS, Bejerman N, Johnson KN, Dietzgen RG, 2016. Cytorhabdovirus P3 genes encode 30K-like cell-to-cell movement proteins. *Virology* **489**, 20-33.
- Mann KS, Dietzgen RG, 2014. Plant rhabdoviruses: new insights and research needs in the interplay of negative-strand RNA viruses with plant and insect hosts. *Arch Virol* **159**, 1889-900.
- Mapa, 2015. Perfil do feijão no Brasil. In.: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>. Acesso em 24/10/2015.
- Mcgavin WJ, Cock PJA, Macfarlane SA, 2011. Partial sequence and RT-PCR diagnostic test for the plant rhabdovirus Raspberry vein chlorosis virus. *Plant Pathology* **60**, 462-7.
- Mokili JL, Rohwer F, Dutilh BE, 2012. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr Opin Virol* **2**, 63-77.
- Munoz-Amatriain M, Mirebrahim H, Xu P, *et al.*, 2016. Genome resources for climate-resilient cowpea, an essential crop for food security. *The Plant Journal*.
- Nassar RMA, Ahmed YM, Boghdady MS, 2010. Botanical studies on *Phaseolus vulgaris* L. I-morphology of vegetative and reproductive growth. *international Journal of Botany* **6**, 323-33.
- Navas-Castillo J, Fiallo-Olive E, Sanchez-Campos S, 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annu Rev Phytopathol* **49**, 219-48.
- Navas-Castillo J, Sanchez-Campos S, Díaz JA, Sáez-Alonso E, Moriones E, 1999. Tomato Yellow Leaf Curl Virus-Is Causes a Novel Disease of Common Bean and Severe Epidemics in Tomato in Spain. *Plant Disease* **83**, 29-32
- Neumann G, Whitt MA, Kawaoka Y, 2002. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned? *J Gen Virol* **83**, 2635-62.
- Nicolini C, Pio-Ribeiro G, Andrade GP, *et al.*, 2012. A distinct tymovirus infecting *Cassia hoffmannseggii* in Brazil. *Virus Genes* **45**, 190-4.

- Orfanidou CG, Pappi PG, Efthimiou KE, Katis NI, Maliogka VI, 2016. Transmission of Tomato chlorosis virus (ToCV) by Bemisia tabaci Biotype Q and Evaluation of Four Weed Species as Viral Sources. *Plant Disease* **100**, 2043-9.
- Orilio AF, Fortes IM, Navas-Castillo J, 2014. Infectious cDNA clones of the crinivirus Tomato chlorosis virus are competent for systemic plant infection and whitefly-transmission. *Virology* **464-465**, 365-74.
- Pakkianathan BC, Kontsedalov S, Lebedev G, *et al.*, 2015. Replication of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Its Whitefly Vector, Bemisia tabaci. *J Virol* **89**, 9791-803.
- Palanga E, Filloux D, Martin DP, *et al.*, 2016. Metagenomic-Based Screening and Molecular Characterization of Cowpea-Infecting Viruses in Burkina Faso. *PLoS One* **11**, e0165188.
- Peng DW, Zheng GH, Zheng ZZ, Tong QX, Ming YL, 2013. Orchid fleck virus: an unclassified bipartite, negative-sense RNA plant virus. *Arch Virol* **158**, 313-23.
- Posthuma KI, Adams AN, Hong Y, Kirby MJ, 2002. Detection of Strawberry crinkle virus in plants and aphids by RT-PCR using conserved L gene sequences. *Plant Pathology* **51**, 266-74.
- Ramalho TO, Figueira AR, Wang R, Jones O, Harris LE, Goodin MM, 2016. Detection and survey of coffee ringspot virus in Brazil. *Arch Virol* **161**, 335-43.
- Revill PA, Jackson GVH, Hafner GJ, *et al.*, 2005. Incidence and distribution of viruses of Taro (*Colocasia esculenta*) in Pacific Island countries. *Australasian Plant Pathology* **34**, 327-31.
- Rodriguez M, Rau D, Bitocchi E, *et al.*, 2016. Landscape genetics, adaptive diversity and population structure in *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol* **209**, 1781-94.
- Roossinck MJ, 2012. Plant virus metagenomics: biodiversity and ecology. *Annu Rev Genet* **46**, 359-69.
- Roy A, Stone A, Otero-Colina G, *et al.*, 2013. Genome assembly of citrus leprosis virus nuclear type reveals a close association with orchid fleck virus. *Genome Announc* **1**.
- Ruiz ML, Simón A, García MC, Janssen D, 2014. First Report of Lettuce chlorosis virus Infecting Bean in Spain. *Plant Disease* **98**, 857-
- Rybicki EP, 2015. A Top Ten list for economically important plant viruses. *Arch Virol* **160**, 17-20.
- Sanchez-Campos S, Rodriguez-Negrete EA, Cruzado L, *et al.*, 2016. Tomato yellow leaf curl virus: No evidence for replication in the insect vector Bemisia tabaci. *Sci Rep* **6**, 30942.
- Schmidt TM, DeLong EF, Pace NR, 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J Bacteriol* **173**, 4371-8.

- Schmutz J, Mcclean PE, Mamidi S, *et al.*, 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nat Genet* **46**, 707-13.
- Schnell MJ, Buonocore L, Whitt MA, Rose JK, 1996. The minimal conserved transcription stop-start signal promotes stable expression of a foreign gene in vesicular stomatitis virus. *J Virol* **70**, 2318-23.
- Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK, 1994. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J* **13**, 4195-203.
- Scholthof KB, Adkins S, Czosnek H, *et al.*, 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **12**, 938-54.
- Sicard A, Zeddami JL, Yvon M, Michalakakis Y, Gutierrez S, Blanc S, 2015. Circulative Nonpropagative Aphid Transmission of Nanoviruses: an Oversimplified View. *J Virol* **89**, 9719-26.
- Singh SP, Gepts P, Debouck DG, 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany* **45**, 379-96.
- Sobrinho RR, Xavier CA, Pereira HM, *et al.*, 2014. Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous hosts. *J Gen Virol* **95**, 2540-52.
- Sottoriva LD, Lourencao AL, Colombo CA, 2014. Performance of Bemisia tabaci (Genn.) Biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) on Weeds. *Neotrop Entomol* **43**, 574-81.
- Sward RJ, 1990. Lettuce necrotic yellows rhabdovirus and other viruses infecting garlic. *Australasian Plant Pathology* **19**.
- Van Brunschot SL, Bergervoet JH, Pagendam DE, *et al.*, 2014. A bead-based suspension array for the multiplexed detection of begomoviruses and their whitefly vectors. *J Virol Methods* **198**, 86-94.
- Verbeek M, Dulleman AM, Van Bekkum PJ, Van Der Vlugt RaA, 2013. Evidence for Lettuce big-vein associated virus as the causal agent of a syndrome of necrotic rings and spots in lettuce. *Plant Pathology* **62**, 444-51.
- Vives MC, Velazquez K, Pina JA, Moreno P, Guerri J, Navarro L, 2013. Identification of a new enamovirus associated with citrus vein enation disease by deep sequencing of small RNAs. *Phytopathology* **103**, 1077-86.
- Walker PJ, Dietzgen RG, Joubert DA, Blasdell KR, 2011. Rhabdovirus accessory genes. *Virus Res* **162**, 110-25.
- Walker PJ, Firth C, Widen SG, *et al.*, 2015. Evolution of genome size and complexity in the rhabdoviridae. *PLoS Pathog* **11**, e1004664.
- Wang Q, Ma X, Qian S, *et al.*, 2015. Rescue of a Plant Negative-Strand RNA Virus from Cloned cDNA: Insights into Enveloped Plant Virus Movement and Morphogenesis. *PLoS Pathog* **11**, e1005223.

Whelan SP, Ball LA, Barr JN, Wertz GT, 1995. Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8388-92.

Wintermantel WM, Gilbertson RL, McCreight JD, Natwick ET, 2016. Host-Specific Relationship Between Virus Titer and Whitefly Transmission of Cucurbit yellow stunting disorder virus. *Plant Disease* **100**, 92-8.

Youssef F, Marais A, Faure C, Gentit P, Candresse T, 2011. Strategies to facilitate the development of uncloned or cloned infectious full-length viral cDNAs: Apple chlorotic leaf spot virus as a case study. *Virology* **418**, 488.