

Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

BRUNA PINHEIRO DE LIMA

**Evolução de Bean-associated cytorhabdovirus (BaCV): o primeiro
rabdovírus transmitido por mosca branca**

Brasília
2022

BRUNA PINHEIRO DE LIMA

**Evolução de Bean-associated cytorhabdovirus (BaCV): o primeiro
rabdovírus transmitido por mosca branca**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, para a obtenção do título de Doutora em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Lucas de Melo

Co-Orientadora: Dra. Simone da Graça Ribeiro

Brasília

2022

Esta tese intitulada “Evolução de Bean-associated cytorhabdovirus (BaCV): o primeiro rabdovírus transmitido por mosca branca” foi apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do grau de Doutora em Biologia Molecular e avaliado pela banca examinadora abaixo assinada. A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feito de acordo com as normas de ética científica.

Tese avaliada em: 30/03/2022

Banca Examinadora

Dr. Fernando Lucas de Melo (Presidente)

Universidade de Brasília

Dr. Tatsuya Nagata

Universidade de Brasília

Dra. Maite Vaslin de Freitas Silva

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Patricia Valle Pinheiro

Embrapa Arroz e Feijão

Dr. Leonardo Silva Boiteux

(suplente)

RESUMO

O bean-associated cytorhabdovirus (BaCV), um isolado de *Papaya cytorhabdovirus* (gênero *Cytorhabdovirus*, família *Rhabdoviridae*), é o primeiro rhabdovírus descrito sendo transmitido por mosca branca. O BaCV foi identificado em feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) no Brasil e compartilha 97% de identidade com o papaya virus E do Equador. Outros isolados foram encontrados em citros (*Citrus* spp.), maracujá (*Passiflora edulis*) e arbusto de papel (*Edgeworthia chrysantha*) na China, em feijão comum no México, e em espécies de Fabaceae não cultivadas (*Centrosema plumieri*, *Macroptilium lathyroides* e *Rhynchosia minima*) no Equador. O BaCV foi transmitido experimentalmente por *Bemisia tabaci* MEAM1 para feijão, caupi (*Vigna unguiculata*) e soja (*Glycine max*). Partículas baciliformes típicas de rhabdovírus foram visualizadas, por MET, em folhas e raiz de feijoeiros. RNAs correspondentes aos genes N, P, P3, P4, M, G foram amplificados a partir de folhas e de moscas brancas coletadas em plantas infectadas pelo BaCV. Feijoeiros coletados em Bahia (BA), Alagoas (AL), Minas Gerais (MG), São Paulo (SP), Goiás (GO), Distrito Federal (DF) e Mato Grosso (MT), entre 2007 e 2018, (n=219) foram avaliados quanto à infecção por BaCV, bem como por bean golden mosaic virus – BGMV e cowpea mild mottle virus – CPMMV, ambos também transmitidos por mosca branca. O BaCV foi encontrado majoritariamente em infecções mistas (n=85) com BGMV e/ou CPMMV e não foi detectado apenas em AL e MT. Considerando-se que no Brasil o semeio de grãos de feijão de safras anteriores é uma medida comumente adotada e que tal prática apresenta risco para a ocorrência de doenças propagadas por sementes, avaliamos a transmissão do BaCV e do CPMMV nas cultivares de feijão ‘Pérola’ e ‘BRS FC 401 RMD’. A transmissão por sementes foi observada apenas para o CPMMV com taxas entre 10 e 45% dependendo da cultivar e do tipo de experimento conduzido para a obtenção das sementes utilizadas. Amostras de soja coletadas, entre 2014 e 2020, em MG, GO, PR, RS e DF (n=122) foram testadas resultando em 11 plantas BaCV-positivas. Coinfecção por BGMV e/ou CPMMV também foi observada. A partir de transcriptomas de plantas disponíveis em banco de dados online, 17 genomas relacionados ao BaCV foram montados a partir dos dados de oito hospedeiros (*Psophocarpus tetragonolobus*, *Mucuna pruriens*, *Gossypium hirsutum*, *Stylosanthes guianensis*, *Ruta angustifolia*, *G. max*, *Corchorus capsularis* e *C. papaya*). Quatro novos genomas de isolados brasileiros de BaCV obtidos em amostras de feijão, soja e *P. cacao* foram sequenciados utilizando MinION. Na análise filogenética de todas as 36 sequências relacionadas ao BaCV (17 em transcriptomas, 4 sequenciadas com nanopore, 3 sequenciadas por Illumina e 12 disponíveis no GenBank), dois clados foram formados com amostras

provenientes da China e Malásia e amostras da Índia e Américas. Uma maior diversidade genética foi observada entre os isolados brasileiros de BaCV com a ocorrência de uma linhagem do Sudeste/Centro Oeste e outra do Nordeste. Em conjunto, os dados sugerem que o rhabdovírus encontra-se disperso no Brasil e no mundo e possui uma ampla gama de hospedeiros que até então era parcialmente desconhecida.

Palavras-chave: cytorhabdovirus, BaCV, CPMMV, BGMV, *Phaseolus vulgaris*, *Bemisia tabaci*, *Glycine max*

ABSTRACT

Bean-associated cytorhabdovirus (BaCV), an isolate of Papaya cytorhabdovirus (genus *Cytorhabdovirus*, family *Rhabdoviridae*), is the first rhabdovirus described as being transmitted by the whitefly. BaCV was identified in common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil and shares 97% identity with papaya virus E from Ecuador. Other isolates were found in citrus (*Citrus* spp.), passion fruit (*Passiflora edulis*) and paper bush (*Edgeworthia chrysantha*) in China, in common bean in Mexico, and in uncultivated Fabaceae (*Centrosema plumieri*, *Macroptilium lathyroides* and *Rhynchosia minima*) in Ecuador. BaCV was experimentally transmitted by *Bemisia tabaci* MEAM1 to beans, cowpea (*Vigna unguiculata*) and soybean (*Glycine max*). Typical bacilliform particles of rhabdoviruses were visualized in leaves and roots of bean plants by MET. RNAs corresponding to N, P, P3, P4, M, G genes were amplified from leaves and from whiteflies collected from BaCV-infected plants. Beans collected between 2007 and 2018 in Bahia (BA), Alagoas (AL), Minas Gerais (MG), São Paulo (SP), Goiás (GO), Distrito Federal (DF), and Mato Grosso (MT) (n= 219) were tested for BaCV, as well for whitefly-transmitted bean golden mosaic virus – BGMV and cowpea mild mottle virus – CPMMV. BaCV was mostly found in mixed infections (n=85) with BGMV and/or CPMMV and was not detected only in AL and MT. In Brazil, sowing bean seeds from previous harvests is a common practice, presenting a risk for the occurrence of seed-borne diseases. Therefore, we studied the seed transmission of BaCV and CPMMV in bean cultivars: 'Pérola' and 'BRS FC 401 RMD'. Seed transmission was observed only for CPMMV, with rates ranging from 10 to 45% depending on the cultivar and the type of experiment used to obtain the seed. Soybean samples collected between 2014 and 2020 in MG, GO, PR, RS, and DF (n=122) were tested. The result was 11 BaCV-positive plants. Co-infection with BGMV and/or CPMMV was also observed. From plant transcriptomes available in an online database, 17 genomes related to BaCV were assembled using data from eight hosts (*Psophocarpus tetragonolobus*, *Mucuna pruriens*, *Gossypium hirsutum*, *Stylosanthes guianensis*, *Ruta angustifolia*, *G. max*, *Corchorus capsularis*, and *C. papaya*). Four new genomes of Brazilian isolates of BaCV obtained from bean, soybean and *P. cacao* samples were sequenced using MinION. In phylogenetic analysis of all 36 BaCV-related sequences (17 from transcriptomes, 4 sequenced by nanopore, 3 sequenced by Illumina, and 12 available in GenBank), one clade was observed with samples from China and Malaysia and another one with samples from India and the Americas. A greater genetic diversity was observed among Brazilian isolates of BaCV with the occurrence of a lineage from the Southeast/Midwest and another from the Northeast. Taken together, the results

suggest that BaCV is globally distributed and has a broad host range, some of which was unknown.

Keywords: cytorhabdovirus, BaCV, CPMMV, BGMV, *Phaseolus vulgaris*, *Bemisia tabaci*, *Glycine max*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados nas PCRs e RT-PCRs para amplificação do genoma do BaCV (<i>amplicons</i> 1 a 6) e detecção de seus genes (N, P, P3, P4, M, G, L); levantamento viral em feijoeiros (BaCV, CPMMV, BRMV, BGMV e MaYSV); genes de planta (RbSC e Act11) e de mosca branca (RpL9, ATPase e mtCOI).	49
Tabela 2. Número de acesso de seqüências de cytorhabdovírus no GenBank e seus vetores ou insetos hospedeiros.	51
Tabela 3. Detecção do bean-associated cytorhabdovirus (BaCV), cowpea mild mottle virus (CPMMV) e bean golden mosaic virus (BGMV) em amostras de feijão coletadas de 2007 a 2018 no Brasil.	58
Tabela 4. Identities de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos (%) de ORFs do BaCV-LUZ em comparação com outros isolados de PpVE.	60
Tabela 5. Transmissão do BaCV por <i>B. tabaci</i> MEAM1.	64
Tabela 6. Detecção do BaCV, CPMMV e BGMV em amostras de soja, por RT-PCR e PCR.	72
Tabela 7. <i>Primers</i> desenhados com base em alinhamento de seqüências de isolados de BaCV utilizando o <i>software</i> Primal Scheme.	79
Tabela 8. Transcriptomas de plantas disponíveis no Sequence <i>Read</i> Archive - SRA com seqüências relacionadas ao BaCV.	84
Tabela 9. <i>Primers</i> utilizados nas RT-PCRs de feijoeiros para detecção do BaCV e CPMMV.	96
Tabela 10. Transmissão por sementes do CPMMV em cultivares de feijão comum.	105

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 stop-start com a produção decrescente dos mRNAs monocistrônicos apresentando o 5' cap e a cauda poli (A). Figura adaptada de DIETZGEN et al. (2017). 35
- Figura 2. Sintomas em feijoeiros coletados em um campo comercial em Luziânia, estado de Goiás, com infecção mista por bean-associated cytorhabdovirus (BaCV), cowpea mild mottle virus (CPMMV), bean golden mosaic virus (BGMV) e colonização por mosca branca (*B. tabaci* MEAM1). (a) Mosaico e enrugamento foliar. (b) Mosaico e deformação severa. (c) Em detalhe, folhas com redução de área, mosaico amarelo e enrugamento severo. 45
- Figura 3. Resumo da distribuição dos locais de amostragem de feijão nos estados de Alagoas (AL), Bahia (BA), Goiás (GO), Minas Gerais (MG), Mato Grosso (MT), São Paulo (SP) e no Distrito Federal (DF). Cada município foi colorido de vermelho de acordo com a área plantada de feijão (em hectares), obtida no Instituto Brasileiro de Geografia (<http://www.ibge.gov.br/>). Os círculos pretos representam os locais de amostragem e seu tamanho é proporcional ao número de plantas coletadas. As amostras foram coletadas entre 2007 e 2018. 46
- Figura 4. Transmissão do BaCV mediada por mosca branca (*Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor 1-MEAM1). No experimento 1, um feijoeiro do campo colonizado por mosca branca foi utilizado como fonte de inóculo para a transmissão do BaCV (BGMV e CPMMV) aos feijoeiros 'Jalo', 'Pérola' e 'BRS FC 401 RMD'. Após 14 dias, as amostras foram coletadas e a transmissão do BaCV (CPMMV e BGMV) confirmada por RT-PCR e PCR. No experimento 2, moscas brancas foram expostas a feijoeiros infectados com BaCV (e CPMMV) por um período de aquisição de 7 dias. Trinta moscas brancas foram transferidas da planta fonte de inóculo para uma folha de planta saudável envolvida por um saco de voile, por um período de inoculação de 7 dias. Após 7 dias, as amostras foram coletadas e testadas por RT-PCR. O mesmo procedimento foi aplicado à plantas saudáveis com moscas avirulíferas como controle. 53
- Figura 5. Detecção por RT-PCR e microscopia eletrônica de transmissão (MET) do BaCV em adultos de *B. tabaci* MEAM1 mantidos em feijoeiros com o isolado BaCV_Luz. O seccionamento de dez insetos foi realizado entre abdome e tórax em solução de NaCl 0,9%. Parte do inseto foi colocada em solução fixadora para processamento e análise por MET e a outra parte em TRIzol Reagent para extração de RNA total e RT-PCR. 56
- Figura 6. Detecção por RT-PCR e PCR de vírus que infectam feijão: BaCV, CPMMV, BGMV, MaYSV, BRMV. O tamanho esperado do produto é mostrado. M: 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). 57
- Figura 7. Distribuição de infecções virais em 219 plantas de feijão comum coletadas entre 2007 e 2018. BaCV foi encontrado principalmente em infecções mistas com BGMV e CPMMV. Apenas seis plantas foram encontradas infectadas individualmente com BaCV. 59
- Figura 8. Organização genômica do BaCV-Luz. Genes canônicos que codificam [N] nucleoproteína, [P] fosfoproteína, [M] proteína matriz, [G] glicoproteína e [L] RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e não canônicos [P3] e [P4]. Cada ORF é representado por uma seta cinza com as primeiras e últimas posições de

nucleotídeos representadas. O genoma completo (13.467 nts) foi recuperado por RT-PCR de seis <i>amplicons</i> sobrepostos.....	60
Figura 9. Árvore filogenética de máxima verossimilhança de aminoácidos de RdRP de sequências de cytorhabdovírus e rede de similaridade de sequências de aminoácidos de glicoproteína codificadas por BaCV-Luz, BaCV-GO e outros 26 cytorhabdovírus. Em ambas as análises, , quatro grupos foram formados de acordo com seu provável vetor: pulgão, fulgomorfo, cigarrinha e mosca branca. Enzyme Function Initiative – Enzyme Similarity Tool (EFI – EST) foi usada para a análise de glicoproteínas com um limite de pontuação de alinhamento de 35 e um e-value mínimo de 1×10^{-5} . A rede foi visualizada no Cytoscape v3.7.1. Os valores de suporte $\geq 90\%$ SH-aLRT são exibidos com círculos pretos nos nós. (?) Vírus com vetores desconhecidos. (*) Vírus detectados em metatranscriptoma de insetos.	61
Figura 10. Detecção por RT-PCR de BaCV e CPMMV em mosca branca. O tamanho esperado do produto é mostrado. M: 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).....	62
Figura 11. Folhas de feijão comum ‘BRS FC 401 RMD’ provenientes do ensaio de transmissão de BaCV e CPMMV mediada por mosca branca. Leves pontos cloróticos em uma folha de uma planta infectada, 50 dias após a inoculação, e a folha de uma planta controle não infectada.....	63
Figura 12. Detecção do BaCV em folha de feijão e mosca branca (<i>B. tabaci</i> MEAM1). O RNA de BaCV correspondente aos genes G, M, P4, P3, P, N foi detectado por PCR usando <i>primers</i> específicos. Os controles internos incluem a planta RbcS e act11 e a mosca branca RpL9 e v-ATPase. (a) Produtos de RT-PCR obtidos de RNA extraído de feijão comum. (b) Produtos de RT-PCR obtidos de RNA extraído de moscas brancas virulíferas.	66
Figura 13. Micrografias eletrônicas de transmissão de folhas de feijão infectadas por BaCV. (a) Visão geral de um viroplasma formado por material filamentososo (*) no citoplasma de uma célula parenquimatosa. Partículas típicas de rhabdovírus estão presentes na periferia do viroplasma (setas). (b) Detalhes do quadrado marcado com partículas seccionadas longitudinalmente são representados. (c) Cortes transversais de partículas de BaCV mostram o núcleo interno e cilíndrico da nucleoproteína e a membrana viral externa, e também que os vírions estão dentro de uma cavidade do retículo endoplasmático. (d) Célula parenquimatosa esponjosa duplamente infectada por BaCV e CPMMV. Agregados de partículas de CPMMV (pontas de seta) e BaCV em secções longitudinais e transversais (setas) são visíveis. (e) Células do parênquima paliçádico de um feijoeiro saudável. Cloroplasto (C), retículo endoplasmático (ER), complexo de Golgi (G), mitocôndria (M), peroxissomo (Px), vacúolo (Vc) e parede celular (CW).	68
Figura 14. Ocorrência do BaCV em infecção mista com CPMMV e BGMV em sojas coletadas em Goiás e Distrito Federal entre 2015 e 2019. Nove plantas estavam infectadas pelos três vírus, uma por BaCV e CPMMV e uma apenas pelo BaCV.	73
Figura 15. Amplificação do genoma completo de isolados de BaCV em feijoeiro e soja. As RT-PCRs foram realizadas com seis combinações de <i>primers</i> desenhados com sobreposição de pelo menos 100 nt dos fragmentos. Amostras coletadas na Bahia (feijão 712 e 714), em Cristalina-GO (feijão 1211 e 1225), em Luziânia-GO (feijão 1237; soja 1250), em Brasília-DF (feijão 1536 e 1808; soja 1561 e 1824) e o isolado BaCV_LUZ (B, MT811775.1).	81
Figura 16. Amplificação do genoma completo de oito isolados de BaCV em feijoeiro comum, soja e Passiflora sp. por RT-PCR multiplex com os <i>primers</i> em <i>pool 1</i> e <i>pool 2</i> . No gel de agarose 1%, pode-se observar <i>amplicons</i>	

evidentes e do tamanho esperado (1.5 kb) em ambas as reações (*pool 1* e *pool 2*) nas amostras de feijoeiro comum (714 e 1364), soja (1561) e *Passiflora cacao* (1599). Bandas mais fracas podem ser notadas para o *pool 1*, nas amostras de soja 1365 e 1824. As amostras de *P. gardneri* (1626), feijoeiro P11, bem como para os controles das reações (C1 e C2) não apresentaram bandas evidentes. 82

Figura 17. Posição dos *amplicons* e cobertura do sequenciamento para cada *amplicon*. A) Os pares de *primers* de numeração ímpar formaram o *pool 1* e os de numeração par, o *pool 2*. Todos os pares produzem um *amplicon* de aproximadamente 1.5 kb. B) Cobertura do sequenciamento para as amostras 714, 1364, 1561 e 1599. Com exceção do *amplicon* 11, todos os *amplicons* em todas as amostras apresentaram cobertura maior que 20X. 83

Figura 18. Evolução molecular dos vírus pertencentes à espécie Papaya cytorhabdovirus. A) Inferência filogenética por máxima verossimilhança do genoma de isolados disponíveis no Genbank (em cinza, 12 genomas) e dos isolados descritos neste trabalho (em preto, 24 genomas). As amostras descobertas em banco de dados de transcriptomas foram nomeadas com o número da corrida (por exemplo: SRR8926862). Os isolados incluídos no Clado I foram provenientes da China e Malásia e os pertencentes ao Clado II do Brasil, Equador, México e Índia. O genoma de cada isolado foi representado no sentido 3' *leader* até 5' *trailer*. Os genomas destacados com um asterisco estão com extremidade 5' incompleta. Os ramos com valores de suporte maior que 0,9 foram destacados com um círculo preto. A árvore foi enraizada pelo método de *midpoint*. B) Mapa representando o espalhamento geográfico dos vírus relacionados ao BaCV. As linhas pontilhadas conectam as localidades de partida (círculos pretos) e de chegada (setas pretas). Os pontos de interrogação indicam a incerteza da localização geográfica do ancestral das sequências analisadas. 87

Figura 19. Distância genética *pareada*. A variação da distância foi representada com um diagrama de caixas onde os valores mínimos, máximos e a mediana para cada um dos genes virais são apresentados. A maior amplitude observada foi na ORF P4 e na G. 88

Figura 20. Experimentos de transmissão conduzidos para avaliar a transmissão de CPMMV e/ou BaCV por sementes em feijão comum transgênico 'BRS FC 401 RMD' e 'Pérola'. As sementes usadas nos testes to tipo grow-out foram coletadas de feijoeiros em campo experimental (Experimento I e II) e campo comercial (Experimento II) com elevada incidência viral; e de feijoeiros inoculados mecanicamente (Experimento III) ou por mosca branca, *B. tabaci* MEAM1 (Experimento IV). Inicialmente (Experimento I), 190 plantas foram testadas individualmente para CPMMV por PTA-ELISA, seguida da formação de 19 amostras compostas por 10 plantas cada que foram avaliadas por RT-PCR. Nos demais experimentos, todas as plantas foram testadas individualmente por RT-PCR e hibridização de ácidos nucléicos. 94

Figura 21. Transmissão mediada por mosca branca (*B. tabaci* MEAM 1) do cowpea mild mottle virus (CPMMV) verticalmente transmitido. Três mudas 'BRS FC 401 RMD' positivas detectadas em um ensaio de transmissão por sementes foram usadas como fonte de inóculo em gaiolas separadas com moscas brancas avirulíferas, por um período de aquisição de 48h. Posteriormente, dez plantas saudáveis foram introduzidas em cada gaiola e mantidas por 30 dias. As folhas foram agitadas periodicamente. Ao final do ensaio, as folhas mais jovens foram coletadas e testadas para CPMMV, por RT-PCR e Southern blot. O controle foi conduzido pelo mesmo período em uma quarta gaiola com cinco mudas saudáveis de feijão e moscas brancas avirulíferas. 97

Figura 22. Sementes de feijão comum da cultivar Pérola utilizadas em experimentos de transmissão de CPMMV e BaCV por sementes. (a, d) Alterações na forma e tamanho podem ser notadas nas sementes coletadas em plantios com sintomas virais observados e com alta incidência de CPMMV, BGMV e BaCV. (b, c) Sementes produzidas

em casa de vegetação livre de insetos e com amostragem periódica negativa para CPMMV. (c, d) Para cada cultivar, as porções de sementes representadas apresentam o mesmo peso. 99

Figura 23. O cowpea mild mottle virus (CPMMV) pode ser transmitido por sementes em feijão comum. Sementes de feijoeiros coletadas em campos experimental com ocorrência de sintomas virais (cv. BRS FC 401 RMD, **A**) e em campo comercial em que o CPMMV foi detectado em alta incidência (cv. Pérola, **B**) foram semeadas em câmara de germinação. As plantas obtidas foram cultivadas e aos 30 dias pós germinação, amostras foliares foram coletadas individualmente. A detecção do vírus foi realizada por RT-PCR, com *primers* específicos (tamanho do *amplicon* de 196 pb), seguida por Southern blot. No gel das amostras ‘BRS FC 401 RMD’ (**A**) bandas muito discretas estão presentes nas plantas 5 e 16, enquanto dentre as ‘Pérola’ (**B**), é possível notar bandas nas amostras 35, 37, 38 e 39. A hibridização confirmou a infecção nas plantas ‘BRS FC 401 RMD’ 5 e 16 e aumentou a detecção nos feijoeiros ‘Pérola’ (4, 5, 7, 8, 19, 31, 35, 37,38, 39 e 50)..... 100

Figura 24. O cowpea mild mottle virus (CPMMV) pode ser transmitido por sementes para a progênie de feijoeiros ‘Pérola’ e ‘BRS FC 401 RMD’ inoculados mecanicamente. Após a inoculação mecânica com CPMMV, as sementes das plantas infectadas foram coletadas em *pool*. As sementes obtidas foram semeadas e as plantas mantidas em câmara de crescimento até a detecção do vírus aos 30 dias após a germinação (dag). A detecção do vírus foi realizada por RT-PCR, com *primers* específicos (tamanho do *amplicon* de 196 pb), seguida por Southern blot. Nove ‘BRS FC 401 RMD’ (1, 4, 11, 13, 14, 15, 16, 19, 21) e três ‘Pérola’ (3, 5, 22) foram positivas para CPMMV na análise de Southern blot. 103

Figura 25. O cowpea mild mottle virus (CPMMV) pode ser transmitido por sementes para a progênie de feijoeiros ‘Pérola’ e ‘BRS FC 401 RMD’ inoculados por mosca branca. Vinte e cinco sementes de plantas inoculadas com CPMMV através de mosca branca (*B. tabaci* MEAM1) foram semeadas e mantidas em câmara de crescimento até a extração do RNA, aos 30 dias após a germinação (dag). O CPMMV foi detectado por Southern blot em três plantas (17, 20 e 25). 103

Figura 26. Folhas de feijão comum 'BRS FC 401 RMD' cultivados a partir de sementes coletadas em plantas-mãe inoculadas com BaCV e CPMMV por mosca branca (*B. tabaci* MEAM1). (a, b) Plantas positivas e (c, d) plantas negativas para CPMMV em hibridização southern blot. 104

Figura 27. O cowpea mild mottle virus – CPMMV verticalmente transmitido em feijão comum é fonte de inóculo para transmissão secundária por mosca branca (*B. tabaci* MEAM1). Três plantas ‘BRS FC 401 RMD’ positivas para CPMMV obtidas em ensaio grow-out de transmissão por semente foram introduzidas em três gaiolas do tipo BugDorm com moscas brancas e mantidas por 48h. Dez plântulas da mesma cultivar foram introduzidas em cada gaiola (gaiola 1: plantas 1-10; gaiola 2: pantas 11-20 e gaiola 3: plantas 21-30) e mantidas por 30 dias. Como controle, outros cinco feijoeiros foram introduzidos em uma quarta gaiola contendo apenas moscas brancas. Ao fim desse período, a última folha recém formada de cada feijoeiro foi coletada e analisada por RT-PCR e southern blot. No gel, é possível identificar bandas fracas nas amostras 3, 22 e 23 no tamanho esperado de 196 pb. Na membrana, as amostras 3, 4, 5, 16, 17, 22 e 23 mostraram-se positivas. Os cinco controles **c1-c5** mostraram-se negativos em ambas as técnicas empregadas..... 106

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	29
REFERENCIAL TEÓRICO	31
1. O feijoeiro	31
2. A família <i>Rhabdoviridae</i>	33
2.1. Genômica e morfofisiologia dos rhabdovírus	34
2.2. Os rhabdovírus que infectam plantas.....	35
3. Interação vírus-vetor-planta	36
4. A mosca branca (<i>Bemisia tabaci</i> Genn.).....	39
JUSTIFICATIVA.....	41
OBJETIVOS	42
CAPÍTULO 1 –Caracterização molecular e biológica do bean-associated cytorhabdovirus (BaCV) ..	43
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
2.1. Obtenção do material vegetal.....	45
2.2. Ocorrência do BaCV em feijoeiro comum	46
2.3. Extração de ácidos nucleicos	47
2.4. RT-PCR, PCR e clonagem.....	48
2.5. Análises filogenéticas.....	50
2.6. Transmissão do BaCV por <i>Bemisia tabaci</i> MEAM1	52
2.7. Detecção do BaCV em feijoeiro e mosca branca	54
2.8. Microscopia eletrônica de transmissão.....	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.1. BaCV é amplamente distribuído em todas as áreas de produção de feijão no Brasil	56
3.2. A análise evolutiva indica a mosca branca como o vetor potencial para o BaCV	59
3.3. <i>B. tabaci</i> MEAM1 transmite BaCV-Luz para feijão comum, caupi e soja	62
3.4. Detecção do BaCV-Luz em plantas e moscas brancas	65
4. CONCLUSÃO	69
CAPÍTULO 2 – Ocorrência do bean-associated cytorhabdovirus (BaCV) em leguminosas.....	70
1. INTRODUÇÃO	70
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	71
2.1. Amostragem em soja e caupi.....	71
2.2. Extração de RNA e DNA	71
2.3. RT-PCR, PCR e sequenciamento.....	71

3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.1.	Ocorrência natural do BaCV em soja	72
4.	CONCLUSÃO	75
CAPÍTULO 3 – Estudo da diversidade genética do bean-associated cytorhabdovirus (BaCV).....		76
1.	INTRODUÇÃO	76
2.	MATERIAL E MÉTODOS	78
2.1.	Obtenção dos isolados e enriquecimento por RT-PCR	78
2.2.	Preparo da biblioteca, sequenciamento e montagem dos genomas	79
2.3.	Descoberta de novos isolados de BaCV em transcriptomas disponíveis em bancos de dados públicos	80
2.4.	Análises evolutivas	80
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
3.1.	O sequenciamento por nanoporos de genomas de isolados de BaCV é viável e produz seqüências de qualidade	81
3.2.	Novos isolados de BaCV encontrados em transcriptoma de plantas das famílias Caricaceae, Malvaceae, Fabaceae e Rutaceae	84
3.3.	Organização genômica, filogeografia e diversidade genética	85
4.	CONCLUSÃO	89
CAPÍTULO 4 – Transmissão vertical de vírus em feijoeiro comum.....		90
1.	INTRODUÇÃO	90
2.	MATERIAL E MÉTODOS	92
2.1.	Obtenção do material vegetal	92
2.2.	Experimentos de transmissão por sementes	93
2.3.	ELISA indireto	94
2.4.	Extração de RNA de folhas de feijoeiros	95
2.5.	Detecção viral por RT-PCR	95
2.6.	Análise de hibridização Southern blot	96
2.7.	Ensaio de transmissão por mosca branca <i>B. tabaci</i> MEAM1	96
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
3.1.	Transmissão por sementes do CPMMV em feijão-comum	98
3.2.	O CPMMV transmitido por semente pode ser uma fonte de inóculo em transmissão secundária por mosca branca	105
4.	CONCLUSÃO	107
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....		109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		111
ANEXO I – Publicações realizadas durante o período do doutorado		128
ANEXO II – Publicação referente ao Capítulo 1 (com modificações)		129

INTRODUÇÃO GERAL

O feijão é uma leguminosa de grande importância para o fornecimento de proteína na dieta humana principalmente em países da América Latina e na África (BROUGHTON et al., 2003). No Brasil, o termo feijão é empregado em referência tanto ao feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) com suas diversas cores, quanto ao feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.). O país é o terceiro maior produtor do grão que é normalmente cultivado em três safras anuais (FAO, 2019).

Pelo menos 69 espécies de vírus já foram relatadas em feijão comum (MIHARA et al., 2016) e no Brasil, o bean golden mosaic virus – BGMV (gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*) é um dos responsáveis pelos altos prejuízos na cultura. Como estratégia de controle à doença do mosaico dourado no feijoeiro, foi desenvolvida uma cultivar transgênica resistente ao vírus, a ‘BRS FC 401 RMD’ (BONFIM et al., 2007; FARIA et al., 2016; SOUZA et al., 2018). Em 2014, sintomas virais de encarquilhamento, nanismo e deformação foliar foram encontrados em linhagens transgênicas do feijoeiro resistente ao BGMV e a técnica de sequenciamento de alto desempenho foi empregada para detecção viral. Cinco vírus conhecidos foram detectados: cowpea mild mottle virus – CPMMV (gênero *Carlavirus*, família *Betaflexiviridae*), bean rugose mosaic virus – BRMV (gênero *Comovirus*, família *Secoviridae*), *Phaseolus vulgaris* alphaendornavirus 1 - PvEV-1 e *Phaseolus vulgaris* alphaendornavirus 2 – PvEV-2 (gênero *Alphaendornavirus*, família *Endornaviridae*), bem como um novo rhabdovírus, bean-associated cytorhabdovirus – BaCV (ALVES-FREITAS et al., 2019).

Em 2016, lavouras de feijão comum próximas à Brasília (cidade Luziânia, estado de Goiás) apresentaram fortes sintomas virais atingindo 20 a 80% da plantação que também se encontrava infestada por mosca branca (*Bemisia tabaci* Genn.). Após a realização de um screening viral em amostras da área, o BaCV foi detectado em infecções mistas com o CPMMV e BGMV. O isolado BaCV_Luz foi então utilizado para a caracterização molecular e biológica do novo cytorhabdovírus.

Após as análises filogenéticas iniciais sugerirem uma íntima relação do BaCV com sequências de transcriptoma de mosca branca *B. tabaci* Asia 1 mantidas em algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) na Índia (UPADHYAY et al., 2015), e após detectarmos sua presença no campo infestado pelo inseto e em associação com CPMMV e BGMV (ambos sabidamente

transmitidos por mosca branca), ensaios foram realizados para confirmar a transmissão do BaCV por esse vetor (*B. tabaci* MEAM1).

Sabendo-se que o feijão é amplamente cultivado em todo território, bem como a mosca branca é um inseto disseminado no país, tornou-se necessário conhecer a ocorrência do BaCV no Brasil e sua diversidade filogenética. Assim, amostragens em novas coletas, bem como em material da coleção armazenada a -80°C foram utilizados em um levantamento viral com foco em infecção múltipla por BaCV, CPMMV e BGMV, incluindo também amostras de soja (*Glycine max* L. Merr.) e caupi.

Durante visitas a campo em Goiás, sintomas virais em plantas jovens de feijão comum foram encontrados, mesmo na ausência de moscas brancas nas lavouras (mediante frequente pulverização de inseticidas), instigando a possível transmissão de vírus na cultura também por sementes. Embora esse meio de transmissão pareça não ocorrer entre os rhabdovírus, a transmissão por semente já foi relatada para o carlavírus CPMMV, isolado de feijão em Gana (BRUNT; KENTEN, 1973) e mais recentemente em soja no Brasil (BARRETO DA SILVA et al., 2020). Optamos, então, por investigar a transmissão por sementes para o BaCV e CPMMV no feijão ‘Pérola’, comercialmente cultivado, bem como na cultivar transgênica ‘BRS FC 401 RMD’ que rotineiramente utilizamos para os ensaios biológicos e citológicos do cytorhabdovírus, por se tratar de cultivar resistente ao BGMV e, portanto, mais fácil de realizar ensaios na ausência de BGMV.

A partir da caracterização do BaCV incluindo seu modo de transmissão, a ocorrência aparentemente característica em infecção mista, a ampliação de sua gama de hospedeiras, sua diversidade genética; bem como com o levantamento de viroses em lavouras de feijão, soja e caupi; e a ocorrência de transmissão por sementes em feijão, esperamos agregar novos conhecimentos a respeito de doenças virais em culturas de grande relevância econômica em nosso país.

1. O feijoeiro

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae originária do México e domesticada há mais de 8 mil anos na América Central e na América do Sul, resultando em dois *pools* genéticos (MesoAmericano e Andino) com características morfofisiológicas distintas (BITOCCHI et al., 2013).

Durante expedições em terras americanas, o feijão foi levado para a Europa e, em seguida, para países africanos e asiáticos passando a ser cultivado e consumido por diferentes povos. O feijão é hoje o grão mais importante para a alimentação direta humana, com maior destaque em dietas na América Latina e África nas quais é a principal fonte de proteína, sendo normalmente consumido com cereais (BROUGHTON et al., 2003; MEZIADI et al., 2017).

Nos últimos anos, a produção do grão tem ganhado destaque em países asiáticos como Myanmar e Índia, com produção acima de 5 milhões de toneladas cada e também na China, com cerca de 1,2 milhões de toneladas. O Brasil é o terceiro colocado no ranking mundial de produtores do grão com valores aproximados de 3 milhões de toneladas e, que, diferentemente dos países asiáticos, é uma produção com foco no comércio interno (FAO, 2019).

No Brasil, a cultura é plantada em três safras durante o ano com a primeira iniciando entre agosto e dezembro. Estados como Paraná, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Bahia e São Paulo são os principais produtores da cultura. Nacionalmente, o feijão é composto por dois grupos, ambos pertencentes à família Fabaceae, o Grupo I composto por feijão comum *P. vulgaris* de diversas cores e o Grupo II com o caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) (CONAB, 2020). A produção do feijão preto (~509 mil toneladas) ocorre majoritariamente, acima de 93%, na região Sul do país, sendo o ranking liderado pelo Paraná, seguido de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Já o caupi é produzido na região Nordeste (~470 mil toneladas), Centro-Oeste (~168 mil toneladas), norte (~58 mil toneladas) e em Minas Gerais (~8 mil toneladas) (CONAB, 2020).

Assim como ocorre em outras culturas, doenças virais também são gargalos para a produção mundial de feijão. Mais de 69 vírus são catalogados no Virus-Host Database (<https://www.genome.jp/virushostdb/>) (MIHARA et al., 2016) em *P. vulgaris* e alguns apresentam maior destaque devido à sua importância econômica, como os potyvirus (Família

Potyviridae: bean common mosaic virus – BCM e, bean common mosaic necrosis virus – BCMNV, bean yellow mosaic virus – BYMV, clover yellow vein virus – CIYVV, soybean mosaic virus – SMV); comovirus (Família *Secoviridae*: bean pod mottle virus – BPMV, bean rugose mosaic virus – BRMV, cowpea severe mosaic virus – CpSMV); o sobemovirus southern bean mosaic virus – SBMV; o curtovírus beet curly top virus – BCTV e alguns begomovirus (Família *Geminiviridae*: BGMV, bean golden yellow mosaic virus – BGYMV, tomato yellow leaf curl virus – TYLCV e bean dwarf mosaic virus – BDMV) (MEZIADI et al., 2017).

Diversos vírus já foram relatados infectando o feijoeiro no Brasil, como o BCMV, BYMV (DE CAMARGO et al., 1968), BGMV (COSTA, A. S., 1965), BRMV (DE CAMARGO et al., 1976), CPMMV (COSTA, A. S. et al., 1983), bean necrotic mosaic orthotospovirus – BeNMV (Família *Tospoviridae*) e SBMV (DE OLIVEIRA et al., 2012). Outros vírus comuns em plantas daninhas também já foram detectados em feijoeiros, como o begomovirus sida micrantha mosaic virus – SimMV, em Goiás (FERNANDES-ACIOLI et al., 2011) e o begomovirus macroptilium yellow spot virus – MaYSV, no nordeste brasileiro (SOBRINHO et al., 2014).

O BGMV é hoje o vírus de maior relevância para a produção nacional de feijão e pode ser encontrado também em soja (FERNANDES et al., 2009), em feijão fava (*Phaseolus lunatus* L.) e em feijão de rola (*Macroptilium lathyroides* L.) (SOBRINHO et al., 2014). O controle da doença no campo é bastante árduo, pois as plantas cultivadas (cultivares de feijão) são suscetíveis ao BGMV, que por sua vez é transmitido por um inseto, a mosca branca, resistente a muitos dos controles químicos empregados (FARIA et al., 2016). Como medida para frear a disseminação da doença, um vazio sanitário decretado por lei é adotado anualmente durante um mês, em alguns municípios de Goiás, Minas Gerais e no Distrito Federal. O objetivo é minimizar a presença do vetor e de feijoeiros infectados no campo para garantir a produção nas safras seguintes.

Devido à ausência de genótipos resistentes ao BGMV, foi desenvolvida por meio da expressão de RNAs interferentes, uma cultivar de feijão (BRS FC 401 RMD) imune ao vírus, aprovada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio e comercializada no país desde 2021 (BONFIM et al., 2007). Em plantios da cultivar transgênica, outros vírus mostraram-se relevantes para a cultura, como o CPMMV, com taxas de até 69% de incidência nesses campos (FARIA et al., 2016). Assim, o controle de vetores na lavoura, principalmente a mosca branca, continua sendo a principal estratégia adotada.

2. A família *Rhabdoviridae*

A família *Rhabdoviridae* atualmente é composta por 40 gêneros e mais de 240 espécies virais que apresentam partículas baciliformes, genoma de RNA fita simples e senso negativo com cinco genes essenciais que codificam a nucleoproteína (N: nucleoprotein), fosfoproteína (P: phosphoprotein), proteína matriz (M: matrix protein), glicoproteína (G: glycoprotein) e RNA polimerase dependente de RNA (L: RNA dependet RNA polymerase, rdrp) (WALKER et al., 2021).

Dentre os rhabdovírus, são encontrados vírus capazes de infectar animais e plantas. Na família, as espécies classificadas formam grupos filogenéticos com características genômicas e biológicas distintas entre si como a ocorrência de genes acessórios, o círculo de hospedeiros e também seus vetores (WALKER et al., 2021). A filogenia baseada na sequência da proteína L dos vírus da família resulta em três clados distintos, que recentemente passaram a ser definidos como subfamílias, sendo o primeiro formado por vírus que infectam vertebrados e invertebrados classificados em 26 gêneros (subfamília *Alpharhabdovirinae*); o segundo é composto por 6 gêneros com vírus que infectam plantas, insetos e ácaros (subfamília *Betarhabdovirinae*); e o terceiro por um único gênero de vírus que possuem teleósteos como hospedeiros (subfamília *Gammarhabdovirinae*) (WALKER et al., 2021).

A espécie tipo da família é a *Indiana vesiculovirus* classificada no gênero *Vesiculovirus* juntamente com outras 16 espécies (WALKER et al., 2021). O vesicular stomatitis Indiana virus –VSIV foi caracterizado em 1927, como agente etiológico de vesículas e úlceras em equinos, bovinos, suínos e porquinhos da Índia (*Cavia porcellus*, família Caviidae) e desde então, tem sido um dos rhabdovírus mais bem pesquisados, tornando-se modelo de estudo para a virologia animal (OLITSKY, 1927; WALKER et al., 2015).

Outro rhabdovírus de grande relevância é o *Rabies lyssavirus* (gênero *Lyssavirus*) causador da raiva em mamíferos e humanos e responsável pela morte de 59.000 pessoas por ano, principalmente em países em desenvolvimento, em que a vacinação canina não é realizada preventivamente (HAMPSON et al., 2015).

No grupo dos rhabdovírus que infectam plantas (subfamília *Betarhabdovirinae*), o *Sonchus yellow net betanucleorhabdovirus* (SYNV, gênero *Betanucleorhabdovirus*) destaca-se por ter sido o primeiro vírus de planta de RNA senso negativo obtido por meio da genética reversa. A obtenção de clones infecciosos a partir de cDNA do SYNV permitiu que a morfogênese de

partículas, bem como a movimentação do vírus célula-a-célula fossem mais bem caracterizadas (WANG, Q. et al., 2015; JACKSON et al., 2018).

2.1. Genômica e morfofisiologia dos rhabdovírus

Os genomas dos rhabdovírus são compostos por fitas de RNA senso negativo com tamanhos entre 10 e 16 kb. Dentre todos os gêneros, apenas membros de dois (*Dichorhavirus* e *Varicosavirus*) possuem genoma bisegmentado, em que a polimerase é codificada em uma fita isolada das demais proteínas (SASAYA et al., 2002; DIETZGEN et al., 2014; WALKER et al., 2021). Nas extremidades, existem regiões não traduzidas (3' *leader* e 5' *trailer*) com complementariedade parcial que flanqueiam as ORFs e são comumente maiores nos vírus que infectam plantas, em comparação com os demais rhabdovírus (JACKSON et al., 2005).

Entre as ORFs, regiões intergênicas normalmente conservadas e repetidas apresentam três porções distintas com nucleotídeos que ancoram a polimerase e definem o ponto inicial de transcrição (UUG), uma sequência mais variável que não é transcrita (GNN) e uma sequência rica em uracila para síntese da cauda poli A nos mRNAs (AUUNUUUUU) que define o fim da transcrição do gene (DIETZGEN et al., 2011).

Em comum, os genomas codificam as cinco proteínas essenciais, na seguinte ordem: 3'-N-P-M-G-L-5', **Figura 1** (WALKER et al., 2021). Além dessas proteínas canônicas, mais de 35 outros genes já foram identificados em genomas de rhabdovírus codificando proteínas capazes de atuar na modulação de resposta das células hospedeiras frente à infecção, na eficiência de replicação do vírus e também no seu transporte entre células (WALKER et al., 2011).

Nucleoproteína, fosfoproteína e polimerase associadas ao RNA genômico formam um complexo ribonucleoproteico, o nucleocapsídeo com conformação helicoidal. A proteína matriz atua condensando o nucleocapsídeo, enquanto a glicoproteína confere a formação de um envelope lipídico durante a morfogênese da partícula com o brotamento ocorrendo a partir da membrana plasmática (*Vesicularivirus*, *Lyssavirus*, *Ephemerovirus*), membranas citoplasmáticas em viroplasmas (*Cytorhabdovirus*) e em membranas nucleares (*Alphanucleorhabdovirus*, *Betanucleorhabdovirus* e *Gammanucleorhabdovirus*). As partículas dos rhabdovírus assemelham-se a balas de revólver, ou são baciliformes, com 100 a 460 nm de comprimento (WALKER et al., 2021).

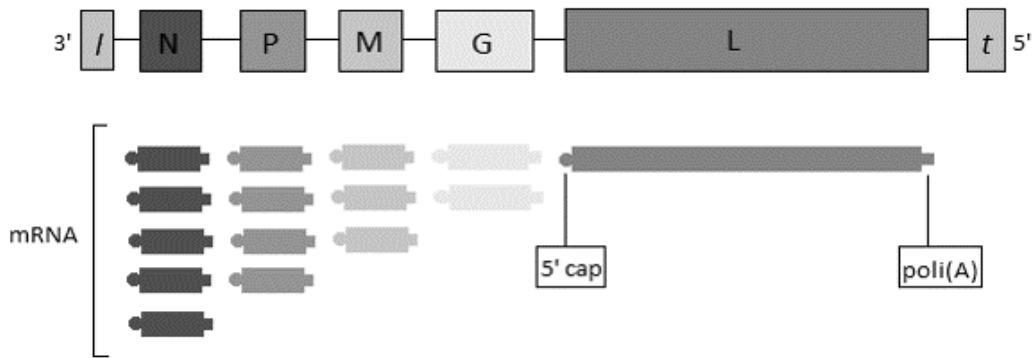


Figura 1. Organização genômica típica da família *Rhabdoviridae* em que *l* e *t* são as regiões não transcritas (*l* = *leader* e *t* = *trailer*) e N, P, M, G e L são, respectivamente, os genes estruturais que codificam a nucleoproteína, fosfoproteína, proteína matriz, glicoproteína e polimerase. Modelo de transcrição do tipo stop-start com a produção decrescente dos mRNAs monocistrônicos apresentando o 5' cap e a cauda poli (A). Figura adaptada de DIETZGEN et al. (2017).

A replicação dos vírus de RNA senso negativo ocorre no citoplasma celular, exceto para os vírus classificados nos gêneros *Alphanucleorhabdovirus*, *Betanucleorhabdovirus*, *Gammanucleorhabdovirus* e *Dichorhavirus*. Inicialmente, as glicoproteínas do vírion se ligam a receptores celulares e, por endocitose, a partícula entra na célula hospedeira. No caso dos rhabdovírus que infectam plantas a introdução do vírus ocorre durante a alimentação pelo vetor, através de seu aparelho bucal. Quando o nucleocapsídeo entra no citoplasma, ocorre a desencapsidação, a proteína matriz é desfeita e inicia-se a transcrição primária através da polimerase viral (1 unidade L e 3 Ps) com a síntese de um RNA *leader* senso positivo e dos mRNAs virais. O mecanismo da transcrição é do tipo *stop-start*, com a formação de mRNAs monocistrônicos com 5' cap e cauda poli (A) iniciando a partir da região 3' *leader*. Após a formação da cauda poli (A) no mRNA de cada gene, 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). Em seguida, a tradução dos mRNAs ocorre culminando na síntese das proteínas virais. Posteriormente, novos nucleocapsídeos são formados a partir da replicação viral com a síntese de fitas de RNA antígenômica e genômicas. A formação dos vírions ocorre após a associação do nucleocapsídeo com a proteína matriz e glicoproteína, que normalmente ocorre na membrana celular e, então, a partícula sai formada da célula (JACKSON et al., 2005; DIETZGEN et al., 2017; WALKER et al., 2021).

2.2. Os rhabdovírus que infectam plantas

Acredita-se que os rhabdovírus que infectam plantas sejam oriundos de vírus exclusivos de artrópodes que em um dado momento estabeleceram a capacidade de replicar também em células vegetais (HOGENHOUT et al., 2008). Além da replicação, o transporte de partículas entre células também passaria a ser uma necessidade em hospedeiras vegetais e assim proteínas com função de movimento passaram a ser codificadas no genoma viral, a exemplo da sc4 estudada em SYNV, a partir de clone infeccioso viral (WANG, Q. et al., 2015; WALKER et al., 2021).

Outros genes também têm sido caracterizados nesses rhabdovírus codificando proteínas capazes de interferir no sistema de defesa de plantas por meio da supressão de silenciamento de RNAs, como as proteínas P e P6 no lettuce necrotic yellows virus – LNYV e no rice yellow stunt virus – RYSV (DIETZGEN et al., 2017). Esses genes acessórios são normalmente encontrados nos rhabdovírus de plantas entre os genes da nucleoproteína e fosfoproteína (normalmente codificando uma proteína de movimento); entre o da fosfoproteína e a matriz; e entre glicoproteína e polimerase e muitos ainda têm função desconhecida (WALKER et al., 2011).

Nos últimos anos com o avanço das tecnologias de sequenciamento de alto desempenho e estudos de metagenômica viral, muitos genomas completos de rhabdovírus têm sido disponibilizados e vários novos têm sido relatados associados a plantas (ALVES-FREITAS et al., 2019; BAEK et al., 2019; DING et al., 2019; FRANOVA et al., 2019; GAAFAR et al., 2019; MARTIN; WHITFIELD, 2019; MEDINA-SALGUERO et al., 2019; READ et al., 2019). Atualmente são 57 espécies reconhecidas classificadas em seis gêneros *Alphanucleorhabdovirus*, *Betanucleorhabdovirus*, *Gammanucleorhabdovirus*, *Cytorhabdovirus*, *Dichorhavirus* e *Varicosavirus*, a partir de critérios biológicos como a gama de hospedeiras e o vetor viral, bem como análises filogenéticas da polimerase e características do genoma (monopartido ou bipartido) (WALKER et al., 2021).

Os dichoravírus possuem genoma bissegmentado, infectam plantas di e monocotiledôneas e são transmitidos por ácaros *Brevipalpus*. Os vírus pertencentes ao gênero *Varicosavirus* também possuem genoma bissegmentado, infectam plantas das famílias Compositae e Solanaceae e são transmitidos por zoósporos do fungo *Olpidium brassicae*. Rhabdovírus com genoma não segmentado infectam plantas mono- e dicotiledôneas e seus vetores são hemípteros, incluindo pulgões, cigarrinhas e fulgomorfos (WALKER et al., 2018).

3. Interação vírus-vetor-planta

Os vírus que ocorrem em plantas podem ser propagados graças à ação de vetores que na grande maioria são insetos como pulgões, mosca branca, cigarrinhas e tripses, ou ainda por ácaros e, menos frequentemente, por nematoides e fungos (WHITFIELD et al., 2015; DIETZGEN et al., 2016). A transmissão viral só ocorre devido a uma relação bastante específica estabelecida entre o vírus e o vetor por meio da interação entre proteínas de ambos. A compreensão da doença ou infecção necessita de um olhar global para o sistema vírus-vetor-hospedeira, levando-se em consideração que estudos moleculares atestam a capacidade viral de alteração comportamental do inseto vetor e fisiológicas nas plantas (ZIEGLER-GRAFF, 2020).

Begomovírus monopartidos associados a betassatélites são altamente favorecidos pela ação da proteína $\beta C1$ capaz de interferir na síntese de glicosinolatos indólicos, quando associada ao fator de transcrição vegetal WRKY20. A produção de glicosinolatos alifáticos torna-se elevada em partes da planta não infectadas e são atraentes para insetos não vetores, enquanto no floema, por exemplo, os glicosinolatos são sintetizados em menor grau, favorecendo a infecção pelo begomovírus, que é restrita ao tecido, bem como tornando a atração do vetor mosca branca mais específica (HOPKINS et al., 2009; ZIEGLER-GRAFF, 2020). Ao examinar a ação de vírus propagativos como o tomato spotted wilt virus - TSWV (Família *Tospoviridae*, Gênero *Orthotospovirus*) na fisiologia do hospedeiro, mudanças na via de sinalização do ácido jasmônico são induzidas a fim de interferir na alimentação dos tripses. O inseto que cresceu em plantas infectadas será atraído por plantas saudáveis na idade adulta e vice-versa (WU et al., 2019; ZIEGLER-GRAFF, 2020).

O tipo de interação existente entre vírus e inseto possui classificações definidas com base na penetração das partículas nos órgãos do vetor e no tempo de retenção das partículas e, assim os vírus podem ser não persistentes (ou não circulativo), ou persistentes (ou circulativo). Dentre os vírus circulativos, que são normalmente ingeridos, atravessam barreiras do sistema digestório, atingem a hemolinfa, seguem para glândulas salivares e aparelho bucal do inseto, há uma classificação com base na replicação durante sua permanência no inseto podendo então ser propagativo ou não propagativo (HOGENHOUT et al., 2008; WHITFIELD et al., 2015; BLANC; MICHALAKIS, 2016). Mesmo os potyvírus, cucumovírus, crinivírus e caulimovírus que são não circulativos apresentam uma relação específica com o artrópode vetor por meio da ação de proteínas potencializadoras da permanência de partículas virais no aparelho bucal do inseto, como a P2 codificada no genoma do cauliflower mosaic virus (Família *Caulimoviridae*, Gênero *Caulimovirus*) e a HC-Pro nos potyvírus (DRUCKER; THEN, 2015; ZIEGLER-GRAFF, 2020).

A ocorrência de transmissão propagativa é menos frequentemente relatada na virologia vegetal sendo atualmente bem estabelecida para vírus de RNA pertencentes às famílias *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Tospoviridae* (Gênero *Orthotospovirus*), *Tymoviridae* (Gênero *Marafivirus*), *Phenuiviridae* (Gênero *Tenuivirus*) (HOGENHOUT et al., 2008; BLANC; MICHALAKIS, 2016; DIETZGEN et al., 2017; HE et al., 2020). Dentre os vírus de DNA, apenas a replicação do TYLCV foi detectada em glândulas salivares de seu vetor *B. tabaci* (PAKKIANATHAN et al., 2015; WEI, J. et al., 2017; HE et al., 2020).

Os rhabdovírus são transmitidos de modo propagativo por seus vetores e, assim, tanto a planta como o vetor são hospedeiros do vírus. Acredita-se que, originalmente, os rhabdovírus ocorriam em artrópodes, mas que, em algum momento, cruzaram a barreira entre reinos e passaram também a infectar espécies vegetais e animais (HOGENHOUT et al., 2003). A presença de genes acessórios nos genomas de alguns rhabdovírus é um dos indicativos dessa ampliação de hospedeiros, resultando na incorporação de genes que codificam proteínas com papéis decisivos na patogenicidade, como observado para as ORFs que codificam proteína de movimento e supressores de silenciamento gênico nos rhabdovírus de plantas (WALKER et al., 2011).

Além da ocorrência de genes conservados no genoma de todos os vírus da família *Rhabdoviridae* independente de seus hospedeiros, a função e localização das proteínas virais compatíveis em células vegetais e de insetos são indicativos da conservação da replicação nos hospedeiros (HOGENHOUT et al., 2008). Apesar do modo de replicação ser conservado, a replicação e o acúmulo de partículas virais é inferior no vetor, em comparação com o observado nas plantas (AMMAR EL et al., 2009).

Para que um vírus persistente seja transmitido por um artrópode, algumas barreiras fisiológicas precisam ser transponidas e a primeira delas é a infecção do intestino. Após a replicação inicial no intestino, o vírus precisa atingir outras partes do inseto, como células nervosas, hemolinfa e por fim as glândulas salivares. Replicando nas glândulas salivares e conseguindo ultrapassar suas barreiras, as partículas podem, então, ser transmitidas para plantas (HOGENHOUT et al., 2008). Para o sucesso da transmissão, interações vírus-vetor bastante específicas precisam ocorrer e para os rhabdovírus, somente nos últimos anos esses mecanismos passaram a ser estudados (WHITFIELD et al., 2018).

ZHANG, Z. J. et al. (2020) identificaram que a replicação do barley yellow striate mosaic virus (BYSMV) é favorecida tanto em cevada e *N. benthamiana*, quanto no vetor *Laodelphax*

striatellus, por meio da interação de sua fosfoproteína (P) com a deadenilase celular CCR4. Quando a proteína P de BYSMV sequestra CCR4 para o viroplasma, a proteína N deixa de se ligar inespecificamente com mRNAs celulares, aumentando assim a especificidade da formação dos capsídeos e conseqüentemente aumentando a eficiência da replicação viral. Avaliando o mesmo patossistema, o grupo também demonstrou a interação entre a quinase caseína CK1 e a proteína P de BYSMV ocorrendo tanto em planta como no vetor. A proteína P do vírus ocorre em duas formas (P42 e P44) e sua fosforilação é mediada pela CK1. A P42 estimula a replicação viral, enquanto P44 favorece a transcrição de BYSMV, já que esta é a principal forma de P encontrada no nucleocapsídeo viral (GAO et al., 2020).

Para o rice yellow stunt virus (RYSV), foi demonstrada a interação direta existente entre a proteína matriz (M) e células nervosas de seu vetor *Nephotettix cincticeps*, bem como a capacidade da M de RYSV regular a expressão de reguladores da biosíntese de poliaminas (ornitina descarboxilase ODC1 e a antienzima OAZ1), culminando no aumento da expressão de putrescina, uma das poliaminas que atuam durante replicação, transcrição e tradução em infecções virais (ZHANG et al., 2021).

4. A mosca branca (*Bemisia tabaci* Genn.)

A mosca branca *Bemisia tabaci* Genn. é considerada um complexo de espécies crípticas composto por 44 grupos classificados a partir de análises filogenéticas do gene mitocondrial citocromo oxidase, em que o critério para distinção de espécies consiste em divergências $\geq 4\%$ (LEE et al., 2013; KANAKALA; GHANIM, 2019). As espécies podem ainda apresentar diferenças biológicas ou comportamentais como a gama de hospedeiras, níveis distintos de resposta a inseticidas, colonização por endossimbiontes e também na eficiência de transmissão de vírus (HUSSAIN et al., 2019).

Dentre as espécies de mosca branca já descritas, a Middle-East Asia Minor 1 - MEAM1 (biótipo B) e Mediterranean – MED (biótipo Q) são, atualmente, as mais relevantes com relatos de sua presença em mais de quarenta países. Ambas as espécies são oriundas do Oriente Médio e podem ser encontradas inclusive na Ásia, juntamente com outras 26, caracterizando a região como a mais relevante em termos de diversidade de espécies presentes (KANAKALA; GHANIM, 2019).

Em várias regiões, a invasão de moscas das espécies MEAM1 e MED tem tornado a presença de espécies endógenas menos significantes e no Brasil, a situação não foi diferente (VAN BRUNSCHOT et al., 2014). Em 1990, a mosca MEAM1 foi introduzida no país e desde então tem se mostrado uma importante peste para a horticultura brasileira com a transmissão de begomovírus (INOUE-NAGATA et al., 2016). Análises filogenéticas com moscas coletadas a partir de 1989 sugerem que o biótipo B conhecido pelos surtos a partir de 1990 tenha sido originado de um cruzamento entre um haplótipo da Etiópia e um parental do Norte da África-Oriente Médio e independentemente introduzido no Sudeste e Nordeste do país (PAREDES-MONTERO et al., 2021; PAREDES-MONTERO et al., 2022). Já a MED, foi encontrada no país somente em 2015, e aparentemente, restrita a uma área de fronteira do Rio Grande do Sul com a Argentina e o Uruguai (DA FONSECA BARBOSA et al., 2015). Posteriormente, em um levantamento realizado com amostras coletadas entre 2013 e 2017, *B. tabaci* MED foi identificada em Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul em plantas de valor ornamental e em plantas das famílias Solanaceae, Cucurbitaceae e Brassicaceae (DE MORAES et al., 2018). MED também foi detectada em infestações em cultivos protegidos de solanáceas e cucurbitáceas, em campos de solanáceas, em São Paulo e em ornamentais em Goiás (BELLO et al., 2020). No Distrito Federal, MED foi detectada em mudas de teca (*Tectona grandis*) (BORGES, R. C. F. et al., 2019), em plantas ornamentais, solanáceas e cucurbitáceas em lojas tipo garden center e/ou em pequenas propriedades em área urbana (DA SILVA RODRIGUES et al., 2021).

A mosca branca é hoje uma das principais pragas na agricultura, com mais de 500 espécies vegetais listadas como suas hospedeiras mundialmente. Além dos danos diretos causados por seu hábito alimentar como a depauperação e o favorecimento do surgimento de fumagina na planta, a mosca branca é um supervetor de mais de 200 vírus com grandes danos em culturas como tomate, batata doce (*Ipomoea batatas* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e algodão (*Gossypium* spp. L.) (GILBERTSON et al., 2015). Tais vírus são de genoma de DNA circular como os geminivírus, ou de RNA fita simples classificados nos gêneros *Ipomovirus* (Família *Potyviridae*), *Crinivirus* (Família *Closteroviridae*), *Carlavirus* (Família *Betaflexiviridae*) e *Torradovirus* (Família *Secoviridae*) (GILBERTSON et al., 2015). Recentemente, a mosca branca também foi relatada como vetor de dois polerovírus (Família *Solemoviridae*) (GHOSH et al., 2019; COSTA, T. M. et al., 2020).

JUSTIFICATIVA

O feijão é uma cultura de grande importância no Brasil e é comumente afetada por diversas viroses responsáveis por severas reduções na produtividade e consequente elevação de custos de produção que são repassados ao consumidor. Na safra de inverno de 2016, diversos relatos de sintomas virais severos tais como mosaico, encarquilhamento e deformação foliar foram feitos por agricultores na região central do Brasil e, após testes (RT-PCR), detectou-se a ocorrência de infecções mistas por vírus de DNA, o BGMV, e os de RNA, CPMMV e um novo rhabdovirus, bean-associated cytorhabdovirus – BaCV, detectado previamente por HTS (*high-throughput sequencing*).

Uma ampla caracterização molecular e biológica desse novo vírus faz-se extremamente importante tendo em vista que na família *Rhabdoviridae* não há relatos de infecções naturais em feijoeiro, bem como de mosca branca atuando como inseto vetor. A mosca branca apresenta-se como vetora de diversos vírus para as mais distintas famílias botânicas. Essa ampla diversidade de hospedeiras do inseto, em associação com o surgimento de resistência a diversos produtos químicos, torna seu controle e o das viroses transmitidas por este inseto bastante difícil e oneroso. Em suma, estamos diante de um vírus novo, presente em uma planta amplamente cultivada, com forte poder de dispersão devido ao tipo de transmissão e ainda não podemos estabelecer seus efeitos no feijoeiro.

OBJETIVOS

O trabalho tem como **objetivo geral** realizar a caracterização biológica e molecular do bean-associated cytorhabdovirus (BaCV) previamente detectado em feijoeiro comum e, para tal, propõem-se os seguintes **objetivos específicos**:

- (i) estudar a genômica do vírus;
- (ii) estudar a ocorrência do BaCV no Brasil;
- (iii) estudar o círculo de hospedeiras do BaCV;
- (iv) estudar a variabilidade genética e filogeografia do vírus;
- (v) estudar a ocorrência de infecções mistas com BGMV e CPMMV;
- (vi) estudar a transmissão vertical do BaCV e CPMMV.

Publicação do capítulo com algumas modificações

Pinheiro-Lima, B.; Pereira-Carvalho, R.C.; Alves-Freitas, D.M.T.; Kitajima, E.W.; Vidal, A.H.; Lacorte, C.; Godinho, M.T.; Fontenele, R.S.; Faria, J.C.; Abreu, E.F.M.; Varsani, A.; Ribeiro, S.G.; Melo, F.L. Transmission of the Bean-Associated Cytorhabdovirus by the Whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1. *Viruses* **2020**, *12*, 1028. <https://doi.org/10.3390/v12091028>

1. INTRODUÇÃO

Os rhabdovírus (família *Rhabdoviridae*) são um grupo diverso de vírus de RNA de fita simples senso negativo que infectam plantas, vertebrados e invertebrados. São responsáveis por doenças em humanos e animais e podem causar grandes perdas de produtividade nas lavouras. Rhabdovírus que infectam plantas são atualmente taxonomicamente atribuídos a seis gêneros (WALKER et al., 2021).

Membros do gênero *Dichorhavirus* possuem genoma bissegmentado, infectam plantas di e monocotiledôneas e são transmitidos por ácaros *Brevipalpus*. Os vírus pertencentes ao gênero *Varicosavirus* também possuem um genoma bissegmentado, infectam plantas das famílias Compositae e Solanaceae e são transmitidos por zoósporos do fungo *Oplidium brassicae*. Rhabdovírus de genoma não segmentado infectam plantas mono- e dicotiledôneas e são transmitidos por insetos sugadores de seiva, incluindo pulgões, cigarrinhas e fulgomorfos (WALKER et al., 2021). Além disso, existe uma relação estreita entre rhabdovírus de plantas e seus vetores, em que cada vírus pode ser transmitido por uma única espécie ou algumas espécies intimamente relacionadas (AMMAR EL et al., 2009).

Os vírus que replicam no núcleo de células vegetais infectadas são atribuídos aos gêneros *Alphanucleorhabdovirus*, *Betanucleorhabdovirus*, *Gammanucleorhabdovirus* e *Dichorhavirus* enquanto aqueles que replicam no citoplasma pertencem ao gênero *Cytorhabdovirus* (DIETZGEN et al., 2017; WALKER et al., 2021). Os rhabdovírus transmitidos por insetos e por ácaro replicam em seus vetores e são transmitidos de modo persistente propagativo (AMMAR EL et al., 2009; WHITFIELD et al., 2018).

Avanços recentes em sequenciamento de alto rendimento (HTS) e estudos de metagenômica viral permitiram a descoberta e identificação de vários rhabdovírus associados a plantas. (ALVES-FREITAS et al., 2019; BAEK et al., 2019; DING et al., 2019; FRANOVA et al., 2019; GAAFAR et al., 2019; MARTIN; WHITFIELD, 2019; MEDINA-SALGUERO et al., 2019;

READ et al., 2019). Mais de 150 genomas completos de rhabdovírus que constam no GenBank® foram detectados em plantas cultivadas em ambientes agrícolas e plantas em ecossistemas nativos e são, atualmente, classificados em mais de 50 espécies (WALKER et al., 2021). No entanto, as informações sobre vetores de insetos e características de transmissão são desconhecidas para aproximadamente 60% desses vírus. (WHITFIELD et al., 2018).

Bean-associated cytorhabdovirus (BaCV) foi identificado em linhagens de feijão comum resistentes ao bean golden mosaic virus (BGMV) por HTS. O genoma do BaCV tem uma organização 3'-N-P-M-G-L-5' [proteína de nucleocapsídeo (N), fosfoproteína (P), proteína matriz (M), glicoproteína (G) e polimerase (L)] que é típica de rhabdovírus, e entre P e M, codifica dois genes acessórios, P3 e P4 (ALVES-FREITAS et al., 2019).

Um vírus intimamente relacionado com uma identidade de sequência de genoma de 97%, denominado papaya virus E (PpVE), foi relatado em plantas de mamoeiro no Equador (MEDINA-SALGUERO et al., 2019). Com base na alta identidade de sequência entre ambos os vírus e a prioridade de data de envio da sequência ao GenBank, foi proposto que a espécie do vírus seria denominada *Papaya cytorhabdovirus* com o isolado PpVE infectando mamões e BaCV infectando feijoeiros (FREITAS-ASTUA et al., 2019).

Em 2020, outros sete isolados foram detectados por HTS em citrus (*Citrus* spp.), maracujazeiro (*Passiflora edulis* Curtis) e arbusto papel (*Edgeworthia chrysantha* Sieb. & Zucc.), na China. Os isolados denominados citrus-associated rhabdovirus (CiaRV) apresentaram identidade de sequência de aminoácidos entre 84,7 e 99,9% com o BaCV e o PpVE (ZHANG, S. et al., 2020). Mais recentemente, o BaCV foi identificado no México em amostra de *P. vulgaris* concomitantemente infectada pelo potyvírus bean common mosaic necrosis virus – BCMNV (CHIQUITO-ALMANZA et al., 2021).

Para caracterizar em detalhes o cytorhabdovírus, realizamos a clonagem molecular e definimos suas características morfológicas e citopatológicas. Além disso, observamos uma alta prevalência do BaCV em campos de feijão no Brasil e determinamos a transmissão eficiente de BaCV pela mosca branca *Bemisia tabaci* (Middle East-Asia Minor 1, MEAM1), uma característica até então desconhecida para rhabdovírus que infectam plantas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção do material vegetal

Quinze feijoeiros (cultivar 'Pérola') com sintomas virais típicos como mosaico, distorção foliar e nanismo (**Figura 2**) foram coletados em um campo comercial em Luziânia, Estado de Goiás, em junho de 2016. Amostras foliares das 15 plantas foram coletadas e armazenadas a -80°C. Seis plantas foram transplantadas em vasos e mantidas em uma gaiola com tela antiáfídica, sem remover as abundantes colônias de mosca branca presentes nas folhas. Uma das plantas transplantadas sobreviveu e foi utilizada para transmissão do vírus e clonagem do genoma do BaCV-Luz.

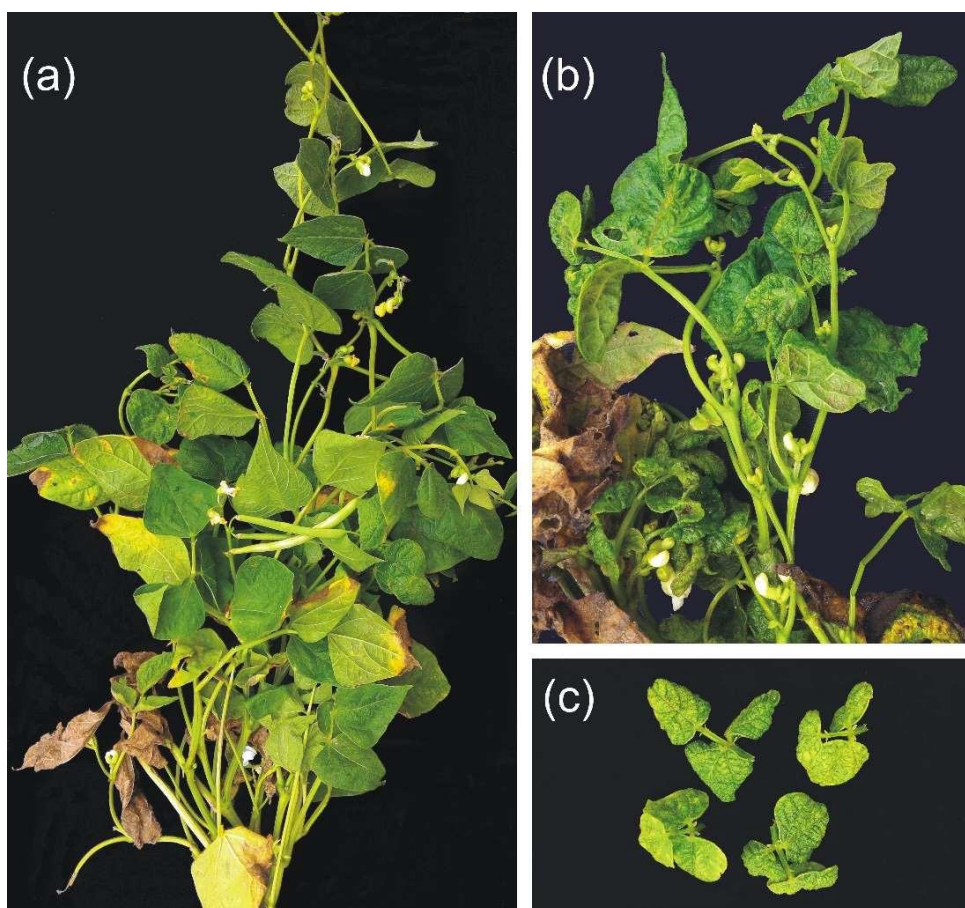


Figura 2. Sintomas em feijoeiros coletados em um campo comercial em Luziânia, estado de Goiás, com infecção mista por bean-associated cytorhabdovirus (BaCV), cowpea mild mottle virus (CPMMV), bean golden mosaic virus (BGMV) e colonização por mosca branca (*B. tabaci* MEAM1). (a) Mosaico e enrugamento foliar. (b) Mosaico e deformação severa. (c) Em detalhe, folhas com redução de área, mosaico amarelo e enrugamento severo.

2.2. Ocorrência do BaCV em feijoeiro comum

Inicialmente, as 15 plantas coletadas em Luziânia foram examinadas por RT-PCR ou PCR para a presença de vírus frequentemente encontrados infectando feijoeiros no Brasil, os vírus transmitidos por mosca branca CPMMV, BGMV e MaYSV, o BRMV transmitido pelo besouro crisomelídeo e o BaCV. Para determinar a ocorrência do BaCV em diferentes áreas do Brasil (**Figura 3**), amostras adicionais de feijão foram coletadas em campos de feijão experimentais ou comerciais entre 2016 e 2018, incluindo Brasília (n = 30), Distrito Federal - DF; Santo Antônio de Goiás (n = 26), Luziânia (n = 15), Cristalina (n = 43), Urutai (n = 1) e Araçu (n = 1) no estado de Goiás - GO; Sorriso, Estado de Mato Grosso - MT (n = 2); Bonfinópolis de Minas (n = 3), Paracatu (n = 1), Três Pontas (n = 5) em Minas Gerais; e Arapiraca (n = 5) no Estado de Alagoas. Além disso, analisamos amostras de feijão de nossa coleção arquivada. Plantas coletadas em Brasília, DF em 2007 (n = 2), PAD / DF Paranoá, DF em 2012 (n = 11), e Riacho Fundo, DF em 2015 (n = 41); Cruz das Almas (n = 8), Morro do Chapéu (n = 4), Piritiba (n = 3) e Antônio Gonçalves (n = 2) na Bahia em 2015; e Palmital (n = 1) no Estado de São Paulo em 2015 também foram testadas. No total, 219 plantas de feijão foram avaliadas quanto à presença de BaCV, CPMMV e BGMV (41 plantas da cultivar BGMV-imune 'BRS FC 401 RMD' não foram testadas para BGMV).

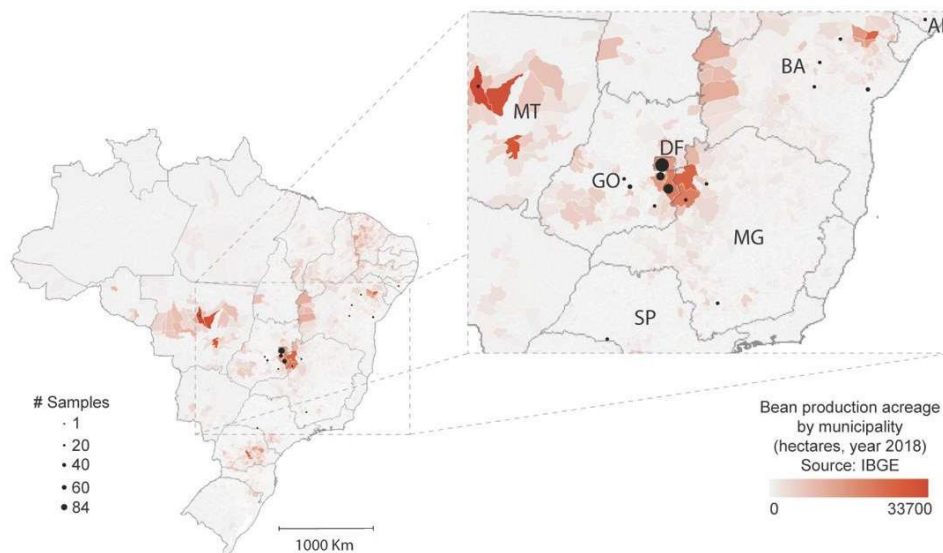


Figura 3. Resumo da distribuição dos locais de amostragem de feijão nos estados de Alagoas (AL), Bahia (BA), Goiás (GO), Minas Gerais (MG), Mato Grosso (MT), São Paulo (SP) e no Distrito Federal (DF). Cada município foi colorido de vermelho de acordo com a área plantada de feijão (em hectares), obtida no Instituto Brasileiro de Geografia (<http://www.ibge.gov.br/>). Os círculos pretos representam os locais de amostragem e seu tamanho é proporcional ao número de plantas coletadas. As amostras foram coletadas entre 2007 e 2018.

2.3. Extração de ácidos nucleicos

Para a obtenção de RNA total, extrações foram realizadas seguindo o protocolo do TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a partir de 100 mg de folhas (feijão comum, vigna e soja) e raiz (feijão comum); *pool* de 30 moscas brancas adultas; único indivíduo de mosca branca adulto; e partes do inseto (cabeça com tórax e abdome), a depender do ensaio. Folhas e insetos congelados em nitrogênio líquido foram macerados com pistilo em tubos de 1,5 mL e 2 mL, respectivamente. Ao pulverizado, foi adicionado 1 mL do TRIzol Reagent (250 µL para *pool* de moscas e 100 µL para indivíduos ou partes) e o tubo foi agitado em vórtex. Após 5 minutos em temperatura ambiente, 200 µL de clorofórmio (50 µL para *pool* de moscas e 20 µL para indivíduos ou partes) foram adicionados e os tubos agitados manualmente durante 15 segundos. Após 3 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram submetidas à centrifugação 12000 x g a 4 °C, durante 15 minutos. Com a separação de fases do material, a porção aquosa foi transferida para tubo limpo ao qual 500 µL de isopropanol (125 µL para *pool* de moscas e 50 µL para indivíduos ou partes) foi adicionado e mantido em temperatura ambiente por 10 minutos. Para a formação do pellet, o material foi centrifugado por 10 minutos (12000 x g a 4°C) e o sobrenadante descartado. Os pellets formados foram limpos por meio da adição de 1 mL de etanol 70% (250 µL para *pool* de moscas e 100 µL para indivíduos ou partes), agitação em vórtex, centrifugação por 5 minutos (7500 xg a 4°C) e descarte do sobrenadante. Os pellets foram secados em temperatura ambiente, ressuspensos em água e incubados em banho seco a 60°C por 10 minutos. A qualidade e a concentração dos RNAs extraídos foram avaliadas em gel de agarose a 1% e verificação em espectrômetro.

O DNA total foi extraído de amostras foliares e *pools* de moscas brancas adotando-se o método CTAB descrito por DOYLE; DOYLE (1987). Os tecidos foram inicialmente pulverizados em nitrogênio líquido com pistilo e, em seguida, misturados a 800 µL de uma solução de extração (2% CTAB; 0,2% 2-Mercaptoetanol). Após adição de 400 µL de clorofil 24:1 (clorofórmio: álcool isoamílico, v/v), as amostras foram incubadas em banho seco por 10 minutos a 55°C sob agitação. As fases foram separadas após centrifugação por 10 minutos e, ao sobrenadante, foram adicionados 1,2x o volume de isopropanol. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Os pellets foram limpos por meio da lavagem com 500 µL de etanol 70%, centrifugação por 10 minutos e descarte do sobrenadante. Os tubos foram secos em temperatura ambiente e o DNA ressuspensionado em 100 µL de TE com RNase (10 µg/mL) e incubação a 37°C por 10 minutos.

2.4. RT-PCR, PCR e clonagem

Os RNAs totais das amostras (5 µL, aproximadamente 1 µg) foram utilizados para síntese dos cDNAs com 200 U de SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 0,5 µL de *primers* randômico e oligo dT (50 mM); 1 µL de dNTP (10 mM); 2 µL de ditiontreiol – DTT (100 mM); 4 µL de tampão 5x first-strand buffer (Tris-HCl 250 mM pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM) em um volume de 20 µL. As reações foram incubadas por 1 hora a 50°C e desnaturadas a 70°C por 15 minutos.

Para amplificação do genoma completo do BaCV, foram realizadas PCRs com seis pares de *primers* distintos desenhados de modo a haver uma sobreposição de pelo menos 150 nucleotídeos entre os *amplicons*. As reações foram realizadas com 1 µL de cDNA; 1 µL de LongAmp Taq DNA Polymerase (2500 U/mL) (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA); 1,5 µL de dNTPs (10 mM); 2 µL de cada *primer* (10 mM); 10 µL de 5x LongAmp Taq Reaction Buffer e 32,5 µL de água. Condições adotadas nas PCRs: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 60°C por 40 segundos e extensão a 65°C por 3 minutos, e 15 minutos de extensão final a 65°C (**Tabela 1**).

As PCRs para detecção viral (BaCV, CPMMV, BGMV, BRMV e MaYSV), de genes específicos do BaCV (N, P, P3, P4, M, G e L), de genes de planta (gene RbcS e Act11) e mosca branca (RpL9, ATPase e mtCOI) foram realizadas a partir de 1 µL de cDNA ou DNA; 1 µL de cada *primer* (10 mM); 0,8 µL de dNTPs (10 mM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 0,2 µL de Taq DNA Polymerase (5 U/ µL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 2,5 µL de tampão 10x PCR buffer (Tris-HCl pH 8,4 200 mM; KCl 500 mM), 1 µL de MgCl₂ (50 mM) e 17,5 µL de água. As reações foram conduzidas com desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos; anelamento 45-65°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos a 1 minuto e 40 segundos (**Tabela 1**).

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%. Bandas referentes à amplificação do genoma completo e algumas para confirmação das detecções virais foram excisadas e eluídas com o Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Os fragmentos foram então clonados em vetor PCR 2.1 TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e enviados para o sequenciamento na MacroGen Inc. (Seul, Coreia do Sul).

Tabela 1. *Primers* utilizados nas PCRs e RT-PCRs para amplificação do genoma do BaCV (*amplicons* 1 a 6) e detecção de seus genes (N, P, P3, P4, M, G, L); levantamento viral em feijoeiros (BaCV, CPMMV, BRMV, BGMV e MaYSV); genes de planta (RbcS e Act11) e de mosca branca (RpL9, ATPase e mtCOI).

Alvo	Nome do <i>primer</i> ¹	Sequência 5' - 3'	Fragmento (pb)	Tm (°C)	Referência
BaCV	BaCV_1F BaCV_1579R	GTTCAAAACTTTATAACCGCAGGAG CGCAACAGATTAAACAGGAAAT	1579	61°C	¹
CPMMV	CPMMV_4000F CPMMV_4500R	AACTTGGCCTTAGTGAAGCTCTACA ATTAGCTCTGTGCCTGGGGT	500	61°C	(LAMAS et al., 2017) ²
BRMV	BRMV1_76F BRMV1_521_R	CTTGACTTGGTTGAAATACACCT GCCCTCAGCTTGACTAGGCC	445	62°C	(ALVES-FREITAS et al., 2019) ²
BGMV	BGMV_HPXHO BGMV_HPKPN	CCTCGAGATAGTGCAGTGC GA AGGTACCATGCGGCATCCGAAGC	400	65°C	(BONFIM et al., 2007) ²
MaYSV ²	MaYSV-249F MaYSV-1083R	GGTTTCCC GCAATAACAA CATGTTGTACTTAGAACGAA	834	55°C	¹ ¹
N gene	BaCV_N_F BaCV_N_R	ATGCCGAAAGCGTACAAGGAC TCAAGGCTTGTAGATCCTCTTGC	1356	60°C	¹ ¹
P gene	BaCV_P_F_2 BaCV_P_R	ATGTCTATTGAGGAGATGG TTAATAGTATGACTTGATATTCTTC	1338	55°C	¹ ¹
P3 gene	BaCV_P3_F BaCV_P3_R	ATGGAGAAGAGCAACTCAGATA TTATTCAGTGGGAATCAAGGAGA	570	58°C	¹ ¹
P4 gene	BaCV_P4_F BaCV_P4_R	ATGGAAGGACAATGCAGG TCACTCATCCCCACTAGG	237	55°C	¹ ¹
M gene	BaCV_M_F BaCV_M_R	ATGTCAATCCTAAAGTATATCTC TCATTTAACAGACTTAAACAGAG	645	55°C	¹ ¹
G gene	BaCV_G_F BaCV_G_R	ATGTCTGGGTACGCTATTGC CTACGCAAAGATGGGGAACG	1560	60°C	¹ ¹
L gene	BaCV_L_F BaCV_L_R	ATGTCTTTCTTCTTTGAGGAA TCAGTCAGCAATGAAAGC	6342	51°C	¹
<i>RbcS</i>	CG03_Pv_s_rubiscoF CG03_Pv_s_rubiscoR	TTGGAGCATGGTTTCGTGTA ATGCACTGCACTTGACGAAC	180	55°C	(KNIGHT; JENKINS, 1992) ²
<i>Act11</i>	qAct11_F qAct11_R	TGCATACGTTGGTGATGAGG AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG	150	58°C	(BORGES, A. et al., 2012) ²
Whitefly <i>RpL9</i>	qWF_RPL9_F qWF_RPL9_R	AGGTAGACATGTTCCGTGGTGT CACAACCTTGCATGACGTGTGG	250	55°C	(UPADHYA Y et al., 2011) ²
Whitefly v- ATPase	qWF_ATPase_F qWF_ATPase_R	TTCCGACGTTTGGCAGAGA ACCGCGCCAACAATACTCACA	300	55°C	(UPADHYA Y et al., 2011) ²
cDNA	M10Pa-cIT50VN	AAGCAGTGTTATCAACGCAGATTAATTAA T ₅₀ VN	-	-	(NICOLINI et al., 2012) ²
cDNA	Anchored Oligo(dT)20	(T)20VN	-	-	Invitrogen ²
RACE 3' First PCR	M10	AAGCAGTGTTATCAACGCAGA	580	61°C	(NICOLINI et al., 2012; ALVES-

	BaCV_12881F	GGAGGATCATGAGAGACTGAGGC			FREITAS et al., 2019) ²
RACE 3' Second PCR	M10	AAGCAGTGTTATCAACGCAGA	300	61°C	(NICOLINI et al., 2012; ALVES-FREITAS et al., 2019) ²
	BaCV_13169F	GGTGACCTTCCAGTACCTTCCTC			(SCHUSTER et al., 1992; ALVES-FREITAS et al., 2019) ²
RACE 5' First PCR	AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIG GGIIG	600	61°C	(SCHUSTER et al., 1992; ALVES-FREITAS et al., 2019) ²
	BaCV_546_R	TTCACTCTCCTCAGACTCCTTGC			(SCHUSTER et al., 1992; ALVES-FREITAS et al., 2019) ²
RACE 5' Second PCR	AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	400	61°C	(SCHUSTER et al., 1992; ALVES-FREITAS et al., 2019) ²
<i>Amplicon 1</i>	BaCV_321_R BaCV_1F	TGTACATCCCATAACCGCTCCAG GTTCAAAACTTTATAACCGCAGGAG	1579	60°C	¹
<i>Amplicon 2</i>	BaCV_1579R BaCV_1248F	CGCAACAGATTAAACAGGAAAT ACAGAGGAGACTGGGGATCC	2813	60°C	¹
<i>Amplicon 3</i>	BaCV_4061R BaCV_3645F	ATGCATGTTACTTTCTACACAC GGACGGCGACTATCTGACAG	2874	60°C	¹
<i>Amplicon 4</i>	BaCV_6519R BaCV_6369F	CGACGAGCTATGCGACTTCT CTCGGGGATGTCTCGAAATC	2242	60°C	¹
<i>Amplicon 5</i>	BaCV_8611R BaCV_8495F	TCCGTTACGACAATATAAGCCC GTTGCCAAAGAAGTGTCCGAT	2654	60°C	¹
<i>Amplicon 6</i>	BaCV_11149R BaCV_10947F	CCGGAATAAGAGAATTTGGACGC CCCGTACCTCCTTCCTCCAT	2522	60°C	¹
	BaCV_13469R_GA	GAGATGCCATGCCGACCCGCGAACGAAAA TATCGAAA			¹
Whitefly mtCOI	COI-Fw COI-Rv	TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	880	45°C	(BOSCO et al., 2006) ²

¹Primers desenhados para esse estudo. ²Primers utilizados com base na literatura.

2.5. Análises filogenéticas

Após a obtenção do genoma completo do isolado de BaCV encontrado em Luziânia sua sequência foi depositada no GenBank, com o código de acesso MT811775. O genoma BaCV_Luz foi então comparado com o isolado BaCV-GO, o PpVE e o transcrito de *Bemisia tabaci* (TSA2) da Índia, considerando-se a identidade de sequências de nucleotídeos e aminoácidos para cada ORF. Além dessas, outras 22 sequências (**Tabela 2**) da polimerase de cytorhabdovirus depositadas no GenBank (até maio de 2020) foram alinhadas usando o

algoritmo MAFFT (KATOH et al., 2019) implementado no *software* Geneious (v. 11, Biomatters, Auckland, New Zealand) (KEARSE et al., 2012). A árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) foi inferida usando IQ-TREE (TRIFINOPOULOS et al., 2016), com suporte de nó estimado com o teste de razão de verossimilhança aproximada de Shimodaira-Hasegawa (SH-aLRT) (SHIMODAIRA, 2002). Além disso as glicoproteínas dos mesmos cytorhabdovirus foram analisadas a partir de uma rede de similaridade de sequências gerada usando a ferramenta Enzyme Function Initiative–Enzyme Similarity Tool (EFI–EST) (GERLT et al., 2015) com um limite de pontuação de alinhamento de 35 e limite mínimo do E-value de 1×10^{-5} . A rede foi visualizada no Cytoscape v3.7.1 (SHANNON et al., 2003). As comparações de identidade de sequência par a par foram realizadas usando Sequence Demarcation Tool (SDT) v.1.2 (MUHIRE et al., 2014).

Tabela 2. Número de acesso de sequências de cytorhabdovirus no GenBank e seus vetores ou insetos hospedeiros.

Acrônimo	Vírus	Número de acesso	Vetor ou hospedeiro (Família)	Referência
ADV	alfalfa dwarf virus	KP205452.2	Desconhecido	
BYSMV	barley yellow striate mosaic virus	KM213865.1	<i>Laodelphax striatellus</i> (Delphacidae)	(CONTI; APPIANO, 1973)
BaCV-GO	bean-associated cytorhabdovirus	MK202584.1		
BaCV-Luz	bean-associated cytorhabdovirus-Luz	MT811775.1	<i>B. tabaci</i> MEAM1 (Aleyrodidae)	Trabalho atual
	<i>B. tabaci</i> TSA 1	KJ994265.1/GA UC01021749.1	<i>B. tabaci</i> (Aleyrodidae)*	
	<i>B. tabaci</i> TSA 2	KJ994260.1/KJ9 94255.1	<i>B. tabaci</i> (Aleyrodidae)*	
CCyV-1	cabbage cytorhabdovirus 1	KY810772.1	Desconhecido	
CBDaV	Colocasia bobone disease-associated virus	KT381973.1	<i>Tarophagus proserpina</i> (Delphacidae)	(GOLLIFE R et al., 1977)
LNyV	lettuce necrotic yellows virus	AJ867584.2	<i>Hyperomyzus lactucae</i> (Aphididae)	(FRANCKI et al., 1989)
LYMoV	lettuce yellow mottle virus	EF687738.1	Desconhecido	
MaCV	maize associated rhabdovirus	KY965147.1	Desconhecido	
MYSV	maize yellow striate virus	KY884672.1	<i>Peregrinus maidis</i> and <i>Delphacodes kuscheli</i> (Delphacidae)	(MAURIN O, M. F. et al., 2012; MAURINO, F. et al., 2018)
NCMV	northern cereal mosaic virus	AB030277.1	<i>Laodelphax striatellus</i> , <i>Unkanodes albifascia</i> , <i>U. sapporona</i> and <i>Muellerianella fairmairei</i> (Delphacidae)	(TORIYA MA, 1972; 2004)
PpVE	papaya cytorhabdovirus	MH282832.1	Desconhecido	
PeVA	persimmon virus A	AB735628.2	Desconhecido	
RVCV	raspberry vein chlorosis virus	MK240091.1	<i>Aphis idaei</i> (Aphididae)	(JONES, S. et al., 2019)
RSMV	rice stripe mosaic virus	KX525586.2	<i>Recilia dorsalis</i> and <i>Nephotettix virescens</i> (Cicadellidae)	(YANG et al., 2016)

SCV	strawberry crinkle cytorhabdovirus	MH129615.1	<i>Chaetosiphon fragaefolii</i> and <i>C. jacobi</i> . (Aphididae)	(SYLVEST ER et al., 1974)
StrV-1	strawberry cytorhabdovirus 1	MK211270.1	<i>Aphis fabae</i> , <i>Acyrtosiphon malvae</i> and <i>A. ruborum</i> (Aphididae)	(FRANOV A et al., 2019)
TYMaV	tomato yellow mottle-associated virus	KY075646.1	Desconhecido	
TrARV1	Trichosanthes associated rhabdovirus 1	BK011194.1	Desconhecido	
TPVA	Trifolium pratense virus A	MH982250.1	Desconhecido	
TPVB	Trifolium pratense virus B	MH982249.1	Desconhecido	
WuIV-4	Wuhan Insect virus 4	KM817650.1	<i>Hyalopterus pruni</i> (Aphididae)*	(LI et al., 2015)
WuIV-5	Wuhan Insect virus 5	KM817651.1	<i>Hyalopterus pruni</i> (Aphididae)*	(LI et al., 2015)
WuIV-6	Wuhan Insect virus 6	KM817652.1	<i>Hyalopterus pruni</i> (Aphididae)*	(LI et al., 2015)
YmCaV	yerba mate chlorosis-associated virus	KY366322.2	Desconhecido	
YmVA	yerba mate virus A	MN781667.1	Desconhecido	

*Vírus detectados por metatranscriptoma de insetos.

2.6. Transmissão do BaCV por *Bemisia tabaci* MEAM1

2.6.1. Criação de *Bemisia tabaci* MEAM1 avirulíferas

Adultos de *B. tabaci* MEAM1 utilizados nos ensaios de transmissão do BaCV foram obtidos na criação avirulífera mantida em plantas de repolho (*Brassica oleraceae* var. *capitata* L.), em casa de vegetação na Estação Experimental de Biologia - EEB, Universidade de Brasília. A genotipagem dos insetos foi realizada por PCR-RFLP com a amplificação do gene mitocondrial citocromo oxidase I (mtCOI) seguida pela digestão com a endonuclease Taq I (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) e visualização em gel de agarose. O padrão de bandas foi comparado aos das espécies MEAM1 (antigo biótipo B) e MED (antigo biótipo Q) (BOSCO et al., 2006).

2.6.2. Manutenção do isolado BaCV_Luz

Experimentos de transmissão do BaCV por mosca branca foram conduzidos, em 2016, durante o mestrado em Fitopatologia (2015-2016) e o isolado mantido até 2018, por meio da periódica introdução de feijoeiros ‘BRS FC 401 RMD’ e de moscas avirulíferas em gaiolas mantidas na Embrapa Cenargen.

Em 2016, após a confirmação da infecção por BaCV, CPMMV e BGMV, um feijoeiro colonizado por moscas brancas transplantado do campo foi utilizado como fonte de inóculo para testes de transmissão (**Figura 4**). Inicialmente, oito mudas jovens de feijão de cada cultivar ‘Pérola’, ‘Jalo’ e ‘BRS FC 401 RMD’ foram colocadas na gaiola com a planta infestada por mosca branca. Sete dias depois, mais oito mudas de cada cultivar foram colocadas dentro da

mesma gaiola. Amostras foliares foram coletadas 14 dias após sua introdução na gaiola e testadas quanto à presença de BaCV, CPMMV e BGMV. Uma vez que as plantas 'BRS FC 401 RMD' são imunes ao BGMV (FARIA et al., 2016), elas não foram testadas para infecção por BGMV. Moscas brancas também foram coletadas e testadas quanto à presença de BaCV.

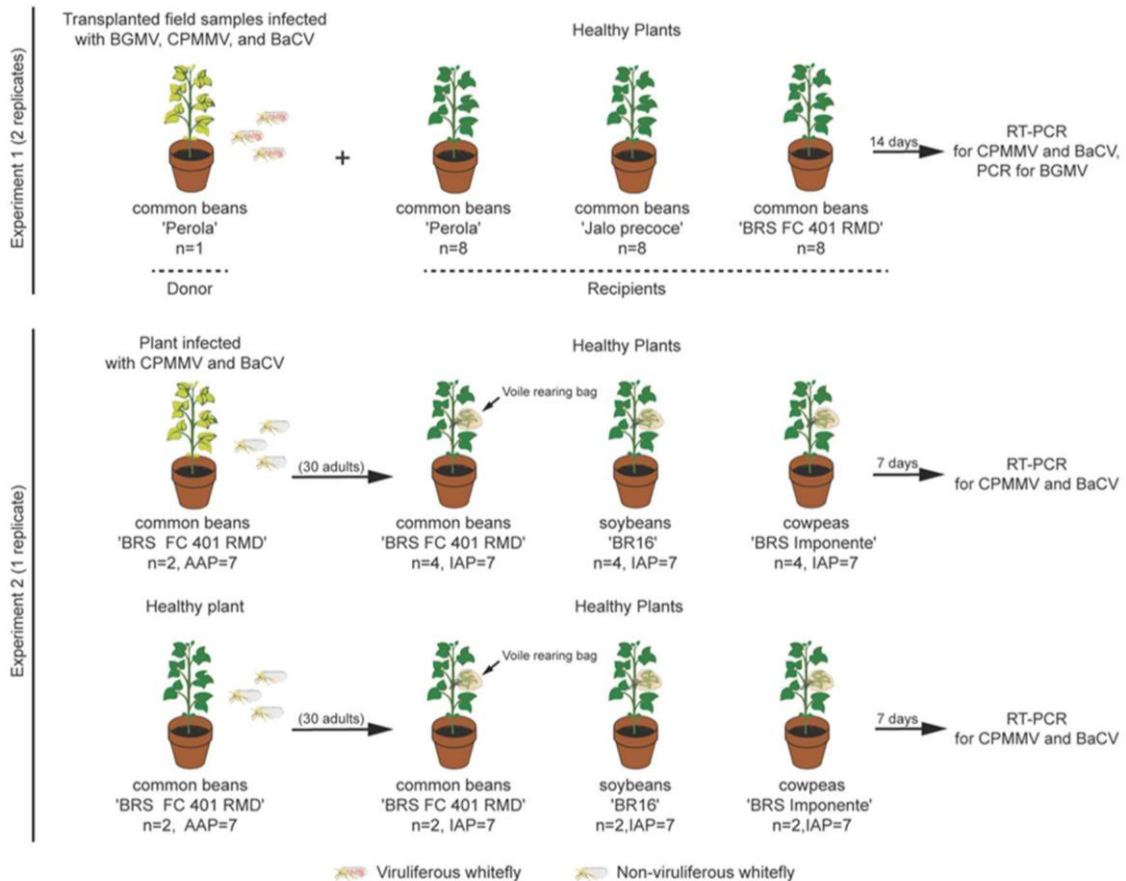


Figura 4. Transmissão do BaCV mediada por mosca branca (*Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor 1-MEAM1). No experimento 1, um feijoeiro do campo colonizado por mosca branca foi utilizado como fonte de inóculo para a transmissão do BaCV (BGMV e CPMMV) aos feijoeiros 'Jalo', 'Pérola' e 'BRS FC 401 RMD'. Após 14 dias, as amostras foram coletadas e a transmissão do BaCV (CPMMV e BGMV) confirmada por RT-PCR e PCR. No experimento 2, moscas brancas foram expostas a feijoeiros infectados com BaCV (e CPMMV) por um período de aquisição de 7 dias. Trinta moscas brancas foram transferidas da planta fonte de inóculo para uma folha de planta saudável envolvida por um saco de *voile*, por um período de inoculação de 7 dias. Após 7 dias, as amostras foram coletadas e testadas por RT-PCR. O mesmo procedimento foi aplicado à plantas saudáveis com moscas avirulíferas como controle.

Em 2016, para refinar ainda mais os testes de transmissão, duas plantas 'BRS FC 401 RMD' de três semanas de idade infectadas com BaCV-Luz (e CPMMV) foram removidas da gaiola, pulverizadas com imidaclopride (32 mg/L) para eliminar qualquer mosca branca presente. As plantas foram transferidas para uma gaiola Bugdorm e mantidas em casa de vegetação à

temperatura ambiente durante 10 dias. Plantas de repolho com ovos e ninfas de mosca branca avirulíferas da EEB foram colocadas na gaiola e mantidas em casa de vegetação por três dias, para a sincronização da idade dos adultos. Moscas brancas adultas com um a três dias de idade foram coletadas dos repolhos e transferidas para os feijoeiros infectados com BaCV-Luz e mantidas por um período de acesso de aquisição (PAA) de 7 dias (**Figura 4**). Como controle, um lote de moscas brancas foi colocado por 7 dias em plantas de feijão sem BaCV.

Em seguida, 25 a 30 moscas brancas potencialmente virulíferas foram transferidas das plantas fonte de inóculo para um saco de *voile* de poliéster previamente colocado em torno de uma folha de cada espécie testada (4 plantas por espécie: feijão 'BRS FC 401 RMD', soja 'BR16' e caupi 'BRS Imponente') por um período de acesso de inoculação (PAI) de 7 dias. Da mesma forma, como controle, moscas avirulíferas foram colocadas em 2 plantas saudáveis de cada espécie por 7 dias. Após esse período, as folhas dentro dos sacos de *voile* de poliéster foram destacadas das plantas para evitar a maturação das ninfas, e as plantas foram pulverizadas com imidaclopride (32 mg/L) para remover quaisquer possíveis moscas brancas remanescentes (ORFANIDOU et al., 2016). As plantas foram observadas quanto ao desenvolvimento de sintomas e a infecção pelo vírus foi confirmada por RT-PCR, conforme descrito acima.

2.7. Detecção do BaCV em feijoeiro e mosca branca

Para identificar a presença de BaCV-Luz em plantas de feijão e moscas brancas, o RNA total foi tratado com TURBO DNase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para eliminar qualquer traço de DNA, conforme descrito por CAO et al. (2018). O cDNA foi preparado com o *primer* Anchored Oligo (dT) 20 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e as reações de PCR foram realizadas com *primers* específicos para todos os genes do BaCV (**Tabela 1**). Os transcritos para genes de feijão comum, Actin-11 (act11) (BORGES, A. et al., 2012) e a subunidade menor da Rubisco (RbcS) (KNIGHT; JENKINS, 1992), bem como genes de mosca branca, proteína ribossomal L9 (RpL9) (UPADHYAY et al., 2011) e subunidade A da ATPase vacuolar (v-ATPase) (UPADHYAY et al., 2011), foram usados como controles de referência interna e para identificação de possíveis transcritos ingeridos pelas moscas durante a alimentação no feijoeiro (**Tabela 1**).

2.8. Microscopia eletrônica de transmissão

Um feijoeiro ‘Pérola’ (planta 7) contendo o isolado BaCV_Luz e utilizado como fonte de inóculo para a transmissão por mosca branca para feijoeiros ‘BRS FC 401 RMD’ (planta C, F e H); um feijoeiro ‘Pérola’ coletado em Brasília (isolado BaCV_BSB, planta 1) e; um feijoeiro transgênico não inoculado foram avaliados por microscopia eletrônica de transmissão – MET. Secções finas de cada folha ou raiz (planta transgênica F) foram fixadas overnight em Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,05M pH 7.2) e pós fixadas em tetróxido de ósmio 1% (em tampão cacodilato 0,05M) por 1-2 horas. Após desidratação, as amostras foram emblocadas em resina epóxi Spurr (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) e seccionadas em ultramicrótomo Leica UC6. Em seguida, as secções foram coradas com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo Reynold’s e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1011.

Com o objetivo de confirmar a presença do BaCV em moscas brancas utilizadas na transmissão viral, dez adultos também foram analisados por MET. Inicialmente, os insetos foram coletados na gaiola de manutenção do isolado e mantidos em tubo falcon de 50 mL. O tubo foi colocado em gelo para diminuir a atividade dos insetos e possibilitar a captura. Cada mosca foi mergulhada em solução de NaCl 0,9%, e sob a visualização em lupa, a dissecação foi realizada removendo, primeiramente, as asas e depois seccionando o abdome do tórax. Uma parte do inseto foi adicionada em tubo contendo solução fixadora (glutaraldeído 2,5%; sacarose 1,8%; tampão cacodilato 0,1M) gelada e a outra em tubo contendo 10 µL de TRIzol Reagent para extração de RNA total (**Figura 5**). Todas as dez moscas tiveram uma parte do corpo testada para BaCV por RT-PCR, enquanto a outra parte foi processada e analisada por MET (as amostras 3 e 10 encontravam-se amassadas e não foram processadas).



Figura 5. Detecção por RT-PCR e microscopia eletrônica de transmissão (MET) do BaCV em adultos de *B. tabaci* MEAM1 mantidos em feijoeiros com o isolado BaCV_Luz. O seccionamento de dez insetos foi realizado entre abdome e tórax em solução de NaCl 0,9%. Parte do inseto foi colocada em solução fixadora para processamento e análise por MET e a outra parte em TRIZOL Reagent para extração de RNA total e RT-PCR.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. BaCV é amplamente distribuído em todas as áreas de produção de feijão no Brasil

O BaCV foi identificado pela primeira vez no Brasil em 2014 em feijoeiros coletados em Santo Antônio de Goiás, estado de Goiás (GO) (ALVES-FREITAS et al., 2016). Em junho de 2016, sintomas virais severos como nanismo, mosaico, deformação e redução de área foliar foram registrados por produtores em Luziânia (GO) (**Figura 2**). Os sintomas foram observados, em uma análise visual, ocorrendo em 20 a 80% das plantas a depender da área avaliada. Os campos de feijão estavam fortemente infestados por moscas brancas migrando de campos próximos de algodão e tomate. As primeiras 15 plantas de feijão recebidas dos agricultores foram testadas por PCR ou RT-PCR para a presença dos vírus transmitidos por mosca branca BGMV, MaYSV e CPMMV, além do BRMV, e o novo cytorhabdovírus BaCV (**Figura 6**). Nenhuma das plantas estava infectada com MaYSV ou BRMV. Por outro lado, todas as 15 plantas tiveram uma infecção mista com BaCV, BGMV e CPMMV.

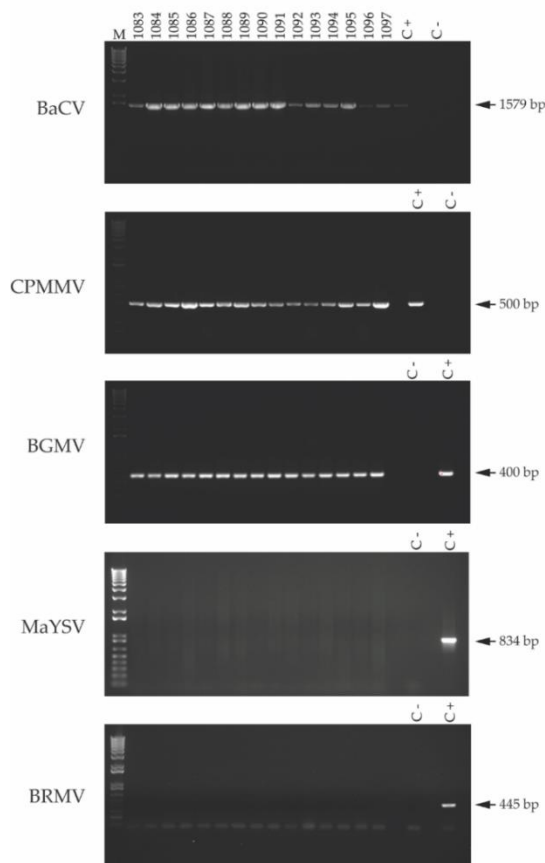


Figura 6. Detecção por RT-PCR e PCR de vírus que infectam feijão: BaCV, CPMMV, BGMV, MaYSV, BRMV. O tamanho esperado do produto é mostrado. M: 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Dada a alta taxa de infecção, investigamos a ocorrência desses vírus em amostras recém-coletadas (2016-2018) e arquivadas (2007-2016) coletadas de plantas com sintomas virais e assintomáticas no Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste do Brasil, compreendendo seis estados e o Distrito Federal (**Figura 3**). No total, foram analisadas 219 plantas e 91 (41,55%) estavam infectadas pelo BaCV (**Tabela 3, Figura 7**). A maioria das plantas analisadas (46,12%) foi amostrada em Goiás, um dos principais estados produtores de feijão do país, onde a incidência [segundo BOCK et al. (2021), incidência é a proporção de espécimes doentes do total de espécimes avaliados, independentemente do método], de BaCV atingiu até 100%, dependendo da área (**Tabela 3**). Apesar da amostragem desigual entre as regiões, conseguimos detectar BaCV nas regiões Sudeste e Nordeste, situadas a mais de 2.000 km de distância, sugerindo que o BaCV está amplamente distribuído nas áreas produtoras de feijão.

Tabela 3. Detecção do bean-associated cytorhabdovirus (BaCV), cowpea mild mottle virus (CPMMV) e bean golden mosaic virus (BGMV) em amostras de feijão coletadas de 2007 a 2018 no Brasil.

Estado/Total de amostras	Cidade	Áreas amostradas	Ano	Incidência viral (infectada/testada)			
				BaCV	CPMMV	BGMV	
Bahia (BA) (n=17)	Cruz das Almas	1	2015	2/8	8/8	4/8	
		1	2015	0/4	3/4	0/4	
		1	2015	0/3	3/3	0/3	
		1	2015	0/2	2/2	0/2	
Total em Bahia				2/17	16/17	4/17	
Alagoas (AL) (n=5)	Arapiraca	1	2018	0/5	4/5	1/5	
Total em Alagoas				0/5	4/5	1/5	
Minas Gerais (MG) (n=9)	Bonfinópolis de Minas	1	2016	0/3	3/3	0/3	
		1	2016	1/1	1/1	1/1	
		1	2018	0/5	1/5	2/5	
Total em Minas Gerais				1/9	5/9	3/9	
São Paulo (SP) (n=1)	Palmital	1	2015	1/1	1/1	1/1	
Total em São Paulo				1/1	1/1	1/1	
Goiás (GO) (n=101)	Luziânia	1	2016	15/15	15/15	15/15	
		2	2016	7/7	7/7	7/7	
		3	2016	3/4	4/4	4/4	
		4	2016	4/4	4/4	4/4	
	Cristalina	1	2016	10/14	14/14	14/14	
		2	2016	0/14	12/14	13/14	
		3	2016	11/11	10/11	11/11	
		4	2016	4/4	4/4	4/4	
	Santo Antônio de Goiás	1	2016	0/4	4/4	4/4	
		2	2016	2/17	17/17	8/8	
		1	2018	0/5	4/5	4/5	
	Urutaí	1	2018	0/1	0/1	0/1	
	Araçu	1	2018	0/1	1/1	1/1	
	Total em Goiás				56/101	96/101	89/92
	Distrito Federal (DF) (n=84)	Brasília	1	2017	8/30	19/30	14/30
1			2007	0/2	0/2	2/2	
1			2012	0/11	1/11	7/11	
1			2015	8/12	6/12	-	
2			2015	15/29	25/29	-	
Total no Distrito Federal				31/84	51/84	23/43	
Mato Grosso (MT) (n=2)	Sorriso	1	2018	0/2	1/2	2/2	
Total no Mato Grosso				0/2	1/2	2/2	
TOTAL				91/219	174/219	123/169	

O BaCV foi encontrado em infecção simples em apenas seis amostras de plantas 'BRS FC401 RMD' resistentes ao BGMV coletadas em Riacho Fundo, DF, em 2015. As 85 plantas positivas para BaCV restantes estavam coinfectadas com CPMMV (n = 22), BGMV (n = 1) ou com CPMMV e BGMV (n = 62) (**Tabela 3, Figura 7**). Infecções mistas parecem ser, portanto,

comuns nessas plantas. Coinfecções virais são muito comuns e, no campo, parecem ser a regra e não a exceção, e podem resultar em efeitos sinérgicos e sintomas mais fortes (MORENO; LOPEZ-MOYA, 2020). Além disso, a mudança no fenótipo da planta induzida pela coinfecção pode alterar ou aumentar a atração de vetores e facilitar a transmissão desses vírus, potencializando epidemias (GAUTAM et al., 2020). As amostras infectadas apenas com BaCV foram identificadas em amostras armazenadas a -80°C, e não temos registros dos sintomas específicos exibidos por essas plantas. Portanto, não foi possível estabelecer os possíveis efeitos das infecções mistas sobre os sintomas observados no campo. É importante ressaltar que o fenótipo das plantas no campo também é influenciado por outros fatores bióticos e abióticos, como estresse hídrico e térmico e infecção por outros patógenos, como bactérias e fungos.

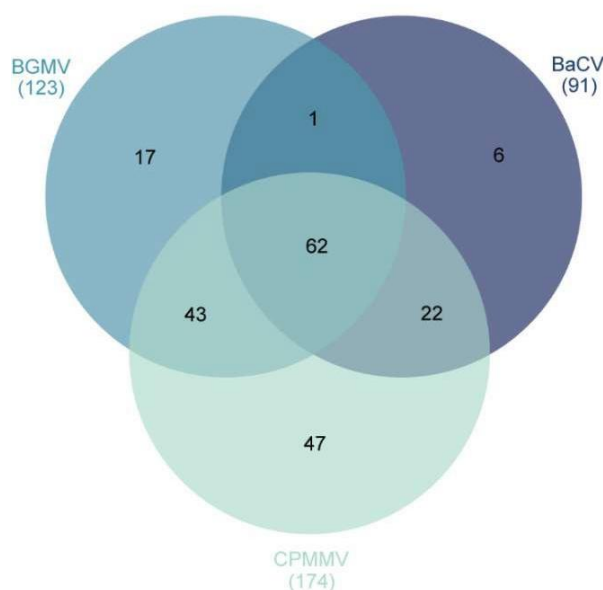


Figura 7. Distribuição de infecções virais em 219 plantas de feijão comum coletadas entre 2007 e 2018. BaCV foi encontrado principalmente em infecções mistas com BGMV e CPMMV. Apenas seis plantas foram encontradas infectadas individualmente com BaCV.

3.2. A análise evolutiva indica a mosca branca como o vetor potencial para o BaCV

O genoma completo do BaCV-Luz foi determinado por RT-PCR de seis fragmentos sobrepostos totalizando 13.467 nt. Como esperado, o genoma apresentou as sete ORFs originalmente descritas no BaCV-GO (N, P, P3, P4, M, G e L), flanqueadas por duas regiões *leader* e *trailer* não transcritas (**Figura 8**). Conforme mostrado na **Tabela 4**, o genoma

completo de BaCV-Luz compartilha 99,8% e 96,3% de identidade com BaCV-GO e PpVE, respectivamente. Para melhor investigar a relação filogenética de cytorhabdovírus, sequências de aminoácidos da RdRP (2374 aa de comprimento, incluindo *gaps*) de 28 cytorhabdovírus disponíveis no GenBank®, incluindo duas sequências derivadas de transcriptomas de *B. tabaci* foram alinhadas (**Tabela 2**).

Tabela 4. Identities de sequências de nucleotídeos e aminoácidos (%) de ORFs do BaCV-LUZ em comparação com outros isolados de PpVE.

	Genoma	N		P		P3		P4		M		G		L	
	nt	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
<i>Bemisia tabaci</i> TSA-2	77.1	82.6	92.3	78	82.9	81.1	88.9	73.3	71.8	81.2	93.5	76.9	86.1	80	93.2
BaCV-GO	99.8	99.8	99.4	99.6	99.3	99.7	99.5	100	100	99.8	99.5	99.4	98.7	100	100
PpVE	96.3	96.6	96.3	96.6	94.2	95.9	96.8	93.7	87.2	96.4	98.1	96.7	96.5	97.3	97.8

A análise filogenética mostra que os cytorhabdovírus se agrupam em grupos monofiléticos de acordo com seu vetor potencial: pulgão (SYLVESTER et al., 1974; FRANCKI et al., 1989; LI et al., 2015; FRANOVA et al., 2019; JONES, S. et al., 2019), fulgomorfo (TORIYAMA, 1972; CONTI; APPIANO, 1973; GOLLIFER et al., 1977; TORIYAMA, 2004; MAURINO, M. F. et al., 2012; MAURINO, F. et al., 2018), cigarrinha (YANG et al., 2016), mosca branca e um vetor não descrito (**Figura 9**). Como sugerido anteriormente (BEJERMAN; DIETZGEN, 2019; MEDINA-SALGUERO et al., 2019; DIETZGEN et al., 2020), os isolados de BaCV e PpVE mostraram-se intimamente relacionados a *B. tabaci* TSA 2 (AKC57270.1), confirmando que esses vírus pertencem à espécie *Papaya cytorhabdovirus*. Além disso, o yerba mate chlorosis-associated virus agrupou-se com *B. tabaci* TSA 1 (AKC57275.1) em um clado próximo ao dos isolados de *Papaya cytorhabdovirus*. Além disso, assumindo que a glicoproteína G do envelope da superfície viral interage diretamente com os receptores nas células do vetor, uma rede de similaridade de sequência (EFI-EST) foi gerada usando as sequências de aminoácidos das glicoproteínas codificadas pelos 28 cytorhabdovírus. As análises mostram três *clusters* distintos (pulgões, fulgomorfos e moscas brancas) e dois *singletons* (cigarrinhas e um vetor não descrito) com um alto grau de interconectividade.

Esses resultados, juntamente com a detecção do BaCV em infecção mista com BGMV e CPMV em todas as plantas (**Figura 6**), e com a presença de moscas brancas adultas, ninfas e ovos nessas plantas (**Figura 2**), nos levaram a postular que as moscas brancas também são vetoras do BaCV.

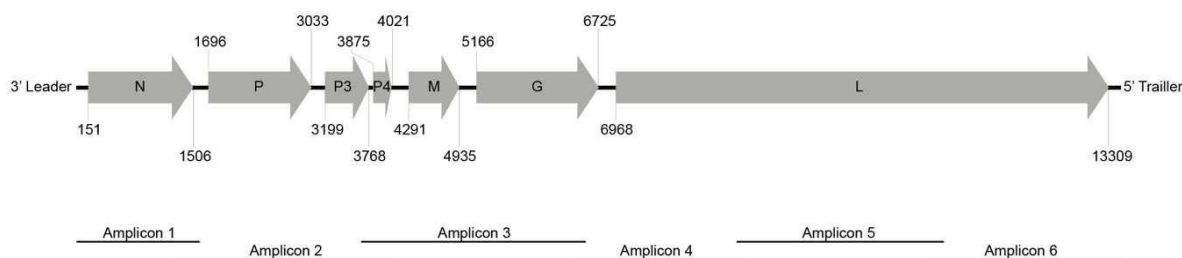


Figura 8. Organização genômica do BaCV-Luz. Genes canônicos que codificam [N] nucleoproteína, [P] fosfoproteína, [M] proteína matriz, [G] glicoproteína e [L] RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e não

canônicos [P3] e [P4]. Cada ORF é representado por uma seta cinza com as primeiras e últimas posições de nucleotídeos representadas. O genoma completo (13.467 nts) foi recuperado por RT-PCR de seis *amplicons* sobrepostos.

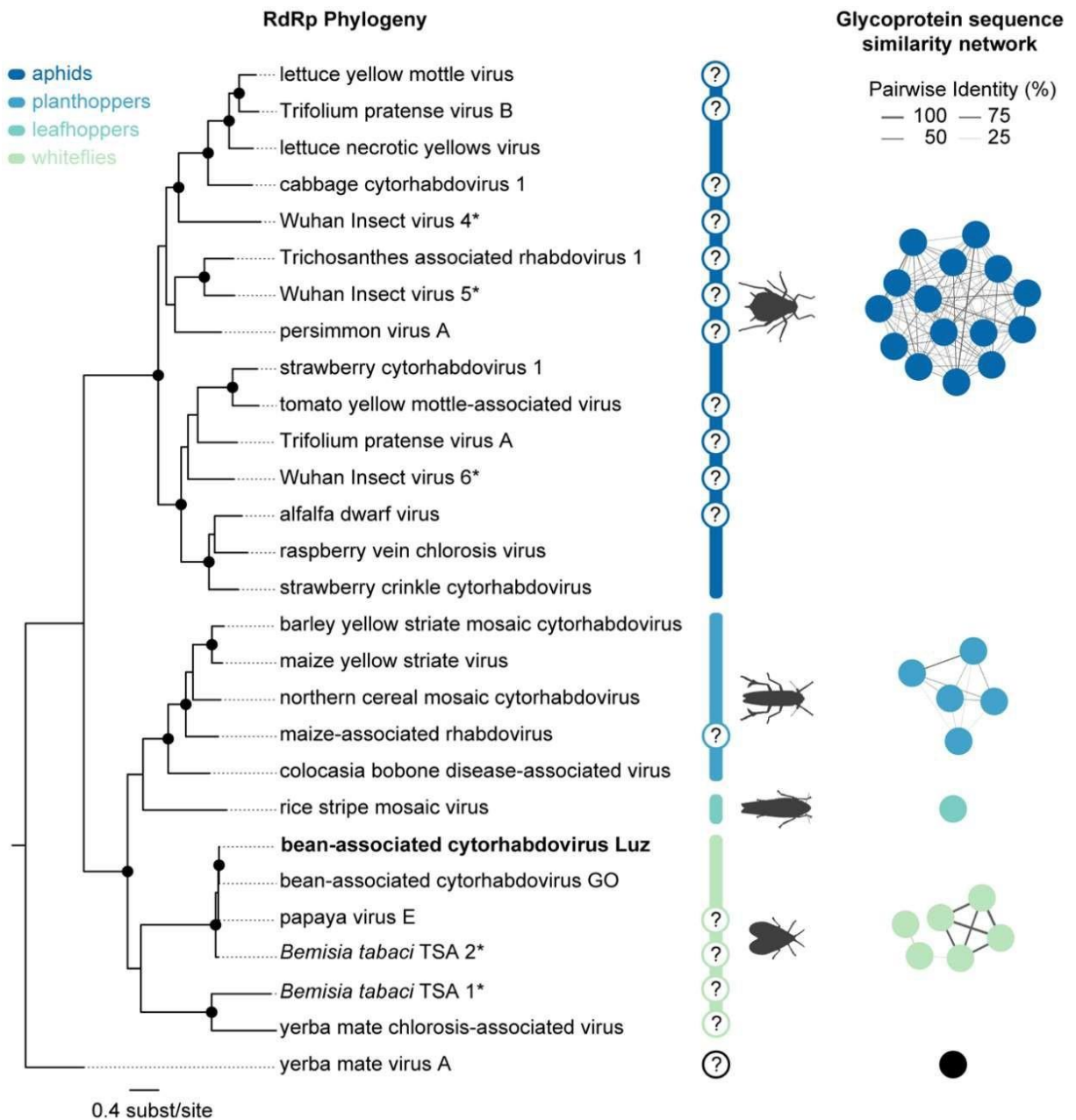


Figura 9. Árvore filogenética de máxima verossimilhança de aminoácidos de RdRP de sequências de cytorhabdovírus e rede de similaridade de sequências de aminoácidos de glicoproteína codificadas por BaCV-Luz, BaCV-GO e outros 26 cytorhabdovírus. Em ambas as análises, , quatro grupos foram formados de acordo com seu provável vetor: pulgão, fulgomorfo, cigarrinha e mosca branca. Enzyme Function Initiative – Enzyme Similarity Tool (EFI – EST) foi usada para a análise de glicoproteínas com um limite de pontuação de alinhamento de 35 e um *e-value* mínimo de 1×10^{-5} . A rede foi visualizada no Cytoscape v3.7.1. Os valores de suporte $\geq 90\%$ SH-aLRT são exibidos com círculos pretos nos nós. (?) Vírus com vetores desconhecidos. (*) Vírus detectados em metatranscriptoma de insetos.

3.3. *B. tabaci* MEAM1 transmite BaCV-Luz para feijão comum, caupi e soja

Os vetores conhecidos de cytorhabdovírus são insetos pertencentes às famílias Aphididae (pulgões), Delphacidae (fulgomorfos) e Cicadellidae (cigarrinhas). Em geral, quando os vetores são conhecidos, existe uma relação altamente específica, e apenas um tipo ou espécies de inseto são capazes de transmitir um determinado vírus. Assim, é possível estabelecer uma forte correlação entre a detecção viral e a presença de seu vetor no campo (AMMAR EL et al., 2009; MANN; DIETZGEN, 2014).

O campo em Luziânia, GO, onde os feijoeiros foram inicialmente coletados, estava densamente infestado por moscas brancas. A genotipagem dessas moscas brancas por PCR-RFLP confirmou sua identidade como *B. tabaci* MEAM1, a espécie prevalente no Brasil Central (DE MORAES et al., 2018). Para avaliar se as moscas brancas também transmitem BaCV, usamos um feijoeiro infectado coletado em campo como fonte de inóculo (positivo também para BGMV e CPMMV) e as moscas colonizando essa planta em um ensaio de transmissão de livre escolha (**Figura 4**). Após um PAA de 14 dias, 100% (n = 48) das plantas de feijão ‘Pérola’, ‘Jalo’ e ‘BRS FC 401 RMD’ apresentaram resultados positivos para BaCV por RT-PCR. Adultos de mosca branca coletados ao mesmo tempo que as folhas de feijão também foram positivos para BaCV e CPMMV (**Figura 10**). Todas as plantas também continham CPMMV e as cultivares suscetíveis foram positivas para BGMV, sugerindo que os três vírus foram transmitidos simultaneamente por moscas brancas.

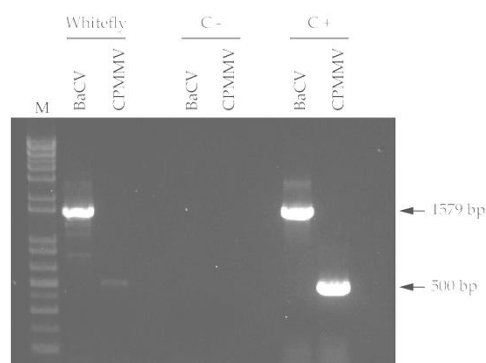


Figura 10. Detecção por RT-PCR de BaCV e CPMMV em mosca branca. O tamanho esperado do produto é mostrado. M: 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Os sintomas de manchas leves detectados em plantas ‘BRS FC 401 RMD’ aproximadamente 50 dias após a introdução na gaiola (**Figura 11**) se assemelham aos descritos para infecção por CPMMV (CARVALHO et al., 2017). Esses resultados indicam que o BaCV pode ser transmitido em altas taxas para três diferentes cultivares de feijão pela mosca branca *B. tabaci* MEAM1. O isolado BaCV-Luz (e também CPMMV) foi mantido por transmissão periódica mediada por mosca branca para plantas de feijão saudáveis durante 18 meses. Ao todo, durante este período, 83 plantas foram expostas a moscas potencialmente virulíferas na gaiola e 72 foram infectadas por BaCV, uma taxa de transmissão geral de ~ 87%.

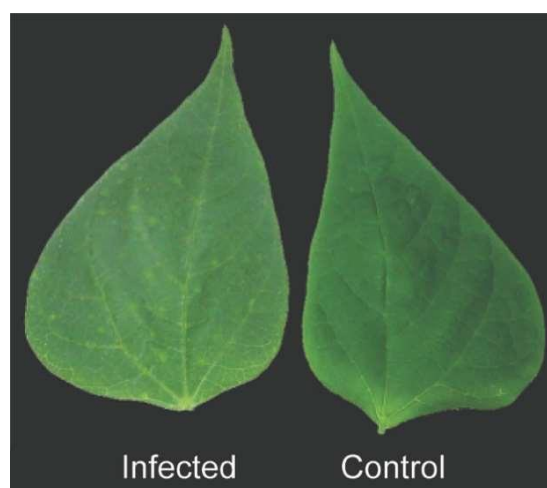


Figura 11. Folhas de feijão comum ‘BRS FC 401 RMD’ provenientes do ensaio de transmissão de BaCV e CPMMV mediada por mosca branca. Leves pontos cloróticos em uma folha de uma planta infectada, 50 dias após a inoculação, e a folha de uma planta controle não infectada.

Um segundo experimento foi conduzido para confirmar a capacidade das moscas brancas de transmitir BaCV ao feijão comum, bem como à soja e ao caupi (**Figura 4**). Com 25 a 30 adultos de mosca branca por planta e PAA e PAI de 7 dias, o BaCV foi transmitido a 75% dos feijões comuns, 50% do caupi e 25% da soja (**Tabela 5**). Todas as plantas usadas como controle expostas a insetos não virulíferos apresentaram resultados negativos para BaCV (e CPMMV). Com esses resultados, também foi possível estender experimentalmente a faixa de hospedeiros do BaCV para o caupi e a soja (**Tabela 5**).

Tabela 5. Transmissão do BaCV por *B. tabaci* MEAM1.

Planta	Cultivar	Positiva/Total	Taxa de transmissão (%)
<i>P. vulgaris</i> (feijão comum)	‘BRSFC 401 RMD’	3/4	75
<i>V. unguiculata</i> (caupi)	‘BRS Imponente’	2/4	50
<i>G. max</i> (soja)	‘BR16’	1/4	25

O segundo experimento apresentou uma taxa de eficiência de transmissão inferior ao teste piloto, no qual a transmissão ocorreu para 100% das plantas. A redução na eficiência de transmissão do BaCV pode estar relacionada ao PAI, que foi inferior ao do primeiro experimento. Além disso, o número de insetos adultos se alimentando em cada planta foi limitado a no máximo 30, enquanto no primeiro teste as moscas brancas ficaram livres para se alimentar e assim, cada planta pode ter recebido um número maior de partículas virais. Além disso, as idades das moscas brancas não foram sincronizadas nos testes iniciais, e o estágio do ciclo de vida do inseto pode influenciar na eficiência da transmissão do BaCV.

A soja é uma cultura economicamente importante no Brasil e também é suscetível ao CPMMV (ZANARDO; CARVALHO, 2017) e BGMV (FERNANDES et al., 2009). O ciclo de cultivo da soja e do feijão comum se sobrepõe em muitas áreas do Brasil. Nessas áreas, a soja pode atuar como uma fonte de inóculo desses três vírus transmitidos pela mosca branca para a cultura do feijão, causando múltiplas epidemias virais. Nossa investigação futura deve se concentrar no estudo da infecção em campo de plantas de soja por BaCV.

B. tabaci é um complexo contendo aproximadamente 40 espécies crípticas com morfologia semelhante, mas diferindo na genética, comportamento, eficiência como vetor de vírus e na colonização por endossimbiontes (DE BARRO et al., 2011; LEE et al., 2013; DE MORAES et al., 2018). Esses insetos possuem um grande número de hospedeiros, mais de 500 espécies de plantas, cultivadas ou não, em regiões tropicais e subtropicais. *B. tabaci* é considerada um super vetor, pois transmite mais de 300 vírus de plantas, incluindo begomovírus, crinivírus, torradovírus, ipomovírus e os carlavírus CPMMV e MYaV (GILBERTSON et al., 2015; FIALLO-OLIVE et al., 2020). Recentemente, dois polerovírus também foram transmitidos por *B. tabaci* (GHOSH et al., 2019; COSTA, T. M. et al., 2020).

Nossos resultados de transmissão demonstram que moscas brancas, neste caso a espécie *B. tabaci* MEAM1, são vetores do cytorhabdovírus BaCV no Brasil, destacando a importância do inseto como vetor de vírus de plantas e enfatizando sua designação como supervetor (GILBERTSON et al., 2015). Apesar de as moscas brancas serem excelentes vetores de vírus

de plantas, a eficiência de transmissão pode variar dependendo do vírus, isolado, planta hospedeira, espécie e biologia da mosca branca e origem geográfica da população do vírus e da mosca branca (FIALLO-OLIVE et al., 2020).

Em nosso estudo, *B. tabaci* MEAM1 foi muito eficiente na transmissão de BaCV, principalmente para o feijoeiro. *B. tabaci* MEAM1 predomina como vetor de vários vírus de plantas no Brasil (DE MORAES et al., 2018). No entanto, outras espécies como *B. tabaci* Mediterranean (MED) e *B. tabaci* New World (NW), também estão presentes em áreas mais restritas em estados do sudeste e sul. Se as moscas brancas MED e NW podem transmitir BaCV para feijão ou outras culturas, ainda necessita ser investigado.

Também é necessário investigar se *B. tabaci* MEAM1 é o vetor de PpVE para plantas de mamoeiro no Equador e se este vírus infecta mamão no Brasil. CORNEJO-FRANCO et al. (2018) mencionam que *B. tabaci* é uma das principais pragas do mamão no Equador e é o vetor do papaya virus Q (semelhante a umbravírus, família *Tombusviridae*). Assim, essa espécie de mosca branca também pode ser o vetor de PpVE para o mamão. Testamos um número limitado de mamoeiros (n = 27) coletadas no Distrito Federal e no Estado do Espírito Santo para a presença de BaCV, utilizando os *primers* BaCV_1F e BaCV_1579R (**Tabela 1**), com resultados negativos. Nove espécies de mosca branca, incluindo *B. tabaci* MEAM1, já foram identificadas em mamoeiros no Brasil, mas *Trialeurodes variabilis* é a principal espécie associada à cultura, e *B. tabaci* MEAM1 tem uma ocorrência limitada em mamões no país (MARTINS, D. S. et al., 2016). Considerando que BaCV e PpVE são frequentemente detectados em infecções mistas, é importante investigar se este grupo de vírus é transmitido sozinho por *B. tabaci* MEAM1 ou se algum vírus auxiliar é necessário.

3.4. Detecção do BaCV-Luz em plantas e moscas brancas

Dependendo do grupo taxonômico ao qual pertencem, os vírus são transmitidos por mosca branca por diferentes modos de transmissão (FIALLO-OLIVE et al., 2020). O CPMMV é transmitido de forma não persistente (ZANARDO; CARVALHO, 2017), enquanto os crinivírus, torradovírus e ipomovírus são vírus semipersistentes, o modo de transmissão dos polerovírus por *B. tabaci* ainda é desconhecido (GILBERTSON et al., 2015; FIALLO-OLIVE et al., 2020). Os begomovírus são transmitidos por diferentes espécies do complexo *B. tabaci* de maneira persistente. No entanto, pelo menos para um begomovírus, o tomate yellow leaf curl virus (TYLCV), há evidências de que ele se replica na mosca branca (CZOSNEK et al., 2001;

SINISTERRA et al., 2005; PAKKIANATHAN et al., 2015; WANG, L. L. et al., 2016) principalmente nas glândulas salivares (HE et al., 2020).

Rhabdovírus de plantas são transmitidos por seus vetores artrópodes de maneira persistente e propagativa. Após a aquisição, os insetos virulíferos transmitem o vírus por toda a vida. Os rhabdovírus replicam e acumulam em uma variedade de tecidos, incluindo epiderme e mesofilo foliar, tecidos do floema e raízes (JACKSON et al., 2005; WHITFIELD et al., 2018). Em seus insetos vetores, os rhabdovírus infectam células intestinais, musculares, tecido nervoso, hemócitos, traqueias e glândulas salivares (AMMAR EL et al., 2009; CAO et al., 2018; WHITFIELD et al., 2018).

O RNA de BaCV correspondente aos genes N, P, P3, P4, M, G foi amplificado a partir de folhas de feijão infectadas com BaCV e moscas brancas potencialmente virulíferas coletadas em plantas infectadas. Fragmentos com tamanhos de acordo com suas ORFs previstas foram amplificados (**Figura 12a, b**), exceto L, provavelmente devido ao seu grande tamanho. Os *amplicons* correspondentes a act11 e RbcS foram amplificados apenas de cDNA de feijão, e v-ATPase e RpL9 de moscas brancas (**Figura 12a, b**).

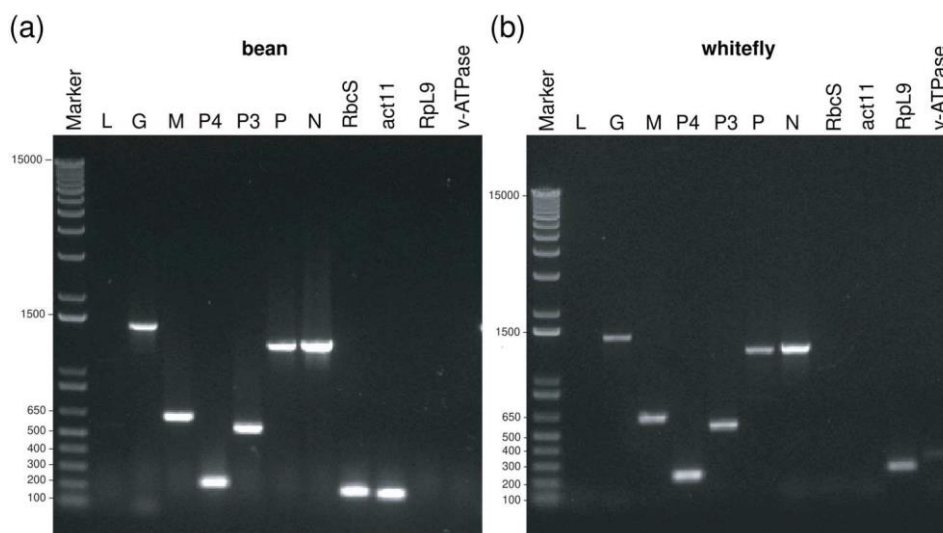


Figura 12. Detecção do BaCV em folha de feijão e mosca branca (*B. tabaci* MEAM1). O RNA de BaCV correspondente aos genes G, M, P4, P3, P, N foi detectado por PCR usando *primers* específicos. Os controles internos incluem a planta RbcS e act11 e a mosca branca RpL9 e v-ATPase. (a) Produtos de RT-PCR obtidos de RNA extraído de feijão comum. (b) Produtos de RT-PCR obtidos de RNA extraído de moscas brancas virulíferas.

Usamos microscopia eletrônica de transmissão (TEM) para visualizar o acúmulo de BaCV nos tecidos do feijão e da mosca branca. O exame por microscopia eletrônica de folhas de feijão infectadas com BaCV revelou partículas baciliformes típicas de rhabdovírus em células parenquimatosas. Partículas longitudinais e seccionadas transversalmente foram localizadas no citoplasma da célula, comumente na periferia de uma massa de material filamentososo enrolado, que se acredita ser o viroplasma, onde o vírus se replica (**Figura 13a-d**) (JACKSON et al., 2018; WHITFIELD et al., 2018). As partículas baciliformes de BaCV pareciam bastante escassas nos tecidos de feijão observados. Víriões do cytorhabdovírus foram encontrados em apenas uma das quatro amostras de folhas examinadas e de uma raiz avaliada, embora todas as amostras de plantas tenham testado positivo para BaCV por RT-PCR.

Em contraste, agregados semelhantes a partículas de CPMMV foram prontamente reconhecidos em todas as amostras de tecido de feijão examinadas. Estas observações *in situ* da presença de víriões BaCV e CPMMV em folhas de feijão duplamente infectadas corroboram o estudo de sequenciamento HTS anterior em que 8,2% do total de *reads* de múltiplas folhas de feijão infectadas com vírus corresponderam a CPMMV enquanto apenas 0,01% dos *reads* mapearam no genoma de BaCV (ALVES-FREITAS et al., 2019). Em alguns casos, BaCV e CPMMV podem ser identificados infectando a mesma célula (**Figura 13d**). Secções de três pares de cabeça/tórax ou partes abdominais de moscas brancas que se alimentaram de feijões infectados com BaCV não apresentaram evidências de partículas ou viroplasma de BaCV nos tecidos observados. Os insetos foram testados antes da fixação, e apenas a cabeça/tórax correspondente aos insetos cujo abdome testou positivo para BaCV em RT-PCR ou vice-versa foi examinado. Portanto, embora o RNA do BaCV pudesse ser detectado nos insetos por RT-PCR, as partículas não foram localizadas em nenhum dos tecidos examinados.

A distribuição espacial e temporal do BaCV dentro do corpo da mosca branca pode ter dificultado a localização das partículas por TEM. Além disso, os rhabdovírus parecem se replicar e acumular em níveis mais baixos nas células de insetos quando comparados às células vegetais (AMMAR EL; HOGENHOUT, 2008; AMMAR EL et al., 2009; ALVES-FREITAS et al., 2019). O BaCV parece acumular-se em níveis baixos, mesmo no feijão. Portanto, a avaliação de órgãos dissecados, como intestino médio ou glândulas salivares, pode facilitar a visualização de BaCV em moscas brancas por TEM ou por microscopia confocal usando imunofluorescência ou hibridização *in situ*.

Recentemente, CORNEJO-FRANCO et al. (2021) detectaram o PpVE em fabáceas espontâneas em área de cultivo de mamoeiro e realizaram a transmissão do isolado por mosca branca em mamoeiro e *M. lathyroides*. Com o emprego de qRT-PCR, o PAA mínimo identificado foi de 18h e o PAI de 12h. Após 24h de PAA não foi detectado acúmulo viral e, ao longo de oito dias, a carga viral decresceu. A transmissão vertical em ninfas não foi observada e o trabalho sugere que o modo de transmissão do vírus seja do tipo semi persistente.

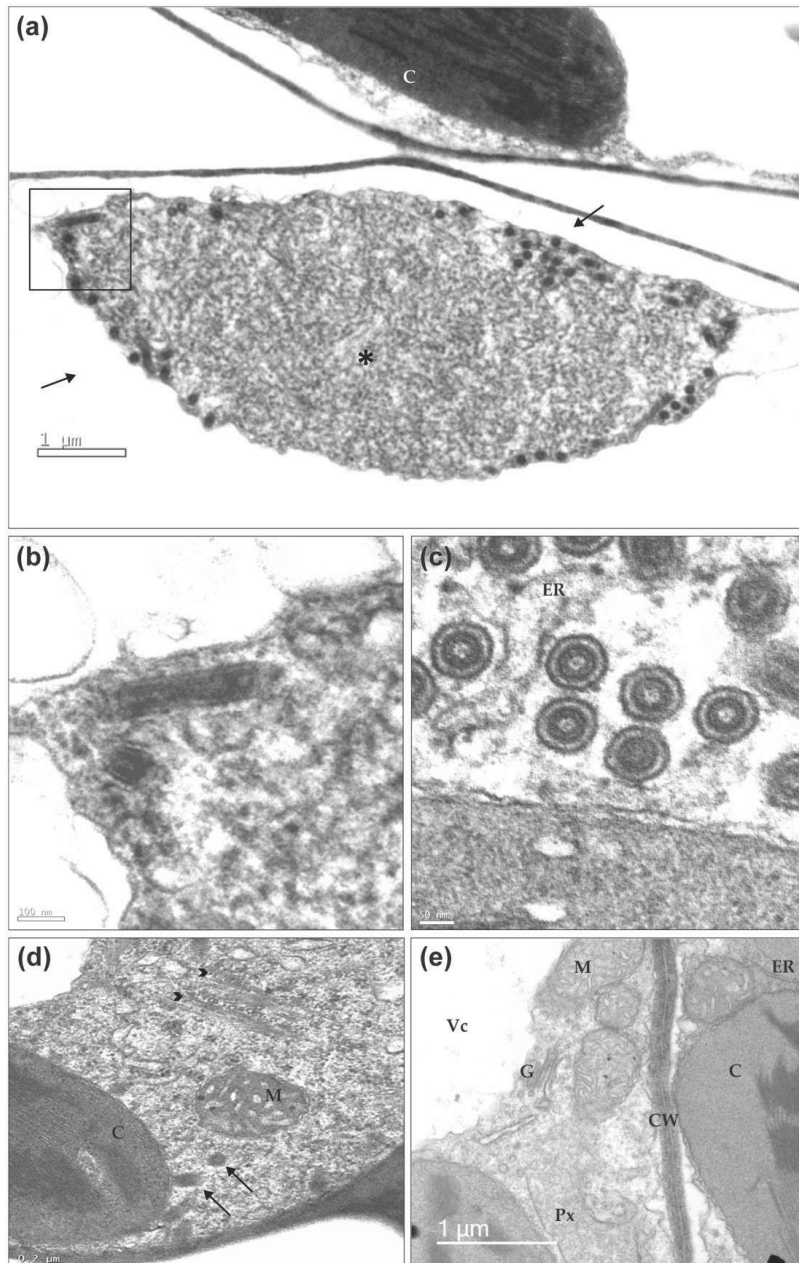


Figura 13. Micrografias eletrônicas de transmissão de folhas de feijão infectadas por BaCV. (a) Visão geral de um viroplasma formado por material filamentosos (*) no citoplasma de uma célula parenquimatosa. Partículas típicas de rhabdovírus estão presentes na periferia do viroplasma (setas). (b) Detalhes do quadrado marcado com

partículas seccionadas longitudinalmente são representados. (c) Cortes transversais de partículas de BaCV mostram o núcleo interno e cilíndrico da nucleoproteína e a membrana viral externa, e também que os vírions estão dentro de uma cavidade do retículo endoplasmático. (d) Célula parenquimatosa esponjosa duplamente infectada por BaCV e CPMMV. Agregados de partículas de CPMMV (pontas de seta) e BaCV em secções longitudinais e transversais (setas) são visíveis. (e) Células do parênquima paliçádico de um feijoeiro saudável. Cloroplasto (C), retículo endoplasmático (ER), complexo de Golgi (G), mitocôndria (M), peroxissomo (Px), vacúolo (Vc) e parede celular (CW).

4. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que o BaCV é transmitido de forma eficiente, em condições experimentais, por *B. tabaci* MEAM1 para três cultivares de feijão cultivadas no Brasil, e com menor eficiência para feijão caupi e soja. Resta ser determinado se o BaCV se replica em moscas brancas, conforme observado para outros rhabdovírus que infectam plantas em seus vetores artrópodes. O BaCV não pôde ser isolado para testes de patogenicidade, identificação dos sintomas induzidos e ensaio de transmissão. Além disso, o BaCV foi detectado em cinco dos sete estados brasileiros avaliados. Além do BaCV no Brasil (ALVES-FREITAS et al., 2019) e PpVE no Equador (MEDINA-SALGUERO et al., 2019), sequências de vírus semelhantes foram registradas em amostras de moscas brancas na Índia (UPADHYAY et al., 2015), feijão da Tanzânia (MWAIPOPO et al., 2018), citros, maracujá e arbusto de papel na China (ZHANG, S. et al., 2020) e feijão comum no México (CHIQUITO-ALMANZA et al., 2021) o que implica que outros isolados de BaCV/PpVE ou rhabdovírus relacionados que também são transmitidos por moscas brancas podem existir em outros continentes.

1. INTRODUÇÃO

A produção de feijões no Brasil inclui além de *P. vulgaris*, a espécie *Vigna unguiculata* L. comumente conhecida por feijão caupi, feijão de corda ou feijão macassar, que é amplamente consumido na região Nordeste do país. Características agronômicas como maior rusticidade e resistência à seca favoreceram a cultura, que tem o estado do Ceará como principal produtor (~144 mil toneladas) no Nordeste (CONAB, 2020).

Ao longo dos últimos vinte anos a cultura da soja ganhou grande destaque mundial devido ao uso do farelo e óleo na crescente cadeia de proteína animal (HIRAKURI et al., 2018). A soja é o grão mais produzido no Brasil com aproximadamente 120 milhões de toneladas garantindo ao país o primeiro lugar no ranking mundial seguido por EUA e Argentina (FAO, 2019). Inicialmente cultivada na região sul do país, a área destinada à cultura passou a se expandir significativamente pelo Centro-Oeste e, mais recentemente, no Norte (Pará e Tocantins) e Nordeste (Maranhão, Piauí e Bahia) (HIRAKURI et al., 2018). O Mato Grosso é hoje o maior produtor (~35 milhões de toneladas), seguido por Paraná (~21 milhões de toneladas), Goiás (~13 milhões de toneladas) e Rio Grande do Sul (~11 milhões de toneladas) (CONAB, 2020).

Doenças virais são alguns dos entraves na cultura que tem mais de 40 espécies listadas no Virus-Host Database (<https://www.genome.jp/virushostdb/>) (MIHARA et al., 2016) como soybean mosaic virus (gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*), cucumber mosaic virus (gênero *Cucumovirus*, família *Bromoviridae*), alfalfa mosaic virus (gênero *Alfamovirus*, família *Bromoviridae*) e o CPMMV (WEI, Z. et al., 2021).

Sabendo-se da importância do CPMMV na cultura da soja e do caupi, conhecendo sua transmissão por mosca branca e a alta incidência do vírus em feijoeiro em infecção mista com o BGMV e BaCV, ensaios de transmissão do cytorhabdovírus foram realizados também para essas culturas. O BaCV foi transmitido por *B. tabaci* MEAM1 para soja ‘BR 16’ e para o caupi ‘BRS Imponente’ com taxas de 25% e 50%, respectivamente (**Capítulo 1**) (PINHEIRO-LIMA et al., 2020). Assim surgiu a necessidade de estudar a ocorrência natural do BaCV nessas culturas e avaliar a presença de infecção mista.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem em soja e caupi

Amostras foliares de soja e caupi provenientes do banco de coletas do grupo armazenadas a -80°C foram testadas para o BaCV, por meio de RT-PCR com *primers* específicos e as amostras positivas também foram avaliadas quanto à infecção por CPMMV e BGMV. Ao todo, 122 amostras de soja coletadas entre 2014 e 2020 em Bonfinópolis de Minas (n=5) e Buritis (n=32), em Minas Gerais – MG; Luziânia (n=6), Cristalina (n=4) e Santo Antônio de Goiás (n=9), em Goiás – GO; Londrina (n=30) no Paraná – PR; Santa Vitória do Palmar (n=8), no Rio Grande do Sul – RS; e Brasília (n=29), no Distrito Federal – DF foram testadas. Caupis coletados em 2015 em Dom Basílio (n=8) e Cruz das Almas (n=6), na Bahia – BA e, em 2017, em Brasília (n=4), DF, totalizando 18 amostras também foram testados.

2.2. Extração de RNA e DNA

O RNA total foi extraído a partir de ~100 mg de tecido da folha da planta (pulverizado em nitrogênio líquido) usando o TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e o DNA total foi extraído usando o Protocolo CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987).

2.3. RT-PCR, PCR e sequenciamento

O cDNA foi sintetizado a partir de 5 μL de RNA (~1 μg), com *primers* randômicos e oligo dT 50 mM (0,5 μL de cada um) e 200 U de Transcriptase Reversa M-MLV (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). As PCRs realizadas usando 1 μL de cDNA, 1 μL de cada 10 mM *primers* específicos, 0,8 μL de 10 mM dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,2 μL de (5 U/ μL) Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 2,5 μL de tampão 10x, 1 μL de MgCl_2 (50 mM) e 17,5 μL de água. As reações foram conduzidas com desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento (a 65°C ou 61°C conforme *primers* utilizados (**Capítulo 1, Tabela 1**) por 30 segundos e extensão a 72°C (por 40 segundos ou 1 minuto e 40 segundos). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%, e enviados para sequenciamento na Macrogren Inc. (Seul, Coréia do Sul).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ocorrência natural do BaCV em soja

Após a confirmação de que o BaCV é transmitido por mosca branca para a soja ‘BR16’ (**Capítulo 1**), em 2017, amostras foliares de 12 plantas foram coletadas em uma área (Estação Experimental de Biologia – UnB) em que o vírus foi previamente detectado em *P. vulgaris*. Dentre essas plantas avaliadas por RT-PCR algumas apresentavam pontos cloróticos e/ou mosqueado e quatro foram positivas para o BaCV. Posteriormente, amostras da coleção de plantas armazenadas a -80°C foram incluídas ao levantamento viral composto por 122 plantas de soja de quatro estados e o Distrito Federal (**Tabela 6**).

Novamente, o BaCV foi detectado em plantas de soja provenientes de áreas em que o vírus fora detectado previamente em feijoeiros, sendo em três plantas de soja coletadas em Brasília – DF em 2015 (n=9), e quatro sojas tiguera coletadas em um campo de feijão comum em Luziânia – GO, em 2016 (n=6), totalizando 11 plantas (**Tabela 6**). A incidência do BaCV em soja foi 9%, já em feijão comum esse índice foi bem maior, 41% (**Capítulo 1**).

Tabela 6. Detecção do BaCV, CPMMV e BGMV em amostras de soja, por RT-PCR e PCR.

Estado/Total de amostras	Cidade	Áreas amostradas	Ano	Incidência viral (infectada/testada)		
				BaCV	CPMMV	BGMV
Minas Gerais (MG) (n=37)	Bonfinópolis de Minas	1	2016	0/5		
	Buritis	1	2014	0/20		
		2	2020	0/12		
Total em Minas Gerais				0/37		
Goiás (GO) (n=19)	Luziânia	1	2016	4/6	4/4	4/4
	Cristalina	1	2016	0/4		
	Santo Antônio de Goiás	1	2018	0/9		
Total em Goiás				4/19		
Distrito Federal (DF) (n=29)	Brasília	1	2015	3/9	3/3	2/3
		1	2017	4/12	3/4	3/4
		1	2019	0/7		
Total no Distrito Federal				7/28		
Paraná (PR) (n=30)	Londrina	1	2019	0/30		
Total no Paraná				0/30		
Rio Grande do Sul (RS) (n=8)	Santa Vitória do Palmar	2	2020	0/8		
Total no Rio Grande do Sul				0/8		
TOTAL				11/122	10/11	9/11

Adicionalmente, as 11 plantas positivas para o BaCV foram testadas quanto à presença de CPMMV e BGMV e, assim como ocorre com o feijão comum, o cytorhabdovírus é encontrado

em infecção mista na soja. Os três vírus foram detectados concomitantemente em nove plantas, BaCV e CPMMV em uma, e o BaCV em infecção simples em apenas uma planta de soja (**Figura 14**). Devido à ausência de registros fotográficos não foi possível estabelecer a ocorrência de sintomas visuais na planta infectada somente pelo BaCV. Ao analisar os efeitos de um isolado brasileiro de CPMMV em soja, (BARRETO DA SILVA et al., 2020) identificaram variações entre as cultivares avaliadas tanto na ocorrência de sintomas visuais, como na altura da planta, número de vagens, peso de grãos e produtividade. Os sintomas predominantemente observados em campo foram mosqueado e clorose, porém as maiores perdas na produtividade foram identificadas em cultivar assintomática ressaltando a importância de estudos sobre viroses e seus efeitos na soja.

A identidade dos três vírus foi confirmada pelo sequenciamento Sanger dos produtos de PCR. As sequências OM333242, OM420284 e OM333241 apresentaram 100% de identidade de nucleotídeos com o isolado BaCV-BR-GO (MK202584), 99.7% com BGMV Ponte Nova-MG (MG334552) e 99.30% com CPMMV Florida_Whiteflies_2007 (KC774019), respectivamente.

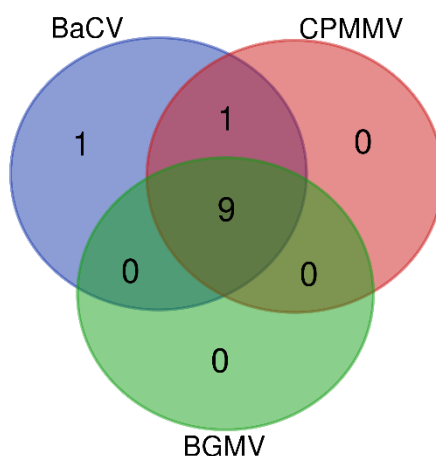


Figura 14. Ocorrência do BaCV em infecção mista com CPMMV e BGMV em sojas coletadas em Goiás e Distrito Federal entre 2015 e 2019. Nove plantas estavam infectadas pelos três vírus, uma por BaCV e CPMMV e uma apenas pelo BaCV.

Além da diferença no número amostral (122 sojas e 219 feijoeiros), alguns locais de coleta foram diferentes para as culturas, com a Região Sul sendo contemplada no levantamento em soja e a Região Nordeste no levantamento em feijoeiros. Distrito Federal, Goiás e Minas Gerais são os locais amostrados em comum para soja e feijão e a incidência do BaCV encontrada previamente em feijoeiros nessas áreas foi de 36%, 55% e 11%, respectivamente (**Capítulo 1**).

Em um estudo da diversidade de mosca branca realizado após a introdução da espécie *B. tabaci* MED no Brasil, DE MORAES et al. (2018) amostraram adultos em diversas plantas em 11 estados. A espécie *B. tabaci* MEAM1 mostrou ser a espécie mais abundante e também a única detectada em GO, MT, PA, BA, RN, CE. Já a *B. tabaci* MED foi encontrada em MG, SP, PR, SC e RS em plantas ornamentais, solanáceas, cucurbitáceas e brassicáceas. Coletas também foram realizadas em plantas de soja e/ou feijão resultando na identificação apenas de MEAM1 em GO, MT, BA, SP e PR, enquanto no RS a *B. tabaci* NW foi encontrada em maior número. Embora em MG tanto MEAM1 como MED tenham sido encontradas, nenhuma das amostragens foi feita em feijão ou soja. Em uma amostragem no DF e GO realizada entre 2018 e 2020, a espécie MEAM1 foi detectada em mais de 60% das amostras avaliadas e foi a única espécie identificada em lavouras de soja (DA SILVA RODRIGUES et al., 2021).

B. tabaci MEAM1 mostrou ser um eficiente vetor para o BaCV experimentalmente (**Capítulo 1**) e o fato de ser a espécie prevalente na região central pode estar relacionada à maior incidência do vírus na área. A presença de outras espécies de mosca na lavoura, como a NW no RS, bem como a menor eficiência apresentada na transmissão do BaCV pela MEAM1 em soja (25%) em comparação ao feijão (75%), **Capítulo 1**, pode afetar a distribuição do vírus.

Nenhuma das 18 plantas de caupi testadas foi positiva para o BaCV, embora tenham sido amostradas em áreas com feijoeiros positivos para o vírus. No ensaio de transmissão do BaCV por mosca branca (**Capítulo 1**) em que apenas uma cultivar de caupi foi avaliada, uma menor eficiência de transmissão (50%) em comparação ao feijoeiro foi observada. É possível que cultivares distintas de caupi respondam ao BaCV diferentemente, assim como alguns genótipos possuem mecanismos de resistência à *B. tabaci* MEAM1 como atratividade e preferência para oviposição (CRUZ et al., 2012).

4. CONCLUSÃO

Nesse trabalho, para otimizar tempo e recursos, optamos por avaliar sojas e/ou caupis coletadas no DF e GO e aquelas armazenadas em nosso banco de amostras para verificar a hipótese de que o BaCV ocorre naturalmente nessas culturas. Após a testagem, confirmamos a presença do BaCV em *G.max* ocorrendo também em infecções mistas com BGMV e CPMMV. Assim, BaCV e soybean blotchy mosaic virus (LAMPRECHT et al., 2010) são os únicos vírus na família *Rhabdoviridae* identificados em soja. Considerando-se a ampla distribuição da mosca branca, a presença do BaCV, seja isolada ou em infecção mista em lavouras de soja, deve ser monitorada a fim de identificar possíveis impactos na cultura.

CAPÍTULO 3 – Estudo da diversidade genética do bean-associated cytorhabdovirus (BaCV)

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a taxonomia da família *Rhabdoviridae* tem passado por algumas alterações como a revisão de critérios de classificação de espécies e a criação de novos gêneros para melhor acomodar a grande quantidade de vírus descobertos por meio do High-throughput sequencing – HTS. A técnica não só tem permitido conhecermos um pouco mais da diversidade desses vírus, como também tem melhorado a caracterização de espécies descritas no passado e que não possuíam a sequência completa de seus genomas (BEJERMAN et al., 2020).

Especificamente para a espécie *Papaya cytorhabdovirus* da qual fazem parte o PpVE e o BaCV, o HTS se mostrou de enorme valia. Em 2020, outros sete isolados denominados citrus-associated rhabdovirus (CiaRV) foram identificados na China infectando citros, maracujazeiros e arbusto de papel (ZHANG, S. et al., 2020). Recentemente, um isolado denominado BaCV CN3 foi detectado, também por HTS, em amostras de *P. vulgaris* em um levantamento viral em feijoeiros (*Phaseolus* spp.) selvagens e domesticados no México (CHIQUITO-ALMANZA et al., 2021). Dentre os isolados de CiaRV, dois genótipos foram definidos a partir da análise genômica. Os isolados encontrados em citros não apresentam glicoproteína funcional nem o gene P4, o que sugere uma adaptação do vírus ao patossistema estabelecido com a transmissão sendo realizada por meio da propagação de plantas infectadas por enxertia (ZHANG, S. et al., 2020).

Investigar a diversidade genética do BaCV no Brasil e dos demais isolados da espécie já relatados torna-se necessário para entendermos sobre a origem do vírus e sua dispersão, a relação vírus-hospedeira, bem como a transmissão. Estudos de variabilidade genética de cytorhabdovírus ainda são poucos e feitos em sua maioria com análises do gene N (CALLAGHAN; DIETZGEN, 2005; RAMALHO et al., 2016; SAMARFARD et al., 2018), gene L (KLERKS et al., 2004) ou com parte do genoma (PAPPI et al., 2016).

Em 2018, a diversidade genética de um cytorhabdovirus, o RSMV, foi analisada em 12 isolados detectados em plantas de arroz em três províncias no sul da China. O genoma completo de cada um dos isolados foi obtido a partir de 10 reações de *one-step* RT-PCR (realizadas com *primers* específicos desenhados a partir de um único isolado depositado no GenBank) e sequenciamento de 3 replicatas. Uma baixa variabilidade genética foi encontrada entre os

isolados <1% com a formação de dois grupos filogenéticos com ramos diferenciados pela localização geográfica (YANG et al., 2018).

Tendo em vista que o tamanho de um rhabdovírus torna o sequenciamento por Sanger caro e bastante laborioso, faz-se necessário desenvolver um protocolo eficiente para a obtenção de genomas completos de diferentes isolados brasileiros do BaCV sendo o sequenciamento, a partir de amostras individuais, com o equipamento MinION uma alternativa.

O MinION foi lançado em 2014 pela Oxford Nanopore Technologies com a proposta de um equipamento portátil e acessível para sequenciamento de ácidos nucleicos em tempo real por meio da tecnologia de nanoporos (LU et al., 2016). Na virologia vegetal, o emprego da tecnologia ainda é limitado sendo relatado em metagenômica em inhame (*Dioscorea alata* L.) (FILLOUX et al., 2018); em metatranscriptoma em pulgões (*Myzus persicae* Sulz.) e pessegueiros (*Prunus persica* L. Batsch) infectados por plum pox virus (BRONZATO BADIAL et al., 2018); caracterização de isolados de potato virus Y e detecção de seus genótipos em batatas (*Solanum tuberosum* L.) na Irlanda (DELLA BARTOLA et al., 2020); detecção de um isolado de tomato brown rugose fruit virus em tomateiro nos EUA (CHANDA et al., 2020) e detecção de dois isolados do capulavirus trifolium virus 1 em luzerna (*Medicago arborea* L.) na França (BEN CHEHIDA et al., 2021). No Brasil, foi utilizada na identificação dos novos begomovírus cowpea bright yellow mosaic virus em caupi (NAITO et al., 2019) e o tomato mottle leaf distortion virus em tomate (MARTINS, T. P. et al., 2021).

Assim, com o objetivo de conhecer a variabilidade genética e melhor entender a epidemiologia do BaCV, duas estratégias para obtenção de genomas virais foram empregadas: (i) isolados encontrados em diferentes hospedeiras e áreas de cultivo no país e sequenciados por nosso grupo de pesquisa e (ii) transcriptomas de diferentes hospedeiros disponíveis em bancos de dados públicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos isolados e enriquecimento por RT-PCR

Genomas de isolados de BaCV foram amplificados a partir de amostras selecionadas de feijoeiros coletados de diferentes localidades em que o BaCV foi detectado previamente (**Capítulo 1**), bem como amostras de soja (**Capítulo 2**) e *Passiflora* sp. Duas estratégias distintas foram avaliadas na obtenção do genoma destes isolados. Inicialmente, os cDNAs foram sintetizados como descrito anteriormente utilizando a enzima SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A PCR foi realizada com a enzima KAPA HiFi HotStart *ReadyMix* PCR Kit (KAPA Biosystems, Cape Town, África do Sul) e os 6 pares de *primers* previamente desenhados com sobreposição de pelo menos 100 nucleotídeos entre *amplicons* (**Capítulo 1, Tabela 1**).

Posteriormente, uma segunda metodologia baseada em (QUICK et al., 2017) e FREED et al. (2020) foi adotada. Novos *primers* para *multiplex* PCR foram desenhados (**Tabela 7**), a partir do alinhamento de sequências de diferentes isolados de BaCV (BaCV-GO e BaCV-LUZ em feijão e BaCV-BAG3 em *Passiflora* sp.) incluindo CiaRV e o PpVE, utilizando o Primal Scheme (<https://primalscheme.com>). Os cDNAs foram sintetizados utilizando 2 µL de LunaScript® RT SuperMix Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) e 8 µL de RNA e foram incubados a 25°C por 2 minutos, 55°C por 10 minutos e 95°C por 1 minuto. Duas PCRs foram realizadas para todas as amostras, uma contendo um *pool* dos *primers* de numeração ímpar (6 *primers*) - P1, e outra com *pool* de *primers* pares (5 *primers*) - P2. As PCRs foram realizadas com 12,5 µL de Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA), 0,5 µL de P1 ou P2 (10 mM), 9 µL de água e 2,5 µL de cDNA. As reações foram conduzidas com desnaturação inicial a 98°C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 98°C por 15 segundos e anelamento a 65°C por 5 minutos. Após a visualização dos produtos de PCR (2 µL) em gel de agarose 1%, os produtos das reações P1 e P2 foram misturados resultando em um único tubo por amostra. Todas as amostras amplificadas foram purificadas com o kit AMPure beads (Beckman Coulter, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA purificado foi quantificado com o kit Qubit dsDNA HS (Life Technologies) no fluorímetro Qubit (Invitrogen).

Tabela 7. *Primers* desenhados com base em alinhamento de sequências de isolados de BaCV utilizando o *software* Primal Scheme.

Alvo	Nome do <i>primer</i>	Sequência 5'- 3'	Fragmento (pb)	T _m (°C)
3' <i>leader</i> , N	bacv_1.5kb_1_F	CTACACCCAGTTGTAGCGCAAA	1500	65
	bacv_1.5kb_1_R	AGTCTCGCTCCCAGTTTTTCTT		
N, P	bacv_1.5kb_2_F	TGATGAAGAACGCTCCGAAGAC		
	bacv_1.5kb_2_R	AGGAATCCCCTCTAGCAAATAGC		
P, P3, P4	bacv_1.5kb_3_F	GCGTCTGGATGAGGTAAATCAGG		
	bacv_1.5kb_3_R	AAGCCACTGGTCATAGAGAGGG		
P4, M, G	bacv_1.5kb_4_F	GTATTCTAGGTGGCCAGTGTGG		
	bacv_1.5kb_4_R	GAGTTATGTTGAAGGGCTCCCC		
M, G	bacv_1.5kb_5_F	GCGGTAGAAACTGTCATCGGAG		
	bacv_1.5kb_5_R	CTAGAGCCCTCCCATTCACAAT		
G, L	bacv_1.5kb_6_F	TCCGAATATGTTTTGGGACTTCTCT		
	bacv_1.5kb_6_R	CAGCCATCCTAACCATGTCCAG		
L	bacv_1.5kb_7_F	ATTCGGGGTCAAAGTGTGGATG		
	bacv_1.5kb_7_R	AAGTCCTTCCAAACCAGCAAGG		
	bacv_1.5kb_8_F	ACCCAGCTGTATAACCGGACTT		
	bacv_1.5kb_8_R	CGATAATGTGCTTCTTCCACCCT		
	bacv_1.5kb_9_F	CCCTCAGCCGAATGACTTCATT		
	bacv_1.5kb_9_R	CACAGCTGGTTCTTCGTCACAA		
	bacv_1.5kb_10_F	TGAGCTTATTGCCGCTAGAAG		
	bacv_1.5kb_10_R	TCGTTTAACATCCTGGTGAAGTTTG		
L, 5' <i>trailer</i>	bacv_1.5kb_11_F	CCCCAGTATCAAGATGAGCCAA		
	bacv_1.5kb_11_R	AGCATTATTCCTTGTCCAGTTTT		

2.2. Preparo da biblioteca, sequenciamento e montagem dos genomas

Os *pools* de PCRs para cada amostra foram sequenciados utilizando o MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido). A biblioteca foi construída utilizando um *barcode* por amostra (*pool* de PCRs) com o Rapid Barcoding Kit (SQK-RBK004) (Oxford Nanopore Technologies). Aproximadamente 50 ng de DNA em 7,5 μ L foi incubado com 2,5 μ L de Fragmentation Mix a 30 °C por 1 min e, em seguida, a 80 °C durante 1 min. Ao final desta etapa todas as amostras foram misturadas e purificadas com o kit AMPure beads (Beckman Coulter, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, a biblioteca foi quantificada e aproximadamente 20 ng do DNA resultante foi aplicado na *flow cell* (FLO-MIN106D - Oxford Nanopore Technologies) e o sequenciamento realizado no sequenciador MinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies) por cerca de 8 horas. Os arquivos brutos *FAST5* foram convertidos em *FASTQ* usando o *software* Guppy no modo de alta precisão (UENO et al., 2003). As sequências obtidas foram demultiplexadas para agrupar as amostras de acordo com os *barcodes* utilizados com o auxílio do *software* MinKNOW (Oxford Nanopore Technologies). O genoma consenso foi obtido após mapeamento das leituras do sequenciamento no genoma de referência MK202584 no programa Medaka v1.2.3 (Oxford

Nanopore Technologies). Os contigs finais foram anotados com o auxílio do Geneious Prime 2021 (Biomatters, Ltd.).

2.3. Descoberta de novos isolados de BaCV em transcriptomas disponíveis em bancos de dados públicos

Inicialmente foram selecionados transcriptomas com evidência da presença de cythorabdovirus relacionados ao BaCV com auxílio do *software* Serratus (EDGAR et al., 2021). Cada experimento de RNA-Seq foi então baixado em nosso servidor e processado para montagem *de novo*. Os adaptadores e as sequências de baixa qualidade foram removidos com o *software* Trimmomatic (V0.32) (BOLGER et al., 2014). A montagem *de novo* dos *contigs* foi realizada com o *pipeline* rnaviralSPAdes implementado no *software* SPAdes (ANTIPOV et al., 2020). Os contigs relacionados ao BaCV-Luz (MT811775) foram identificados e anotados com o auxílio do programa Geneious Prime 2021 (Biomatters, Ltd.).

2.4. Análises evolutivas

Para a avaliação da diversidade e evolução dos vírus relacionados ao BaCV foram selecionadas todas as sequências disponíveis no GenBank (PpVE, CiaRV e BaCV CN3), as sequências obtidas neste trabalho e as obtidas a partir da prospecção do banco de dados de transcriptomas. Sequências provenientes de outros projetos de HTS realizados por nosso grupo em maracujazeiro (BaCV_BAG3) e em feijão (Feijão-F1BA) (dados não publicados) foram incluídas para a validação dos resultados. Todas as sequências foram alinhadas com o algoritmo MAFFT (KATO et al., 2019) implementado no programa Geneious Prime 2021 (Biomatters, Ltd.). A inferência filogenética foi realizada com o algoritmo de máxima verossimilhança implementado nos programas FastTree (PRICE et al., 2009) e IQ-TREE (TRIFINOPOULOS et al., 2016). A distância genética entre os diferentes isolados foi estimada com o programa SDT v.1.2 (MUHIRE et al., 2014). Os gráficos de organização genômica e da variação da distância genética foram gerados com o auxílio dos programas EvolView (SUBRAMANIAN et al., 2019) e BoxPlotR (SPITZER et al., 2014), respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. O sequenciamento por nanoporos de genomas de isolados de BaCV é viável e produz sequências de qualidade.

O tamanho do genoma dos rhabdovírus é o principal fator limitante para análises de genomas completos, tornando os processos de amplificação e sequenciamento do tipo Sanger caros e laboriosos. Além disso, as amplificações normalmente são feitas utilizando uma combinação de *primers* desenhada com base em apenas uma sequência de referência. Levando em consideração tais limitações, empregamos uma metodologia baseada em FREED et al. (2020) para amplificar genomas brasileiros de BaCV utilizando o MinION e acessar sua diversidade genética. Inicialmente, 11 isolados do BaCV foram selecionados para o sequenciamento com o MinION, sendo 3 provenientes de sojas, 7 de feijão comum e o BaCV_LUZ (MT811775.1), sequenciado previamente pelo método Sanger em feijoeiro (**Capítulo 1**). Alguns dos *amplicons* esperados foram obtidos para as amostras de soja 1561, para o feijão 1536 (coletados em Brasília em 2017), bem como para o isolado BaCV_LUZ (**Figura 15**). A baixa eficiência nas reações pode ser devido à especificidade dos *primers* empregados desenhados com base no isolado BaCV_GO (MK202584.1).

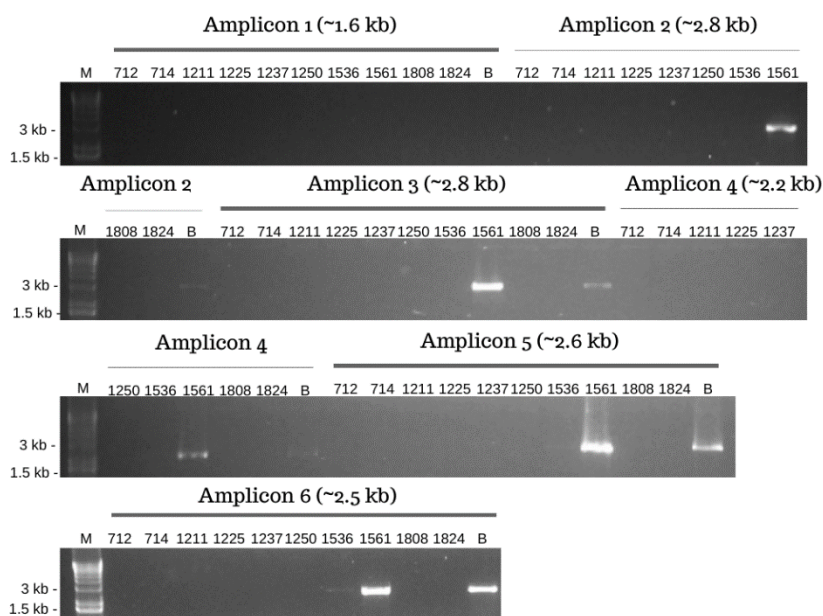


Figura 15. Amplificação do genoma completo de isolados de BaCV em feijoeiro e soja. As RT-PCRs foram realizadas com seis combinações de *primers* desenhados com sobreposição de pelo menos 100 nt dos fragmentos. Amostras coletadas na Bahia (feijão 712 e 714), em Cristalina-GO (feijão 1211 e 1225),

em Luziânia-GO (feijão 1237; soja 1250), em Brasília-DF (feijão 1536 e 1808; soja 1561 e 1824) e o isolado BaCV_LUZ (B, MT811775.1).

Novos *primers* foram desenhados a partir do alinhamento de sequências de diferentes isolados de BaCV e RT-PCRs *multiplex* foram realizadas com dois *pools* de *primers* distintos (P1 e P2). Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% em que foi possível notar bandas bem evidentes no tamanho esperado de 1.5 kb para as amostras 714 (feijão, BA, 2015), 1364 (feijão, MG, 2016), 1561 (soja, DF, 2017), 1599 (*Passiflora cacao*, DF, 2017); bandas discretas para 1365 (feijão, SP, 2015) e 1824 (soja, DF, 2015); e ausente para 1626 (*Passiflora gardneri*, DF, 2017), *Pool*11 (feijão, GO, 2017), bem como para os controles negativos (**Figura 16**).

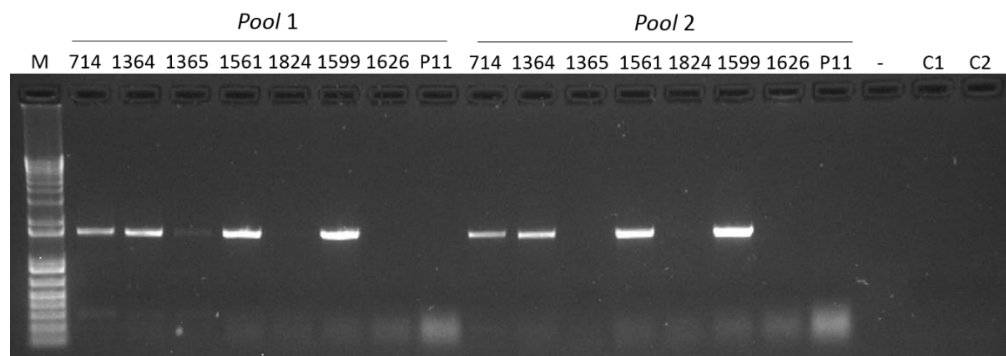


Figura 16. Amplificação do genoma completo de oito isolados de BaCV em feijoeiro comum, soja e *Passiflora* sp. por RT-PCR multiplex com os *primers* em *pool 1* e *pool 2*. No gel de agarose 1%, pode-se observar *amplicons* evidentes e do tamanho esperado (1.5 kb) em ambas as reações (*pool 1* e *pool 2*) nas amostras de feijoeiro comum (714 e 1364), soja (1561) e *Passiflora cacao* (1599). Bandas mais fracas podem ser notadas para o *pool 1*, nas amostras de soja 1365 e 1824. As amostras de *P. gardneri* (1626), feijoeiro P11, bem como para os controles das reações (C1 e C2) não apresentaram bandas evidentes.

Após a análise dos resultados do sequenciamento foi possível confirmar que todos os pares de *primers* produziram *amplicons* (**Figura 17**). Entretanto, os *primers* para a região 5'UTR (bacv_1.5kb_11_F e bacv_1.5kb_11_R) tiveram uma baixa eficiência para a maioria dos isolados sequenciados, e em apenas dois isolados foi possível obter a sequência completa da ORF L. Esta baixa eficiência de amplificação pode ser explicada por variações no sítio de pareamento do *primer* e pela baixa eficiência de conversão do RNA genômico em cDNA durante a síntese com oligos randômicos. Novos *primers* para a região 5' *trailer* serão avaliados

futuramente. Após o processamento dos *reads* foi possível obter o genoma consenso para cada um dos isolados. Todas as ORFs estavam completas e sem códons de parada ou deleções/inserções. A amostra 1364 apresentou uma redução na cobertura do *amplicon* 4 em comparação aos demais *amplicons* do mesmo *pool*, provavelmente por apresentar alguma variação na região de pareamento dos *primers* ou pela interação inespecífica com outras regiões no genoma do hospedeiro ou microbiota associada.

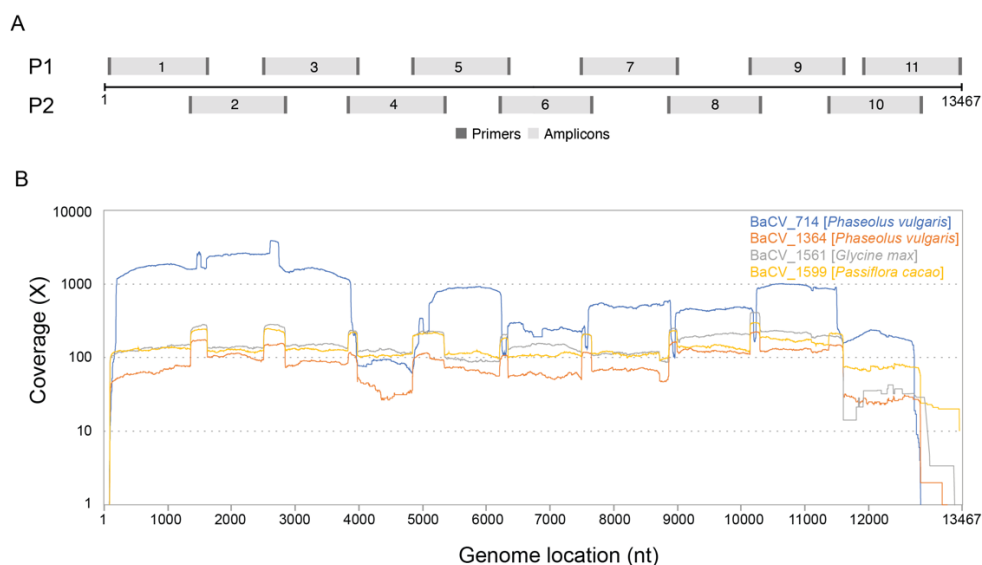


Figura 17. Posição dos *amplicons* e cobertura do sequenciamento para cada *amplicon*. A) Os pares de *primers* de numeração ímpar formaram o *pool* 1 e os de numeração par, o *pool* 2. Todos os pares produzem um *amplicon* de aproximadamente 1.5 kb. B) Cobertura do sequenciamento para as amostras 714, 1364, 1561 e 1599. Com exceção do *amplicon* 11, todos os *amplicons* em todas as amostras apresentaram cobertura maior que 20X.

O sequenciamento de vírus de planta com o MinION tem ganhado destaque recentemente em estudos de metagenômica, metatranscriptoma e detecção de isolados de vírus conhecidos, com a técnica sendo empregada na análise de hospedeiras como inhame (FILLOUX et al., 2018), pessegueiro (BRONZATO BADIAL et al., 2018), batata (DELLA BARTOLA et al., 2020), luzerna (BEN CHEHIDA et al., 2021), caupi (NAITO et al., 2019) e tomate (CHANDA et al., 2020; MARTINS, T. P. et al., 2021). Para rhabdovírus, a tecnologia foi empregada na detecção do vírus da raiva em humanos no Catar (OUDE MUNNINK et al., 2020) e na identificação da raiva canina em amostras da Guatemala, Índia, Quênia, e Vietnã (GIGANTE et al., 2020). Assim a otimização de um protocolo de sequenciamento do BaCV pode, no futuro, contribuir para estudos de epidemiologia e de diversidade genética de rhabdovírus que infectam plantas.

3.2. Novos isolados de BaCV encontrados em transcriptoma de plantas das famílias Caricaceae, Malvaceae, Fabaceae e Rutaceae

O programa Serratus disponibilizou os resultados de vírus presentes em mais de 5 milhões de experimentos disponíveis no SRA database. Deste total, 367.924,00 mil experimentos são de plantas e fungos. Dezessete transcriptomas de plantas apresentaram sequências relacionadas ao BaCV (**Tabela 8**), num total de oito hospedeiros distintos (*Psophocarpus tetragonolobus* L., *Mucuna pruriens* (L.) DC., *G. hirsutum*, *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw., *Ruta angustifolia* Pers., *G. max*, *Corchorus capsularis* L. e *C. papaya*) das famílias Caricaceae, Fabaceae, Malvaceae, Rutaceae. Todas estas espécies de plantas, com exceção de *C. papaya* e *G. max*, nunca haviam sido identificadas como potenciais hospedeiras de BaCV. A ocorrência destes vírus em duas das principais culturas do agronegócio brasileiro, soja (Brasil e China) e algodão (Índia), justifica estudos posteriores para avaliação da importância destes patógenos nestas culturas e em diferentes regiões brasileiras.

Tabela 8. Transcriptomas de plantas disponíveis no Sequence Read Archive - SRA com sequências relacionadas ao BaCV.

Família botânica	Espécie hospedeira	Genoma (nt)	Cobertura	SRA run	Tecido	Local	Referência
Caricaceae	<i>Carica papaya</i>	13464		SRR10606000 SRR10605993 SRR10605995	Folhas	México	(ALCALA-BRISENO et al., 2020)
Malvaceae	<i>Corchorus capsularis</i>	13487	21.26x	SRR9729099	Caule	China	(ZHANG, L. et al., 2020)
	<i>Gossypium hirsutum</i>	13450	168.66x	SRR5912807	Óvulo (<i>in vitro</i>)	Índia	(SABLE et al., 2018)
		13477	243.56x	SRR5912808			
Fabaceae	<i>Glycine max</i>	13481	64.92x	SRR8926860	Vagens	China	(KANG et al., 2020)
		13224	48.87x	SRR8926861			
		13487	169.97x	SRR8926862			
		13535	44.57x	SRR8926863			
		13503	132.61x	SRR8926864			
		13496	157.08x	SRR8926865			
		13484	62.69x	SRR8926866			
		13461	49.02x	SRR8926868			
	13480	42.19x	SRR8926869				
		<i>Mucuna pruriens</i>	13482	86.01x	SRR5211372	Folhas	Índia
	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	13450	41.74x	SRR2229092	Folhas	Índia	(SINGH, V. et al., 2017)
	<i>Stylosanthes guianensis</i>	13460	38.28x	SRR6649995	Raíz (coifa)	China	(JIANG et al., 2018)
Rutaceae	<i>Ruta angustifolia</i>	13672	22.74x	SRR7900860	Folhas	Malásia	(KAMAL et al., 2021)

3.3. Organização genômica, filogeografia e diversidade genética

Os isolados brasileiros sequenciados (7 sequências) foram anotados juntamente com os genomas identificados no banco de dados de transcriptoma (17 sequências). A maioria dos novos isolados apresentaram todas as ORFs esperadas para a espécie, exceto o genoma encontrado em *R. angustifolia* (Planta medicinal, “Arruda”) que não apresentou as ORFs relacionadas aos genes M e G (**Figura 18**). Nestas duas ORFs foram encontradas mutações pontuais (duas no gene M e seis no gene G) que introduziram códons de parada prematuros (dados não mostrados).

Mutantes defectivos na glicoproteína já haviam sido descritos em CiaRV (ZHANG, S. et al., 2020). A ocorrência deste tipo de mutação pode estar relacionada com a propagação vegetativa das plantas hospedeiras, que elimina a pressão seletiva exercida pela transmissão pelo inseto vetor. Durante a transmissão vetorial os vírus que não possuem glicoproteínas são eliminados pois não conseguem estabelecer infecção no inseto vetor. Este fenômeno já foi observado em vírus envelopados de plantas e mamíferos (RESENDE RDE et al., 1991; MOUTAILLER et al., 2011; ZHANG, S. et al., 2020). Evidências experimentais mostraram que mesmo na ausência das proteínas G e M, o nucleocapsídeo é montado (MEBATION et al., 1996), portanto a transmissão entre as células e tecidos da planta não é impossibilitada pela ausência da G ou da M. De fato, a estaquia é o método recomendado para propagação de *Ruta* spp. desde a Grécia antiga (POLLIO et al., 2008). Curiosamente, a perda da glicoproteína ocorreu independentemente em dois isolados identificados em plantas pertencentes à família Rutacea. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para avaliar se o hospedeiro ou apenas a forma de transmissão possibilita a manutenção destes isolados defectivos.

O alinhamento das sequências obtidas neste trabalho (24) com as sequências disponíveis no Genbank (12) foi utilizado na inferência da árvore filogenética (**Figura 18A**). Os isolados agruparam-se em dois clados: Clado I contendo sequências obtidas de *Citrus* spp., *C. capsularis*, *E. chrysantha*, *G. max*, *P. edulis*, *S. guianensis* e *R. angustifolia*, todas amostradas na China e Malásia; Clado II contendo sequências obtidas de *C. papaya*, *G. max*, *G. hirsutum*, *M. pruriens*, *P. spp*, *P. cacao*, *P. vulgaris*, *P. tetragonolobus* do Brasil, Equador, México e Índia. Com base nos dados disponíveis não foi possível determinar se o ancestral desta espécie surgiu na Ásia ou nas Américas. Em geral, as amostras agruparam-se de acordo com a localidade geográfica, exceto para duas sequências de feijão (BaCV_714 e F1BA_HTS_Contig2) provenientes do estado da Bahia, sugerindo que a diversidade genética

de BaCV no Brasil é mais alta do que a descrita anteriormente (ALVES-FREITAS et al., 2019; PINHEIRO-LIMA et al., 2020). Estas amostras são provenientes da mesma localidade, uma foi obtida pelo sequenciamento nanopore (BaCV_714) e a outra por sequenciamento Illumina de um *pool* de amostras (F1BA_HTS_Contig2). Como é possível observar na **Figura 18**, a amostra F1BA_HTS possui dois contigs diferentes relacionados com BaCV, um relacionado à amostra BaCV_714 e outro relacionado às amostras de maracujá e feijão. Nenhum evento de recombinação foi identificado entre estas sequências (dados não mostrados).

Duas hipóteses alternativas poderiam explicar esta alta diversidade genética observada entre os isolados brasileiros (**Figura 18B**). Na primeira hipótese, o Brasil seria o centro de origem do Clado II e de onde partiram os vírus identificados na Índia e Equador. Esta hipótese pressupõe ainda que existe uma grande diversidade de isolados brasileiros ainda não identificados. Alternativamente, o ancestral desta espécie viral surgiu na Ásia e foi introduzido no continente americano em dois momentos: (i) uma a partir da Índia, dando origem a toda a linhagem dos vírus encontrados no continente americano, com exceção das amostras da Bahia descritas anteriormente; (ii) e outra de uma localidade indeterminada na Eurásia, dando origem às amostras da Bahia. A confirmação ou exclusão destas hipóteses depende da identificação de novos isolados geneticamente distintos no Brasil ou outros países. Entretanto, como a maioria destes vírus é possivelmente transmitida por *B. tabaci*, é muito provável que eles tenham sido introduzidos na América Central e Caribe em 1988-1990 a partir do Mediterrâneo ou Oriente Médio (COSTA, H. S.; BROWN, 1991; BROWN, J. K., 1992; BROWN, J., 1994). Recentemente, foram identificadas duas entradas distintas do biótipo B (haplótipos NAFME 6 e 8) de *B. tabaci* no Brasil: no Rio de Janeiro em 1989 e no Ceará em 1990 (PAREDES-MONTERO et al., 2022), o que explicaria a ocorrência de duas linhagens de BaCV no Brasil, uma no Sudeste/Centro-Oeste e outra no Nordeste.

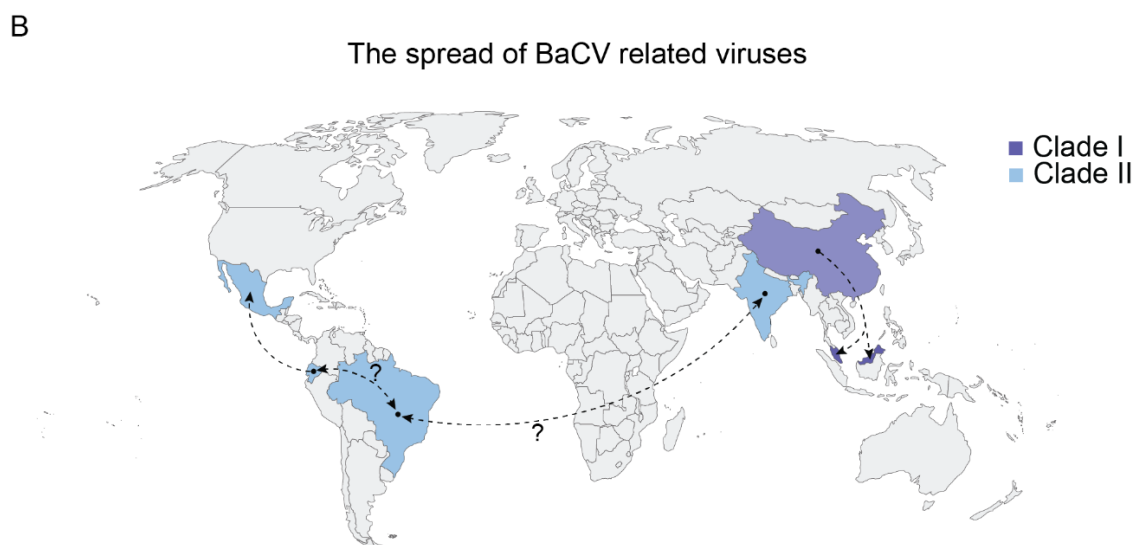
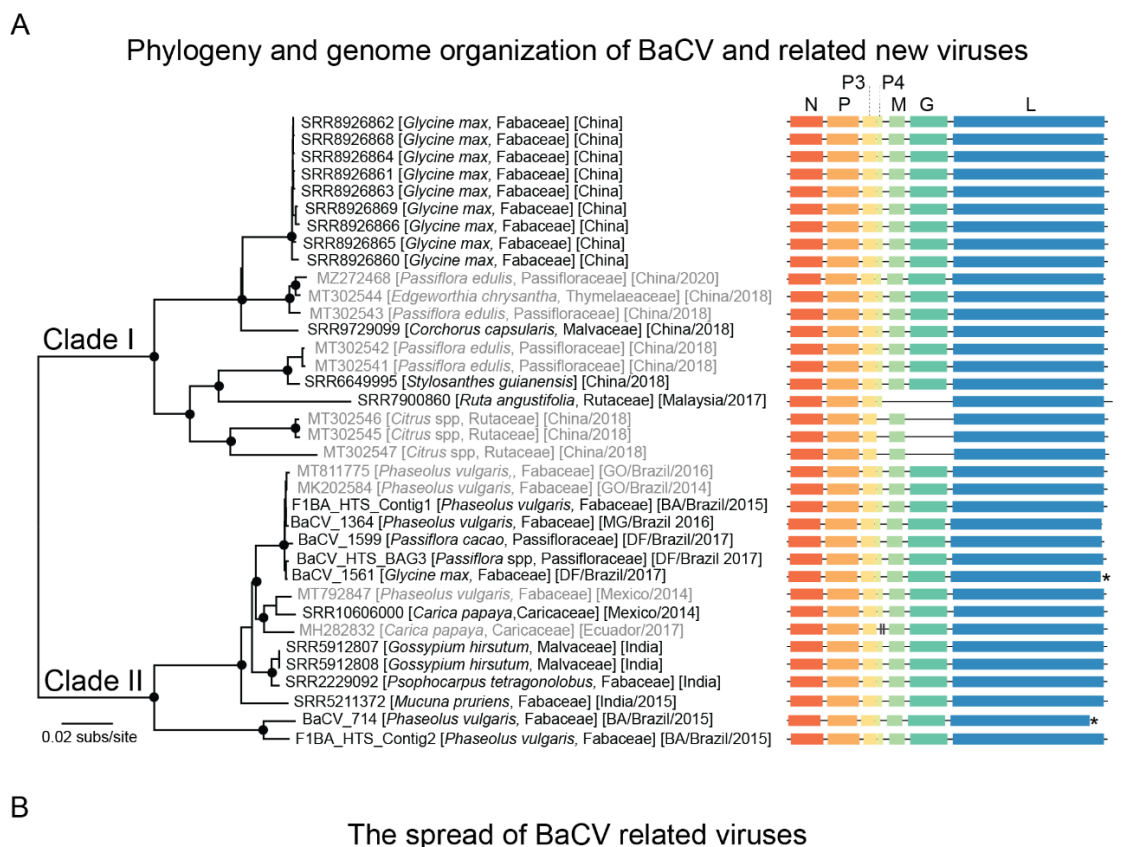


Figura 18. Evolução molecular dos vírus pertencentes à espécie *Papaya cytorhabdovirus*. A) Inferência filogenética por máxima verossimilhança do genoma de isolados disponíveis no Genbank (em cinza, 12 genomas) e dos isolados descritos neste trabalho (em preto, 24 genomas). As amostras descobertas em banco de dados de transcriptomas foram nomeadas com o número da corrida (por exemplo: SRR8926862). Os isolados incluídos no Clado I foram provenientes da China e Malásia e os pertencentes ao Clado II do Brasil, Equador, México e Índia. O genoma de cada isolado foi representado no sentido 3' *leader* até 5' *trailer*. Os genomas destacados com um asterisco estão com extremidade 5' incompleta. Os ramos com valores de suporte maior que 0,9 foram destacados com um círculo preto. A árvore foi enraizada pelo método de *midpoint*. B) Mapa representando o espalhamento geográfico dos vírus relacionados ao BaCV. As linhas pontilhadas conectam as localidades de partida (círculos pretos) e de chegada (setas pretas). Os pontos de interrogação indicam a incerteza da localização geográfica do ancestral das seqüências analisadas.

Estudos de diversidade intraespecífica em rhabdovírus que infectam plantas são escassos e a maioria consiste em análises realizadas apenas com sequências de nucleotídeos parciais ou completas de poucos genes. Os dados de diversidade genética *pareada* para cada ORF estão apresentados na **Figura 19**. A diversidade genética entre alguns isolados é elevada chegando a mais de 20%. As ORFs P4 e G foram as que apresentaram a maior variação, provavelmente devido ao afrouxamento da seleção negativa nos genomas que não possuem ORFs funcionais (CiarRV e *R. angustifolia*). Esta grande variação já havia sido observada para outras espécies. Por exemplo, ao analisar a diversidade genética de nucleotídeos do gene N de 15 isolados de taro vein chlorosis virus (TaVVCV), aproximadamente 20% de variabilidade foi observada, resultado semelhante ao obtido para o mesmo gene em isolados de LNYV da Austrália e Nova Zelândia (HIGGINS et al., 2016). Já para o gene L de 20 isolados de TaVVCV a diversidade foi de ~28% (REVILL et al., 2005). Para o SbBMV, parte do gene L foi sequenciada de mais de 60 isolados de plantas de soja coletadas ao longo de 16 anos na África do Sul e as análises filogenéticas resultaram na formação de 3 linhagens principais, com uma variabilidade de até 15% entre as sequências de nucleotídeos (STRYDOM; PIETERSEN, 2018).

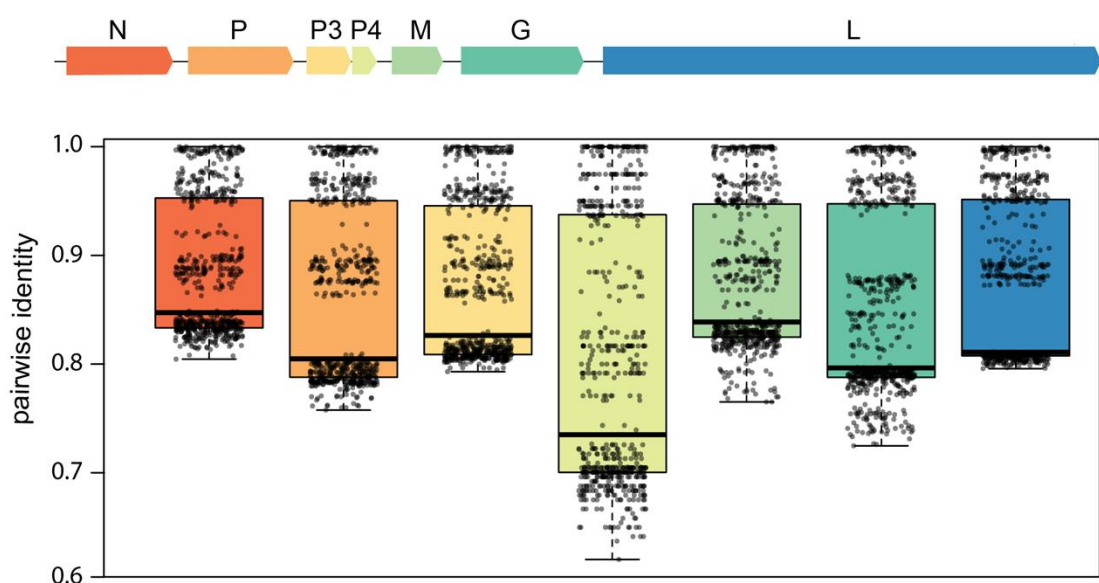


Figura 19. Distância genética *pareada*. A variação da distância foi representada com um diagrama de caixas onde os valores mínimos, máximos e a mediana para cada um dos genes virais são apresentados. A maior amplitude observada foi na ORF P4 e na G.

Para alguns rhabdovírus, a diversidade genética identificada é baixa, menos de 2% para gene P3 de strawberry crinkle virus amostrados em morangueiros no Irã (HAJIZADEH; ZANDAN, 2021), ou mesmo menos de 1%. As análises sugerem que esses genes estudados encontram-se sob pressão de seleção negativa indicando que esses vírus tenham surgido e se

disseminado mais recentemente, como observado para isolados brasileiros de coffee ringspot virus (RAMALHO et al., 2016), para os isolados de alfalfa dwarf virus na Argentina (SAMARFARD et al., 2018) e também para o rice stripe mosaic virus (RSMV) na China (YANG et al., 2018). A diversidade genética do RSMV na China foi estudada a partir da amplificação do genoma completo de 12 isolados encontrados em plantas de arroz. Foram realizadas 10 reações para amplificação de cada um dos genomas com um kit de RT-PCR do tipo one-step e os sequenciamentos (Sanger) foram realizados em triplicatas. Os genomas divergiram em menos de 1% e na filogenia, se agruparam em dois grupos de acordo com a localização geográfica. Ao avaliar individualmente os genes de RSMV, foi observada uma variabilidade distinta e decrescente P>N>M>L>G entre eles (YANG et al., 2018).

4. CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida utilizando tecnologia de nanopore com enriquecimento por RT-PCR multiplex mostrou-se viável para o sequenciamento de rabdovirus em plantas. O método resultou no sequenciamento de quatro isolados brasileiros de BaCV coletados, entre 2015 e 2017, em feijoeiros (MG e BA), soja e *P. cacao* (DF). Novas sequências (17) relacionadas ao BaCV foram obtidas a partir de transcriptomas de diferentes tecidos vegetais (folhas, caule, raiz, vagens e óvulo) disponíveis em banco de dados público. Os genomas foram identificados em seis novos hospedeiros (*P. tetragonolobus*, *M. pruriens*, *G. hirsutum*, *S. guianensis*, *R. angustifolia* e *C. capsularis*), em mamoeiro e em soja. As análises genômicas e de diversidade foram realizadas com as 24 sequências obtidas pelo grupo (4 por nanopore e 3 por Illumina) e 12 sequências de BaCV, PpVE e CiaRV disponíveis no GenBank. A maioria dos genomas apresenta as ORFs N-P-P3-P4-M-G-L, excetuando as sequências identificadas em plantas que são propagadas por estaquia e não possuem G e P4 (citrus), M e G (arruda) e P4 (mamoeiro Equador – PpVE). A diversidade genética observada entre os isolados foi superior a 20% e nas análises filogenéticas eles se agruparam, de modo geral, com base na localização geográfica: Clado I com amostras da Ásia e Clado II com as das Américas e Índia. As sequências identificadas na Bahia em 2015 não se agruparam com as demais sequências brasileiras sugerindo uma maior diversidade genética do vírus no país. Até o momento não é possível determinar o local de origem do ancestral da espécie.

1. INTRODUÇÃO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma cultura importante no Brasil, com produção anual de aproximadamente 3 milhões de toneladas (FAO, 2018; CONAB, 2020). As doenças virais têm sido uma limitação significativa na produtividade do grão. O vírus que mais frequentemente afeta a cultura é o begomovirus bean golden mosaic virus - BGMV (família *Geminiviridae*) e, mais recentemente, o carlavírus cowpea mild mottle virus - CPMMV (família *Betaflexiviridae*) (FARIA et al., 2016). Ambos os vírus foram encontrados em incidência muito alta e em infecções mistas com o bean-associated cytorhabdovirus - BaCV (família *Rhabdoviridae*), que também é transmitido por mosca branca (*Bemisia tabaci*) (**Capítulo 1**) (PINHEIRO-LIMA et al., 2020).

O CPMMV tem um único RNA senso positivo com ~8,2 kb de comprimento e uma estrutura cap na extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3'. O genoma é composto por seis ORFs, codificando uma replicase (ORF1 que contém quatro domínios conservados de metiltransferase, C23 peptidase, RNA helicase e RNA polimerase dependente de RNA), bloco triplo de genes (ORFs 2, 3 e 4), capa proteica (ORF 5) e uma proteína de ligação a ácido nucleico (ORF 6) (MENZEL et al., 2010; ZANARDO et al., 2014). As partículas virais apresentam conformação de filamentos flexuosos de 13 x 650 nm e são comumente encontradas em agregados, principalmente no citoplasma do parênquima paliádico e nas células do mesófilo (BRUNT et al., 1983).

O CPMMV é transmitido pela mosca branca de forma não persistente e, experimentalmente, por transmissão mecânica de extrato foliar. A infecção por CPMMV pode induzir diferentes sintomas dependendo da espécie hospedeira e seu genótipo. No caupi (*Vigna unguiculata*), quando o vírus foi detectado pela primeira vez, em 1973, algumas plantas apresentavam manchas cloróticas sistêmicas e outras eram assintomáticas (BRUNT; KENTEN, 1973). O CPMMV foi relatado pela primeira vez no Brasil, em 1983, causando deformação foliar e mosaico no feijoeiro comum (COSTA, A. S. et al., 1983), mas somente nos anos 2000 tornou-se relevante no país, quando foi detectado causando necrose do caule e nanismo na soja (*Glycine max*) (COSTA, A. S. et al., 1983; ALMEIDA et al., 2005).

A transmissão vertical de CPMMV tem sido testada com diferentes combinações de isolado viral e planta hospedeira gerando resultados distintos. A transmissão por sementes foi

relatada para o isolado de Gana em caupi, soja e feijão-comum em taxas entre 2 e 91%, dependendo da espécie vegetal. Para a soja, a transmissão por sementes foi muito alta (91%), enquanto para três variedades de *P. vulgaris* (Canadian Wonder, The Prince e Comtesse de Chambord) as taxas de transmissão foram muito menores, 2%, 4% e 13%, respectivamente. Além disso, todas as plântulas avaliadas eram visualmente assintomáticas (BRUNT; KENTEN, 1973). A transmissão por sementes do isolado CPMMV Venezuela foi sugerida pela presença de sintomas em 40% das plantas (*V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis*) avaliadas, mas nenhum método de diagnóstico foi usado para confirmar a infecção viral (BRITO et al., 2012). Na Índia, a transmissão por sementes foi relatada para várias cultivares de soja com taxas de ~ 0,62% a 14% (YADAV et al., 2013) e na Tailândia uma frequência de aproximadamente 1% foi observada (IWAKI et al., 1982). Em contraste, HORN et al. (1991) não conseguiram detectar CPMMV em sementes de soja na Indonésia por ELISA.

No Brasil, a natureza da transmissão vertical de CPMMV em soja e feijão comum tem sido estudada em várias instâncias, por avaliação visual do aparecimento de sintomas em plantas potencialmente infectadas, todas com resultados negativos (COSTA, A. S. et al., 1983; ALMEIDA et al., 2003; ALMEIDA et al., 2005). Recentemente, BARRETO DA SILVA et al. (2020) apresentaram evidências de baixo nível de transmissão de CPMMV por sementes (0,375%) na cultivar de soja BMX POTÊNCIA RR. Esses resultados demonstram que a transmissão por sementes de isolados brasileiros de CPMMV em feijão ainda é uma questão importante não resolvida.

As sementes certificadas de feijão representam menos de 19% do total da área plantada no Brasil, e a maioria dos agricultores usa sementes (ou seja, grãos) guardadas de safras anteriores para replantio (GUIMARÃES; SOUZA, 2019), aumentando os riscos de infecção de doenças transmitidas por sementes. Na verdade, mesmo as baixas taxas de transmissão de sementes combinadas com disseminação secundária por moscas brancas podem resultar em surtos graves (SIMMONS; MUNKVOLD, 2014).

A presença de CPMMV em mudas de feijoeiro, mesmo na ausência de moscas brancas em plantios visitados em Goiás sugeria que estava ocorrendo alguma transmissão de sementes. Aqui, examinamos a transmissão por sementes de CPMMV em duas cultivares de feijão-comum e, para garantir uma alta sensibilidade na detecção, a infecção foi avaliada por RT-PCR e hibridização de ácido nucléico. Embora não existam relatos da transmissão de vírus membros da família *Rhabdoviridae* por sementes (MANN; DIETZGEN, 2014; WALKER et al., 2021),

optamos por incluir o BaCV nas análises realizadas tendo em vista que esse é um vírus recentemente identificado e que os estudos com testes de transmissão de rhabdovírus por sementes são escassos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do material vegetal

Entre 2016 e 2019, detectamos CPMMV e BaCV em alta incidência em lavouras de feijão, principalmente no estado de Goiás, mesmo em plantas jovens e na ausência de *B. tabaci*. Especificamente, em 2016, em Cristalina - GO (área 1: Fazenda Mina d'Água) a incidência de CPMMV e BaCV foi de 100% e 71%, respectivamente (**Capítulo 1**). Algumas vagens da cultivar 'Pérola' foram colhidas aleatoriamente nessa área e mantidas em temperatura ambiente até a completa secagem e obtenção das sementes que foram armazenadas a 4°C. Em 2017, sementes de feijoeiros 'BRS FC 401 RMD' apresentando sintomas virais com incidência de 80% no campo experimental na EmbrapaArroz e Feijão - CNPAF (Santo Antônio de Goiás, GO) foram colhidas e também armazenadas a 4°C.

Plantas saudáveis de ambas cultivares foram mantidas por várias gerações em casa de vegetação à prova de insetos e pulverizadas periodicamente com inseticida (ciantraniliprole 0,25 mL/L) no CNPAF. As plantas cultivadas nessas condições não apresentaram sintomas virais e quando testadas para CPMMV, mostravam-se negativas e, assim, as sementes coletadas desses feijoeiros foram consideradas livres de vírus. Sementes saudáveis das cultivares BRS FC 401 RMD e/ou Pérola foram semeadas em gaiola à prova de insetos em casa de vegetação, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Brasília, e as plântulas geradas foram utilizadas em experimentos de inoculação mecânica e por mosca branca.

Em 2018, folhas de feijoeiro infectado (CPMMV, BaCV e BGMV) coletado em Cristalina, GO, em 2016, (**Capítulo 1**) e armazenadas a -80°C foram maceradas com tampão de inoculação (tampão fosfato de potássio 0,01M, pH 8,0; contendo 0,25 M EDTA e sulfito de sódio 0,01%). O inóculo foi então esfregado nas folhas primárias de 9 plântulas de 'BRS FC 401 RMD' e 8 de 'Pérola' previamente polvilhadas com carborundum. Trinta dias após a inoculação (dpi), as plantas foram testadas para infecção por CPMMV e BaCV por RT-PCR. As plantas infectadas foram cultivadas até a coleta de suas sementes.

Sementes de 'BRS FC 401 RMD' foram coletadas de plantas infectadas com CPMMV (e BaCV) obtidas pela inoculação por mosca branca de experimentos anteriores descritos no **Capítulo 1**.

2.2. Experimentos de transmissão por sementes

Um conjunto de quatro experimentos foi realizado para avaliar a transmissão de CPMMV por sementes de feijão 'BRS FC 401 RMD' e 'Pérola' (**Figura 20**). Foram utilizadas sementes de plantas infectadas naturalmente e inoculadas experimentalmente. Todos os ensaios foram baseados em testes do tipo *grow-out*, em que as sementes originadas de plantas potencialmente infectadas foram testadas para infecção viral.

O primeiro experimento (experimento I, **Figura 20**) foi realizado por membros do nosso grupo de pesquisa na Embrapa Arroz e Feijão. Sementes 'BRS FC 401 RMD' coletadas em um campo com alta incidência de CPMMV foram usadas para os testes de transmissão. As sementes foram semeadas individualmente em vasos de 300 mL contendo solo fertilizado com 0,06g de NPK (5-30-15). As plantas foram mantidas em casa de vegetação livre de mosca branca e cuidados foram tomados para evitar a transmissão por insetos, como o isolamento adequado da casa de vegetação e aplicações semanais de ciantraniliprol (0,25 mL/L). Vinte dias após a germinação (dag), a análise visual de sintomas foi feita e tecidos foliares foram coletados. Inicialmente, as 190 plantas foram testadas individualmente por PTA-ELISA e, em seguida, amostras compostas por 10 plantas foram formadas e analisadas por RT-PCR.

Adicionalmente ao experimento I, sementes coletadas de plantas naturalmente infectadas no campo do mesmo lote descrito acima e sementes de 'Pérola' coletadas em Cristalina, onde tanto CPMMV como BaCV foram encontrados em alta incidência, foram utilizadas no experimento II (**Figura 20**). Avaliamos também a transmissão vertical do CPMMV em feijoeiros de ambas as cultivares inoculados mecanicamente (experimento III) e do CPMMV e BaCV em plantas 'BRS FC 401 RMD' inoculadas por mosca branca, *B. tabaci* MEAM1, (experimento IV) (**Figura 20**).

Os experimentos II, III, IV foram conduzidos em câmara de crescimento a 24°C (+/- 4°C) e fotoperíodo de 12 horas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília. Nos três ensaios, o semeio foi feito em uma mistura (1:1) de solo autoclavado e substrato Plantmax HT (Eucatex Agro, Paulínia, Brasil) em potes de 500 mL, nos quais as plantas resultantes foram

cultivadas durante todo o período. A primeira folha totalmente desenvolvida de cada feijoeiro foi coletada aos 30 dag, e foram avaliadas individualmente quanto à infecção viral, por RT-PCRs seguidas de hibridizações Southern blot com sondas específicas.

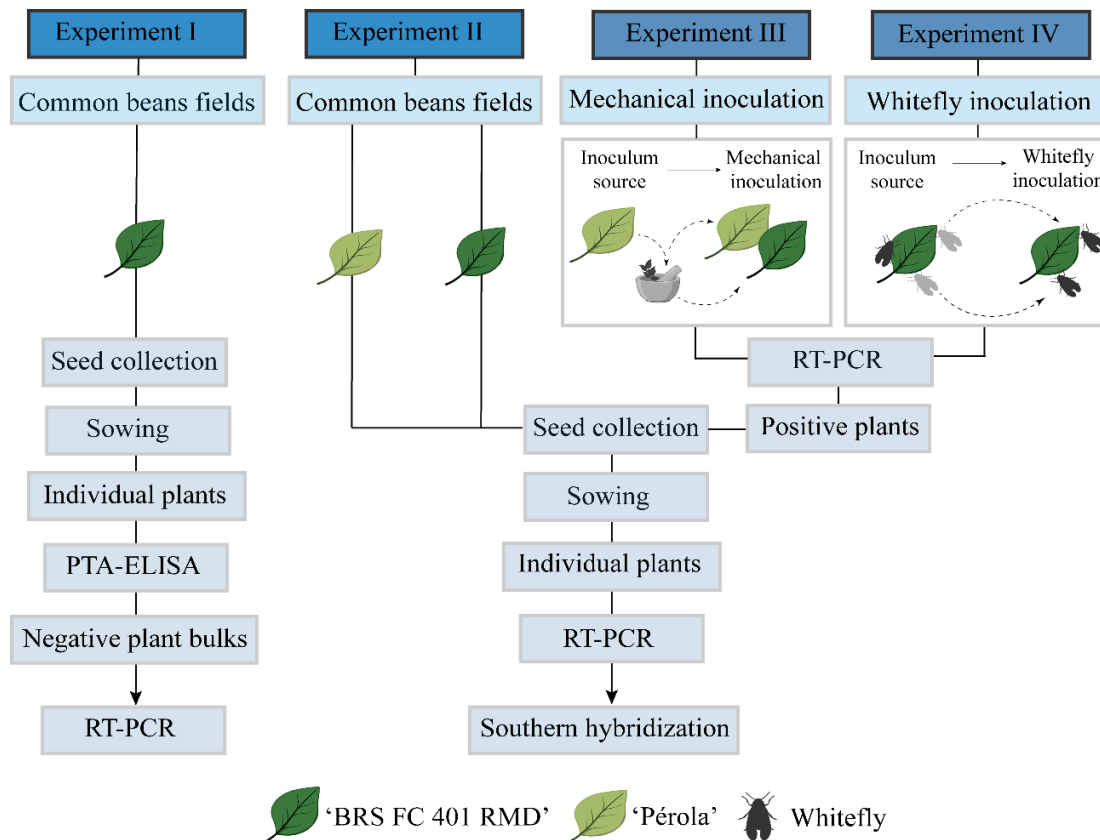


Figura 20. Experimentos de transmissão conduzidos para avaliar a transmissão de CPMMV e/ou BaCV por sementes em feijão comum transgênico ‘BRS FC 401 RMD’ e ‘Pérola’. As sementes usadas nos testes to tipo *grow-out* foram coletadas de feijoeiros em campo experimental (Experimento I e II) e campo comercial (Experimento II) com elevada incidência viral; e de feijoeiros inoculados mecanicamente (Experimento III) ou por mosca branca, *B. tabaci* MEAM1 (Experimento IV). Inicialmente (Experimento I), 190 plantas foram testadas individualmente para CPMMV por PTA-ELISA, seguida da formação de 19 amostras compostas por 10 plantas cada que foram avaliadas por RT-PCR. Nos demais experimentos, todas as plantas foram testadas individualmente por RT-PCR e hibridização de ácidos nucléicos.

2.3. ELISA indireto

Amostras ‘BRS FC 401 RMD’ de 190 plantas cultivadas a partir de sementes coletadas em campo foram testadas para infecção de CPMMV por antígeno indireto ou *plate-trapped antigen* (PTA)-ELISA. As amostras consistiram em três discos foliares (1cm) de cada planta. O anticorpo CPMMV foi fornecido pelo Dr. Álvaro M. R. Almeida (da Embrapa Soja, Londrina, Brasil), e o método PTA-ELISA foi feito conforme descrito por ARIAS et al. (2015). As

amostras foram analisadas em triplicatas e os controles negativo e positivo foram obtidos de plantas de feijão saudáveis e plantas sabidamente infectadas por CPMMV, respectivamente.

2.4. Extração de RNA de folhas de feijoeiros

Extrações de RNA total foram realizadas usando TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, a partir de 100 mg de folhas de feijão. Os tecidos foram pulverizados em nitrogênio líquido, foi adicionado 1 mL do TRIzol Reagent e os microtubos foram agitados em *vortex* e mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos. Para a solubilização de lipídios e formação das fases, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e os microtubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos. Em seguida, as amostras foram incubadas por três minutos em temperatura ambiente e centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e a precipitação do RNA feita por isopropanol (500 µL por 10 minutos em temperatura ambiente seguido de 10 minutos de centrifugação). Os *pellets* de RNA foram limpos com etanol 70% e ressuspensos em 50 µL de água. A qualidade e a quantidade dos RNAs extraídos foram avaliadas em gel de agarose a 1% e verificação em espectrômetro.

2.5. Detecção viral por RT-PCR

Amostras de RNA foram previamente tratadas com 2 unidades de TURBO DNase (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) a 37°C por uma hora. Posteriormente, foi realizada a transcrição reversa utilizando 0,5 µL de oligo dT (50 mM), 0,5 µL de *primer* aleatório (10 mM), 200 U de Transcriptase Reversa M-MLV (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) e 2 µg de RNA. As PCRs foram realizadas usando 1 µL de cDNA; 1 µL de cada *primer* específico 10 mM (qCPMMV_4144 F e qCPMMV_4339 R; BaC_1F e BaC_1579R); 0,8 µL de 10mM dNTPs a 10 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 0,2 µL de Taq DNA polimerase a 5 U/µL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 2,5 µL de tampão 10x; 1 µL de MgCl₂ (50 mM) e 17,5 µL de água. As reações foram conduzidas com desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos; anelamento a 58°C ou 60°C (para CPMMV; para BaCV, **Tabela 9**) por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos ou 1 minuto e 40 segundos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,2%.

Tabela 9. *Primers* utilizados nas RT-PCRs de feijoeiros para detecção do BaCV e CPMMV.

Alvo	Primer	Sequência do primer 5' - 3'	Tamanho do amplicon (pb)	Tm (°C)	Referência
BaCV	BaC_1F	GTTCAAAACTTTATAACCGCAGGAG	1579	61	(PINHEIRO-LIMA et al., 2020) ¹
	BaC_1579R	CGCAACAGATTAAACAGGAAAT			
CPMMV	CPMMV_4000F	AACTTGGCCTTAGTGAAGCTCTACA	500	58	(LAMAS et al., 2017) ¹
	CPMMV_4500R	ATTAGCTCTGTGCCTGGGGT			
CPMMV	qCPMMV_4144 F	GAAGGGTTTCCATCCAAGGT	196	58	²
	qCPMMV_4339 R	TTGTTTCGAGTTCCTCCATC			

¹*Primers* utilizados com base na literatura. ²*Primers* desenhados para esse estudo

2.6. Análise de hibridização Southern blot

Os géis de agarose com produtos de PCR para detecção dos vírus foram transferidos para membranas de náilon Hybond XL (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA) por transferência alcalina (tampão de desnaturação 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl). O DNA foi fixado nas membranas sob UV Stratalinker 1800 (Stratagene, San Diego, CA, EUA) por 30 segundos. As membranas foram hibridizadas com sondas radiomarcadas específicas para CPMMV ou BaCV preparadas usando Amersham TM Rediprime TM II DNA Labeling System (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA) e [α^{32} P] dCTP e regiões do genoma dos vírus que abrangem os fragmentos de PCR como moldes. As pré-hibridações e hibridizações foram conduzidas usando tampão Church Modified (0,5 M NaPO₄ pH 7,2, 7% SDS, 10 mM EDTA) a 55°C durante 2 horas e *overnight*, respectivamente. Em seguida, as membranas foram lavadas duas vezes com 2x SSC, 0,1% SDS (SSC 20x: 3 M NaCl, 300 mM Na₃C₆H₅O₇.2H₂O). As membranas foram expostas em IP-Image Plate Fujifilm BAS-MS por 30 minutos a 72 horas e os sinais de hibridização foram visualizados e capturados no Scanner FLA-3000.

2.7. Ensaio de transmissão por mosca branca *B. tabaci* MEAM1

Com o objetivo de verificar se o CPMMV transmitido por sementes poderia ser uma fonte de inóculo em campos de feijoeiro e ser transmitido para outras plantas, realizamos um ensaio de transmissão mediada por mosca branca (**Figura 21**). Três feijoeiros 'BRS FC 401 RMD' infectados com CPMMV positivos no experimento II foram usados como fonte de inóculo e colocados em gaiolas BugDorm em uma câmara de crescimento com temperatura de 24 °C (+/- 4 °C) e fotoperíodo de 12 horas. Moscas brancas (~ 400) foram coletadas de plantas de repolho

da criação de *B. tabaci* MEAM1 (EEB – UnB) e transferidas para cada uma das plantas inóculo por um período de acesso de aquisição de 48h. Após este período, 10 plântulas saudáveis de ‘BRS FC 401 RMD’ foram introduzidas nas gaiolas e mantidas com os insetos e a fonte de inóculo por 30 dias. Como controle, as moscas brancas foram colocadas em uma barraca com cinco mudas de feijão saudáveis. Durante esses 30 dias, sacudimos periodicamente as folhas para garantir que as moscas brancas se movessem entre as plantas. A folha mais jovem de cada planta teste foi coletada antes de serem colocadas na gaiola e, após o período de 30 dias, foram avaliadas quanto à infecção por CPMMV.

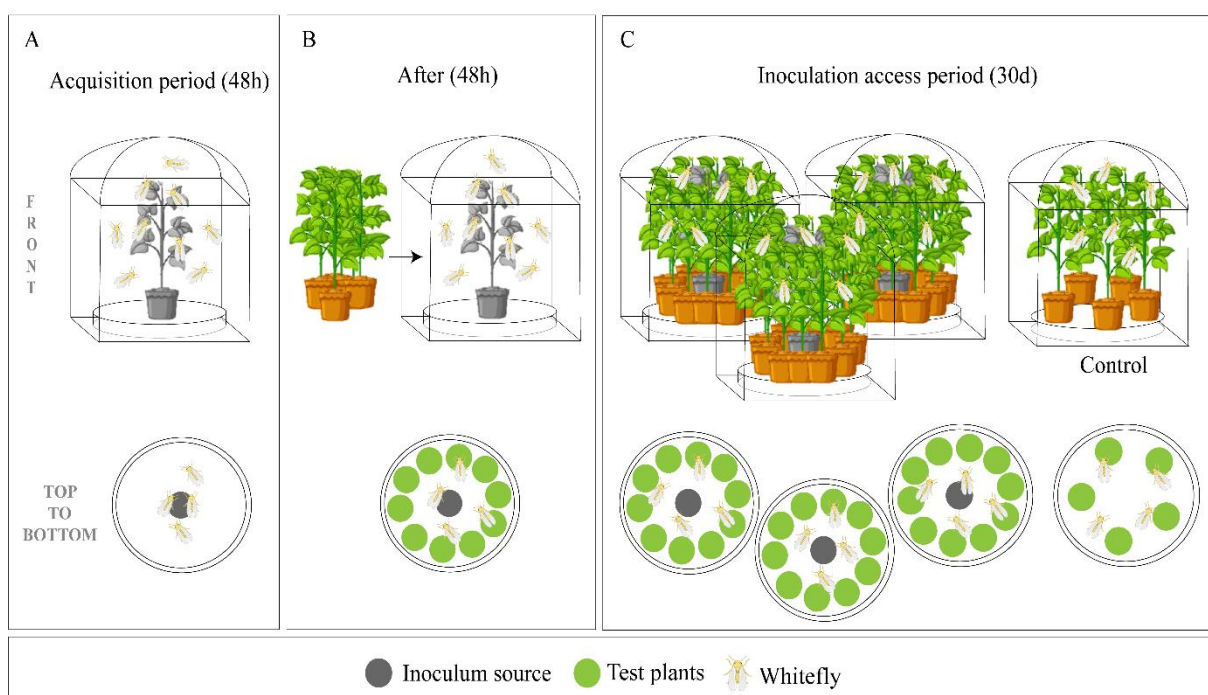


Figura 21. Transmissão mediada por mosca branca (*B. tabaci* MEAM 1) do cowpea mild mottle virus (CPMMV) verticalmente transmitido. Três mudas 'BRS FC 401 RMD' positivas detectadas em um ensaio de transmissão por sementes foram usadas como fonte de inóculo em gaiolas separadas com moscas brancas avirulíferas, por um período de aquisição de 48h. Posteriormente, dez plantas saudáveis foram introduzidas em cada gaiola e mantidas por 30 dias. As folhas foram agitadas periodicamente. Ao final do ensaio, as folhas mais jovens foram coletadas e testadas para CPMMV, por RT-PCR e Southern blot. O controle foi conduzido pelo mesmo período em uma quarta gaiola com cinco mudas saudáveis de feijão e moscas brancas avirulíferas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Transmissão por sementes do CPMMV em feijão-comum

No Brasil, o primeiro relato de CPMMV foi em feijoeiro, causando mosaico angular em plantas da cultivar ‘Jalo Precoce’, em 1979 (COSTA, A. S. et al., 1983). Vinte anos se passaram e o vírus reapareceu nas lavouras de soja no estado de Goiás, causando mosaico e necrose do caule. Na safra seguinte de soja, o CPMMV também foi reportado nos estados de Mato Grosso, Bahia, Maranhão e Paraná (ALMEIDA et al., 2005). Embora o carlavírus tenha sido considerado irrelevante no feijão quando foi relatado pela primeira vez, em 2013 foi encontrado espalhado em oito estados brasileiros e sua ocorrência foi avaliada em um programa de melhoramento de linhagens transgênicas de feijoeiros resistentes ao BGMV, apresentando sintomas como manchas e enrugamento foliar (FARIA et al., 2016).

A infecção das sementes por um vírus desempenha um papel fundamental na epidemiologia da doença, uma vez que as plântulas infectadas podem atuar como fontes primárias de inóculo na safra. Quando um vírus é transmitido por um vetor eficiente, como é o caso da transmissão do CPMMV pela mosca branca, podem ocorrer graves epidemias. Embora não seja considerado um vírus transmitido por sementes em soja ou feijão-comum no Brasil nos primeiros estudos (COSTA, A. S. et al., 1983; ALMEIDA et al., 2003; ALMEIDA et al., 2005), o CPMMV foi detectado em áreas de cultivo de feijão nos últimos cinco anos, no início da safra, mesmo na ausência de grandes populações de vetores. Esse fato reacendeu a preocupação de que o CPMMV possa ser transmitido por sementes de feijão.

A fim de entender o que estava ocorrendo no campo, no experimento I, usamos sementes de ‘BRS FC 401 RMD’ coletadas em uma lavoura com uma alta taxa de sintomas virais. As sementes coletadas dessas plantas eram menores do que as sementes de plantas saudáveis e algumas estavam ligeiramente deformadas, mas as plantas que emergiram dessas sementes tinham uma aparência normal, sem a presença de sintomas. Por termos um anticorpo anti-CPMMV disponível e pela técnica ELISA ser comumente empregada em estudos de transmissão de vírus por sementes, incluindo CPMMV (IWAKI et al., 1982; HAMPTON et al., 1992; SASTRY, 2013), optamos pelo PTA-ELISA como método de detecção neste experimento.

Todas as 190 plantas cultivadas a partir de sementes coletadas dos feijoeiros no campo apresentaram resultado negativo para CPMMV no PTA-ELISA. Uma vez que as técnicas baseadas em PCR podem detectar vírus em níveis de picogramas, sendo, portanto, mais

sensíveis do que ELISA, incluímos RT-PCR para detecção do CPMMV nas amostras compostas por 10 plantas. Todas as 19 amostras compostas mostraram-se negativas para CPMMV. Esses resultados sugeriam que o CPMMV não é transmitido por sementes dessa cultivar de feijão ou que o CPMMV estava presente em concentrações muito baixas nas plantas e não pôde ser detectado pelas metodologias empregadas.

Assumindo que a carga de CPMMV transmitida pela semente poderia ser muito baixa nas plantas, no experimento II, recapitulamos os testes com sementes de feijão 'BRS FC 401 RMD' coletadas no campo e, adicionalmente, incluímos sementes da cv. 'Pérola'. A fim de diminuir as chances de os resultados apresentarem falsos negativos, a partir de então todas as RT-PCRs foram realizadas em amostras de plantas individuais. As sementes de 'BRS FC 401 RMD' foram obtidas do mesmo lote daquelas utilizadas no experimento I e algumas das plantas cultivadas a partir dessas sementes apresentaram algumas folhas deformadas que se assemelham às plantas infectadas por CPMMV. Sementes de 'Pérola' coletadas de plantas em um campo com alta incidência de sintomas virais eram levemente deformadas e menores (**Figura 22**) e as plantas originadas não apresentaram sintomas evidentes.

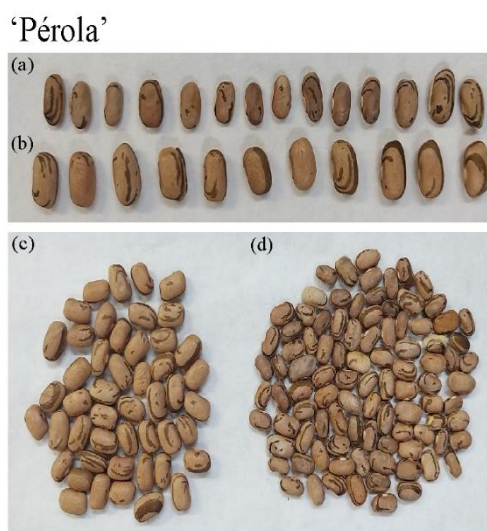


Figura 22. Sementes de feijão comum da cultivar Pérola utilizadas em experimentos de transmissão de CPMMV e BaCV por sementes. (a, d) Alterações na forma e tamanho podem ser notadas nas sementes coletadas em plantios com sintomas virais observados e com alta incidência de CPMMV, BGMV e BaCV. (b, c) Sementes produzidas em casa de vegetação livre de insetos e com amostragem periódica negativa para CPMMV. (c, d) Para cada cultivar, as porções de sementes representadas apresentam o mesmo peso.

As RT-PCRs realizadas para as 20 plantas 'BRS FC 401 RMD' e 50 de 'Perola' originaram bandas muito fracas com o mesmo tamanho (~ 200 nt) que o controle positivo de

CPMMV. Para 'BRS FC 401 RMD' esta banda parece presente em duas amostras (amostras 5 e 16, **Figura 23-A**), enquanto para as plantas 'Pérola', a banda foi discernível em quatro amostras (amostras 35, 37, 38 e 39, **Figura 23-B**). Os controles positivos mostraram-se bem visíveis. Considerando-se que as mesmas concentrações de RNA foram utilizadas para amostras e controles, sugere-se que a carga viral nessas plantas cultivadas a partir de sementes infectadas seja mais baixa, explicando os resultados negativos obtidos nos testes ELISA e RT-PCR (de *pool* de amostras), no experimento I.

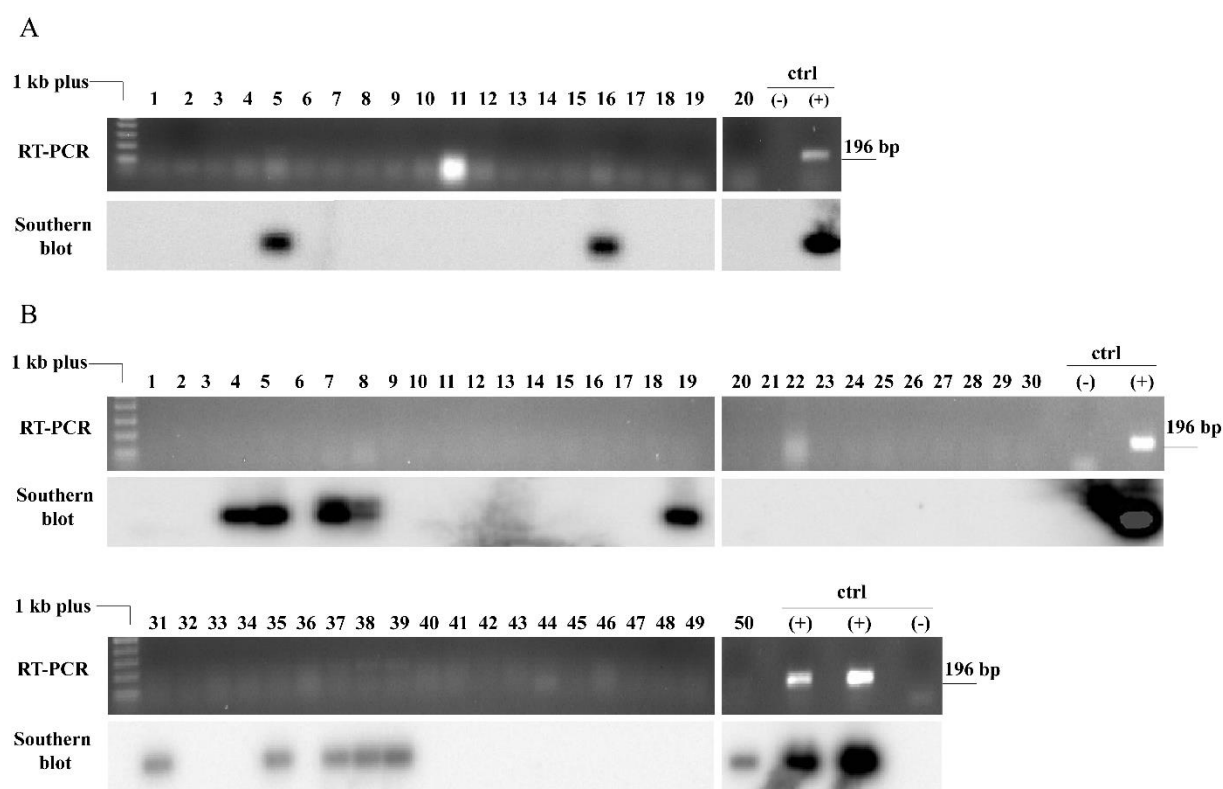


Figura 23. O cowpea mild mottle virus (CPMMV) pode ser transmitido por sementes em feijão comum. Sementes de feijoeiros coletadas em campos experimental com ocorrência de sintomas virais (cv. BRS FC 401 RMD, **A**) e em campo comercial em que o CPMMV foi detectado em alta incidência (cv. Pérola, **B**) foram semeadas em câmara de germinação. As plantas obtidas foram cultivadas e aos 30 dias pós germinação, amostras foliares foram coletadas individualmente. A detecção do vírus foi realizada por RT-PCR, com *primers* específicos (tamanho do *amplicon* de 196 pb), seguida por Southern blot. No gel das amostras 'BRS FC 401 RMD' (**A**) bandas muito discretas estão presentes nas plantas 5 e 16, enquanto dentre as 'Pérola' (**B**), é possível notar bandas nas amostras 35, 37, 38 e 39. A hibridização confirmou a infecção nas plantas 'BRS FC 401 RMD' 5 e 16 e aumentou a detecção nos feijoeiros 'Pérola' (4, 5, 7, 8, 19, 31, 35, 37,38, 39 e 50).

Detecções virais a partir de RT-PCRs combinadas com Southern blot foram adotadas com o intuito de antigir uma alta sensibilidade, bem como pela possibilidade de detectar também o BaCV, já que não há até o momento anticorpo disponível para realização de ELISA. Em

algumas interações vírus-hospedeira, o método ELISA se mostrou menos eficiente para a detecção da transmissão viral por sementes, em comparação com PCR, ou RT-PCR (SASTRY, 2013).

Na Espanha, em um experimento do tipo *grow-out* para o melon necrotic spot virus – MNSV (Gênero *Gammacarmovirus*, Família *Tombuviridae*), em melão (*Cucumis melo* L.) cv. Gália, nenhuma amostra composta (10 plantas por amostra) foi positiva no teste ELISA, enquanto para RT-PCR, 22 foram positivas resultando em taxas de transmissão de aproximadamente 8% (HERRERA-VÁSQUEZ et al., 2009). Para o begomovirus dolichos yellow mosaic virus – DoYMV em feijão pedra (*Lablab purpureus* L.) na Índia, a detecção por DAS-ELISA resultou em 46% de plântulas positivas, enquanto por PCR a transmissão por sementes detectada foi de 55% (SURUTHI et al., 2018).

Embora os *amplicons* de CPMMV derivados de RT-PCR tenham sido vistos em algumas amostras individuais no experimento II, eles estavam no limite da detecção visual no gel de agarose. Portanto, poderíamos estar negligenciando a transmissão de CPMMV por sementes caso o vírus estivesse presente em cargas mais baixas. A hibridização é uma ferramenta poderosa para a detecção de ácidos nucleicos em baixas concentrações podendo ser usada para detectar vírus em plantas por Southern blot, mesmo na ausência de bandas derivadas de vírus visíveis em gel (RIBEIRO et al., 2007; FONTENELE et al., 2018; FONTENELE et al., 2020).

Portanto, para verificar se haviam outras amostras positivas para CPMMV com *amplicons* imperceptíveis nos géis, esses foram transferidos para membranas de náilon e hibridização Southern blot foi realizada com uma sonda específica para CPMMV. Para as plantas 'BRS FC 401 RMD', a hibridização corroborou os resultados de RT-PCR, e um sinal de hibridização foi detectado apenas nas amostras 5 e 16 (**Figura 23-A**), indicando uma taxa de transmissão vertical de 10% para essa cultivar (**Tabela 10**). Embora algumas das plantas 'BRS FC 401 RMD' apresentassem folhas deformadas, esta aparência anormal não pôde ser correlacionada com a infecção por CPMMV. Para as plantas 'Pérola', a hibridização revelou que mais sete plantas (# 4, 5, 7, 8, 19, 31 e 50) estavam infectadas por CPMMV além das quatro já identificadas por RT-PCR (**Figura 23-B**), totalizando uma taxa de transmissão por sementes de 22% (**Tabela 10**).

Acredita-se que os rhabdovírus de plantas não sejam transmitidos por sementes (WALKER et al., 2021). No entanto, como as sementes 'BRS FC 401 RMD' e 'Pérola' foram

coletadas de feijoeiros em áreas onde o BaCV foi encontrado (**Capítulo 1**) e, como não há informações sobre a transmissão vertical do cytorhabdovírus, as plantas avaliadas nos experimentos II e IV também foram testadas quanto à presença do BaCV. Todas as plantas testadas apresentaram resultados negativos para o BaCV tanto na RT-PCR quanto na hibridização, o que implica que, pelo menos, nessas plantas o BaCV não foi transmitido por sementes. Recentemente, a transmissão por sementes foi avaliada para o PpVE em ensaios do tipo *grow-out* a partir de 100 sementes coletadas de mamão e *M. lathyroides* positivos para o rhabdovírus e, assim como para o BaCV, esse modo de transmissão não foi observado (CORNEJO-FRANCO et al., 2021).

Os resultados do experimento II demonstram que o isolado brasileiro do CPMMV é transmitido por sementes de feijão comum e que a combinação dos dois métodos de diagnose é essencial para que a sensibilidade necessária para identificar a transmissão por sementes seja alcançada. Assim, RT-PCR seguido por hibridização foi empregado em todos os outros experimentos. O experimento II foi realizado com sementes coletadas de feijoeiro no campo e embora o nível de sintomas nesses campos exceda 80%, não testamos as plantas-mãe para infecção por CPMMV. Portanto, não é possível afirmar que os feijoeiros analisados foram cultivados a partir de sementes oriundas de plantas-mãe infectadas. Os experimentos III e IV foram realizados para verificar se as taxas de transmissão por sementes apresentariam variação caso as sementes derivassem de plantas-mãe seguramente infectadas.

A análise de RT-PCR e Southern blot das plantas cultivadas a partir de sementes coletadas de plantas-mãe infectadas com CPMMV (que foram inoculadas por meios mecânicos no experimento III) resultou em 45% de transmissão para 'BRS FC 401 RMD' e 13% para 'Pérola' (**Figura 24**).

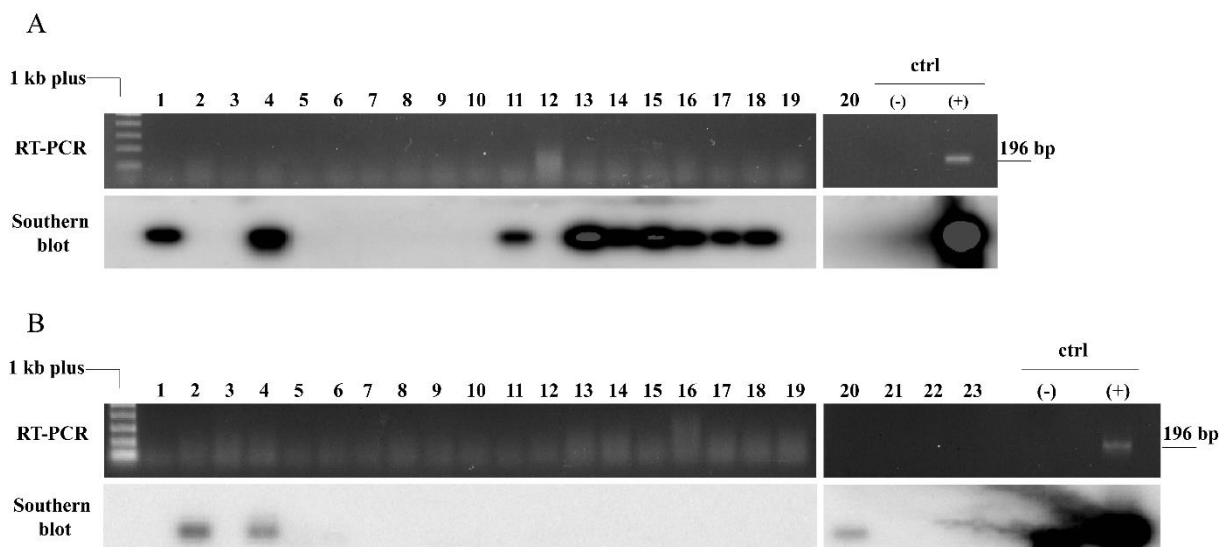


Figura 24. O cowpea mild mottle virus (CPMMV) pode ser transmitido por sementes para a progênie de feijoeiros ‘Pérola’ e ‘BRS FC 401 RMD’ inoculados mecanicamente. Após a inoculação mecânica com CPMMV, as sementes das plantas infectadas foram coletadas em *pool*. As sementes obtidas foram semeadas e as plantas mantidas em câmara de crescimento até a detecção do vírus aos 30 dias após a germinação (dag). A detecção do vírus foi realizada por RT-PCR, com *primers* específicos (tamanho do *amplicon* de 196 pb), seguida por Southern blot. Nove ‘BRS FC 401 RMD’ (1, 4, 11, 13, 14, 15, 16, 19, 21) e três ‘Pérola’ (3, 5, 22) foram positivas para CPMMV na análise de Southern blot.

Seguindo a metodologia dos experimentos anteriores, feijoeiros ‘BRS FC 401 RMD’ que germinaram de sementes colhidas em plantas-mãe infectadas com CPMMV e BaCV (inoculadas pelo vetor mosca branca no experimento IV) apresentaram uma taxa de transmissão vertical de CPMMV de 12% (**Figura 25**). Algumas dessas plantas apresentaram deformações foliares, embora não tenha sido possível correlacionar tal fato à presença do CPMMV, já que deformações foram observadas tanto nas amostras positivas 20 e 25 (**Figura 26 a e b**), quanto em amostras negativas como 1 e 2 (**Figura 26 c e d**).

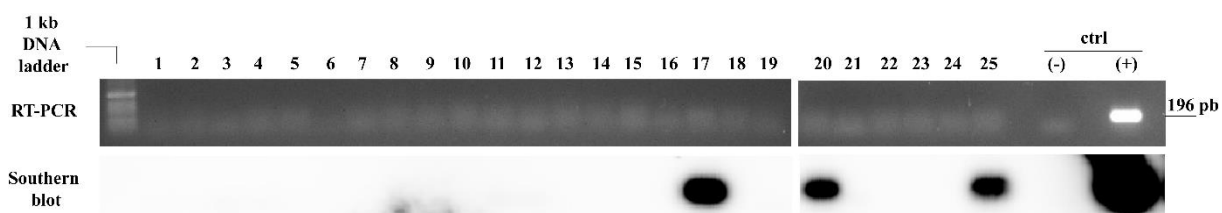


Figura 25. O cowpea mild mottle virus (CPMMV) pode ser transmitido por sementes para a progênie de feijoeiros ‘Pérola’ e ‘BRS FC 401 RMD’ inoculados por mosca branca. Vinte e cinco sementes de plantas inoculadas com CPMMV através de mosca branca (*B. tabaci* MEAM1) foram semeadas e mantidas em câmara de crescimento até a extração do RNA, aos 30 dias após a germinação (dag). O CPMMV foi detectado por Southern blot em três plantas (17, 20 e 25).

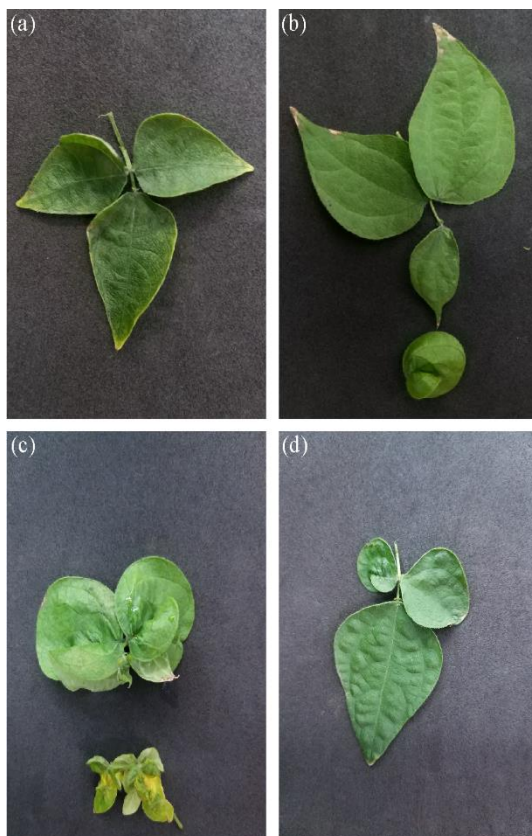


Figura 26. Folhas de feijão comum 'BRS FC 401 RMD' cultivados a partir de sementes coletadas em plantas-mãe inoculadas com BaCV e CPMMV por mosca branca (*B. tabaci* MEAM1). (a, b) Plantas positivas e (c, d) plantas negativas para CPMMV em hibridização southern blot.

Para a cultivar 'BRS FC 401 RMD' houve um aumento da taxa de transmissão vertical de CPMMV do experimento I para os experimentos II e III, enquanto para 'Pérola' houve uma menor taxa de transmissão de sementes de CPMMV no experimento II (**Tabela 10**). Os resultados de 'BRS FC 401 RMD' podem estar relacionados ao fato de a planta-mãe estar inquestionavelmente infectada por CPMMV.

No entanto, outros fatores abióticos, como temperatura (FROSHEISER, 1974), seca (JONES, R. A. C.; PROUDLOVE, 1991), intensidade da luz (MONTES; PAGAN, 2019), bem como o isolado do vírus (POSPIESZNY et al., 2020), genótipo da hospedeira (BRUNT; KENTEN, 1973) (YADAV et al., 2013) e o estágio fenológico no qual a planta foi infectada (MAHMOUD HAMDY ABD, 2020) podem influenciar a produção de sementes infectadas por vírus.

Tomados em conjunto, nossos resultados indicam transmissão vertical de CPMMV em taxas de 10-45% para ‘BRS FC 401 RMD’ e 13-22% para ‘Pérola’ (**Tabela 10**). Essas taxas são um pouco maiores do que aquelas observadas em cultivares de feijão comum para o isolado de CPMMV de Gana (Brunt and Kenten 1973) e pelo menos 26,6 vezes maiores do que a taxa de transmissão de CPMMV por sementes relatada para a cultivar de soja BMX POTÊNCIA RR no Brasil (BARRETO DA SILVA et al., 2020).

Tabela 10. Transmissão por sementes do CPMMV em cultivares de feijão comum.

Cultivar	Taxa de transmissão por semente (%) n. plantas positivas/n. plantas testadas		
	Experimento II ^{1,2}	Experimento III ³	Experimento IV ⁴
Pérola	11/50 ¹ 22%	3/23 13%	-
BRS FC 401 RMD	2/20 ² 10%	9/20 45%	3/25 12%
Total	13/70 18,6%	12/43 27,9%	3/25 12%

Sementes coletadas em campo comercial¹, campo experimental², ensaio de inoculação mecânica³ e ensaio de transmissão por mosca branca⁴.

3.2. O CPMMV transmitido por semente pode ser uma fonte de inóculo em transmissão secundária por mosca branca

O ensaio de transmissão mediado por mosca branca confirmou que o CPMMV transmitido verticalmente em ‘BRS FC 401 RMD’ é fonte de inóculo para infecções secundárias, ao menos em condições experimentais em câmara de crescimento. O vírus foi detectado, por RT-PCR seguido por Southern blot, 30 dias após inoculação em um total de 7 feijoeiros inicialmente saudáveis que foram inseridos em cada uma das três gaiolas contendo moscas brancas e um feijoeiro fonte em cada. Foram positivas as plantas 3, 4 e 5 na repetição 1; plantas 16 e 17 na repetição 2 e plantas 22 e 23 na repetição 3 (**Figura 27**). O CPMMV não foi detectado em nenhuma das cinco plantas utilizadas como controle do experimento (c1 a c5, **Figura 27**), nem nas amostras de folhas coletadas antes da introdução das plântulas de feijão nas gaiolas.

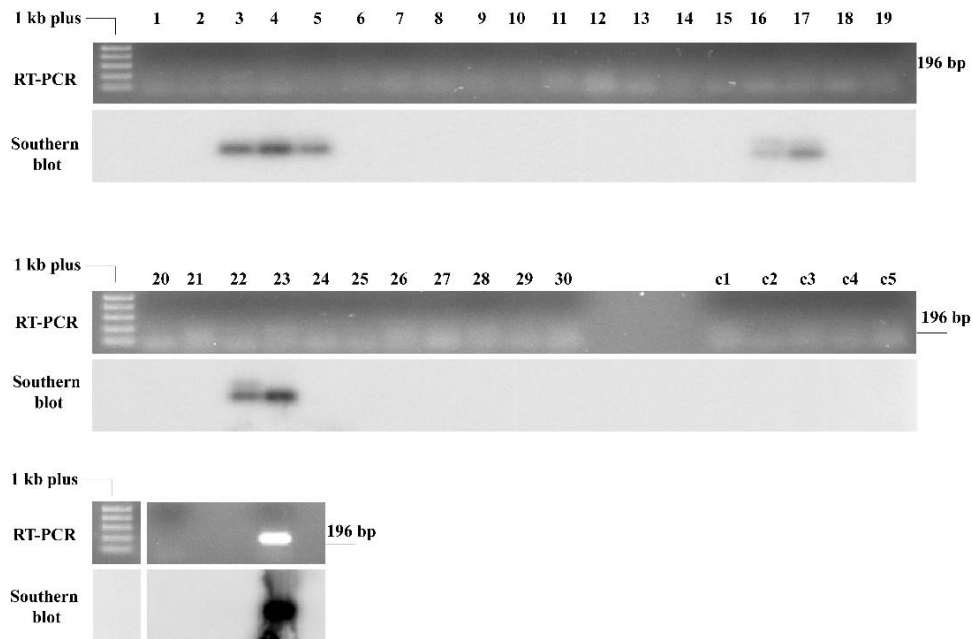


Figura 27. O cowpea mild mottle virus – CPMMV verticalmente transmitido em feijão comum é fonte de inóculo para transmissão secundária por mosca branca (*B. tabaci* MEAM1). Três plantas ‘BRS FC 401 RMD’ positivas para CPMMV obtidas em ensaio *grow-out* de transmissão por semente foram introduzidas em três gaiolas do tipo BugDorm com moscas brancas e mantidas por 48h. Dez plântulas da mesma cultivar foram introduzidas em cada gaiola (gaiola 1: plantas 1-10; gaiola 2: plantas 11-20 e gaiola 3: plantas 21-30) e mantidas por 30 dias. Como controle, outros cinco feijoeiros foram introduzidos em uma quarta gaiola contendo apenas moscas brancas. Ao fim desse período, a última folha recém formada de cada feijoeiro foi coletada e analisada por RT-PCR e southern blot. No gel, é possível identificar bandas fracas nas amostras 3, 22 e 23 no tamanho esperado de 196 pb. Na membrana, as amostras 3, 4, 5, 16, 17, 22 e 23 mostraram-se positivas. Os cinco controles **c1-c5** mostraram-se negativos em ambas as técnicas empregadas.

Apesar da aparente baixa carga viral encontrada nas progênies de feijão infectado verticalmente, essas plantas podem ser uma fonte de inóculo para novas infecções por CPMMV em feijoeiro sadio. A taxa de transmissão de 23,3% indica a relevância da transmissão por sementes na cultura como fonte primária de CPMMV nos campos de feijão. Adicionando a este cenário um vetor eficiente (como moscas brancas para CPMMV), as perdas de rendimento podem ser muito altas mesmo quando a transmissão do vírus pela semente ocorre em taxas baixas (ROSENMAN et al., 2019).

Para o caupi, já foi relatada uma forte associação da cultivar com o cowpea aphid-borne mosaic virus - CABMV (gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*) e a presença de vetores em campo. Quando cultivares mais sensíveis à transmissão por sementes de CABMV foram

cultivadas, a taxa inicial de sementes infectadas foi significativa para as infecções secundárias com transmissão do vírus por pulgões. A infecção secundária para essas cultivares foi detectada entre 17 e 45 dias após a semeadura, quando algumas taxas de infectividade atingiram 100%. Porém, para as demais cultivares, a infecção secundária ocorreu entre 31 e 38 dias e foi inferior a 50% (NEYA et al., 2007).

Com base na capacidade de transmissão por sementes de alguns vírus e na severidade da doença, algumas lavouras precisam ser cultivadas em condições rigorosas de controle de vetores e é altamente recomendável o uso de sementes certificadas. Modelos sugerem que em campos de batata com plantio de sementes certificadas, a presença de vetores do PVY (incluindo os pulgões de cereais *Rhopalosiphum maidis*, *R. padi* e *Schizaphis graminum* que apesar de não colonizarem a batata conseguem transmitir o vírus) poderia aumentar a ocorrência do vírus a partir de uma taxa aceitável de 2,5% antes da semeadura a 5% ou mais, após a colheita (ROSENMAN et al., 2019).

O efeito do CPMMV sobre a produção de feijão precisa ser melhor investigado, mas considerando-se o fato de ser transmitido por sementes (a taxas de até 45%) e a já caracterizada redução na produtividade da soja (BARRETO DA SILVA et al., 2020), algumas abordagens podem ser adotadas no futuro. A implementação de campos de sementes certificados sob estrito controle da mosca branca pode ser uma alternativa para garantir baixos níveis de infecção primária durante a semeadura.

4. CONCLUSÃO

A ocorrência do CPMMV em lavouras de feijão comum tem se destacado desde 2013 (FARIA et al., 2016) com altas taxas de incidência ~79% em vários estados brasileiros (PINHEIRO-LIMA et al., 2020) e nossos resultados mostram que a presença da mosca branca no campo pode não ser o único fator responsável por esses números. Após testarmos plantas obtidas a partir de sementes de feijoeiros ‘Pérola’ e/ou ‘BRS FC 401 RMD’ inoculados experimentalmente e naturalmente constatamos a transmissão vertical do vírus. Para a cultivar Pérola, a taxa de transmissão do CPMMV por sementes foi de 22% quando as plantas avaliadas foram obtidas de sementes do campo (experimento II) e de 13% quando obtidas em ensaio de inoculação mecânica (experimento III). Já para a cultivar BRS FC 401 RMD, a transmissão verificada no experimento III foi pelo menos 3x maior. Por ser resistente ao BGMV, essa

cultivar foi avaliada em plantas geradas em ensaio de transmissão por mosca branca (experimento IV) resultando em 12% de transmissão sendo esse um valor mais próximo aos 10% obtido no experimento II. Após os resultados confirmarem a transmissão por sementes, foi possível atestar a transmissão secundária do vírus (23,3%) por *B. tabaci* MEAM1 em câmara de crescimento. Juntos os resultados sugerem que o vírus esteja sendo propagado nas lavouras do país com o plantio de sementes infectadas que quando germinam passam a ser fontes de inóculo para a dispersão pelo vetor. A ocorrência desse modo de transmissão pode afetar inclusive ensaios biológicos, como realizados no **Capítulo 1**, podendo tornar ainda mais difícil a avaliação dos efeitos do BaCV em separado. Não constatamos a transmissão vertical do BaCV em nenhuma das cultivares, pelo menos entre os 95 feijoeiros avaliados (50 'Pérola' no experimento II, 20 e 25 em II e IV, respectivamente), mas para elucidar a questão um maior número de sementes precisaria ser avaliado. A transmissão por sementes ainda não foi relatada para vírus da família *Rhabdoviridae* (MANN; DIETZGEN, 2014; WALKER et al., 2021) e também não foi observada para o PpVE em mamão ou *M. lathyroides* (CORNEJO-FRANCO et al., 2021). Este é o primeiro relato de transmissão por sementes de CPMMV em feijoeiro comum no Brasil ocorrendo em duas cultivares e tal fato só pôde ser identificado com a combinação de métodos de diagnose.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos até o momento mostram que o BaCV é um vírus recém identificado, mas que ao combinarmos ensaios biológicos e moleculares foi possível expandir significativamente sua caracterização incluindo a transmissão, a ocorrência no Brasil e no mundo e a ampliação de sua gama de hospedeiras.

Após a transmissão experimental do BaCV pela mosca branca ter sido demonstrada para feijão, soja e caupi, foi possível detectar sua ocorrência em amostras coletadas em lavouras comerciais e experimentais de feijão e/ou soja em cinco estados brasileiros. Além disso, as amostras foram também avaliadas quanto à infecção por BGMV e CPMMV, ambos patógenos das culturas do feijão e soja também transmitidos pela mosca branca.

Estabelecemos um protocolo para sequenciamento de genomas de BaCV utilizando o MinION. Inicialmente, tentamos amplificar isolados de feijão e soja utilizando *primers* desenhados previamente com o propósito de recuperar a sequência identificada por HTS publicada em 2019, mas a eficiência da amplificação foi baixa. Partimos então para a implementação de uma metodologia utilizada para sequenciamento de vírus humano, em que novos *primers* foram desenhados a partir do alinhamento de todas as sequências relacionadas ao BaCV disponíveis e sequências não publicadas do nosso grupo (sequenciamento Illumina). Os novos *primers* foram utilizados em RT-PCRs do tipo *multiplex* em amostras de feijão comum, soja e *P. cacao*. Dois isolados de feijão (um oriundo da Bahia e outro de Minas Gerais), um de soja e outro de *P. cacao* ambos do Distrito Federal foram amplificados e sequenciados.

A partir de análises de dados disponíveis em banco de dados público, identificamos sequências relacionadas ao BaCV em 17 transcriptomas. Genomas foram montados a partir de sequências de oito hospedeiras, sendo duas já conhecidas (a soja caracterizada nesse trabalho e mamão por MEDINA-SALGUERO et al. (2019)) e seis novas: *Psophocarpus tetragonolobus*, *Mucuna pruriens*, *G. hirsutum*, *Stylosanthes guianensis*, *Ruta angustifolia* e *Corchorus capsularis*. Os novos genomas obtidos são provenientes de amostras foliares, de caule, óvulo *in vitro*, vagens e raízes de amostras do México, China, Índia e Malásia. Com isso, além da ampliação na gama de hospedeiras, foi possível ampliar o conhecimento acerca dos tecidos em que o vírus pode ser detectado (havíamos detectado previamente por RT-PCR e MET em folha e raiz de feijoeiro), bem como a distribuição do vírus no mundo.

A organização genômica, filogeografia e diversidade genética de 36 sequências (12 disponíveis no GenBank e 24 obtidas nesse trabalho) foram avaliadas. Alguns genomas apresentam uma organização peculiar em que genes canônicos como M e/ou G não são observados sugerindo uma adaptação do vírus ao modo de propagação vegetativa adotado em citrus e em *R. angustifolia*. Quanto aos genes acessórios, todos os genomas apresentam P3, já P4 não ocorre nos três genomas identificados em citrus na China e em mamoeiro no Equador (PpVE). Ao avaliarmos um maior número de sequências relacionadas ao BaCV, foi possível ampliar o conhecimento sobre sua diversidade genética que mostrou ser superior a 20%. Para as sequências brasileiras, foi observada uma maior diversidade genética com a ocorrência de dois grupos filogenéticos: um grupo com genomas com maior identidade com o primeiro BaCV sequenciado (GO, 2014) e com genomas de amostras do México, Equador e Índia, e outro grupo apenas com genomas identificados em amostras coletadas em BA. Futuramente, a inclusão de novos isolados às análises pode contribuir para a elucidação do local de origem do ancestral da espécie *Papaya cytorhabdovirus* e das rotas de dispersão desses vírus.

Devido à frequente detecção do BaCV associado ao CPMMV e por ser uma prática comum no país o semeio de grãos de feijão colhidos em safras anteriores, avaliamos a transmissão por semente de ambos os vírus em duas cultivares Pérola e BRS FC 401 RMD que é imune ao BGMV. Detectamos a ocorrência da transmissão do CPMMV por sementes em taxas de 10% a 45%, a depender da cultivar e do experimento empregado para a obtenção das sementes utilizadas. Avaliamos plantas que germinaram de sementes coletadas aleatoriamente em campo comercial e experimental (e sem conhecimento de infecção prévia) e de sementes coletadas em plantas sabidamente infectadas por BaCV e/ou CPMMV que haviam sido inoculadas mecanicamente ou por mosca branca.

Com os resultados tomados em conjunto, sugere-se o monitoramento do BaCV, tendo em vista que o vírus pode ser encontrado em uma grande variedade de plantas incluindo culturas de grande relevância econômica para o Brasil como feijão, soja, mamão e maracujá e, que além de desconhecermos ainda seus efeitos nas mais diferentes hospedeiras, o BaCV é eficientemente transmitido por um dos vetores mais abundantes no mundo, a mosca branca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCALA-BRISENO, R. I.; CASARRUBIAS-CASTILLO, K.; LOPEZ-LEY, D.; GARRETT, K. A.; SILVA-ROSALES, L. Network Analysis of the Papaya Orchard Virome from Two Agroecological Regions of Chiapas, Mexico. **mSystems**, v. 5, n. 1, p., 2020.
- ALMEIDA, A. M. R.; PIUGA, F. F.; KITAJIMA, E. W.; GASPAR, J. O.; VALENTIN, N.; BENATO, L. C.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; OLIVEIRA, T. G.; BELINTANI, P.; GUERZONI, R. A.; NUNES JUNIOR, J.; HOFFMANN, L.; NORA, P. S.; NEPOMUCENO, A. L.; MEYER, M. C.; ALMEIDA, L. A. **Necrose da haste da soja**, 2003.
- ALMEIDA, A. M. R.; PIUGA, F. F.; MARIN, S. R. R.; KITAJIMA, E. W.; GASPAR, J. O.; OLIVEIRA, T. G.; MORAES, T. G. Detection and Partial Characterization of a Carlavirus Causing Stem Necrosis of Soybean in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n., p. 191-194, 2005.
- ALVES-FREITAS, D. M. T.; MELO, F. L.; FARIA, J. C.; RIBEIRO, S. G. dsRNA deep sequencing reveals five viral species in common beans. **Journal of the Brazilian Society for Virology**, v. 20, n., p. 43-44, 2016.
- ALVES-FREITAS, D. M. T.; PINHEIRO-LIMA, B.; FARIA, J. C.; LACORTE, C.; RIBEIRO, S. G.; MELO, F. L. Double-Stranded RNA High-Throughput Sequencing Reveals a New Cytorhabdovirus in a Bean Golden Mosaic Virus-Resistant Common Bean Transgenic Line. **Viruses**, v. 11, n. 1, p., 2019.
- AMMAR EL, D.; HOGENHOUT, S. A. A neurotropic route for Maize mosaic virus (*Rhabdoviridae*) in its planthopper vector *Peregrinus maidis*. **Virus Res**, v. 131, n. 1, p. 77-85, 2008.
- AMMAR EL, D.; TSAI, C. W.; WHITFIELD, A. E.; REDINBAUGH, M. G.; HOGENHOUT, S. A. Cellular and molecular aspects of rhabdovirus interactions with insect and plant hosts. **Annu Rev Entomol**, v. 54, n., p. 447-468, 2009.
- ANTIPOV, D.; RAIKO, M.; LAPIDUS, A.; PEVZNER, P. A. Metaviral SPAdes: assembly of viruses from metagenomic data. **Bioinformatics**, v. 36, n. 14, p. 4126-4129, 2020.
- ARIAS, C. A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; MITUTI, T.; KITAJIMA, E. W. Inheritance of tolerance to Cowpea Mild Mottle Virus in soybean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, n., p. 132-138, 2015.
- BAEK, D.; LIM, S.; JU, H. J.; KIM, H. R.; LEE, S. H.; MOON, J. S. The complete genome sequence of apple rootstock virus A, a novel nucleorhabdovirus identified in apple rootstocks. **Arch Virol**, v. 164, n. 10, p. 2641-2644, 2019.
- BARRETO DA SILVA, F.; MULLER, C.; BELLO, V. H.; WATANABE, L. F. M.; ROSSITTO DE MARCHI, B.; FUSCO, L. M.; RIBEIRO-JUNIOR, M. R.; MINOZZI, G. B.; VIVAN, L. M.; TAMAI, M. A.; FARIAS, J. R.; NOGUEIRA, A. M.; SARTORI, M. M. P.; KRAUSE-SAKATE, R. Effects of cowpea mild mottle virus on soybean cultivars in Brazil. **PeerJ**, v. 8, n., p. e9828, 2020.

BEJERMAN, N.; DIETZGEN, R. G. Letter to the Editor: Bean-Associated Cytorhabdovirus and Papaya Cytorhabdovirus are Strains of the Same Virus. **Viruses**, v. 11, n. 3, p., 2019.

BEJERMAN, N.; DEBAT, H.; DIETZGEN, R. G. The Plant Negative-Sense RNA Virosphere: Virus Discovery Through New Eyes. **Front Microbiol**, v. 11, n., p. 588427, 2020.

BELLO, V. H.; WATANABE, L. F. M.; FUSCO, L. M.; DE MARCHI, B. R.; DA SILVA, F. B.; GORAYEB, E. S.; MOURA, M. F.; DE SOUZA, I. M.; MULLER, C.; SALAS, F. J. S.; YUKI, V. A.; BUENO, R.; PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R. Outbreaks of *Bemisia tabaci* Mediterranean species in vegetable crops in Sao Paulo and Parana States, Brazil. **Bull Entomol Res**, v. 110, n. 4, p. 487-496, 2020.

BEN CHEHIDA, S.; FILLOUX, D.; FERNANDEZ, E.; MOUBSET, O.; HOAREAU, M.; JULIAN, C.; BLONDIN, L.; LETT, J. M.; ROUMAGNAC, P.; LEFEUVRE, P. Nanopore Sequencing Is a Credible Alternative to Recover Complete Genomes of Geminiviruses. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p., 2021.

BITOCCHI, E.; BELLUCCI, E.; GIARDINI, A.; RAU, D.; RODRIGUEZ, M.; BIAGETTI, E.; SANTILOCCHI, R.; SPAGNOLETTI ZEULI, P.; GIOIA, T.; LOGOZZO, G.; ATTENE, G.; NANNI, L.; PAPA, R. Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. **New Phytol**, v. 197, n. 1, p. 300-313, 2013.

BLANC, S.; MICHALAKIS, Y. Manipulation of hosts and vectors by plant viruses and impact of the environment. **Curr Opin Insect Sci**, v. 16, n., p. 36-43, 2016.

BOCK, C. H.; PETHYBRIDGE, S. J.; BARBEDO, J. G. A.; ESKER, P. D.; MAHLEIN, A.-K.; DEL PONTE, E. M. A phytopathometry glossary for the twenty-first century: towards consistency and precision in intra- and inter-disciplinary dialogues. **Tropical Plant Pathology**, v., n., p., 2021.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BONFIM, K.; FARIA, J. C.; NOGUEIRA, E. O.; MENDES, E. A.; ARAGAO, F. J. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Mol Plant Microbe Interact**, v. 20, n. 6, p. 717-726, 2007.

BORGES, A.; TSAI, S. M.; CALDAS, D. G. Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. **Plant Cell Rep**, v. 31, n. 5, p. 827-838, 2012.

BORGES, R. C. F.; FONTES, M. G.; MACEDO, M. A.; LIMA, M. F.; BOITEUX, L. S.; FONSECA, M. E. N. First Report of Tomato Chlorosis Virus Infecting *Tectona grandis* Associated With Infestation of *Bemisia tabaci* Mediterranean in Central Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 10, p. 2704, 2019.

BOSCO, D.; LORIA, A.; SARTOR, C.; CENIS, J. PCR-RFLP Identification of *Bemisia tabaci* biotypes in the Mediterranean Basin. **Phytoparasitica**, v. 34, n., p. 243-251, 2006.

BRITO, M.; FERNANDEZ-RODRIGUEZ, T.; GARRIDO, M. J.; MEJIAS, A.; ROMANO, M.; MARYS, E. First report of Cowpea mild mottle Carlavirus on yardlong bean (*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis*) in Venezuela. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3804-3811, 2012.

BRONZATO BADIAL, A.; SHERMAN, D.; STONE, A.; GOPAKUMAR, A.; WILSON, V.; SCHNEIDER, W.; KING, J. Nanopore Sequencing as a Surveillance Tool for Plant Pathogens in Plant and Insect Tissues. **Plant Dis**, v. 102, n. 8, p. 1648-1652, 2018.

BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.

BROWN, J. The status of *Bemisia tabaci* (Genn.) as a pest and vector in world agroecosystems. **FAO Plant Prot Bull**, v. 42, n., p. 3-32, 1994.

BROWN, J. K. Whitefly-Transmitted Geminiviruses and Associated Disorders in the Americas and the Caribbean Basin. **Plant Disease**, v. 76, n., p. 220-225, 1992.

BRUNT, A. A.; KENTEN, R. H. Cowpea mild mottle, a newly recognized virus infecting cowpeas (*Vigna unguiculata*) in Ghana. **Ann Appl Biol**, v. 74, n. 1, p. 67-74, 1973.

BRUNT, A. A.; ATKEY, P. T.; WOODS, R. D. Intracellular occurrence of cowpea mild mottle virus in two unrelated plant species. **Intervirology**, v. 20, n. 2-3, p. 137-142, 1983.

CALLAGHAN, B.; DIETZGEN, R. G. Nucleocapsid gene variability reveals two subgroups of Lettuce necrotic yellows virus. **Arch Virol**, v. 150, n. 8, p. 1661-1667, 2005.

CAO, Q.; XU, W. Y.; GAO, Q.; JIANG, Z. H.; LIU, S. Y.; FANG, X. D.; GAO, D. M.; WANG, Y.; WANG, X. B. Transmission Characteristics of Barley Yellow Striate Mosaic Virus in Its Planthopper Vector *Laodelphax striatellus*. **Front Microbiol**, v. 9, n., p. 1419, 2018.

CARVALHO, S. L.; NAGATA, T.; JUNQUEIRA, B. R.; ZANARDO, L. G.; PAIVA, A. C.; CARVALHO, C. M. Construction of a full-length infectious cDNA clone of Cowpea mild mottle virus. **Virus Genes**, v. 53, n. 1, p. 137-140, 2017.

CHANDA, B.; RIVERA, Y.; NUNZIATA, S. O.; GALVEZ, M. E.; GILLIARD, A.; LING, K. S. Complete Genome Sequence of a Tomato Brown Rugose Fruit Virus Isolated in the United States. **Microbiol Resour Announc**, v. 9, n. 29, p., 2020.

CHIQUITO-ALMANZA, E.; CABALLERO-PEREZ, J.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; MONTERO-TAVERA, V.; MARISCAL-AMARO, L. A.; ANAYA-LOPEZ, J. L. Diversity and Distribution of Viruses Infecting Wild and Domesticated *Phaseolus* spp. in the Mesoamerican Center of Domestication. **Viruses**, v. 13, n. 6, p., 2021.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira Grãos**, 2020.

CONTI, M.; APPIANO, A. Barley yellow striate mosaic virus and associated viroplasms in barley cells. **J Gen Virol**, v. 21, n. 2, p. 315-322, 1973.

CORNEJO-FRANCO, J. F.; ALVAREZ-QUINTO, R. A.; QUITO-AVILA, D. F. Transmission of the umbra-like Papaya virus Q in Ecuador and its association with meleira-related viruses from Brazil. **Crop Protection**, v. 110, n., p. 99-102, 2018.

CORNEJO-FRANCO, J. F.; REYES-PROANO, E. G.; MOLLOV, D.; MOWERY, J.; QUITO-AVILA, D. F. Transmission and pathogenicity of papaya virus E: insights from an experimental papaya orchard. **Plant Dis**, v., n., p., 2021.

COSTA, A. S. Three whitefly-transmitted diseases of beans in the State of São Paulo, Brazil. **FAO Plant Protection Bulletin**, v. 13, n., p. 121-130, 1965.

COSTA, A. S.; GASPAR, J. O.; VEGA, J. Mosaico angular do feijão jalo causado por um carlavírus transmitido pela mosca branca *Bemisia tabaci*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, n., p. 325-327, 1983.

COSTA, H. S.; BROWN, J. K. Variation in biological characteristics and esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci*, and the association of one population with silverleaf symptom induction. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 61, n. 3, p. 211-219, 1991.

COSTA, T. M.; INOUE-NAGATA, A. K.; VIDAL, A. H.; RIBEIRO, S. G.; NAGATA, T. The recombinant isolate of cucurbit aphid-borne yellows virus from Brazil is a polerovirus transmitted by whiteflies. **Plant Pathology**, v. 69, n., p. 1042-1050, 2020.

CRUZ, P. L.; BALDIN, E. L. L.; CASTRO, M. J. P.; FANELA, T. L. M.; SILVA, P. H. S. Atratividade de genótipos de feijão-caupi para oviposição de *Bemisia tabaci* biótipo B. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n., p. 1563-1571, 2012.

CZOSNEK, H.; GHANIM, M.; MORIN, S.; RUBINSTEIN, G.; FRIDMAN, V.; ZEIDAN, M. Whiteflies: vectors, and victims (?), of geminiviruses. **Adv Virus Res**, v. 57, n., p. 291-322, 2001.

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

DA SILVA RODRIGUES, C.; NAKASU, E. Y. T.; ORTIZ, G. V.; PEREIRA, J. L.; LUCENA-LEANDRO, V. D. S.; REGO-MACHADO, C. M.; SOUZA, T. A.; MARTINS, T. P.; NAGATA, A. K. I. Evidence of Spread of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Mediated by Internal Transportation of Ornamental Plants in Brazil. **Neotrop Entomol**, v. 50, n. 5, p. 850-857, 2021.

DE BARRO, P. J.; LIU, S. S.; BOYKIN, L. M.; DINSDALE, A. B. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. **Annu Rev Entomol**, v. 56, n., p. 1-19, 2011.

DE CAMARGO, I. J. B.; KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. Estudo ao microscópio eletrônico de tecidos de plantas infetadas pelo vírus do mosaico comum e mosaico amarelo do feijoeiro **Bragantia**, v. 27, n., p. 410-415, 1968.

DE CAMARGO, I. J. B.; KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. Microscopia eletrônica do vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro in situ. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, n., p., 1976.

DE MORAES, L. A.; MULLER, C.; BUENO, R.; SANTOS, A.; BELLO, V. H.; DE MARCHI, B. R.; WATANABE, L. F. M.; MARUBAYASHI, J. M.; SANTOS, B. R.; YUKI, V. A.; TAKADA, H. M.; DE BARROS, D. R.; NEVES, C. G.; DA SILVA, F. N.; GONCALVES, M. J.; GHANIM, M.; BOYKIN, L.; PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R. Distribution and phylogenetics of whiteflies and their endosymbiont relationships after the Mediterranean species invasion in Brazil. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 14589, 2018.

DE OLIVEIRA, A. S.; MELO, F. L.; INOUE-NAGATA, A. K.; NAGATA, T.; KITAJIMA, E. W.; RESENDE, R. O. Characterization of bean necrotic mosaic virus: a member of a novel evolutionary lineage within the Genus *Tospovirus*. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38634, 2012.

DELLA BARTOLA, M.; BYRNE, S.; MULLINS, E. Characterization of Potato Virus Y Isolates and Assessment of Nanopore Sequencing to Detect and Genotype Potato Viruses. **Viruses**, v. 12, n. 4, p., 2020.

DIETZGEN, R. G.; CALISHER, C. H.; KURATH, G.; KUZMIN, I. V.; RODRIGUEZ, L. L.; STONE, D. M.; TESH, R. B.; TORDO, N.; WALKER, P. J.; WETZEL, T.; WHITFIELD, A. E. Family *Rhabdoviridae*. In: (Ed.). **Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses: Classification and Nomenclature of Viruses**.: Elsevier, 2011, p.686-713.

DIETZGEN, R. G.; KUHN, J. H.; CLAWSON, A. N.; FREITAS-ASTUA, J.; GOODIN, M. M.; KITAJIMA, E. W.; KONDO, H.; WETZEL, T.; WHITFIELD, A. E. Dichorhavirus: a proposed new genus for Brevipalpus mite-transmitted, nuclear, bacilliform, bipartite, negative-strand RNA plant viruses. **Arch Virol**, v. 159, n. 3, p. 607-619, 2014.

DIETZGEN, R. G.; MANN, K. S.; JOHNSON, K. N. Plant Virus-Insect Vector Interactions: Current and Potential Future Research Directions. **Viruses**, v. 8, n. 11, p., 2016.

DIETZGEN, R. G.; KONDO, H.; GOODIN, M. M.; KURATH, G.; VASILAKIS, N. The family *Rhabdoviridae*: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins. **Virus Res**, v. 227, n., p. 158-170, 2017.

DIETZGEN, R. G.; BEJERMAN, N. E.; GOODIN, M. M.; HIGGINS, C. M.; HUOT, O. B.; KONDO, H.; MARTIN, K. M.; WHITFIELD, A. E. Diversity and epidemiology of plant rhabdoviruses. **Virus Res**, v. 281, n., p. 197942, 2020.

DING, X.; CHEN, D.; DU, Z.; ZHANG, J.; WU, Z. The complete genome sequence of a novel cytorhabdovirus identified in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). **Arch Virol**, v. 164, n. 12, p. 3127-3131, 2019.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n., p. 11-15, 1987.

DRUCKER, M.; THEN, C. Transmission activation in non-circulative virus transmission: a general concept? **Curr Opin Virol**, v. 15, n., p. 63-68, 2015.

EDGAR, R. C.; TAYLOR, J.; LIN, V.; ALTMAN, T.; BARBERA, P.; MELESHKO, D.; LOHR, D.; NOVAKOVSKY, G.; BUCHFINK, B.; AL-SHAYEB, B.; BANFIELD, J. F.; DE LA PEÑA, M.; KOROBAYNIKOV, A.; CHIKHI, R.; BABAIA, A. Petabase-scale sequence alignment catalyses viral discovery. **bioRxiv**, v., n., p. 2020.2008.2007.241729, 2021.

FAO. **FAOSTAT Statistical Databases**, 2018.

FAO. **FAOSTAT Statistical Databases**, 2019.

FARIA, J. C.; ARAGÃO, F. J. L.; SOUZA, T. L. P. O.; QUINTELA, E. D.; KITAJIMA, E. W.; RIBEIRO, S. G. Golden mosaic of common beans in Brazil: management with a transgenic approach. **APS Features**, v. 10, n., p. 1-14, 2016.

FERNANDES-ACIOLI, N. A. N.; PEREIRA-CARVALHO, R. C.; FONTENELE, R. S.; LACORTE, C.; RIBEIRO, S. G.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S. First Report of Sida micrantha mosaic virus in *Phaseolus vulgaris* in Brazil. **Plant Disease**, v. 95, n., p. 1196-1196, 2011.

FERNANDES, F. R.; CRUZ, A. R.; FARIA, J. C.; ZERBINI, F. M.; ARAGAO, F. J. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. **Arch Virol**, v. 154, n. 9, p. 1567-1570, 2009.

FIALLO-OLIVE, E.; PAN, L. L.; LIU, S. S.; NAVAS-CASTILLO, J. Transmission of Begomoviruses and Other Whitefly-Borne Viruses: Dependence on the Vector Species. **Phytopathology**, v. 110, n. 1, p. 10-17, 2020.

FILLOUX, D.; FERNANDEZ, E.; LOIRE, E.; CLAUDE, L.; GALZI, S.; CANDRESSE, T.; WINTER, S.; JEEVA, M. L.; MAKESHKUMAR, T.; MARTIN, D. P.; ROUMAGNAC, P. Nanopore-based detection and characterization of yam viruses. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 17879, 2018.

FONTENELE, R. S.; ABREU, R. A.; LAMAS, N. S.; ALVES-FREITAS, D. M. T.; VIDAL, A. H.; POPPIEL, R. R.; MELO, F. L.; LACORTE, C.; MARTIN, D. P.; CAMPOS, M. A.; VARSANI, A.; RIBEIRO, S. G. Passion Fruit Chlorotic Mottle Virus: Molecular Characterization of a New Divergent Geminivirus in Brazil. **Viruses**, v. 10, n. 4, p., 2018.

FONTENELE, R. S.; SALLYWON, A. M.; MAJURE, L. C.; COBB, I. N.; BHASKARA, A.; AVALOS-CALLEROS, J. A.; ARGUELLO-ASTORGA, G. R.; SCHMIDLIN, K.; KHALIFEH, A.; SMITH, K.; SCHRECK, J.; LUND, M. C.; KOHLER, M.; WOJCIECHOWSKI, M. F.; HODGSON, W. C.; PUENTE-MARTINEZ, R.; VAN DOORSLAER, K.; KUMARI, S.; VERNIERE, C.; FILLOUX, D.; ROUMAGNAC, P.; LEFEUVRE, P.; RIBEIRO, S. G.; KRABERGER, S.; MARTIN, D. P.; VARSANI, A. A Novel Divergent Geminivirus Identified in Asymptomatic New World Cactaceae Plants. **Viruses**, v. 12, n. 4, p., 2020.

FRANCKI, R. I. B.; RANGLES, J. W.; DIETZGEN, R. G. Lettuce necrotic yellows virus. **AAB Descriptions of Plant Viruses**, v. 343, n., p., 1989.

FRANOVA, J.; PRIBYLOVA, J.; KOLONIUK, I. Molecular and Biological Characterization of a New Strawberry Cytorhabdovirus. **Viruses**, v. 11, n. 11, p., 2019.

FREED, N. E.; VLKOVA, M.; FAISAL, M. B.; SILANDER, O. K. Rapid and inexpensive whole-genome sequencing of SARS-CoV-2 using 1200 bp tiled *amplicons* and Oxford Nanopore Rapid Barcoding. **Biol Methods Protoc**, v. 5, n. 1, p. bpaa014, 2020.

FREITAS-ASTUA, J.; DIETZGEN, R. G.; WALKER, P. J.; BLASDELL, K. R.; BREYTA, R.; FOOKS, A. R.; KONDO, H.; KURATH, G.; KUZMIN, I. V.; STONE, D. M.; TESH, R. B.; TORDO, N.; VASILAKIS, N.; WHITFIELD, A. E.; RAMOS-GONZALEZ, P. L. Create twelve new species in the genus Cytorhabdovirus, family *Rhabdoviridae*. **Approved ICTV Proposal**, v., n., p., 2019.

FROSHEISER, F. I. Alfalfa Mosaic Virus Transmission to Seed Through Alfalfa Gametes and Longevity in Alfalfa Seed. **Phytopathology**, v. 64, n., p. 102-105, 1974.

GAAFAR, Y. Z. A.; RICHERT-POGGELER, K. R.; MAASS, C.; VETTEN, H. J.; ZIEBELL, H. Characterisation of a novel nucleorhabdovirus infecting alfalfa (*Medicago sativa*). **Virol J**, v. 16, n. 1, p. 55, 2019.

GAO, Q.; YAN, T.; ZHANG, Z. J.; LIU, S. Y.; FANG, X. D.; GAO, D. M.; YANG, Y. Z.; XU, W. Y.; QIAO, J. H.; CAO, Q.; DING, Z. H.; WANG, Y.; YU, J.; WANG, X. B. Casein Kinase 1 Regulates Cytorhabdovirus Replication and Transcription by Phosphorylating a Phosphoprotein Serine-Rich Motif. **Plant Cell**, v. 32, n. 9, p. 2878-2897, 2020.

GAUTAM, S.; GADHAVE, K. R.; BUCK, J. W.; DUTTA, B.; COOLONG, T.; ADKINS, S.; SRINIVASAN, R. Virus-virus interactions in a plant host and in a hemipteran vector: Implications for vector fitness and virus epidemics. **Virus Res**, v. 286, n., p. 198069, 2020.

GERLT, J. A.; BOUVIER, J. T.; DAVIDSON, D. B.; IMKER, H. J.; SADKHIN, B.; SLATER, D. R.; WHALEN, K. L. Enzyme Function Initiative-Enzyme Similarity Tool (EFI-EST): A web tool for generating protein sequence similarity networks. **Biochim Biophys Acta**, v. 1854, n. 8, p. 1019-1037, 2015.

GHOSH, S.; KANAKALA, S.; LEBEDEV, G.; KONTSEDALOV, S.; SILVERMAN, D.; ALON, T.; MOR, N.; SELA, N.; LURIA, N.; DOMBROVSKY, A.; MAWASSI, M.; HAVIV, S.; CZOSNEK, H.; GHANIM, M. Transmission of a New Polerovirus Infecting Pepper by the Whitefly *Bemisia tabaci*. **J Virol**, v. 93, n. 15, p., 2019.

GIGANTE, C. M.; YALE, G.; CONDORI, R. E.; COSTA, N. C.; LONG, N. V.; MINH, P. Q.; CHUONG, V. D.; THO, N. D.; THANH, N. T.; THIN, N. X.; HANH, N. T. H.; WAMBURA, G.; ADE, F.; MITO, O.; CHUCHU, V.; MUTURI, M.; MWATONDO, A.; HAMPSON, K.; THUMBI, S. M.; THOMAE, B. G.; DE PAZ, V. H.; MENESES, S.; MUNYUA, P.; MORAN, D.; CADENA, L.; GIBSON, A.; WALLACE, R. M.; PIERACCI, E. G.; LI, Y. Portable Rabies Virus Sequencing in Canine Rabies Endemic Countries Using the Oxford Nanopore MinION. **Viruses**, v. 12, n. 11, p., 2020.

GILBERTSON, R. L.; BATUMAN, O.; WEBSTER, C. G.; ADKINS, S. Role of the Insect Supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the Emergence and Global Spread of Plant Viruses. **Annu Rev Virol**, v. 2, n. 1, p. 67-93, 2015.

GOLLIFER, D. E.; JACKSON, G. V. H.; DABEK, A. J.; PLUMB, R. T.; MAY, Y. Y. The occurrence and transmission of viruses of edible aroids in the Solomon Islands and the Southwest Pacific. **Pesticide Articles and News Summaries**, v. 23, n., p. 171-177, 1977.

GUIMARÃES, E. P.; SOUZA, T. L. P. O. Feijão Comum: o uso de sementes certificadas na cadeia produtiva. **Seed News**, v. 23, n., p. 30-35, 2019.

HAIJZADEH, M.; ZANDAN, N. G. Iranian Strawberry crinkle cytorhabdovirus variation assessed using its movement protein (P3) gene. **Mol Biol Rep**, v. 48, n. 10, p. 7035-7040, 2021.

HAMPSON, K.; COUDEVILLE, L.; LEMBO, T.; SAMBO, M.; KIEFFER, A.; ATTLAN, M.; BARRAT, J.; BLANTON, J. D.; BRIGGS, D. J.; CLEVELAND, S.; COSTA, P.; FREULING, C. M.; HIBY, E.; KNOPF, L.; LEANES, F.; MESLIN, F. X.; METLIN, A.; MIRANDA, M. E.; MULLER, T.; NEL, L. H.; RECUENCO, S.; RUPPRECHT, C. E.; SCHUMACHER, C.; TAYLOR, L.; VIGILATO, M. A.; ZINSSTAG, J.; DUSHOFF, J.; GLOBAL ALLIANCE FOR RABIES CONTROL PARTNERS FOR RABIES, P. Estimating the global burden of endemic canine rabies. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 4, p. e0003709, 2015.

HAMPTON, R. O.; ALBRECHTSEN, S. E.; MATHUR, S. B. Seed health (viruses) of *Vigna unguiculata* selections from developing countries. **Seed Science and Technology**, v. 20, n., p. 23-38, 1992.

HE, Y. Z.; WANG, Y. M.; YIN, T. Y.; FIALLO-OLIVE, E.; LIU, Y. Q.; HANLEY-BOWDOIN, L.; WANG, X. W. A plant DNA virus replicates in the salivary glands of its insect vector via recruitment of host DNA synthesis machinery. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 117, n. 29, p. 16928-16937, 2020.

HERRERA-VÁSQUEZ, J. A.; CÓRDOBA-SELLÉS, M. C.; CEBRIÁN, M. C.; ALFARO-FERNÁNDEZ, A.; JORDÁ, C. Seed transmission of Melon necrotic spot virus and efficacy of seed-disinfection treatments. **Plant Pathology**, v. 58, n. 3, p. 436-442, 2009.

HIGGINS, C. M.; CHANG, W. L.; KHAN, S.; TANG, J.; ELLIOTT, C.; DIETZGEN, R. G. Diversity and evolutionary history of lettuce necrotic yellows virus in Australia and New Zealand. **Arch Virol**, v. 161, n. 2, p. 269-277, 2016.

HIRAKURI, M. H.; CONTE, O.; PRANDO, A. M.; CASTRO, C.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; CAMPOS, L. J. M. **Diagnóstico da produção de soja na macrorregião sojícola 5**, 2018.

HOGENHOUT, S. A.; REDINBAUGH, M. G.; AMMAR EL, D. Plant and animal rhabdovirus host range: a bug's view. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 6, p. 264-271, 2003.

HOGENHOUT, S. A.; AMMAR EL, D.; WHITFIELD, A. E.; REDINBAUGH, M. G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annu Rev Phytopathol**, v. 46, n., p. 327-359, 2008.

HOPKINS, R. J.; VAN DAM, N. M.; VAN LOON, J. J. Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. **Annu Rev Entomol**, v. 54, n., p. 57-83, 2009.

HORN, N. M.; SALEH, N.; BALIADI, Y. Cowpea mild mottle virus could not be detected by ELISA in soybean and groundnut seeds in Indonesia. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 97, n. 2, p. 125-127, 1991.

HUSSAIN, S.; FAROOQ, M.; MALIK, H. J.; AMIN, I.; SCHEFFLER, B. E.; SCHEFFLER, J. A.; LIU, S. S.; MANSOOR, S. Whole genome sequencing of Asia II 1 species of whitefly reveals that genes involved in virus transmission and insecticide resistance have genetic variances between Asia II 1 and MEAM1 species. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 507, 2019.

INOUE-NAGATA, A. K.; LIMA, M. F.; GILBERTSON, R. L. A review of geminivirus (begomovirus) diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n., p. 008-018, 2016.

IWAKI, M.; THONGMEEARKOM, P.; PROMMIN, M.; HONDA, Y.; HIBI, T. Whitefly Transmission and Some Properties of Cowpea Mild Mottle Virus on Soybean in Thailand. **Plant Disease**, v. 66, n., p. 365-368, 1982.

JACKSON, A. O.; DIETZGEN, R. G.; GOODIN, M. M.; BRAGG, J. N.; DENG, M. Biology of plant rhabdoviruses. **Annu Rev Phytopathol**, v. 43, n., p. 623-660, 2005.

JACKSON, A. O.; LI, Z. Developments in Plant Negative-Strand RNA Virus Reverse Genetics. **Annu Rev Phytopathol**, v. 54, n., p. 469-498, 2016.

JACKSON, A. O.; DIETZGEN, R. G.; GOODIN, M. M.; LI, Z. Development of Model Systems for Plant Rhabdovirus Research. **Adv Virus Res**, v. 102, n., p. 23-57, 2018.

JIANG, C.; LIU, L.; LI, X.; HAN, R.; WEI, Y.; YU, Y. Insights into aluminum-tolerance pathways in *Stylosanthes* as revealed by RNA-Seq analysis. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 6072, 2018.

JONES, R. A. C.; PROUDLOVE, W. Further studies on cucumber mosaic virus infection of narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius*): seed-borne infection, aphid transmission, *spread* and effects on grain yield. **Annals of Applied Biology**, v. 118, n. 2, p. 319-329, 1991.

JONES, S.; MCGAVIN, W.; MACFARLANE, S. The complete sequences of two divergent variants of the rhabdovirus raspberry vein chlorosis virus and the design of improved *primers* for virus detection. **Virus Res**, v. 265, n., p. 162-165, 2019.

KAMAL, L. Z. M.; ADAM, M. A. A.; SHAHPUDIN, S. N. M.; SHUIB, A. N.; SANDAI, R.; HASSAN, N. M.; TABANA, Y.; BASRI, D. F.; THAN, L. T. L.; SANDAI, D. Identification of Alkaloid Compounds Arborinine and Graveoline from *Ruta angustifolia* (L.) Pers for their Antifungal Potential against Isocitrate lyase (ICL1) gene of *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v. 186, n. 2, p. 221-236, 2021.

KANAKALA, S.; GHANIM, M. Global genetic diversity and geographical distribution of *Bemisia tabaci* and its bacterial endosymbionts. **PLoS One**, v. 14, n. 3, p. e0213946, 2019.

KANG, X.; CAI, J.; CHEN, Y.; YAN, Y.; YANG, S.; HE, R.; WANG, D.; ZHU, Y. Pod-shattering characteristics differences between two groups of soybeans are associated with specific changes in gene expression. **Funct Integr Genomics**, v. 20, n. 2, p. 201-210, 2020.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Brief Bioinform**, v. 20, n. 4, p. 1160-1166, 2019.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop *software* platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

KLERKS, M. M.; LINDNER, J. L.; VAŠKOVA, D.; ŠPAK, J.; THOMPSON, J. R.; JELKMANN, W.; SCHOEN, C. D. Detection and Tentative Grouping of Strawberry crinkle virus Isolates. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, n. 1, p. 45-52, 2004.

KNIGHT, M. R.; JENKINS, G. I. Genes encoding the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in *Phaseolus vulgaris* L.: nucleotide sequence of cDNA clones and initial studies of expression. **Plant Mol Biol**, v. 18, n. 3, p. 567-579, 1992.

LAMAS, N. S.; MATOS, V. O. R. L.; ALVES-FREITAS, D. M. T.; MELO, F. L.; COSTA, A. F.; FARIA, J. C.; RIBEIRO, S. G. Occurrence of Cowpea mild mottle virus in Common Bean and Associated Weeds in Northeastern Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n., p. 1828, 2017.

LAMPRECHT, R. L.; KASDORF, G. G. F.; STILLER, M.; STAPLES, S. M.; NEL, L. H.; PIETERSEN, G. Soybean blotchy mosaic virus, a New Cytorhabdovirus Found in South Africa. **Plant Dis**, v. 94, n. 11, p. 1348-1354, 2010.

LEE, W.; PARK, J.; LEE, G. S.; LEE, S.; AKIMOTO, S. Taxonomic status of the *Bemisia tabaci* complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and reassessment of the number of its constituent species. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63817, 2013.

LI, C. X.; SHI, M.; TIAN, J. H.; LIN, X. D.; KANG, Y. J.; CHEN, L. J.; QIN, X. C.; XU, J.; HOLMES, E. C.; ZHANG, Y. Z. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. **Elife**, v. 4, n., p., 2015.

LU, H.; GIORDANO, F.; NING, Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 14, n. 5, p. 265-279, 2016.

MAHMOUD HAMDY ABD, E.-A. Incidence and disease control of Zucchini yellow mosaic potyvirus. **Journal of Plant Science and Phytopathology**, v. 4, n. 2, p. 033-035, 2020.

MANN, K. S.; DIETZGEN, R. G. Plant rhabdoviruses: new insights and research needs in the interplay of negative-strand RNA viruses with plant and insect hosts. **Arch Virol**, v. 159, n. 8, p. 1889-1900, 2014.

MARTIN, K. M.; WHITFIELD, A. E. Complete Genome Sequence of Maize Mosaic Nucleorhabdovirus. **Microbiol Resour Announc**, v. 8, n. 29, p., 2019.

MARTINS, D. S.; LIMA, A. F.; FORNAZIER, M. J.; BARCELLOS, B. D.; QUEIROZ, R. B.; FANTON, C. J.; ZANUNCIO-JUNIOR, J. S.; FORNAZIER, D. L. WHITEFLIES (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) ASSOCIATED WITH PAPAYA (*Carica papaya* L.). **Revista Científica Intelletto**, v. 2, n., p. 78-86, 2016.

MARTINS, T. P.; SOUZA, T. A.; DA SILVA, P. S.; NAKASU, E. Y. T.; MELO, F. L.; INOUE-NAGATA, A. K.; NAGATA, T. Nanopore sequencing of tomato mottle leaf distortion virus, a new bipartite begomovirus infecting tomato in Brazil. **Arch Virol**, v. 166, n. 11, p. 3217-3220, 2021.

MAURINO, F.; DUMON, A. D.; LLAUGER, G.; ALEMANDRI, V.; DE HARO, L. A.; MATTIO, M. F.; DEL VAS, M.; LAGUNA, I. G.; GIMENEZ PECCI, M. P. Complete genome sequence of maize yellow striate virus, a new cytorhabdovirus infecting maize and wheat crops in Argentina. **Arch Virol**, v. 163, n. 1, p. 291-295, 2018.

MAURINO, M. F.; LAGUNA, G.; GIOLITTI, F.; NOME, C.; PECCI, M. P. G. First Occurrence of a Rhabdovirus Infecting Maize in Argentina. **Plant Dis**, v. 96, n. 9, p. 1383, 2012.

MEBATION, T.; KONIG, M.; CONZELMANN, K. K. Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 941-951, 1996.

MEDINA-SALGUERO, A. X.; CORNEJO-FRANCO, J. F.; GRINSTEAD, S.; MOLLOV, D.; MOWERY, J. D.; FLORES, F.; QUITO-AVILA, D. F. Sequencing, genome analysis and prevalence of a cytorhabdovirus discovered in *Carica papaya*. **PLoS One**, v. 14, n. 6, p. e0215798, 2019.

MENZEL, W.; WINTER, S.; VETTEN, H. J. Complete nucleotide sequence of the type isolate of Cowpea mild mottle virus from Ghana. **Arch Virol**, v. 155, n. 12, p. 2069-2073, 2010.

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

MIHARA, T.; NISHIMURA, Y.; SHIMIZU, Y.; NISHIYAMA, H.; YOSHIKAWA, G.; UEHARA, H.; HINGAMP, P.; GOTO, S.; OGATA, H. Linking Virus Genomes with Host Taxonomy. **Viruses**, v. 8, n. 3, p. 66, 2016.

MONTES, N.; PAGAN, I. Light Intensity Modulates the Efficiency of Virus Seed Transmission through Modifications of Plant Tolerance. **Plants (Basel)**, v. 8, n. 9, p., 2019.

MORENO, A. B.; LOPEZ-MOYA, J. J. When Viruses Play Team Sports: Mixed Infections in Plants. **Phytopathology**, v. 110, n. 1, p. 29-48, 2020.

MOUTAILLER, S.; ROCHE, B.; THIBERGE, J. M.; CARO, V.; ROUGEON, F.; FAILLOUX, A. B. Host alternation is necessary to maintain the genome stability of rift valley fever virus. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 5, p. e1156, 2011.

MUHIRE, B. M.; VARSANI, A.; MARTIN, D. P. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e108277, 2014.

MWAIPOPO, B.; NCHIMBI-MSOLLA, S.; NJAU, P. J. R.; MARK, D.; MBANZIBWA, D. R. Comprehensive Surveys of Bean common mosaic virus and Bean common mosaic necrosis virus and Molecular Evidence for Occurrence of Other *Phaseolus vulgaris* Viruses in Tanzania. **Plant Dis**, v. 102, n. 11, p. 2361-2370, 2018.

NAITO, F. Y. B.; MELO, F. L.; FONSECA, M. E. N.; SANTOS, C. A. F.; CHANES, C. R.; RIBEIRO, B. M.; GILBERTSON, R. L.; BOITEUX, L. S.; DE CASSIA PEREIRA-CARVALHO, R. Nanopore sequencing of a novel bipartite New World begomovirus infecting cowpea. **Arch Virol**, v. 164, n. 7, p. 1907-1910, 2019.

NEYA, B. J.; ZABRE, J.; MILLOGO, R. J.; GINKO, S.; KONATE, G. Effect of cowpea seeds contamination rate by the Cowpea aphid borne mosaic virus on epidemics development. **Pak J Biol Sci**, v. 10, n. 24, p. 4365-4374, 2007.

NICOLINI, C.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P.; MELO, F. L.; OLIVEIRA, V. C.; GUIMARAES, F. C.; RESENDE, R. O.; KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A.; NAGATA, T. A distinct tymovirus infecting *Cassia hoffmannseggii* in Brazil. **Virus Genes**, v. 45, n. 1, p. 190-194, 2012.

OLITSKY, P. K. Physical, Chemical, and Biological Studies on the Virus of Vesicular Stomatitis of Horses : Comparison with the Virus of Foot-and-Mouth Disease. **J Exp Med**, v. 45, n. 6, p. 969-981, 1927.

ORFANIDOU, C. G.; PAPPI, P. G.; EFTHIMIOU, K. E.; KATIS, N. I.; MALIOGKA, V. I. Transmission of Tomato chlorosis virus (ToCV) by *Bemisia tabaci* Biotype Q and Evaluation of Four Weed Species as Viral Sources. **Plant Disease**, v. 100, n., p. 2043-2049, 2016.

OUDE MUNNINK, B. B.; FARAG, E.; GEURTSVANKESSEL, C.; SCHAPENDONK, C.; VAN DER LINDEN, A.; KOHL, R.; ARRON, G.; ZIGLAM, H.; GORAVEY, W. G. M.; COYLE, P. V.; IBRAHIM, I.; MOHRAN, K. A.; ALRAJHI, M. M. S.; ISLAM, M. M.; ABDEEN, R.; AL-ZEYARA, A.; YOUNIS, N. M.; AL-ROMAIHI, H. E.; THANI, M.; MOLENKAMP, R.; SIKKEMA, R. S.; KOOPMANS, M. First molecular analysis of rabies virus in Qatar and clinical cases imported into Qatar, a case report. **Int J Infect Dis**, v. 96, n., p. 323-326, 2020.

PAKKIANATHAN, B. C.; KONTSEDALOV, S.; LEBEDEV, G.; MAHADAV, A.; ZEIDAN, M.; CZOSNEK, H.; GHANIM, M. Replication of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Its Whitefly Vector, *Bemisia tabaci*. **J Virol**, v. 89, n. 19, p. 9791-9803, 2015.

PAPPI, P. G.; MALIOGKA, V. I.; AMOUTZIAS, G. D.; KATIS, N. I. Genetic variation of eggplant mottled dwarf virus from annual and perennial plant hosts. **Arch Virol**, v. 161, n. 3, p. 631-639, 2016.

PAREDES-MONTERO, J. R.; HAQ, Q. M. I.; MOHAMED, A. A.; BROWN, J. K. Phylogeographic and SNPs Analyses of *Bemisia tabaci* B Mitotype Populations Reveal Only Two of Eight Haplotypes Are Invasive. **Biology (Basel)**, v. 10, n. 10, p., 2021.

PAREDES-MONTERO, J. R.; RIZENTAL, M.; QUINTELA, E. D.; DE ABREU, A. G.; BROWN, J. K. Earlier than expected introductions of the *Bemisia tabaci* B mitotype in Brazil reveal an unprecedented, rapid invasion history. **Ecol Evol**, v. 12, n. 1, p. e8557, 2022.

PINHEIRO-LIMA, B.; PEREIRA-CARVALHO, R. C.; ALVES-FREITAS, D. M. T.; KITAJIMA, E. W.; VIDAL, A. H.; LACORTE, C.; GODINHO, M. T.; FONTENELE, R. S.; FARIA, J. C.; ABREU, E. F. M.; VARSANI, A.; RIBEIRO, S. G.; MELO, F. L. Transmission of the Bean-Associated Cytorhabdovirus by the Whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1. **Viruses**, v. 12, n. 9, p., 2020.

POLLIO, A.; DE NATALE, A.; APPETITI, E.; ALIOTTA, G.; TOUWAIDE, A. Continuity and change in the Mediterranean medical tradition: *Ruta* spp. (rutaceae) in Hippocratic medicine and present practices. **J Ethnopharmacol**, v. 116, n. 3, p. 469-482, 2008.

POSPIESZNY, H.; BORODYNKO-FILAS, N.; HASIÓW-JAROSZEWSKA, B.; CZERWONKA, B.; ELENA, S. F. An assessment of the transmission rate of Tomato black ring virus through tomato seeds. **Plant Protection Science**, v. 56, n., p. 9-12, 2020.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. **Mol Biol Evol**, v. 26, n. 7, p. 1641-1650, 2009.

QUICK, J.; GRUBAUGH, N. D.; PULLAN, S. T.; CLARO, I. M.; SMITH, A. D.; GANGAVARAPU, K.; OLIVEIRA, G.; ROBLES-SIKISAKA, R.; ROGERS, T. F.; BEUTLER, N. A.; BURTON, D. R.; LEWIS-XIMENEZ, L. L.; DE JESUS, J. G.; GIOVANETTI, M.; HILL, S. C.; BLACK, A.; BEDFORD, T.; CARROLL, M. W.; NUNES, M.; ALCANTARA, L. C., JR.; SABINO, E. C.; BAYLIS, S. A.; FARIA, N. R.; LOOSE, M.; SIMPSON, J. T.; PYBUS, O. G.; ANDERSEN, K. G.; LOMAN, N. J. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. **Nat Protoc**, v. 12, n. 6, p. 1261-1276, 2017.

RAMALHO, T. O.; FIGUEIRA, A. R.; WANG, R.; JONES, O.; HARRIS, L. E.; GOODIN, M. M. Detection and survey of coffee ringspot virus in Brazil. **Arch Virol**, v. 161, n. 2, p. 335-343, 2016.

READ, D. A.; FEATHERSTON, J.; REES, D. J. G.; THOMPSON, G. D.; ROBERTS, R.; FLETT, B. C.; MASHINGAIDZE, K.; PIETERSEN, G.; KIULA, B.; KULLAYA, A.; MBEGA, E. R. Molecular characterization of Morogoro maize-associated virus, a nucleorhabdovirus detected in maize (*Zea mays*) in Tanzania. **Arch Virol**, v. 164, n. 6, p. 1711-1715, 2019.

RESENDE RDE, O.; DE HAAN, P.; DE AVILA, A. C.; KITAJIMA, E. W.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Generation of envelope and defective interfering RNA mutants of tomato spotted wilt virus by mechanical passage. **J Gen Virol**, v. 72 (Pt 10), n., p. 2375-2383, 1991.

REVILL, P.; TRINH, X.; DALE, J.; HARDING, R. Taro vein chlorosis virus: characterization and variability of a new nucleorhabdovirus. **J Gen Virol**, v. 86, n. Pt 2, p. 491-499, 2005.

RIBEIRO, S. G.; LOHUIS, H.; GOLDBACH, R.; PRINS, M. Tomato chlorotic mottle virus is a target of RNA silencing but the presence of specific short interfering RNAs does not guarantee resistance in transgenic plants. **J Virol**, v. 81, n. 4, p. 1563-1573, 2007.

ROSENMAN, J.; MCINTOSH, C. S.; ARYAL, G. R.; NOLTE, P. Planting a Problem: Examining the Spread of Seed-Borne Potato Virus Y. **Plant Dis**, v. 103, n. 9, p. 2179-2183, 2019.

SABLE, A.; RAI, K. M.; CHOUDHARY, A.; YADAV, V. K.; AGARWAL, S. K.; SAWANT, S. V. Inhibition of Heat Shock proteins HSP90 and HSP70 induce oxidative stress, suppressing cotton fiber development. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 3620, 2018.

SAMARFARD, S.; BEJERMAN, N. E.; DIETZGEN, R. G. Distribution and genetic variability of alfalfa dwarf virus, a cytorhabdovirus associated with alfalfa dwarf disease in Argentina. **Virus Genes**, v. 54, n. 4, p. 612-615, 2018.

SASAYA, T.; ISHIKAWA, K.; KOGANEZAWA, H. The nucleotide sequence of RNA1 of Lettuce big-vein virus, genus Varicosavirus, reveals its relation to nonsegmented negative-strand RNA viruses. **Virology**, v. 297, n. 2, p. 289-297, 2002.

SASTRY, K. S. **Seed-borne plant virus diseases**. India: Springer, 2013. 328 p.

SCHNELL, M. J.; BUONOCORE, L.; WHITT, M. A.; ROSE, J. K. The minimal conserved transcription stop-start signal promotes stable expression of a foreign gene in vesicular stomatitis virus. **J Virol**, v. 70, n. 4, p. 2318-2323, 1996.

SCHUSTER, D.; BUCHMAN, G.; RASHTCHIAN, A. A simple and efficient method for amplification of cDNA ends using 5' RACE. **Focus**, v. 14, n., p. 46-52, 1992.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S.; WANG, J. T.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. Cytoscape: a *software* environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Res**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.

SHIMODAIRA, H. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. **Syst Biol**, v. 51, n. 3, p. 492-508, 2002.

SIMMONS, H.; MUNKVOLD, G. Seed Transmission in the Potyviridae. In: (Ed.). 2014, p.3-15.

SINGH, S. K.; DHAWAN, S. S.; LAL, R. K.; SHANKER, K.; SINGH, M. Biochemical characterization and spatio-temporal analysis of the putative L-DOPA pathway in *Mucuna pruriens*. **Planta**, v. 248, n. 5, p. 1277-1287, 2018.

SINGH, V.; GOEL, R.; PANDE, V.; ASIF, M. H.; MOHANTY, C. S. De novo sequencing and comparative analysis of leaf transcriptomes of diverse condensed tannin-containing lines of underutilized *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. **Sci Rep**, v. 7, n., p. 44733, 2017.

SINISTERRA, X. H.; MCKENZIE, C. L.; HUNTER, W. B.; POWELL, C. A.; SHATTERS, R. G. Differential transcriptional activity of plant-pathogenic begomoviruses in their whitefly vector (*Bemisia tabaci*, Gennadius: Hemiptera Aleyrodidae). **J Gen Virol**, v. 86, n. Pt 5, p. 1525-1532, 2005.

SOBRINHO, R. R.; XAVIER, C. A.; PEREIRA, H. M.; LIMA, G. S.; ASSUNCAO, I. P.; MIZUBUTI, E. S.; DUFFY, S.; ZERBINI, F. M. Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous hosts. **J Gen Virol**, v. 95, n. Pt 11, p. 2540-2552, 2014.

SOUZA, T. L. P. O.; FARIA, J. C.; ARAGÃO, F. J. L.; DEL PELOSO, M. J.; FARIA, L. C.; WENDLAND, A.; AGUIAR, M. S.; QUINTELA, E. D.; MELO, C. L. P.; HUNGRIA, M.; VIANELLO, R. P.; PEREIRA, H. S.; MELO, L. C. Agronomic Performance and Yield Stability of the RNA Interference-Based Bean golden mosaic virus-Resistant Common Bean. **Crop Science**, v. 58, n. 2, p. 579-591, 2018.

SPITZER, M.; WILDENHAIN, J.; RAPPSILBER, J.; TYERS, M. BoxPlotR: a web tool for generation of box plots. **Nat Methods**, v. 11, n. 2, p. 121-122, 2014.

STRYDOM, E.; PIETERSEN, G. Diversity of partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences of soybean blotchy mosaic virus isolates from different host-, geographical- and temporal origins. **Arch Virol**, v. 163, n. 5, p. 1299-1305, 2018.

SUBRAMANIAN, B.; GAO, S.; LERCHER, M. J.; HU, S.; CHEN, W. H. Evolvview v3: a webserver for visualization, annotation, and management of phylogenetic trees. **Nucleic Acids Res**, v. 47, n. W1, p. W270-W275, 2019.

SURUTHI, V.; NAKKEERAN, S.; RENUKADEVI, P.; MALATHI, V. G.; RAJASREE, V. Evidence of seed transmission of dolichos yellow mosaic virus, a begomovirus infecting lablab-bean in India. **Virusdisease**, v. 29, n. 4, p. 506-512, 2018.

SYLVESTER, E. S.; RICHARDSON, J.; FRAZIER, N. W. Serial passage of strawberry crinkle virus in the aphid *Chaetosiphon jacobi*. **Virology**, v. 59, n. 1, p. 301-306, 1974.

TORIYAMA, S. [Purification and some properties of northern cereal mosaic virus]. **Uirusu**, v. 22, n. 3, p. 114-124, 1972.

TORIYAMA, S. **Northern cereal mosaic**. Paris, France: INRA, 2004 (Viruses and Virus Diseases of Poaceae (Gramineae), Lapierre, H.)

TRIFINOPOULOS, J.; NGUYEN, L. T.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. W1, p. W232-235, 2016.

UENO, Y.; ARITA, M.; KUMAGAI, T.; ASAI, K. Processing sequence annotation data using the Lua programming language. **Genome Inform**, v. 14, n., p. 154-163, 2003.

UPADHYAY, S. K.; CHANDRASHEKAR, K.; THAKUR, N.; VERMA, P. C.; BORGIO, J. F.; SINGH, P. K.; TULI, R. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. **J Biosci**, v. 36, n. 1, p. 153-161, 2011.

UPADHYAY, S. K.; SHARMA, S.; SINGH, H.; DIXIT, S.; KUMAR, J.; VERMA, P. C.; CHANDRASHEKAR, K. Whitefly genome expression reveals host-symbiont interaction in amino acid biosynthesis. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0126751, 2015.

VAN BRUNSCHOT, S. L.; BERGERVOET, J. H.; PAGENDAM, D. E.; DE WEERDT, M.; GEERING, A. D.; DRENTH, A.; VAN DER VLUGT, R. A. A bead-based suspension array for the multiplexed detection of begomoviruses and their whitefly vectors. **J Virol Methods**, v. 198, n., p. 86-94, 2014.

WALKER, P. J.; DIETZGEN, R. G.; JOUBERT, D. A.; BLASDELL, K. R. Rhabdovirus accessory genes. **Virus Res**, v. 162, n. 1-2, p. 110-125, 2011.

WALKER, P. J.; FIRTH, C.; WIDEN, S. G.; BLASDELL, K. R.; GUZMAN, H.; WOOD, T. G.; PARADKAR, P. N.; HOLMES, E. C.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. Evolution of genome size and complexity in the *Rhabdoviridae*. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 2, p. e1004664, 2015.

WALKER, P. J.; BLASDELL, K. R.; CALISHER, C. H.; DIETZGEN, R. G.; KONDO, H.; KURATH, G.; LONGDON, B.; STONE, D. M.; TESH, R. B.; TORDO, N.; VASILAKIS, N.; WHITFIELD, A. E.; ICTV REPORT, C. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Rhabdoviridae*. **J Gen Virol**, v. 99, n. 4, p. 447-448, 2018.

WALKER, P. J.; BLASDELL, K. R.; CALISHER, C. H.; DIETZGEN, R. G.; KONDO, H.; KURATH, G.; LONGDON, B.; STONE, D. M.; TESH, R. B.; TORDO, N.; VASILAKIS, N.; WHITFIELD, A. E.; ICTV REPORT, C. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Rhabdoviridae* 2021. **J Gen Virol**, v., n., p., 2021.

WANG, L. L.; WANG, X. R.; WEI, X. M.; HUANG, H.; WU, J. X.; CHEN, X. X.; LIU, S. S.; WANG, X. W. The autophagy pathway participates in resistance to tomato yellow leaf curl virus infection in whiteflies. **Autophagy**, v. 12, n. 9, p. 1560-1574, 2016.

WANG, Q.; MA, X.; QIAN, S.; ZHOU, X.; SUN, K.; CHEN, X.; ZHOU, X.; JACKSON, A. O.; LI, Z. Rescue of a Plant Negative-Strand RNA Virus from Cloned cDNA: Insights into Enveloped Plant Virus Movement and Morphogenesis. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 10, p. e1005223, 2015.

WEI, J.; HE, Y. Z.; GUO, Q.; GUO, T.; LIU, Y. Q.; ZHOU, X. P.; LIU, S. S.; WANG, X. W. Vector development and vitellogenin determine the transovarial transmission of begomoviruses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 26, p. 6746-6751, 2017.

WEI, Z.; MAO, C.; JIANG, C.; ZHANG, H.; CHEN, J.; SUN, Z. Identification of a New Genetic Clade of Cowpea Mild Mottle Virus and Characterization of Its Interaction With Soybean Mosaic Virus in Co-infected Soybean. **Front Microbiol**, v. 12, n. 754, p., 2021.

WHITFIELD, A. E.; FALK, B. W.; ROTENBERG, D. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. **Virology**, v. 479-480, n., p. 278-289, 2015.

WHITFIELD, A. E.; HUOT, O. B.; MARTIN, K. M.; KONDO, H.; DIETZGEN, R. G. Plant rhabdoviruses-their origins and vector interactions. **Curr Opin Virol**, v. 33, n., p. 198-207, 2018.

WU, X.; XU, S.; ZHAO, P.; ZHANG, X.; YAO, X.; SUN, Y.; FANG, R.; YE, J. The Orthotospovirus nonstructural protein NSs suppresses plant MYC-regulated jasmonate signaling leading to enhanced vector attraction and performance. **PLoS Pathog**, v. 15, n. 6, p. e1007897, 2019.

YADAV, M. K.; BISWAS, K. K.; LAL, S. K.; BARANWAL, V. K.; JAIN, R. K. A Distinct Strain of Cowpea mild mottle virus Infecting Soybean in India. **Journal of Phytopathology**, v. 161, n. 10, p. 739-744, 2013.

YANG, X.; HUANG, J.; LIU, C.; CHEN, B.; ZHANG, T.; ZHOU, G. Rice Stripe Mosaic Virus, a Novel Cytorhabdovirus Infecting Rice via Leafhopper Transmission. **Front Microbiol**, v. 7, n., p. 2140, 2016.

YANG, X.; CHEN, B.; ZHANG, T.; LI, Z.; XU, C.; ZHOU, G. Geographic Distribution and Genetic Diversity of Rice Stripe Mosaic Virus in Southern China. **Front Microbiol**, v. 9, n., p. 3068, 2018.

ZANARDO, L. G.; SILVA, F. N.; BICALHO, A. A. C.; URQUIZA, G. P. C.; LIMA, A. T. M.; ALMEIDA, A. M. R.; ZERBINI, F. M.; CARVALHO, C. M. Molecular and biological characterization of Cowpea mild mottle virus isolates infecting soybean in Brazil and evidence of recombination. **Plant Pathology**, v. 63, n., p. 456-465, 2014.

ZANARDO, L. G.; CARVALHO, C. M. Cowpea mild mottle virus (Carlavirus, Betaflexiviridae): A review. . **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n., p. 417-430, 2017.

ZHANG, L.; WAN, X.; XU, Y.; NIYITANGA, S.; QI, J.; ZHANG, L. De novo assembly of transcriptome and genome-wide identification reveal GA3 stress-responsive WRKY transcription factors involved in fiber formation in jute (*Corchorus capsularis*). **BMC Plant Biol**, v. 20, n. 1, p. 403, 2020.

ZHANG, S.; HUANG, A.; ZHOU, X.; LI, Z.; DIETZGEN, R. G.; ZHOU, C. Y.; CAO, M. Natural defect of a plant rhabdovirus glycoprotein gene: a case study of virus-plant co-evolution. **Phytopathology**, v., n., p., 2020.

ZHANG, X. F.; ZENG, T.; XIE, Y.; ZHENG, Y.; WANG, H.; LIN, H.; WANG, Z.; WEI, T. Rice yellow stunt virus activates polyamine biosynthesis to promote viral propagation in insect vectors by disrupting ornithine decarboxylase antienzyme function. **Sci China Life Sci**, v. 64, n. 9, p. 1522-1532, 2021.

ZHANG, Z. J.; GAO, Q.; FANG, X. D.; DING, Z. H.; GAO, D. M.; XU, W. Y.; CAO, Q.; QIAO, J. H.; YANG, Y. Z.; HAN, C.; WANG, Y.; YUAN, X.; LI, D.; WANG, X. B. CCR4, a RNA decay factor, is hijacked by a plant cytorhabdovirus phosphoprotein to facilitate virus replication. **Elife**, v. 9, n., p., 2020.

ZIEGLER-GRAFF, V. Molecular Insights into Host and Vector Manipulation by Plant Viruses. **Viruses**, v. 12, n. 3, p., 2020.

ANEXO I – Publicações realizadas durante o período do doutorado

PINHEIRO-LIMA, BRUNA; PEREIRA-CARVALHO, RITA C. ; ALVES-FREITAS, DIONE M. T. ; KITAJIMA, ELLIOT W. ; VIDAL, ANDREZA H. ; LACORTE, CRISTIANO ; GODINHO, MARCIO T. ; FONTENELE, RAFAELA S. ; FARIA, JOSIAS C. ; ABREU, EMANUEL F. M. ; VARSANI, ARVIND ; RIBEIRO, SIMONE G. ; MELO, FERNANDO L. . Transmission of the Bean-Associated Cytorhabdovirus by the Whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1. *Viruses-Basel*, v. 12, p. 1028, 2020.

ALVES-FREITAS, DIONE M. T. ; PINHEIRO-LIMA, BRUNA ; FARIA, JOSIAS C. ; LACORTE, CRISTIANO ; RIBEIRO, SIMONE G. ; MELO, FERNANDO L. . Double-Stranded RNA High-Throughput Sequencing Reveals a New Cytorhabdovirus in a Bean Golden Mosaic Virus-Resistant Common Bean Transgenic Line. *Viruses-Basel*, v. 11, p. 90, 2019.

VIDAL, A. H. ; SANCHES, M. M. ; ALVES-FREITAS, D. M. T. ; ABREU, E. F. M. ; LACORTE, C. ; PINHEIRO-LIMA, B. ; ROSA, R. C. C. ; JESUS, O. N. ; CAMPOS, M. A. ; VARSANI, A. ; RIBEIRO, S. G. . First World Report of Cucurbit Aphid-Borne Yellows Virus Infecting Passionfruit. *PLANT DISEASE*, v. 102, p. 2665-2665, 2018.



Article

Transmission of the Bean-Associated Cytorhabdovirus by the Whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1

Bruna Pinheiro-Lima ^{1,2,3}, Rita C. Pereira-Carvalho ², Dione M. T. Alves-Freitas ¹, Elliot W. Kitajima ⁴, Andreza H. Vidal ^{1,3}, Cristiano Lacorte ¹, Marcio T. Godinho ¹, Rafaela S. Fontenele ⁵, Josias C. Faria ⁶, Emanuel F. M. Abreu ¹, Arvind Varsani ^{5,7}, Simone G. Ribeiro ^{1,*} and Fernando L. Melo ^{2,3,*}

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília DF 70770-017, Brazil; pinheiro.limab@gmail.com (B.P.-L.); dionebio@gmail.com (D.M.T.A.-F.); andrezactg@hotmail.com (A.H.V.); cristiano.lacorte@embrapa.br (C.L.); marciolash@gmail.com (M.T.G.); emanuel.abreu@embrapa.br (E.F.M.A.)

² Departamento de Fitopatologia, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília DF 70275-970, Brazil; rcpvalho@unb.br

³ Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília DF 70275-970, Brazil

⁴ Departamento de Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba SP 13418-900, Brazil; ewkitaji@usp.br

⁵ The Biodesign Center for Fundamental and Applied Microbiomics, Center for Evolution and Medicine School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ 85287-5001, USA; rafasfontenele@gmail.com (R.S.F.); avarsani@gmail.com (A.V.)

⁶ Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia GO 75375-000, Brazil; josias.faria@embrapa.br

⁷ Structural Biology Research Unit, Department of Integrative Biomedical Sciences, University of Cape Town, Observatory, Cape Town 7701, South Africa

* Correspondence: simone.ribeiro@embrapa.br (S.G.R.); flucasmelo@gmail.com (F.L.M.)

Received: 04 August 2020; Accepted: 11 September 2020; Published: date

Abstract: The knowledge of genomic data of new plant viruses is increasing exponentially; however, some aspects of their biology, such as vectors and host range, remain mostly unknown. This information is crucial for the understanding of virus–plant interactions, control strategies, and mechanisms to prevent outbreaks. Typically, rhabdoviruses infect monocot and dicot plants and are vectored in nature by hemipteran sap-sucking insects, including aphids, leafhoppers, and planthoppers. However, several strains of a potentially whitefly-transmitted virus, papaya cytorhabdovirus, were recently described: (i) bean-associated cytorhabdovirus (BaCV) in Brazil, (ii) papaya virus E (PpVE) in Ecuador, and (iii) citrus-associated rhabdovirus (CiaRV) in China. Here, we examine the potential of the *Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1) to transmit BaCV, its morphological and cytopathological characteristics, and assess the incidence of BaCV across bean producing areas in Brazil. Our results show that BaCV is efficiently transmitted, in experimental conditions, by *B. tabaci* MEAM1 to bean cultivars, and with lower efficiency to cowpea and soybean. Moreover, we detected BaCV RNA in viruliferous whiteflies but we were unable to visualize viral particles or viroplasm in the whitefly tissues. BaCV could not be singly isolated for pathogenicity tests, identification of the induced symptoms, and the transmission assay. BaCV was detected in five out of the

seven states in Brazil included in our study, suggesting that it is widely distributed throughout bean producing areas in the country. This is the first report of a whitefly-transmitted rhabdovirus.

Keywords: common bean; *Phaseolus vulgaris*; cytorhabdovirus; whitefly; *Bemisia tabaci*; vector; virus transmission; virus evolution

Introduction

Rhabdoviruses (family *Rhabdoviridae*) are a group of negative-sense, single-stranded RNA viruses that infect plants, vertebrate animals, and invertebrate animals. They cause harmful diseases in humans and animals and can cause high yield losses in crops. Plant-infecting rhabdoviruses are currently taxonomically assigned to six genera [1]. Members of the *Dichorhavirus* genus have a bi-segmented genome, infect di- and monocotyledonous plants, and are transmitted by *Brevipalpus* mites. Viruses belonging to the *Varicosavirus* genus also have a bi-segmented genome, infect plants of the Compositae and Solanaceae families, and are transmitted by zoospores of the fungus *Olpidium brassicae*. Non-segmented plant rhabdoviruses infect mono- and dicot plants and are vectored in nature by hemipteran sap-sucking insects, including aphids, leafhoppers, and planthoppers [2]. Moreover, there is a close relationship between plant rhabdoviruses and their vectors, and each virus may be vectored by one species or a few closely related ones [3]. Viruses that replicate within the nuclei of infected plant cells are assigned to the genera *Alphanucleorhabdovirus*, *Betanucleorhabdovirus*, and *Gammanucleorhabdovirus*, while those that multiply in the cell cytoplasm belong to the *Cytorhabdovirus* [2,4]. Insect and mite-transmitted rhabdoviruses also replicate in their arthropod vectors and are transmitted in a persistent propagative manner [3,5]. However, no information on vectors and transmission characteristics is available for most of these viruses [5].

Bean-associated cytorhabdovirus (BaCV) was identified in transgenic bean golden mosaic virus (BGMV)-resistant common bean lines [6]. The BaCV genome has a 3'-N-P-M-G-L-5' [nucleocapsid protein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G), and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) protein (L)] organization that is typical of rhabdoviruses and between P and M, the BaCV genome encodes two accessory genes, P3 and P4 [6]. A closely related virus with a genome sequence identity of 97 % named papaya virus E (PpVE) has been reported from papaya plants in Ecuador [7]. Based on the high sequence identity between the two virus sequences, it was proposed that the virus species would be named *Papaya cytorhabdovirus* with strains PpVE infecting papayas and BaCV infecting beans [8,9].

To characterize the bean-infecting cytorhabdovirus strain in detail, we carried out the molecular cloning and defined its morphological and cytopathological characteristics. Moreover, we observed a high prevalence of BaCV in bean fields in Brazil and determined the efficient transmission of BaCV by the whitefly *Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), a hitherto unknown feature for a plant rhabdovirus.

Materials and Methods

1.1. Plant Material

Fifteen common bean plants (cultivar 'Pérola') with typical virus symptoms of mosaic, leaf distortion, crumpling, and dwarfing (Figure 1) were collected in a commercial field in Luziânia, Goiás State, in June 2016. Leaf samples from the 15 plants were detached and stored at -80 °C. Six plants were transplanted to soil-filled pots and maintained in a screen-protected cage, without removing the abundant whitefly colonies present in the plant leaves. One of the transplanted plants survived and was used for virus transmission and cloning of the genome of BaCV-Luz.

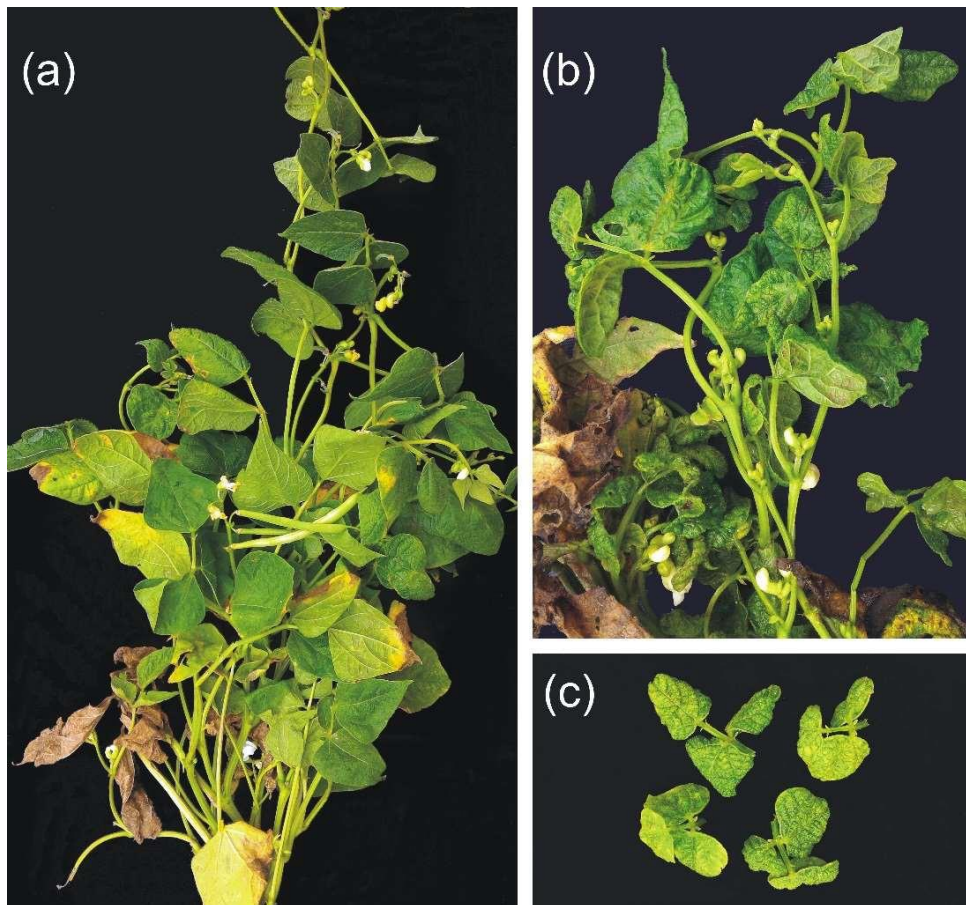


Figure 1. Symptoms in common bean plants collected in a commercial field in Luziânia, Goiás state with mixed infection by bean-associated cytorhabdovirus (BaCV), cowpea mild mottle virus (CPMMV), and bean golden mosaic virus (BGMV) and whitefly colonization. (a) Mosaic and leaf wrinkling. (b) Mosaic, severe leaf distortion, and deformation. (c) Detail of leaves with reduced area, yellow mosaic, and severe crinkling and curling.

1.2. Distribution of BaCV in Common Beans in Brazil

Initially, the 15 plants collected in Luziânia were examined by RT-PCR or PCR for the presence of bean-infecting viruses frequently found in Brazil, the whitefly-transmitted CPMMV (family *Betaflexiviridae*; genus *Carlavirus*), BGMV, and macroptilium yellow spot virus—MaYSV (family *Geminiviridae*; genus *Begomovirus*), the chrysomelid beetle-transmitted bean rugose mosaic virus—BRMV (family *Secoviridae*; genus *Comovirus*), and the recently identified cytorhabdovirus BaCV. To determine the occurrence of BaCV in different areas in Brazil (Figure 2), additional bean samples were collected from experimental or commercial bean fields between 2016 to 2018, including Brasília ($n = 30$), Distrito Federal—DF; Santo Antônio de Goiás ($n = 26$), Luziânia ($n = 15$), Cristalina ($n = 43$), Urutai ($n = 1$), and Araçu ($n = 1$) in Goiás State—GO; Sorriso, Mato Grosso State—MT ($n = 2$); Bonfinópolis de Minas ($n = 3$), Paracatu ($n = 1$), Três Pontas ($n = 5$) in Minas Gerais State; and Arapiraca ($n = 5$) in Alagoas State. In addition, we analyzed bean samples from our archived collection. Plants collected in Brasília, DF in 2007 ($n = 2$), PAD/DF Paranoá, DF in 2012 ($n = 11$), and Riacho Fundo, DF in 2015 ($n = 41$); Cruz das Almas ($n = 8$), Morro do Chapéu ($n = 4$), Piritiba ($n = 3$), and Antônio Gonçalves ($n = 2$) in Bahia State in 2015; and Palmital ($n = 1$) in São Paulo State in 2015 were screened for BaCV infection. In total, 219 bean plants were screened for the presence of BaCV, CPMMV, and BGMV (41 BGMV-immune cultivar ‘BRS FC 401 RMD’ plants were not tested for BGMV).

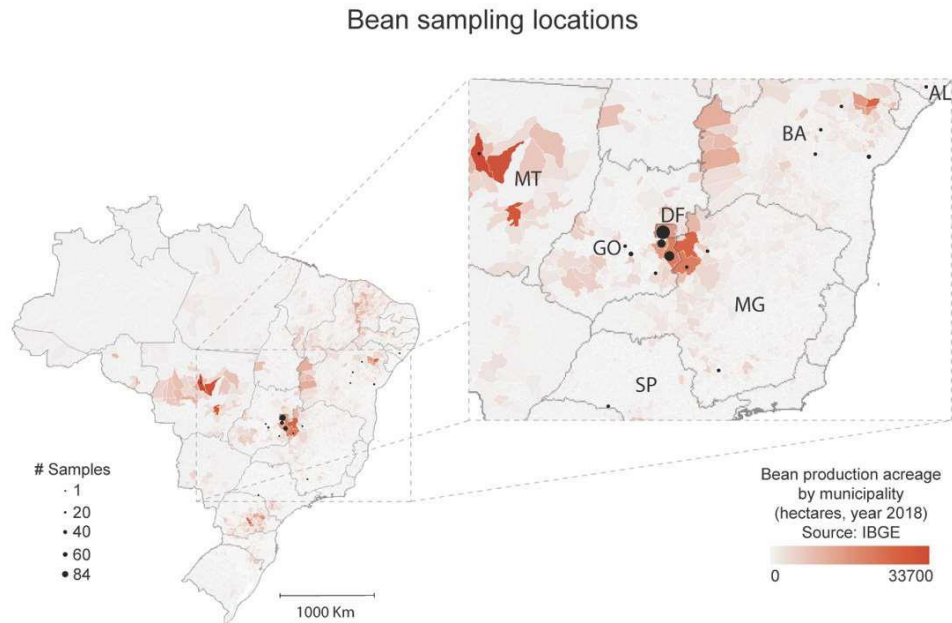


Figure 2. Summary of the distribution of the bean sampling locations at Alagoas (AL), Bahia (BA), Goiás (GO), Minas Gerais (MG), Mato Grosso (MT), São Paulo (SP) states and Distrito Federal (DF). Each municipality was colored in red according to the bean planted area (in hectare), obtained from the Brazilian Institute of Geography (<https://www.ibge.gov.br/>) [10]. The black circles represent the sample sites, and their size is proportional to the number of collected plants. The samples were collected between 2007 and 2018.

1.3. RNA and DNA Extraction

Total RNA was extracted from ~100 mg of plant leaf tissue (pulverized in liquid nitrogen) using the TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was also extracted from (i) a group of 30 whitefly individuals, (ii) from one single individual, and (iii) parts of one single whitefly (head/thorax or abdomen). One fourth and one-tenth of the reagent's volumes of the standard TRIzol Reagent protocol were used for 30 whiteflies and one or parts of an insect, respectively. Total DNA was extracted from leaves and whiteflies using the CTAB protocol [11].

1.4. RT-PCR, PCR, and Cloning

The sequences and characteristics of all *primers* used in this study are summarized in Table S1. To determine the complete genome sequence of BaCV-Luz, first we determined the 5' and 3' ends by rapid amplification of cDNA ends (RACE) as previously described [6,12,13]. Next, based on the genome sequence of BaCV-GO [6] and BaCV-Luz *leader* and *trailer* sequences, *primers* were designed to amplify the virus genome by RT-PCR in six fragments overlapping in at least 150 nt. The cDNA was synthesized with 5 μ L of total RNA (approximately 1 μ g) using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Anchored Oligo(dT)20 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and random *primers* [14]. One microliter of cDNA was used in PCR reactions with LongAmp Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and specific *primers* for each fragment (Table S1). *Amplicons* were gel-purified, cloned into PCR 2.1 TOPO TA vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and sequenced. At least two clones of each fragment were sequenced at MacroGen Inc. (Seoul, South Korea).

Detection of BaCV (in plants and whiteflies), CPMMV (in plants and whiteflies), and BRMV (in plants) was carried out by RT-PCR using the cDNA prepared as described above as template. PCR reactions were performed with Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using 1 μ L of cDNA and *primers* BaCV_1F/BaCV_1579R, CPMMV_4000F/CPMMV_4500R [15], and BRMV1_76F/BRMV1_521R [6] specific for BaCV, CPMMV, and BRMV, respectively. For BGMV and

MaYSV PCR-based infection surveys of field samples, total extracted plant DNA was used as template and *primers* BGMV_HPXHO/BGMV_HPKPN for BGMV [16] and MaYSV-249F/MaYSV-1083R for MaYSV. A portion of the PCR *amplicons* was verified by cloning in PCR 2.1 TOPO TA vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and Sanger sequencing.

Whiteflies populations from the field, as well as from the Universidade de Brasília rearing facility, were identified as *B. tabaci* MEAM1 by genotyping the insects using PCR-RFLP as described by Bosco, *et al.* [17]. Amplification of a region of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene (mtCOI) was undertaken by PCR using whitefly total DNA as template and the *primers* COI-Fw/COI-Rv [17] (Table S1). The *amplicons* were digested with Taq I endonuclease (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). The digestion products were resolved in a 1.2 % agarose gel electrophoresis, and the profile of the bands was compared with the profiles for *B. tabaci* MEAM1 (synonym biotype B) and *B. tabaci* MED (synonym biotype Q) [17].

1.5. Sequence Analysis

All sequences generated in this study were trimmed and assembled using Geneious *software* (v.11, Biomatters, Auckland, New Zealand) [18]. The sequence identity was confirmed by BLASTn analysis [19]. The complete genome of BaCV-Luz isolate was deposited in GenBank under the accession number MT811775. The RdRp amino acid sequence of BaCV-Luz was aligned with those of all cytorhabdoviruses available in GenBank (as by May 2020) (Table S2) using MAFFT algorithm [20] implemented in Geneious. Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree was inferred using IQ-TREE [21], with node support estimated with the Shimodaira–Hasegawa approximate likelihood ratio test (SH-aLRT) [22]. Moreover, the amino acid sequences of the glycoproteins encoded by the cytorhabdoviruses were used to generate a sequence similarity network using the Enzyme Function Initiative–Enzyme Similarity Tool (EFI-EST) [23] with an alignment score threshold of 35 and minimum E-value threshold of 1×10^{-5} . The network was visualized in Cytoscape v3.7.1 [24]. Pairwise sequence identity comparisons were performed using the Sequence Demarcation Tool (SDT) v.1.2 [25].

1.6. BaCV Transmission by *B. tabaci* MEAM1

After confirming the infection by BaCV, CPMMV, and BGMV, a bean plant colonized by whiteflies transplanted from the field was used as an inoculum source for transmission tests (Figure 3). Initially, eight young bean seedlings each of cultivars ‘Pérola’, ‘Jalo’, and ‘BRS FC 401 RMD’ were placed in the cage with the whitefly-infested plant. Seven days later, another set of eight seedlings of each cultivar was placed inside the same cage. Plant samples were collected 14 days after their introduction into the cage and tested for the presence of BaCV, CPMMV, and BGMV. Since ‘BRS FC 401 RMD’ plants are immune to BGMV [26], they were not tested for BGMV infection. Whiteflies were also collected and tested for the presence of BaCV. Following this, the BaCV-Luz isolate was maintained in ‘BRS FC 401 RMD’ plants by introducing plantlets every three to four weeks in the cage, and when the population of whiteflies was declining, adult individuals from the rearing facility from the Universidade de Brasília were added to the cage for BaCV-Luz isolate maintenance until 2018.

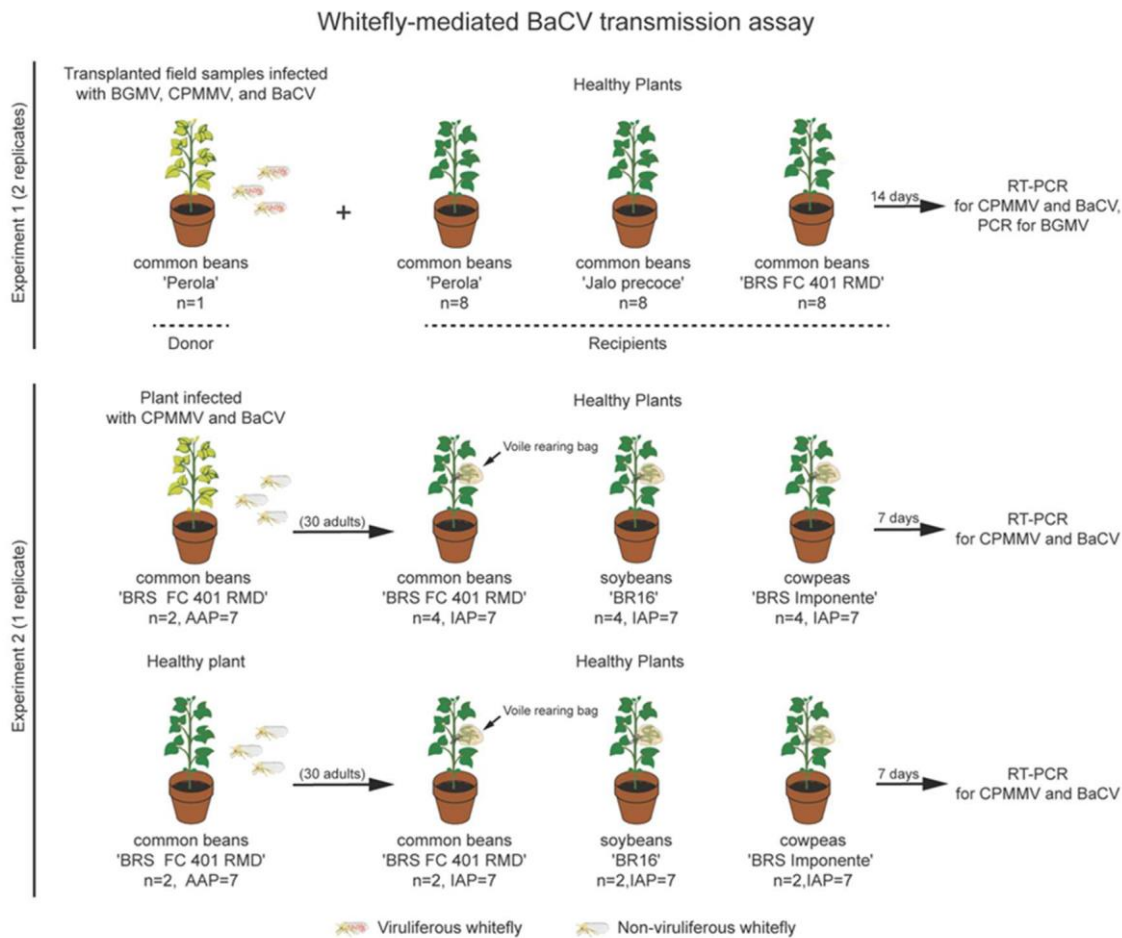


Figure 3. Whitefly (*Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1)) mediated transmission of BaCV. Outline of experimental procedures: In experiment 1, a common bean plant with whitefly colonies from the field was used as an inoculum source for BaCV (BGMV and CPMMV) transmission to bean plants 'Jalo', 'Pérola' and 'BRS FC 401 RMD'. After 14 days, samples were collected, and BaCV (CPMMV and BGMV) transmission confirmed by RT-PCR and PCR. In experiment 2, whiteflies were exposed to BaCV- (and CPMMV)-infected plants for a 7-days acquisition period. Thirty whiteflies were transferred from the inoculum source plant to a healthy plant leaf wrapped by a voile rearing bag for a 7-days inoculation period. After seven days, samples were collected and tested by RT-PCR. The same procedure was applied to healthy plants with aviruliferous whiteflies as controls.

To further refine the transmission tests, two three-week old 'BRS FC 401 RMD' plants infected with BaCV-Luz (and CPMMV) were removed from the cage, sprayed with imidacloprid (32 mg/L) to eliminate any whiteflies present in the plants, transferred to a bugdorm tent, and kept in a greenhouse at room temperature for 10 days. *B. tabaci* MEAM1 individuals were reared in cabbage plants (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) at the Biological Experimental Station of the Universidade de Brasília. To synchronize the whiteflies' age, adult flies were removed from the cabbage plants, the plants were placed in a bugdorm cage, and kept in a greenhouse for three days. One-to-three-day old adult whiteflies were collected from the cabbage plants and transferred to the BaCV-Luz-infected bean plants for an acquisition accession period (AAP) of 7 days (Figure 3). As a control, a batch of whiteflies was placed for 7 days in healthy bean plants. Next, 25 to 30 potentially viruliferous whiteflies were transferred from the virus-infected source plants to a polyester voile rearing bag previously placed around a trifoliolate leaf of 4 healthy beans 'BRS FC 401 RMD', 4 healthy soybeans [*Glycine max* (L.) Merr. 'BR16'], and 4 healthy cowpeas [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. 'BRS Imponente'] plants for an inoculation access period (IAP) of 7 days. Likewise, as controls, non-viruliferous flies were placed in 2 healthy plants of each plant species for 7 days. After this period, the leaves inside the polyester voilebags were detached from plants to avoid nymphal maturation, and plants were sprayed with

imidacloprid (32 mg/L) to remove any possible remaining whiteflies [27]. Plants were observed for the development of symptoms, and virus infection was confirmed by RT-PCR, as described above.

1.7. BaCV Detection in Plants and Whiteflies

To identify the presence of BaCV-Luz in bean plants and whiteflies, the total RNA was treated with TURBO DNase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to eliminate any DNA trace from the RNA preparation as described by Cao, *et al.* [28]. The cDNA was prepared with Anchored Oligo (dT) 20 primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the PCR reactions were performed with primers specific for all BaCV genes (Table S1). The transcripts for Actin-11 (*act11*) [29] and the small Rubisco subunit (*RbcS*) [30] genes from common bean, and Ribosomal protein L9 (*RpL9*) [31] and Vacuolar ATPase (*v-ATPase*) subunit A [31] genes from whitefly, were used as internal reference controls and to identify possible transcripts ingested by the whiteflies during the feeding in the bean plants (Table S1).

1.8. Transmission Electron Microscopy

Small leaf pieces were cut from 'BRS FC 401 RMD' bean plants that were experimentally inoculated with whitefly and tested positive for BaCV by RT-PCR. Leaf sections were fixed overnight with Karnovsky modified fixative (2.5 % glutaraldehyde and 2 % paraformaldehyde in 0.05 M cacodylate buffer, pH 7.2). The samples were post-fixed with 1 % osmium tetroxide (in 0.05 M cacodylate buffer) for 1–2 h. Tissues were dehydrated, embedded in low viscosity epoxy Spurr resin (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), and sectioned in a Leica UC6 ultramicrotome equipped with a Diatome diamond knife. Ultrathin sections (70–100 nm thick) were transferred onto 300 mesh copper grids, stained with 3 % uranyl acetate and Reynold's lead citrate, and examined in a JEOL JEM 1011 transmission electron microscope. Healthy bean leaves were used as controls. Images were digitally recorded. Whiteflies were reared and collected from BaCV-Luz-infected bean plants, dipped into a NaCl 0.9 % solution, and dissected at the thorax region in two parts: head/thorax and abdomen. For each whitefly, either the head/thorax or the abdomen parts were used for BaCV detection by RT-PCR, and the other part was fixed in a cold solution of 2.5 % glutaraldehyde and 1.8 % sucrose in 0.1 M cacodylate buffer. For the whiteflies that one part of the body was positive for BaCV presence by RT-PCR, the other part was processed to be examined by electron microscopy, as described above for plant tissues. Three pairs of head and abdominal parts of presumably viruliferous whiteflies were examined.

Results and Discussion

1.9. BaCV is Widely Distributed Throughout Common Bean Producing Areas in Brazil

BaCV was identified for the first time in Brazil in 2014 in bean plants collected in Santo Antônio de Goiás, Goiás State (GO) [32]. In June 2016, severe virus-like symptoms were recorded by farmers in Luziânia (GO) (Figure 1). The incidence of these symptoms in the bean plants ranged from 20 % to 80 %, depending on the area. The bean fields were heavily infested by whiteflies migrating from nearby cotton and tomato fields. Therefore, the first 15 bean plants received from the farmers were screened by PCR or RT-PCR for the presence of the whitefly-borne viruses BGMV, MaYSV, and CPMMV in addition to BRMV, and the new cytorhabdovirus BaCV (Figure S1). None of the plants were infected with MaYSV or BRMV. Conversely, all 15 plants had a mixed infection with BaCV, BGMV, and CPMMV.

Given the high infection rate, we further investigated the occurrence of these viruses in newly collected (2016–2018) and archived samples (2007–2016) from Central, Southeast, and Northeastern Brazil, comprising six states and the federal district (Figure 2). In total, 219 plants were analyzed, and 91 (41.55 %) were infected by BaCV (Table 1 and Figure 4). Most of the plants analyzed (46.12 %) were sampled in Goiás, Central Brazil, one of the top bean-producing States in the country, where the incidence of BaCV reached up to 100 %, depending on the area (Table 1). Despite the uneven sampling among regions, we were able to detect BaCV in Southeast and Northeast regions, which are more

than 2000 km apart, suggesting that BaCV is widely distributed throughout bean producing areas in the country. However, to have a better view of the prevalence of BaCV in the bean crops in Brazil, further sampling should be conducted in additional bean cultivating areas in the Southeastern, Northeastern, and Southern states.

Table 1. Detection of BaCV, CPMMV, and BGMV in common bean samples collected in Brazil by RT-PCR and PCR.

State/Total Number of Samples	City	Sampled Areas	Year	Virus Incidence (Infected/Tested)			
				BaCV	CPMMV	BGMV	
Bahia (BA) (n = 17)	Cruz das Almas	1	2015	2/8	8/8	4/8	
	Morro do Chapéu	1	2015	0/4	3/4	0/4	
	Piritiba	1	2015	0/3	3/3	0/3	
	Antônio Gonçalves	1	2015	0/2	2/2	0/2	
Total in Bahia				2/17	16/17	4/17	
Alagoas (AL) (n = 5)	Arapiraca	1	2018	0/5	4/5	1/5	
Total in Alagoas				0/5	4/5	1/5	
Minas Gerais (MG) (n = 9)	Bonfinópolis de Minas	1	2016	0/3	3/3	0/3	
	Paracatu	1	2016	1/1	1/1	1/1	
	Três Pontas	1	2018	0/5	1/5	2/5	
Total in Minas Gerais				1/9	5/9	3/9	
São Paulo (SP) (n = 1)	Palmital	1	2015	1/1	1/1	1/1	
Total in São Paulo				1/1	1/1	1/1	
Goiás (GO) (n = 101)	Luziânia	1	2016	15/15	15/15	15/15	
		2	2016	7/7	7/7	7/7	
		3	2016	3/4	4/4	4/4	
		4	2016	4/4	4/4	4/4	
	Cristalina	1	2016	10/14	14/14	14/14	
		2	2016	0/14	12/14	13/14	
		3	2016	11/11	10/11	11/11	
		4	2016	4/4	4/4	4/4	
	Santo Antônio de Goiás	1	2016	0/4	4/4	4/4	
		2	2016	2/17	17/17	8/8	
		1	2018	0/5	4/5	4/5	
	Urutaí	1	2018	0/1	0/1	0/1	
		1	2018	0/1	1/1	1/1	
	Total in Goiás				56/101	96/101	89/92
	Distrito Federal (DF) (n = 84)	Brasília	1	2017	8/30	19/30	14/30
			1	2007	0/2	0/2	2/2
1			2012	0/11	1/11	7/11	
1			2015	8/12	6/12	-	
2			2015	15/29	25/29	-	
Total in Distrito Federal				31/84	51/84	23/43	
Mato Grosso (MT) (n = 2)	Sorriso	1	2018	0/2	1/2	2/2	
Total in Mato Grosso				0/2	1/2	2/2	
TOTAL				91/219	174/219	123/169	

BaCV was found in a single infection only in six samples of BGMV-resistant 'BRS FC401 RMD' plants collected in Riacho Fundo, DF, in 2015. The remaining 85 BaCV positive plants were co-infected with CPMMV ($n = 22$), BGMV ($n = 1$) or with CPMMV and BGMV ($n = 62$) (Table 1, Figure 4). Mixed infections were, therefore, common in these plants. Viral co-infections are very common and, in the field, seem to be the rule rather than the exception, and may result in synergistic effects and stronger symptoms [33]. Moreover, the change in the plant phenotype induced by the co-infection can alter or increase the attraction of vectors and facilitate the transmission of these viruses and enhance epidemics [34]. Unfortunately, singly BaCV-infected samples were identified only in archived samples, and we do not have records of the specific symptoms displayed by these plants. Therefore, it was impossible to establish possible effects of mixed infections on the severe symptoms observed in the field. Importantly, the phenotype of plants in the field is also influenced by other

biotic and abiotic factors such as water and temperature stress and infection by other pathogens like bacteria and fungi.

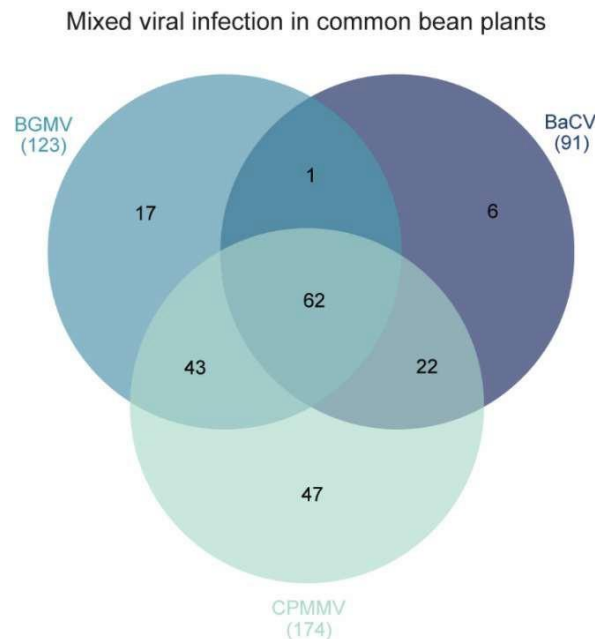


Figure 4. Distribution of viral infections in 219 common bean plants from 2007 to 2018. BaCV was found mostly in mixed infections with BGMV and CPMMV. Only six plants were found singly infected with BaCV.

1.10. Evolutionary Analysis Indicates Whiteflies as the Potential Vector for BaCV

The complete BaCV-Luz genome was determined by PCR of six overlapping fragments and was 13,467 nt in length. As expected, the genome presented the seven ORFs originally described in BaCV-GO (N, P, P3, P4, M, G, and L), flanked by two non-transcribed *leader* and *trailer* regions (Figure 5). As shown in Table S3, the complete genome of BaCV-Luz shares 99.8 % and 96.3 % identity with BaCV-GO and PpVE, respectively. To further investigate the phylogenetic relationship of cytorhabdoviruses, we aligned 28 RdRP amino acid sequences (2374 aa in length, including gaps) from reference cytorhabdoviruses available in Genbank, including two sequences derived from transcriptomes of *B. tabaci* (Table S2). The phylogenetic analysis shows that cytorhabdoviruses cluster in monophyletic groups according to its potential vector: aphid [35–39], planthopper [40–45], leafhopper [46], whitefly, and an undescribed vector (Figure 6). As previously suggested [7,47,48], BaCV isolates and PpVE were closely related to *B. tabaci* TSA 2 (AKC57270.1), confirming that these viruses belong to the species *Papaya cytorhabdovirus*. Moreover, yerba mate chlorosis-associated virus clustered with *B. tabaci* TSA 1 (AKC57275.1), as a sister group of papaya cytorhabdovirus strains. Furthermore, assuming that the viral surface envelope glycoprotein G interacts directly with receptors in the vector cells, a sequence similarity network (EFI–EST webserver) was generated using the glycoprotein amino acid sequences encoded by the 28 cytorhabdoviruses. Interestingly, the analyses show three distinct clusters (aphids, planthopper, and whiteflies) and two singletons (leafhopper and an undescribed vector) with a high degree of interconnectivity.

These results, together with the detection of BaCV in concomitant infection with the whitefly vectored BGMV and CPMMV in all plants (Figure 4), and with the presence of whiteflies adults, nymphs, and eggs in these plants (Figure 1), prompted us to postulate that whiteflies also vector BaCV.

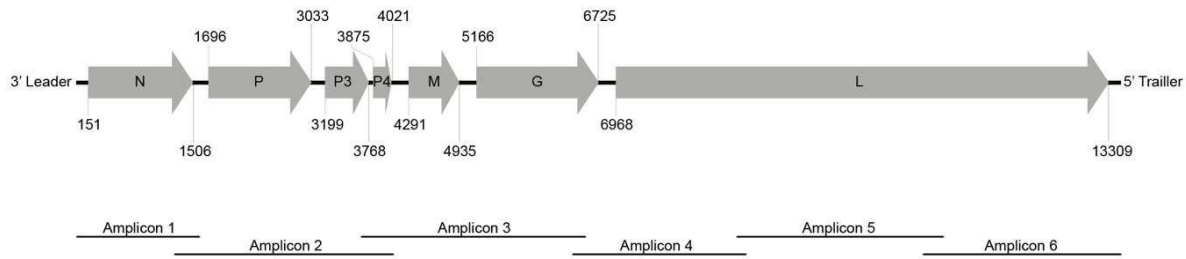


Figure 5. Genome organization of BaCV-Luz. Canonical genes encoding [N] nucleoprotein, [P] phosphoprotein, [M] matrix protein, [G] glycoprotein and [L] RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), and non-canonical [P3] and [P4]. Each ORF is represented by a gray arrow with the first and last nucleotide positions depicted. The complete genome (13,467 nts) was recovered by RT-PCR of six overlapping amplicons.

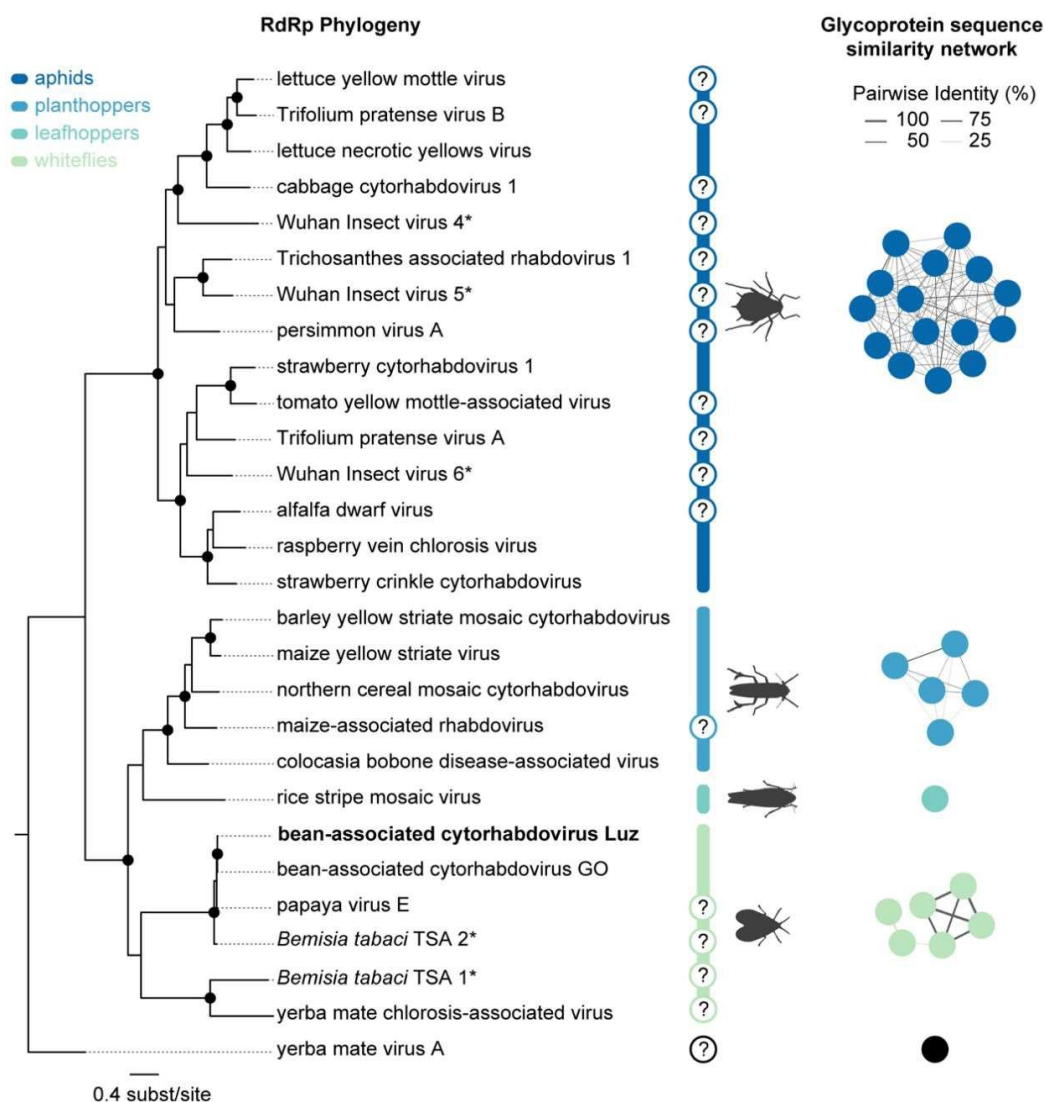


Figure 6. Maximum likelihood phylogenetic tree of cytorhabdovirus RdRP amino acid sequences and sequence similarity network of cytorhabdovirus glycoprotein amino acid sequences encoded by BaCV-Luz, BaCV-GO and other 26 cytorhabdoviruses. In both analyses, four groups were clustered according to their probable vector: aphid, planthopper, leafhopper, and whitefly. Enzyme Function Initiative–Enzyme Similarity Tool (EFI–EST) was used for glycoprotein analysis with an alignment score threshold of 35 and a minimum E-value threshold of 1×10^{-5} . The network was visualized in

Cytoscape v3.7.1. Support values $\geq 90\%$ SH-aLRT are displayed with black circles at nodes. (?) Unknown vector species. (*) Viruses detected by insects metatranscriptome.

1.11. *B. tabaci* MEAM1 Transmit BaCV-Luz to Common Beans, Cowpea, and Soybean

The known vectors of cytorhabdoviruses are insects belonging to the families Aphididae (aphids), Delphacidae (planthoppers), and Cicadellidae (leafhoppers). In general, when the vectors are known, there is a highly specific relationship, and only one (or a few related) types or species of a vector are capable of transmitting a given virus. Thus, it is possible to establish a strong correlation between viral detection and the presence of its vector in the field [3,49].

The field in Luziânia, GO, where the bean plants were initially sampled, was densely infested by whiteflies. The genotyping of these whiteflies by PCR-RFLP confirmed their identity as *B. tabaci* MEAM1, the prevalent whitefly species in Central Brazil [50]. To evaluate whether whiteflies also transmit BaCV, we used a BaCV (plus BGMV and CPMMV) field-collected infected bean plant as inoculum source and the flies carried by this plant in a free choice transmission assay (Figure 3). After a 14 day exposition time to the whitefly feeding, 100% ($n = 48$) of the bean plants 'Pérola', 'Jalo', and 'BRS FC 401 RMD' tested positive for the presence of BaCV RNA by RT-PCR. Whitefly adults collected at the same time as bean leaves were also positive for BaCV and CPMMV (Figure S2). All the plants also contained CPMMV, and the susceptible cultivars were positive for BGMV, suggesting that all three viruses were simultaneously transmitted by whiteflies. The mild mottling symptoms detected in 'BRS FC 401 RMD' plants ~50 days after introduction into the cage (Figure 7) resemble those described for CPMMV infection [51]. These results indicate that BaCV could be transmitted at high rates to three different bean cultivars by whiteflies *B. tabaci* MEAM1. The BaCV-Luz isolate was maintained by whitefly-mediated periodical transmission to healthy bean plants for 18 months. Altogether, during this period, 83 plants were exposed to potentially viruliferous flies in the cage, and 72 became infected by BaCV, an overall transmission rate of ~87%.

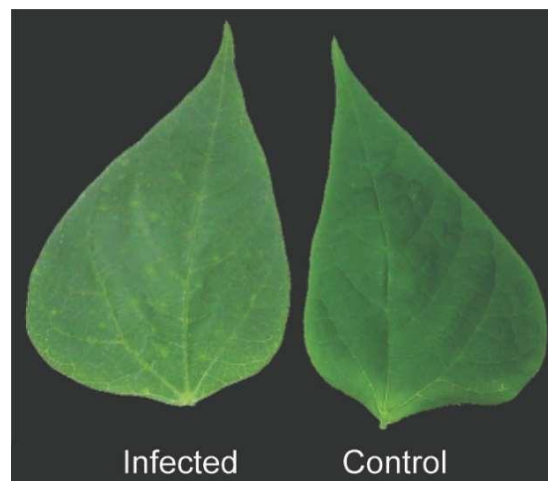


Figure 7. Common bean 'BRS FC 401 RMD' leaves from whitefly mediated BaCV and CPMMV transmission. Mild mottling and chlorotic spots in a leaf of an infected plant at ~50 days after inoculation and the leaf of a non-infected control plant.

A second experiment was conducted to confirm the capacity of whiteflies to transmit BaCV to common bean as well as soybean and cowpea (Figure 3). Using 25 to 30 adult *B. tabaci* MEAM1 per plant and both AAP and IAP of 7 days, BaCV transmission was achieved in 75% of the common beans, 50% of cowpeas, and 25% of the soybean plants (Table 2). All control plants exposed to non-viruliferous insects tested negative for BaCV (and CPMMV). With these results, it was also possible to experimentally extend the host range of BaCV to cowpea and soybean (Table 2). The second experiment showed a transmission efficiency rate lower than the pilot test, in which transmission occurred to 100% of the plants. The reduction in the efficiency of BaCV transmission may be related to the IAP, which was shorter than in the first experiment. Besides, the number of adult insects

feeding on each plant was limited to a maximum of 30, while in the first test, the whiteflies were free to feed so that each plant may have received a larger number of viral particles.

Furthermore, the whiteflies' ages were not synchronized in the initial trials, and the insect stage of the life cycle may influence the efficiency of BaCV transmission. Soybean is an economically important cash crop in Brazil and is also susceptible to CPMMV [52] and BGMV [53]. Cultivation cycle of soybean and common bean overlap in many areas of Brazil. In these areas, soybeans may act as an inoculum source of these three whitefly-borne viruses to bean crop hastening multiple virus epidemics. Our future investigation should focus on the study of field infection of soybean plants by BaCV. *B. tabaci* is a complex containing approximately 40 cryptic species with similar morphology but differing in the genetics, behavior, efficiency as a virus vector, and in the colonization by endosymbionts [50,54,55]. *B. tabaci* has a large number of hosts, more than 500 plant species, cultivated or not, in tropical and subtropical regions. *B. tabaci* is considered a super vector since it transmits over 300 plant viruses including begomoviruses (family *Geminiviridae*), criniviruses (family *Closteroviridae*), torradoviruses (family *Secoviridae*), ipomoviruses (family *Potyviridae*), and the carlaviruses CPMMV and melon yellowing-associated virus (MYaV) (family *Betaflexiviridae* [56,57]). Recently, two poleroviruses (family *Luteoviridae*) were also shown to be transmitted by *B. tabaci* [58,59].

Table 2. BaCV transmission by *B. tabaci* MEAM1.

Plant	Cultivar	Positive/Total	Transmission Rate (%)
<i>P. vulgaris</i> (common bean)	'BRSFC 401 RMD'	3/4	75
<i>V. unguiculata</i> (cowpea)	'BRS Imponente'	2/4	50
<i>G. max</i> (soybean)	'BR16'	1/4	25

Our transmission results demonstrate that whiteflies, in this case the species *B. tabaci* MEAM1, are vectors of the cytorhabdovirus BaCV in Brazil, highlighting the importance of whiteflies as plant virus vectors and emphasizing their designation as super vectors [56]. Moreover, our results expand the whiteflies' attributes as vectors, including the cytorhabdovirus group, to the list of viruses they can transmit.

Despite whiteflies being successful plant virus vectors, the transmission efficiency may vary depending on the virus, virus isolate, host plant, whitefly species and biology, and virus and whitefly population's geographical origin [57]. In our study, *B. tabaci* MEAM1 was very efficient in transmitting BaCV, especially to bean plants. *B. tabaci* MEAM1 predominates as a vector of various plant viruses in Brazil [50]. However, other whitefly species such as *B. tabaci* Mediterranean (MED) and *B. tabaci* New World (NW) are also present in more restricted areas of Southeastern and Southern States. Whether whiteflies MED and NW can transmit BaCV to beans or other crops remains to be investigated.

It is also necessary to investigate if *B. tabaci* MEAM1 is the vector of PpVE to papaya plants in Ecuador and if this virus infects papayas in Brazil. Cornejo-Franco, *et al.* [60] mention that *B. tabaci* is a major pest of papayas in Ecuador and is the vector of papaya virus Q (an umbra-like virus). Thus, this whitefly species may also be the vector PpVE to papayas. We have tested a limited number of papaya plants ($n = 27$) collected in the Distrito Federal and the State of Espirito Santo for the presence of BaCV with negative results. Nine whitefly species, including *B. tabaci* MEAM1, were already identified on papaya trees in Brazil, but *Trialeurodes variabilis* is the primary species associated with this fruit crop, and *B. tabaci* MEAM1 has a limited occurrence in papayas in the country [61]. Considering that BaCV and PpVE are frequently detected in mixed infections, it is important to investigate if this group of viruses is transmitted alone by *B. tabaci* MEAM1 or if a helper virus is required.

1.12. BaCV-Luz Detection in Plants and Whiteflies

Depending on the taxonomic group they belong to, viruses are transmitted by their whitefly vectors by different transmission modes [57]. The carlavirus CPMMV is reported to be stylet borne and transmitted in a nonpersistent mode [52]. While criniviruses, torradoviruses, and ipomoviruses are semipersistent viruses and foregut borne, the mode of transmission of poleroviruses by *B. tabaci*

is still unknown [56,57]. Begomoviruses are transmitted by different species in the *B. tabaci* complex in a persistent circulative manner. However, at least for one begomovirus, tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), there is evidence that it replicates in the whitefly [62–65] and that replication takes place mainly in the salivary glands [66].

Plant rhabdoviruses are transmitted by their arthropod vectors in a persistent, circulative- propagative manner. After the acquisition, viruliferous insects transmit plant rhabdoviruses for their entire lives. In plants, rhabdoviruses infect, replicate, and accumulate in a variety of tissues, including leaf epidermis and mesophyll, phloem tissues, and roots [5,67]. In their insect vectors, plant rhabdoviruses infect gut cells, muscle cells, nervous tissue, hemocytes, tracheae, and salivary glands [3,5,28].

BaCV RNA corresponding to N, P, P3, P4, M, G genes were amplified from BaCV-infected bean leaves and potentially viruliferous whiteflies collected in infected plants. Fragments with sizes according to their predicted ORFs were amplified (Figure 8a,b), except for L, probably because of its large size. *Amplicons* corresponding to *act11* and *RbcS* were only amplified from bean cDNA, and *v-ATPase* and *RpL9* from whiteflies (Figure 8a,b).

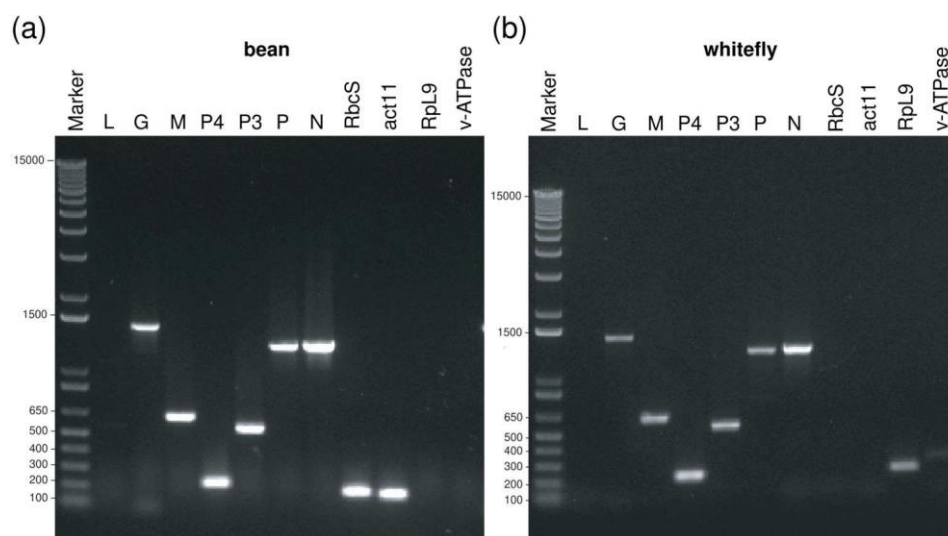


Figure 8. BaCV detection in common bean leaf and whiteflies (*B. tabaci* MEAM1). BaCV RNA corresponding to G, M, P4, P3, P, N genes were detected by PCR using specific *primers*. Internal controls include the plant *RbcS* and *act11* and the whitefly *RpL9* and *v-ATPase*. (a) RT-PCR products obtained from RNA extracted from common bean. (b) RT-PCR products obtained from RNA extracted from viruliferous whiteflies.

We have used transmission electron microscopy (TEM) to visualize BaCV accumulation in bean and whitefly tissues. Electron microscopic examination of BaCV-infected bean leaves revealed bacilliform particles typical of rhabdoviruses in parenchymal cells. Longitudinal and cross-sectioned particles were located in the cell cytoplasm, commonly at the periphery of an electron-lucent mass of coiled filamentous material, believed to be the viroplasm, where the virus replicates (Figure 9a–d) [5,68]. The BaCV bacilliform particles seemed rather scarce in the observed bean tissues. Presumed cytorhabdovirus virions were found in only one of the four examined leaf samples, though all plant samples tested positive for BaCV by RT-PCR.

By contrast, feather-like aggregates of CPMMV particles were readily recognized in all examined bean tissue samples. These in situ observations of BaCV and CPMMV virions presence in dually infected bean leaf corroborate the previous HTS sequencing study in which 8.2 % of the total sequence *reads* from multiple virus-infected bean leaves corresponded to CPMMV whereas only 0.01% mapped to BaCV [6]. In some cases, BaCV and CPMMV virions could be identified infecting the same cell (Figure 9d). Unfortunately, sections of three pairs of head/thorax or abdominal parts of whiteflies that fed in BaCV-infected beans did not yield evidence of BaCV particles or viroplasm in the observed tissues. The insects were tested before fixation, and only head/thorax corresponding to insects

that the abdomen tested positive for BaCV or vice-versa was examined. Therefore, albeit BaCV RNA could be detected in the insects by RT-PCR, particles were not localized in any of the tissues examined. The spatial and temporal distribution of BaCV within the whitefly body could have hindered the localization of particles by TEM. Moreover, plant rhabdoviruses appear to replicate and accumulate at lower levels in insect cells when compared to plant cells [3,6,69]. BaCV seems to accumulate at low levels, even in bean plants. Therefore, assessment of dissected organs such as midguts or salivary glands could facilitate the visualization of BaCV in whiteflies either by TEM or by confocal microscopy using immunofluorescence or in situ hybridization. The occurrence of BaCVvRNA, cRNA, and mRNA in whiteflies will be investigated in future studies.

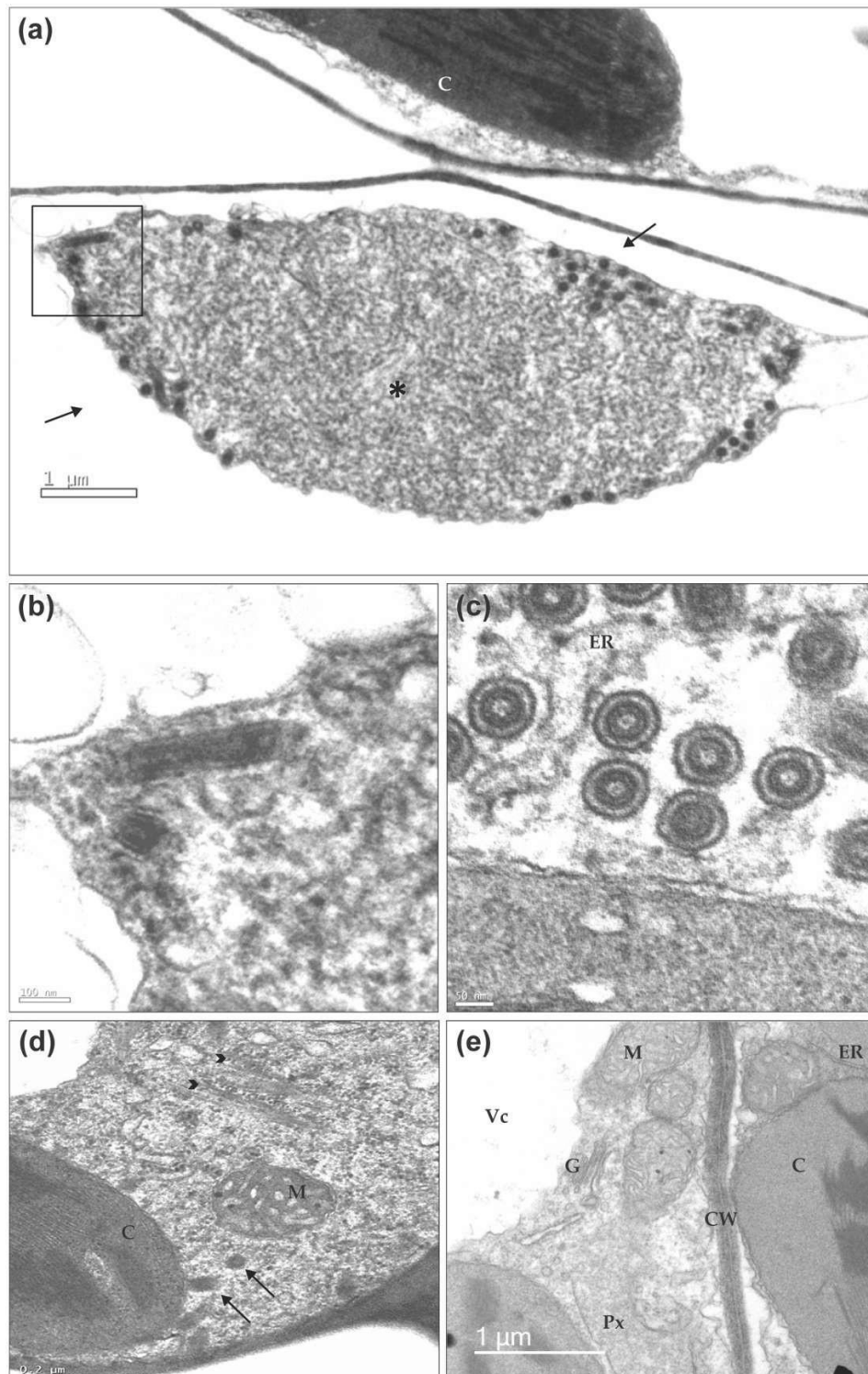


Figure 9. Transmission electron micrographs of bean leaf infected by BaCV. (a) Overview of a viroplasm formed by coiled filamentous material (*) in the cytoplasm of a parenchymal cell. Typical rhabdovirus particles are present in the periphery of the viroplasm (arrows). (b) Details of the marked square with longitudinally-sectioned particles are depicted. (c) Cross-sections of BaCV particles show the internal and cylindrical nucleoprotein core, and the outer viral membrane, and also that virions are within a cavity of the endoplasmic reticulum. (d) Spongy parenchymal cell dually infected by BaCV and CPMMV. Brush-like aggregates of CPMMV particles (arrowheads) and BaCV in longitudinal and cross-sections (arrows) are visible. (e) Palisade parenchyma cells from a healthy bean plant. Chloroplast (C), endoplasmic reticulum (ER), Golgi complex (G), mitochondrion (M), peroxisome (Px), vacuole (Vc), and cell wall (CW).

Conclusions

Our results show that BaCV is efficiently transmitted, in experimental conditions, by *B. tabaci* MEAM1 to three bean cultivars grown in Brazil, and with lower efficiency to cowpea and soybean. It remains to be determined whether BaCV replicates in whiteflies, as observed for other plant-infecting rhabdoviruses in their arthropod vectors. BaCV could not be singly isolated for pathogenicity tests, identification of the induced symptoms, and the transmission assay. Moreover, BaCV was detected in five out of seven Brazilian states evaluated. Besides BaCV in Brazil (this study, [6]) and PpVE in Ecuador [7], similar virus sequences were recorded from whiteflies samples in India [70], beans from Tanzania [71], and citrus, passion fruit, and paper bush in China [72], implying that other isolates/strains of BaCV/PpVE or related rhabdoviruses that are also transmitted by whiteflies might exist in other continents.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: RT-PCR and PCR detection of bean-infecting viruses, Figure S2: RT-PCR detection of BaCV and CPMMV, Table S1: Primers used in this study, Table S2: Accession number of cytorhabdovirus sequences in GenBank and their known vectors, Table S3: Nucleotide and amino acid sequence identities (%) of BaCV-Luz ORFs compared with PpEV strains.

Author Contributions: Conceptualization, B.P.-L., R.C.P.-C., S.G.R. and F.L.M.; Data curation, B.P.-L. and F.L.M.; Formal analysis, B.P.-L., R.S.F. and F.L.M.; Funding acquisition, A.V., S.G.R. and F.L.M.; Investigation, B.P.-L., D.M.T.A.F., E.W.K., A.H.V., M.T.G. and R.S.F.; Methodology, B.P.-L., E.W.K. and F.L.M.; Project administration, J.C.F., S.G.R. and F.L.M.; Resources, J.C.F., E.F.M.A., S.G.R. and F.L.M.; Supervision, R.C.P.-C., S.G.R. and F.L.M.; Visualization, B.P.-L., C.L. and F.L.M.; Writing—original draft, B.P.-L., S.G.R. and F.L.M.; Writing—review & editing, B.P.-L., R.C.P.-C., D.M.T.A.F., E.W.K., A.H.V., C.L., R.S.F., J.C.F., A.V., S.G.R. and F.L.M.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by grants from Embrapa, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq and Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal—FAP/DF. B.P.L. and A.H.V. are supported by scholarships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—CAPES. D.M.T.A.F. and M.T.G. received fellowships from CNPq.

Acknowledgments: We thank Rafael N. Lemos, Rodrigo Carniel, Luis C. Faria, Mônica Neli, and Marlonni Marastoni for helping in sample collection or sharing plant material; Mário Saraiva for technical support and assistance in the lab administration.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders, including Embrapa, had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Freitas-Astua, J.; Dietzgen, R.G.; Walker, P.J.; Blasdel, K.R.; Breyta, R.; Fooks, A.R.; Kondo, H.; Kurath, G.; Kuzmin, I.V.; Stone, D.M.; et al. Split the genus *Nucleorhabdovirus*, creating three new genera (*Alphanucleorhabdovirus*, *Betanucleorhabdovirus* and *Gammanucleorhabdovirus*) comprising sixteen species, including six new species, in the family *Rhabdoviridae*. In *Approved ICTV Proposal*; 2019. Available online: <https://ictv.global/ICTV/proposals/2019.031M.zip> (accessed 18 May 2020).

2. Walker, P.J.; Blasdel, K.R.; Calisher, C.H.; Dietzgen, R.G.; Kondo, H.; Kurath, G.; Longdon, B.; Stone, D.M.; Tesh, R.B.; Tordo, N.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Rhabdoviridae*. *J. Gen. Virol.* **2018**, *99*, 447–448, doi:10.1099/jgv.0.001020.
3. Ammar el, D.; Tsai, C.W.; Whitfield, A.E.; Redinbaugh, M.G.; Hogenhout, S.A. Cellular and molecular aspects of rhabdovirus interactions with insect and plant hosts. *Annu. Rev. Entomol.* **2009**, *54*, 447–468, doi:10.1146/annurev.ento.54.110807.090454.
4. Dietzgen, R.G.; Kondo, H.; Goodin, M.M.; Kurath, G.; Vasilakis, N. The family *Rhabdoviridae*: Mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins. *Virus Res.* **2017**, *227*, 158–170, doi:10.1016/j.virusres.2016.10.010.
5. Whitfield, A.E.; Huot, O.B.; Martin, K.M.; Kondo, H.; Dietzgen, R.G. Plant rhabdoviruses—their origins and vector interactions. *Curr. Opin. Virol.* **2018**, *33*, 198–207, doi:10.1016/j.coviro.2018.11.002.
6. Alves-Freitas, D.M.T.; Pinheiro-Lima, B.; Faria, J.C.; Lacorte, C.; Ribeiro, S.G.; Melo, F.L. Double-Stranded RNA High-Throughput Sequencing Reveals a New Cytorhabdovirus in a Bean Golden Mosaic Virus-Resistant Common Bean Transgenic Line. *Viruses* **2019**, *11*, doi:10.3390/v11010090.
7. Medina-Salguero, A.X.; Cornejo-Franco, J.F.; Grinstead, S.; Mollov, D.; Mowery, J.D.; Flores, F.; Quito-Avila, D.F. Sequencing, genome analysis and prevalence of a cytorhabdovirus discovered in Carica papaya. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0215798, doi:10.1371/journal.pone.0215798.
8. Freitas-Astua, J.; Dietzgen, R.G.; Walker, P.J.; Blasdel, K.R.; Breyta, R.; Fooks, A.R.; Kondo, H.; Kurath, G.; Kuzmin, I.V.; Stone, D.M.; et al. Create twelve new species in the genus Cytorhabdovirus, family *Rhabdoviridae*. In *Approved ICTV Proposal*; 2019. Available online: <https://ictv.global/ICTV/proposals/2019.030M.zip>. (accessed on 18 May 2020).
9. International Committee on Taxonomy of Viruses—ICTV Online. Available online: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-ma-viruses/mononegavirales/w/Rhabdoviridae (accessed on 18 May 2020).
10. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística—IBGE. Available online: <https://www.ibge.gov.br> (accessed on 24 July 2020).
11. Doyle, J.J.; Doyle, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* **1987**, *19*, 11–15.
12. Nicolini, C.; Pio-Ribeiro, G.; Andrade, G.P.; Melo, F.L.; Oliveira, V.C.; Guimaraes, F.C.; Resende, R.O.; Kitajima, E.W.; Rezende, J.A.; Nagata, T. A distinct tymovirus infecting *Cassia hoffmannseggii* in Brazil. *Virus Genes* **2012**, *45*, 190–194, doi:10.1007/s11262-012-0750-9.
13. Schuster, D.; Buchman, G.; Rashtchian, A. A simple and efficient method for amplification of cDNA ends using 5' RACE. *Focus* **1992**, *14*, 46–52.
14. Pinheiro-Lima, B.; Alves-Freitas, D.M.T.; Melo, F.L.; Carvalho, R.; de Faria, J.C.; Ribeiro, S.G. Characterization of a new whitefly-transmitted (*Bemisia tabaci* MEAM 1) cytorhabdovirus infecting common bean. *Congr. Nac. Pesqui. Feijão* **2017**, *12*, 52.
15. Lamas, N.S.; Matos, V.O.R.L.; Alves-Freitas, D.M.T.; Melo, F.L.; Costa, A.F.; Faria, J.C.; Ribeiro, S.G. Occurrence of Cowpea mild mottle virus in Common Bean and Associated Weeds in Northeastern Brazil. *Plant Dis.* **2017**, *101*, 1828, doi:10.1094/PDIS-04-17-0562-PDN.
16. Bonfim, K.; Faria, J.C.; Nogueira, E.O.; Mendes, E.A.; Aragao, F.J. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol. Plant Microbe Interact* **2007**, *20*, 717–726, doi:10.1094/MPMI-20-6-0717.
17. Bosco, D.; Loria, A.; Sartor, C.; Cenis, J. PCR-RFLP Identification of *Bemisia tabaci* biotypes in the Mediterranean Basin. *Phytoparasitica* **2006**, *34*, 243–251, doi:10.1007/BF02980951.
18. Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 1647–1649, doi:10.1093/bioinformatics/bts199.
19. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410, doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
20. Katoh, K.; Rozewicki, J.; Yamada, K.D. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* **2019**, *20*, 1160–1166, doi:10.1093/bib/bbx108.
21. Trifinopoulos, J.; Nguyen, L.T.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q. W-IQ-TREE: A fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W232–W235, doi:10.1093/nar/gkw256.

22. Shimodaira, H. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Syst. Biol.* **2002**, *51*, 492–508, doi:10.1080/10635150290069913.
23. Gerlt, J.A.; Bouvier, J.T.; Davidson, D.B.; Imker, H.J.; Sadkhin, B.; Slater, D.R.; Whalen, K.L. Enzyme Function Initiative-Enzyme Similarity Tool (EFI-EST): A web tool for generating protein sequence similarity networks. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1854*, 1019–1037, doi:10.1016/j.bbapap.2015.04.015.
24. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498–2504, doi:10.1101/gr.1239303.
25. Muhire, B.M.; Varsani, A.; Martin, D.P. SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e108277, doi:10.1371/journal.pone.0108277.
26. Faria, J.C.; Aragão, F.J.L.; Souza, T.L.P.O.; Quintela, E.D.; Kitajima, E.W.; Ribeiro, S.G. Golden mosaic of common beans in Brazil: Management with a transgenic approach. *APS Features* **2016**, *10*, 1–14.
27. Orfanidou, C.G.; Pappi, P.G.; Efthimiou, K.E.; Katis, N.I.; Maliogka, V.I. Transmission of Tomato chlorosis virus (ToCV) by *Bemisia tabaci* Biotype Q and Evaluation of Four Weed Species as Viral Sources. *Plant Dis.* **2016**, *100*, 2043–2049.
28. Cao, Q.; Xu, W.Y.; Gao, Q.; Jiang, Z.H.; Liu, S.Y.; Fang, X.D.; Gao, D.M.; Wang, Y.; Wang, X.B. Transmission Characteristics of Barley Yellow Striate Mosaic Virus in Its Planthopper Vector *Laodelphax striatellus*. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1419, doi:10.3389/fmicb.2018.01419.
29. Borges, A.; Tsai, S.M.; Caldas, D.G. Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Rep.* **2012**, *31*, 827–838, doi:10.1007/s00299-011-1204-x.
30. Knight, M.R.; Jenkins, G.I. Genes encoding the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in *Phaseolus vulgaris* L.: Nucleotide sequence of cDNA clones and initial studies of expression. *Plant Mol. Biol.* **1992**, *18*, 567–579, doi:10.1007/BF00040672.
31. Upadhyay, S.K.; Chandrashekar, K.; Thakur, N.; Verma, P.C.; Borgio, J.F.; Singh, P.K.; Tuli, R. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. *J. Biosci.* **2011**, *36*, 153–161, doi:10.1007/s12038-011-9009-1.
32. Alves-Freitas, D.M.T.; Melo, F.L.; Faria, J.C.; Ribeiro, S.G. dsRNA deep sequencing reveals five viral species in common beans. *J. Braz. Soc. Virol.* **2016**, *20*, 43–44.
33. Moreno, A.B.; Lopez-Moya, J.J. When Viruses Play Team Sports: Mixed Infections in Plants. *Phytopathology* **2020**, *110*, 29–48, doi:10.1094/PHYTO-07-19-0250-FI.
34. Gautam, S.; Gadhave, K.R.; Buck, J.W.; Dutta, B.; Coolong, T.; Adkins, S.; Srinivasan, R. Virus-virus interactions in a plant host and in a hemipteran vector: Implications for vector fitness and virus epidemics. *Virus Res.* **2020**, *286*, 198069, doi:10.1016/j.virusres.2020.198069.
35. Francki, R.I.B.; Randles, J.W.; Dietzgen, R.G. Lettuce necrotic yellows virus. *AAB Descr. Plant Viruses* **1989**, *343*, 5.
36. Jones, S.; McGavin, W.; MacFarlane, S. The complete sequences of two divergent variants of the rhabdovirus raspberry vein chlorosis virus and the design of improved primers for virus detection. *Virus Res.* **2019**, *265*, 162–165, doi:10.1016/j.virusres.2019.03.004.
37. Sylvester, E.S.; Richardson, J.; Frazier, N.W. Serial passage of strawberry crinkle virus in the aphid *Chaetosiphon jacobi*. *Virology* **1974**, *59*, 301–306, doi:10.1016/0042-6822(74)90226-8.
38. Franova, J.; Pribylova, J.; Koloniuk, I. Molecular and Biological Characterization of a New Strawberry Cytorhabdovirus. *Viruses* **2019**, *11*, doi:10.3390/v111110982.
39. Li, C.X.; Shi, M.; Tian, J.H.; Lin, X.D.; Kang, Y.J.; Chen, L.J.; Qin, X.C.; Xu, J.; Holmes, E.C.; Zhang, Y.Z. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *eLife* **2015**, *4*, doi:10.7554/eLife.05378.
40. Conti, M.; Appiano, A. Barley yellow striate mosaic virus and associated viroplasm in barley cells. *The J. Gen. Virol.* **1973**, *21*, 315–322, doi:10.1099/0022-1317-21-2-315.
41. Gollifer, D.E.; Jackson, G.V.H.; Dabek, A.J.; Plumb, R.T.; May, Y.Y. The occurrence and transmission of viruses of edible aroids in the Solomon Islands and the Southwest Pacific. *Pestic. Artic. News Summ.* **1977**, *23*, 171–177.
42. Maurino, M.F.; Laguna, G.; Giolitti, F.; Nome, C.; Pecci, M.P.G. First Occurrence of a Rhabdovirus Infecting Maize in Argentina. *Plant Dis.* **2012**, *96*, 1383, doi:10.1094/PDIS-02-12-0222-PDN.
43. Maurino, F.; Dumon, A.D.; Llauger, G.; Alemandri, V.; de Haro, L.A.; Mattio, M.F.; Del Vas, M.; Laguna, I.G.; Gimenez Pecci, M.P. Complete genome sequence of maize yellow striate virus, a new cytorhabdovirus

- infecting maize and wheat crops in Argentina. *Arch. Virol.* **2018**, *163*, 291–295, doi:10.1007/s00705-017-3579-7.
44. Toriyama, S. Purification and some properties of northern cereal mosaic virus. *Uirusu* **1972**, *22*, 114–124, doi:10.2222/jsv.22.114.
 45. Toriyama, S. Northern cereal mosaic. In *Viruses and Virus Diseases of Poaceae (Gramineae)*; Lapierre, H., Signoret, P.-A., Eds.; INRA: Paris, France, 2004; pp. 578–580.
 46. Yang, X.; Huang, J.; Liu, C.; Chen, B.; Zhang, T.; Zhou, G. Rice Stripe Mosaic Virus, a Novel Cytorhabdovirus Infecting Rice via Leafhopper Transmission. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 2140, doi:10.3389/fmicb.2016.02140.
 47. Bejerman, N.; Dietzgen, R.G. Letter to the Editor: Bean-Associated Cytorhabdovirus and Papaya Cytorhabdovirus are Strains of the Same Virus. *Viruses* **2019**, *11*, doi:10.3390/v11030230.
 48. Dietzgen, R.G.; Bejerman, N.E.; Goodin, M.M.; Higgins, C.M.; Huot, O.B.; Kondo, H.; Martin, K.M.; Whitfield, A.E. Diversity and epidemiology of plant rhabdoviruses. *Virus Res.* **2020**, *281*, 197942, doi:10.1016/j.virusres.2020.197942.
 49. Mann, K.S.; Dietzgen, R.G. Plant rhabdoviruses: New insights and research needs in the interplay of negative-strand RNA viruses with plant and insect hosts. *Arch. Virol.* **2014**, *159*, 1889–1900, doi:10.1007/s00705-014-2029-z.
 50. de Moraes, L.A.; Muller, C.; Bueno, R.; Santos, A.; Bello, V.H.; De Marchi, B.R.; Watanabe, L.F.M.; Marubayashi, J.M.; Santos, B.R.; Yuki, V.A.; et al. Distribution and phylogenetics of whiteflies and their endosymbiont relationships after the Mediterranean species invasion in Brazil. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14589, doi:10.1038/s41598-018-32913-1.
 51. Carvalho, S.L.; Nagata, T.; Junqueira, B.R.; Zanardo, L.G.; Paiva, A.C.; Carvalho, C.M. Construction of a full-length infectious cDNA clone of Cowpea mild mottle virus. *Virus Genes* **2017**, *53*, 137–140, doi:10.1007/s11262-016-1395-x.52. Zanardo, L.G.; Carvalho, C.M. Cowpea mild mottle virus (Carlavirus, Betaflexiviridae): A review. *Trop. Plant Pathol.* **2017**, *42*, 417–430.
 52. Zanardo, L.G.; Carvalho, C.M. Cowpea mild mottle virus (Carlavirus, Betaflexiviridae): A review. *Trop. Plant Pathol.* **2017**, *42*, 417–430, doi:10.1007/s40858-017-0168-y.
 53. Fernandes, F.R.; Cruz, A.R.; Faria, J.C.; Zerbini, F.M.; Aragao, F.J. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. *Arch. Virol.* **2009**, *154*, 1567–1570, doi:10.1007/s00705-009-0463-0.
 54. De Barro, P.J.; Liu, S.S.; Boykin, L.M.; Dinsdale, A.B. *Bemisia tabaci*: A statement of species status. *Annu. Rev. Entomol.* **2011**, *56*, 1–19, doi:10.1146/annurev-ento-112408-085504.
 55. Lee, W.; Park, J.; Lee, G.S.; Lee, S.; Akimoto, S. Taxonomic status of the *Bemisia tabaci* complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and reassessment of the number of its constituent species. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e63817, doi:10.1371/journal.pone.0063817.
 56. Gilbertson, R.L.; Batuman, O.; Webster, C.G.; Adkins, S. Role of the Insect Supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the Emergence and Global Spread of Plant Viruses. *Annu. Rev. Virol.* **2015**, *2*, 67–93, doi:10.1146/annurev-virology-031413-085410.
 57. Fiallo-Olive, E.; Pan, L.L.; Liu, S.S.; Navas-Castillo, J. Transmission of Begomoviruses and Other Whitefly-Borne Viruses: Dependence on the Vector Species. *Phytopathology* **2020**, *110*, 10–17, doi:10.1094/PHYTO-07-19-0273-FI.
 58. Ghosh, S.; Kanakala, S.; Lebedev, G.; Kontsedalov, S.; Silverman, D.; Alon, T.; Mor, N.; Sela, N.; Luria, N.; Dombrovsky, A.; et al. Transmission of a New Polerovirus Infecting Pepper by the Whitefly *Bemisia tabaci*. *J. Virol.* **2019**, *93*, doi:10.1128/JVI.00488-19.
 59. Costa, T.M.; Inoue-Nagata, A.K.; Vidal, A.H.; Ribeiro, S.G.; Nagata, T. The recombinant isolate of cucurbit aphid-borne yellows virus from Brazil is a polerovirus transmitted by whiteflies. *Plant Pathol.* **2020**, *69*, 1042–1050, doi:10.1111/ppa.13186.
 60. Cornejo-Franco, J.F.; Alvarez-Quinto, R.A.; Quito-Avila, D.F. Transmission of the umbra-like Papaya virus Q in Ecuador and its association with meleira-related viruses from Brazil. *Crop Prot.* **2018**, *110*, 99–102.
 61. Martins, D.S.; Lima, A.F.; Fornazier, M.J.; Barcellos, B.D.; Queiroz, R.B.; Fanton, C.J.; Zanuncio-Junior, J.S.; Fornazier, D.L. Whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) Associated with papaya (*Carica papaya* L.). *Rev. Científica Intelletto* **2016**, *2*, 78–86.
 62. Sinisterra, X.H.; McKenzie, C.L.; Hunter, W.B.; Powell, C.A.; Shatters, R.G. Differential transcriptional activity of plant-pathogenic begomoviruses in their whitefly vector (*Bemisia tabaci*, Gennadius: Hemiptera Aleyrodidae). *J. Gen. Virol.* **2005**, *86*, 1525–1532, doi:10.1099/vir.0.80665-0.

63. Pakkianathan, B.C.; Kontsedalov, S.; Lebedev, G.; Mahadav, A.; Zeidan, M.; Czosnek, H.; Ghanim, M. Replication of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Its Whitefly Vector, *Bemisia tabaci*. *J. Virol.* **2015**, *89*, 9791–9803, doi:10.1128/JVI.00779-15.
64. Wang, L.L.; Wang, X.R.; Wei, X.M.; Huang, H.; Wu, J.X.; Chen, X.X.; Liu, S.S.; Wang, X.W. The autophagy pathway participates in resistance to tomato yellow leaf curl virus infection in whiteflies. *Autophagy* **2016**, *12*, 1560–1574, doi:10.1080/15548627.2016.1192749.
65. Czosnek, H.; Ghanim, M.; Morin, S.; Rubinstein, G.; Fridman, V.; Zeidan, M. Whiteflies: Vectors, and victims (?), of geminiviruses. *Adv. Virus Res.* **2001**, *57*, 291–322, doi:10.1016/s0065-3527(01)57006-2.
66. He, Y.Z.; Wang, Y.M.; Yin, T.Y.; Fiallo-Olive, E.; Liu, Y.Q.; Hanley-Bowdoin, L.; Wang, X.W. A plant DNA virus replicates in the salivary glands of its insect vector via recruitment of host DNA synthesis machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, 10.1073/pnas.1820132117, doi:10.1073/pnas.1820132117.
67. Jackson, A.O.; Dietzgen, R.G.; Goodin, M.M.; Bragg, J.N.; Deng, M. Biology of plant rhabdoviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2005**, *43*, 623–660, doi:10.1146/annurev.phyto.43.011205.141136.
68. Jackson, A.O.; Dietzgen, R.G.; Goodin, M.M.; Li, Z. Development of Model Systems for Plant Rhabdovirus Research. *Adv. Virus Res.* **2018**, *102*, 23–57, doi:10.1016/bs.aivir.2018.06.008.
69. Ammar el, D.; Hogenhout, S.A. A neurotropic route for Maize mosaic virus (*Rhabdoviridae*) in its planthopper vector *Peregrinus maidis*. *Virus Res.* **2008**, *131*, 77–85, doi:10.1016/j.virusres.2007.08.010.
70. Upadhyay, S.K.; Sharma, S.; Singh, H.; Dixit, S.; Kumar, J.; Verma, P.C.; Chandrashekar, K. Whitefly genome expression reveals host-symbiont interaction in amino acid biosynthesis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0126751, doi:10.1371/journal.pone.0126751.
71. Mwaipopo, B.; Nchimbi-Msolla, S.; Njau, P.J.R.; Mark, D.; Mbanzibwa, D.R. Comprehensive Surveys of Bean common mosaic virus and Bean common mosaic necrosis virus and Molecular Evidence for Occurrence of Other *Phaseolus vulgaris* Viruses in Tanzania. *Plant Dis.* **2018**, *102*, 2361–2370, doi:10.1094/PDIS-01-18-0198-RE.
72. Zhang, S.; Huang, A.; Zhou, X.; Li, Z.; Dietzgen, R.G.; Zhou, C.Y.; Cao, M. Natural defect of a plant rhabdovirus glycoprotein gene: A case study of virus-plant co-evolution. *Phytopathology* **2020**, doi:10.1094/PHYTO-05-20-0191-FI.

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

