



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

**O patossistema begomovírus e mosca-branca em tomateiro:
relato de uma nova espécie e controle do vetor *Bemisia tabaci***

Thais Pereira Martins

Brasília
2021



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

**O patossistema begomovírus e mosca-branca em tomateiro:
relato de uma nova espécie e controle do vetor *Bemisia tabaci***

Thais Pereira Martins

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Molecular da Universidade de Brasília, como
parte dos requisitos necessários à obtenção do
título de Doutora em Biologia Molecular.

Orientador: Tatsuya Nagata

Brasília
2021

Esta tese intitulada “**O patossistema begomovírus e mosca-branca em tomateiro: relato de uma nova espécie e controle do vetor *Bemisia tabaci***” 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: 23/07/2021

Banca Examinadora

Dr. Tatsuya Nagata (Presidente)
Universidade de Brasília

Dr. Bergmann Morais Ribeiro
Universidade de Brasília

Dra. Rosana Blawid
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Dr. Francisco José Lima Aragão
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen

Dr. Rodrigo Fragoso (suplente)
Embrapa Cerrados

*À Deus e à minha mãe,
que me deram forças para
chegar até aqui, dedico.*

RESUMO

As lavouras de tomateiro são altamente afetadas por doenças causadas pelos vírus do gênero *Begomovirus* que têm causado um grande impacto nas principais regiões produtoras devido à falta de métodos de controle eficientes. Os begomovírus apresentam alta variabilidade genética, favorecendo o surgimento de novas variantes com potencial de causar prejuízos drásticos. Em uma visita de rotina a uma lavoura de tomateiro rasteiro em Luziânia, Goiás, uma planta de tomateiro (cv. AP533, suscetível à infecção por begomovírus) chamou a atenção por apresentar sintomas severos, caracterizado por folhas com manchas cloróticas e deformação foliar. Um novo begomovírus foi identificado nesta planta a partir da análise com a tecnologia Nanopore. A sequência do genoma completo foi determinada e confirmada por sequenciamento Sanger. O DNA-A do novo begomovírus, tentativamente nomeada como tomato begomovirus MoLDi (ToMoLDiV), apresentou maior identidade de nucleotídeos com tomato golden leaf distortion virus (81,65%; ToGLDV; acesso HM357456), confirmando o isolado como potencial novo membro do gênero. A organização genômica é típica de um begomovírus do novo mundo. A sequência conservada do nonanucleotídeo geminiviral e os sítios de ligação da Rep (iterons) foram identificados em ambos os segmentos. Filogeneticamente, o ToMoLDiV está mais próximo aos begomovírus ToGLDV, tomato mosaic severe dwarf virus (ToMSDV) e tomato interveinal chlorosis virus 2 (ToICV2). A agroinoculação do clone dimérico do componente DNA-A (C16A) resultou na detecção do DNA-A em 12 de 103 plantas das espécies *Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara e cv. Lanai, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, *N. rustica* e *Nicandra physaloides*. Entretanto, não foram observados sintomas nessas plantas, indicando que o clone infeccioso do DNA-B será necessário para o cumprimento dos postulados de Koch. O vírus ToMoLDiV foi encontrado em uma lavoura onde já foi registrada a ocorrência dos begomovírus tomato severe rugose virus (ToSRV) e ToICV2, evidenciando uma rica diversidade de espécies de begomovírus nessa região produtora. O surgimento de novas variantes de begomovírus também pode ser favorecido pelas altas populações de moscas-brancas *Bemisia tabaci* que persistem nos campos devido ao desenvolvimento de resistência aos princípios químicos utilizados para seu controle. Muitos grupos de pesquisa têm investigado métodos alternativos de manejo desses insetos e o RNA interferente (RNAi) tem mostrado seu potencial no controle dessas pragas, apesar da atividade de RNases inespecíficas. Aqui, avaliamos os efeitos em moscas-brancas da ingestão de dsRNAs (fita dupla de RNA) contra os genes que codificam as proteínas Loquacious (LOQ), HSP70, Distroglicana (DIS), Tuberina (TUBE) e Laminina (LAMI). Foi verificado que a expressão de Loquacious e HSP70 é maior em estádios ninfais da mosca-

branca, porém, como a realização de ensaios de alimentação em dieta artificial com ninfas é inviável, manteve-se a avaliação do silenciamento de todos os genes em adultos. Os bioensaios utilizando dsRNA de tomato mosaic virus (ToMV) comercial (controle negativo) confirmaram a presença de compostos tóxicos às moscas-brancas nos lotes de dsRNAs comerciais, então optou-se por avaliar o silenciamento dos genes-alvo com administração de dsRNAs produzidos *in vitro* no laboratório. Os ensaios foram realizados basicamente com uma solução de sacarose (SAC) a 30% como dieta artificial. Nos testes com a ingestão de dsLOQ-B, dsTUBE, dsDIS, dsLAMI e dsHSP70-B, nenhum tratamento resultou em taxas de letalidade relevantes em relação aos controles. Porém, uma diferença significativa entre as curvas de sobrevivência dos tratamentos dsLAMI em relação a dsToMV foi observada, indicando possível efeito negativo da ingestão de dsLAMI. A quantificação da expressão de Laminina nas moscas-brancas após 120 horas de ensaio mostrou uma expressão em dsLAMI significativamente mais baixa em relação ao tratamento SAC. Apesar da tendência à letalidade observada após a ingestão de dsLAMI, o uso dos dsRNAs contra os genes-alvo avaliados com abordagens mais complexas, como a expressão em plantas transgênicas, ainda não é indicado. Foi verificada baixa de letalidade após a ingestão de dsHSP70-B, ao contrário dos ensaios já relatados. Portanto, será necessária a avaliação da degradação do dsRNA no intestino das moscas-brancas e do uso dos dsRNAs para genes-alvo associados à dsRNAs contra as RNases responsáveis pela degradação, para aumentar a eficiência do silenciamento visando induzir maior letalidade nas moscas-brancas.

Palavras-chave: controle, dsRNA, mosca-branca, novo begomovírus, tomateiro.

ABSTRACT

Tomato crops are highly affected by diseases caused by viruses of the genus *Begomovirus*, which cause great impacts on the major tomato producing regions due to the lack of efficient control methods. Begomoviruses present a high genetic variability that favours the emergence of new variants with the potential to cause drastic damages. In a routine visit to a processing tomato field in Luziânia, Goiás, a tomato plant cv. AP533 (susceptible to begomovirus infections) presented severe symptoms characterized by chlorotic spots and leaf deformation. A new begomovirus was identified in this plant by sequence analysis using the Nanopore technology. The complete genome sequence was determined and confirmed by Sanger sequencing. The DNA-A of the new begomovirus, tentatively named as tomato begomovirus MoLDi (ToMoLDiV), showed the highest nucleotide identity with tomato golden leaf distortion virus (81.65%; ToGLDV; accession HM357456), confirming the isolate as a potential new member of the genus. The genomic organization is typical of a New World begomovirus. The conserved geminiviral nonanucleotide sequence and Rep binding sites (iterons) were identified in both segments. Phylogenetically, ToMoLDiV is closer to the begomoviruses ToGLDV, tomato mosaic severe dwarf virus (ToMSDV) and tomato interveinal chlorosis virus 2 (ToICV2). Agroinoculation of the dimeric clone of the DNA-A component (C16A) resulted in the detection of DNA-A in 12 of 103 plants, including *Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara and cv. Lanai, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, *N. rustica* and *Nicandra physaloides*. However, no symptoms were observed in the plants, thus the infectious clone of DNA-B will be necessary to fulfil Koch's postulates. The ToMoLDiV virus was found in a field where the occurrence of begomoviruses tomato severe rugose virus (ToSRV) and ToICV2 has been recorded, indicating a rich diversity of begomoviruses in this producing region. The emergence of these new variants can also be favoured by the high populations of *Bemisia tabaci* whiteflies that persist in the fields due to the development of resistance to the chemical compounds used for their control. Several research groups have investigated alternative methods of handling these insects and RNA interference (RNAi) has shown its potential for pest control, despite the activity of nonspecific RNases. Here, we evaluated the effects of dsRNA ingestion in whiteflies against genes encoding Loquacious (LOQ), HSP70, Dystroglycan (DIS), Tuberin (TUBE) and Laminin (LAMI) proteins. We verified that the expression of Loquacious and HSP70 is higher in whitefly nymphal stages, however, as performing feeding trials in artificial diet with nymphs is not feasible, the evaluation of the silencing effect of the two genes in adults was carried out instead. Bioassays using commercial dsRNA of tomato mosaic virus (ToMV) (negative control), demonstrated

the presence of toxic compounds to whiteflies in commercial dsRNA batches, so it was decided to evaluate the target gene silencing with the administration of dsRNAs produced in the laboratory. Tests were carried out with a 30% sucrose solution (SAC) as artificial diet. In tests with ingestion of dsLOQ-B, dsTUBE, dsDIS, dsLAMI and dsHSP70-B, no treatment resulted in relevant lethality rates compared to controls. However, significant differences between the survival curves of the dsLAMI treatment in relation to dsToMV was observed, indicating a possible negative effect of dsLAMI ingestion. The quantification of Laminin expression in whiteflies after 120 hours of testing showed a significantly lower expression in dsLAMI compared to the SAC treatment. Despite the trend towards lethality observed after ingestion of dsLAMI, the use of dsRNAs against target genes evaluated with more complex approaches, such as expression in transgenic plants, is still not indicated. Low lethality was observed after ingestion of dsHSP70-B, as opposed to already reported assays. Consequently, it will be necessary to evaluate the degradation of dsRNA in the intestine of whiteflies and the use of dsRNAs for target genes associated with dsRNAs against the RNases responsible for degradation, to increase the efficiency of silencing in order to induce greater lethality in whiteflies.

Key words: control, dsRNA, new begomovirus, tomato, whitefly.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema mostrando o caminho percorrido pelas partículas dos begomovírus desde sua saída do floema da planta e entrada pelo estilete da mosca-branca. As partículas vermelhas representam os begomovírus, que normalmente são vírus restritos ao floema (p), local onde a mosca-branca alimenta-se a partir da sucção da seiva utilizando o estilete (s). A endocitose para a internalização do vírus começa a ocorrer na câmara de filtro (fc), localizada no intestino médio (mg), onde também ocorre a interação das partículas com a proteína HSP70 (partículas verdes). Após alcançar a hemolinfa, o vírus interage com as proteínas GroEL (partículas azuis), produzidas pelos endossimbiontes presentes nos bacteriócitos (bc), depois entra nas glândulas salivares primárias (psg) por endocitose e é secretado na saliva (Ghanim 2014). 23
- Figura 2. Fases de desenvolvimento da mosca-branca (*B. tabaci*) em tomateiro, MEAM1 (biótipo B). Fotos dos ovos, de todos os estádios ninfais e o adulto com a duração aproximada de cada fase em dias. 29
- Figura 3. Localização da Laminina (laminin 2) na matriz extracelular e da Distroglicana (α -dystroglycan e β -dystroglycan), no sarcolema, formando o complexo dys-glicoproteico na célula muscular (Nakamura 2015). 38
- Figura 4. Planta de tomateiro (cv. AP533) coletada em Luziânia, Goiás, Brasil, apresentando sintomas de mosqueado, distorção foliar, pontos cloróticos, clareamento de nervuras e enrolamento foliar. 58
- Figura 5. Perfil obtido a partir da digestão do produto do RCA da amostra MoLDI com enzima de restrição MspI. M=marcador 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen); 1=amostra MoLDi. 62
- Figura 6. Matrizes de identidade par a par dos genomas do DNA-A (A) e DNA-B (B) de ToMoLDiV com os 12 vírus mais próximos (identificados por análise BLASTn) inferidas usando a ferramenta de demarcação de espécies SDT. Os nomes completos dos vírus são encontrados em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae/479/member-species-begomovirus. 63
- Figura 7. Alinhamento da região contendo TATA box (sublinhado) no DNA-A e DNA-B de ToMoLDiV (negrito), e vírus próximos com o número de acesso: tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV), tomato golden leaf distortion (ToGLDV), pepper blistering leaf virus (PepBLV), tomato vein clearing leaf deformation virus (ToVCLDeV) e tomato interveinal chlorosis-2 (ToICV2). As possíveis sequências dos iterons estão agrupadas e realçadas. 64
- Figura 8. Árvores filogenéticas não enraizadas de ToMoLDiV e os begomovírus mais próximos geradas com o método da máxima verossimilhança (3.000 réplicas), realizado em Mega X (Kumar et al. 2018) usando os modelos general time-reversible (a, DNA-A) e Hasegawa-Kishino-Yano (b, DNA-B). Os valores de bootstrap estão incluídos e os nomes completos dos vírus são encontrados em:

https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae/479/member-species-begomovirus. Barra=substituições por sítio. 65

Figura 9. Moscas-brancas se alimentando em solução contendo dieta artificial em um dos lados do tubo de polietileno coberto com papel alumínio. 79

Figura 10. Expressão relativa dos genes para as proteínas Loquacious (barras cinzas) e HSP70 (barras vermelhas) em amostras do 1^o-2^o, 3^o e 4^o instares e em adultos de mosca-branca. Gene-alvo foi normalizado em relação ao gene da Actina e quantificado utilizando método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os valores são médias + erro padrão da média. A expressão dos genes está representada utilizando como referência amostra 1^o-2^o instar. 85

Figura 11. Curvas de sobrevivência log rank comparando efeitos da administração de sacarose (SAC), dsToMV e dsRNAs contra o gene Loquacious (A) e Tuberina (C). Taxas de letalidade obtidas após 120 h de alimentação com dsLOQ-B (B) e com dsTUBE (D). Estão representadas as médias com o erro padrão da média, e as diferenças significativas indicadas com asteriscos, de acordo com teste de comparações múltiplas de Tukey (em B e D). 91

Figura 12. Curvas de sobrevivência log rank comparando efeitos da administração de sacarose (SAC), dsToMV e dsRNAs contra a proteína Distroglicana (A) e Laminina (C). Taxas de letalidade obtidas após 120 h de alimentação com dsDIS (B) e com dsLAMI (D). Estão representadas as médias com o erro padrão da média e as diferenças significativas indicadas com asteriscos, de acordo com teste de comparações múltiplas de Tukey (em B e D). 92

Figura 13. Expressão relativa do gene da proteína Laminina em adultos de mosca-branca após 120 h de alimentação com SAC, dsToMV ou dsLAMI. Gene-alvo foi normalizado em relação ao gene da Actina e quantificado utilizando método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os valores são médias + erro padrão da média. A expressão dos genes está representada utilizando como referência a expressão na amostra SAC. 93

Figura 14. Curvas de sobrevivência log rank comparando efeitos da administração de sacarose (SAC), dsToMV e dsRNAs contra a proteína HSP90 (A). Taxas de letalidade obtidas após 120 h de alimentação com dsHSP70-B (B). Estão representadas as médias com o erro padrão da média, e as diferenças significativas indicadas com asteriscos, de acordo com teste de comparações múltiplas de Tukey (em B e D). 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista das espécies de begomovírus relatadas ou descritas nos campos de tomateiro do Brasil.	25
Tabela 2. Iniciadores utilizados para o sequenciamento por Sanger do produto do RCA, e dos clones do DNA-A e do DNA-B de tomato begomovirus MoLDi (ToMoLDiV). ...	60
Tabela 3. Detecção do DNA-A do begomovírus por PCR com iniciadores degenerados, 12 dias após a inoculação do clone dimérico C16A em plantas de 11 espécies.....	66
Tabela 4. Sequências dos iniciadores utilizados para a produção de dsRNAs de ToMV e das proteínas Loquacious, Tuberina, Distroglicana, Laminina e HSP70. As letras minúsculas representam a sequência do promotor T7.....	78
Tabela 5. Sequências dos iniciadores utilizados para verificar os níveis de expressão das proteínas Loquacious, HSP70 e Laminina por RT-PCR quantitativo.....	81
Tabela 6. Taxas de letalidade de moscas-brancas no bioensaio 1 após 48 h de alimentação em dieta contendo dsRNAs adquiridos comercialmente.....	86
Tabela 7. Taxas de letalidade de moscas-brancas no bioensaio 2 após 48 h de alimentação em dieta artificial contendo dsToMV adquirido comercialmente precipitado ou dialisado.....	87
Tabela 8. Taxas de letalidade no bioensaio 3, após 48 h de alimentação das moscas-brancas em solução de sacarose a 30% contendo dsToMV não precipitado, precipitado, purificado e sintetizado com MEGAscript RNAi kit.	89

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
SUMÁRIO	12
INTRODUÇÃO GERAL	14
OBJETIVO GERAL	17
CAPÍTULO 1	18
Cultura do tomateiro	19
Doenças em tomateiro	19
O gênero <i>Begomovirus</i>	20
Begomoviroses em tomateiro	24
O inseto-vetor <i>B. tabaci</i>	28
O controle dos begomovírus e da mosca-branca em tomateiro	31
O uso do silenciamento gênico no controle de <i>B. tabaci</i>	34
REFERÊNCIAS	40
CAPÍTULO 2	55
INTRODUÇÃO	56
METODOLOGIA	58
Coleta e processamento da amostra	58
Sequenciamento com a tecnologia Nanopore	58
Análises das características moleculares e filogenéticas do novo vírus	59
Obtenção dos clones do DNA-A e do DNA-B	59
Agroinoculação de plantas com clone C16A	60
RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68
CAPÍTULO 3	72
INTRODUÇÃO	73
METODOLOGIA	76
Seleção dos genes para a produção de dsRNAs	76
Obtenção dos dsRNAs	77
Coleta de moscas-brancas em diferentes fases de desenvolvimento para quantificação de Loquacious e HSP70	79
Bioensaios de alimentação em dieta artificial contendo dsRNAs	79
Coleta de moscas-brancas para quantificação da expressão de Laminina	80
RT-PCR quantitativo para verificar níveis de expressão de Loquacious, HSP70 e Laminina em moscas-brancas	81
Testes estatísticos e análise de sobrevivência	82
RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
Seleção dos genes para silenciamento por RNAi	83
Níveis de expressão de Loquacious e HSP70 em ninfas e adultos de moscas-brancas	84

Bioensaio 1 - Teste inicial com dsRNAs comerciais	85
Bioensaio 2 - Purificação de dsToMV por precipitação com acetato de sódio ou diálise.....	87
Bioensaio 3 - Troca de dieta, purificação e síntese de dsToMV com kit comercial	88
Efeitos da ingestão de dsRNAs homólogos aos genes selecionados.....	90
CONCLUSÕES	98
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	99
REFERÊNCIAS.....	101
ANEXO I	106

INTRODUÇÃO GERAL

A tomaticultura é um setor de destaque no Brasil, que distribui mais renda nas lavouras do que a maioria das outras culturas (Boteon et al. 2020). Combater as doenças que afetam a cultura é essencial para obtenção de safras de boa qualidade e quantidade, porém controlar as doenças causadas pelos begomovírus tem sido uma tarefa difícil para os produtores. Os vírus do gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) são transmitidos pelas moscas-brancas *Bemisia tabaci* e causam sintomas em tomateiro que incluem principalmente clorose internerval, rugosidade, distorção foliar e mosaico (Bergamin-Filho et al. 2016).

Até a década de 1990 os begomovírus apresentavam baixa incidência nas lavouras de tomate (Ribeiro et al. 1998), porém surtos de begomovirose que desencadearam prejuízos econômicos iniciaram-se com a entrada e dispersão da espécie *B. tabaci* MEAM1 (Lourenco e Nagai 1994; Ribeiro et al. 1998; Gilbertson et al. 2015). A alta polifagia e adaptabilidade de MEAM1 à cultura do tomateiro, associadas às altas taxas de variabilidade genética dos begomovírus, resultaram em um aumento acentuado no número de espécies infectando tomateiros (Padidam et al. 1999; Lima et al. 2017; Trindade et al. 2019; Inoue-Nagata et al. 2016).

Atualmente, pelo menos 27 espécies de begomovírus já foram relatadas infectando tomateiro no Brasil, o número é alto e continua crescendo. A alta incidência dos vírus e as densas populações de moscas-brancas que prevalecem devido à dificuldade do seu controle, garantem um potencial evolutivo que facilita o surgimento de novas variantes que podem desencadear mais prejuízos para a safra de tomate (Seal et al. 2006). Os levantamentos que monitoram as espécies de begomovírus presentes nos campos de produção são essenciais para identificar precocemente o surgimento de novas espécies e fornecer informações para o desenvolvimento de medidas de controle duráveis e eficientes.

Os danos causados pelos begomovírus são amenizados com o uso de cultivares com genes provenientes de espécies selvagens de *Solanum*, que fornecem altos níveis de resistência e/ou tolerância (Verlaan et al. 2013; Boiteux et al. 2007). Embora seja uma boa estratégia, existem relatos de quebra da resistência em campo ou em casos de infecções mistas (Voorburg et al. 2020; Butterbach et al. 2014; Michelson et al. 1994).

As medidas de controle que visem reduzir as populações de moscas-brancas também são essenciais para impedir a disseminação dos vírus nas lavouras (Escriu et al. 2003). A implementação de organismos para controle biológico apresentou avanços com uso de agentes predadores, parasitóides e fungos (Anwar et al. 2018; Sani et al. 2020; Wang et al.

2019). Entretanto, muito trabalho ainda deverá ser feito para que esses agentes de biocontrole sejam amplamente usados, sendo necessário avaliar o seu uso em programas de manejo integrado, estabelecendo compatibilidade com o controle químico (Perring et al. 2018).

A aplicação de inseticidas é a principal medida de controle utilizada no momento para reduzir as populações de moscas-brancas, porém o produtor também precisa monitorar a população para definir o momento, o princípio ativo e o limite certo dos produtos que devem ser aplicados (Rojas et al. 2018). O uso excessivo e inadequado desses produtos químicos já trouxe consequências que incluem contaminação ambiental, efeitos em organismos não alvos e surgimento de populações altamente resistentes (Whitehorn et al. 2012; Horowitz et al. 2020; Naveen et al. 2017).

Os problemas que resultam na ineficiência do controle do patossistema mosca-branca e begomovírus têm mobilizado grupos de pesquisa no mundo inteiro na busca por alternativas diferentes que possam ser implementadas. É urgente a necessidade de novas abordagens eficientes e específicas que reduzam o impacto dos produtos químicos na natureza e se somem aos programas de controle.

O RNA interferente (RNAi) é um mecanismo que suprime a expressão de um gene através do reconhecimento e clivagem do seu RNA mensageiro (mRNA - Fire et al. 1998). O reconhecimento e a clivagem de um RNA fita dupla (double-stranded RNA – dsRNA) pela proteína Dicer marcam o início do processo. Os fragmentos gerados com 20 a 25 nucleotídeos são incorporados por um complexo multi-proteico de silenciamento induzido por RNA (RNA-induced silencing complex – RISC) e atuam como guias para degradação de mRNAs com sequência complementar (Scott et al. 2013; Suhag et al. 2020).

A propriedade de silenciar um mRNA específico impedindo a produção da proteína codificada por ele tornou o mecanismo de RNAi especialmente útil para o controle de insetos-praga como a mosca-branca (Shelby et al. 2020). A letalidade causada pela entrega de dsRNAs para o silenciamento de genes de proteínas com funções essenciais no organismo das moscas-brancas atraiu diversos grupos de pesquisa (Ghanim et al. 2007; Upadhyay et al. 2011; Thakur et al. 2014; Asokan et al. 2015; Shim et al. 2015; Malik et al. 2016; Raza et al. 2016; Ibrahim et al. 2017; Luo et al. 2017; Vyas et al. 2017; Grover et al. 2018; Eakteiman et al. 2018; Bar et al. 2019; Kanakala et al. 2019).

A confirmação da ativação do mecanismo através da absorção de dsRNAs ingeridos em moscas-brancas permitiu o desenvolvimento de variadas abordagens de entrega que incluem a expressão dessas moléculas em plantas ou a administração em dietas artificiais contendo dsRNAs produzidos *in vitro* (Upadhyay et al. 2011; Ibrahim et al. 2017; Malik et al. 2016). A

redução dos custos para a produção do dsRNA *in vitro*, que ocorreu nos últimos anos, estabeleceu a administração desses dsRNAs em dietas artificiais como uma abordagem útil para o rastreamento e seleção de genes-alvo promissores (Cagliari et al. 2018; Palli 2014).

Alguns genes já foram testados, mas os problemas enfrentados para o controle das populações de moscas-brancas nas lavouras de tomate e a alta disponibilidade de dados genômicos desse inseto possibilitam o rastreamento de novos alvos promissores que poderão futuramente ser implementados em escala de campo com uso de abordagens mais complexas (expressão em plantas transgênicas, por exemplo).

A ineficiência das medidas de controle atualmente disponíveis mantém densas populações de moscas-brancas nos campos disseminando os begomovírus e isso facilita a ocorrência de mecanismos de variação genética desses vírus e favorece o surgimento de novas espécies (Seal et al. 2006).

Com o objetivo de amenizar os impactos do patossistema begomovírus e mosca-branca na tomaticultura, descrevemos uma potencial nova espécie do gênero *Begomovirus* que estava infectando um tomate no estado de Goiás e verificamos os efeitos da administração de dsRNAs contra genes-alvo que foram selecionados para causar efeitos negativos em moscas-brancas.

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi caracterizar molecularmente um novo vírus membro do gênero *Begomovirus*, encontrado infectando uma planta de tomate coletada em Luziânia (GO), e identificar possíveis alvos para silenciamento gênico visando o controle de moscas-brancas, o inseto vetor dos begomovírus.

CAPÍTULO 1
Revisão bibliográfica

Cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pertence à ordem Solanales, família Solanaceae. A sua origem inclui uma região andina, desde o Equador até o norte do Chile, e sua domesticação parece ter ocorrido no México (Alvarenga 2013).

O tomateiro chegou ao Brasil no final do século XIX trazido por imigrantes europeus, mas sua difusão e consumo iniciaram-se por volta de 1930 (Alvarenga 2013). Atualmente, o tomateiro é cultivado em todas as regiões brasileiras e é a hortaliça mais popular na refeição do brasileiro (Buso et al. 2005). Em 2019, o Brasil foi responsável pela produção de quase 4 milhões de toneladas de tomate das mais de 180 milhões de toneladas produzidas mundialmente (Faostat 2021).

A preferência no consumo do tomate iniciou-se devido às características como aparência, sabor, aroma e textura. Hoje sabe-se da sua importância na dieta humana por ser rico em compostos com propriedades anticancerígenas e antioxidantes (Alvarenga e Coelho 2013). O tomate é considerado um dos produtos do agronegócio de hortaliças mais importantes, tanto em nível nacional como mundial. Em contrapartida, é uma cultura altamente afetada por doenças que são frequentemente consideradas os principais fatores limitantes do seu cultivo (Brahimi et al. 2017; Liu e Wang 2020).

Doenças em tomateiro

Os períodos chuvosos são os mais favoráveis à ocorrência de doenças de origens fúngica e bacteriana, enquanto as doenças virais se disseminam em épocas mais propícias à disseminação dos vetores, em sua maioria insetos (Inoue-Nagata 2013). As doenças viróticas têm se tornado preocupantes devido a agravantes como a inexistência de produtos químicos que combatam o vírus após a infecção, o aumento da incidência das viroses nas lavouras e os prejuízos econômicos que acarretam por conta da baixa eficácia do seu controle em relação aos outros patógenos de plantas (Inoue-Nagata 2013; Sastry e Zitter 2014).

As viroses que ocorrem podem variar de acordo com o tipo, a época e a região de cultivo. O tomateiro estaqueado é geralmente cultivado próximo a áreas com outras plantas solanáceas, então há incidência variável de vírus dos gêneros *Orthotospovirus*, *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus*, *Crinivirus*, *Tymovirus* e *Begomovirus*, já o tomate rasteiro é normalmente cultivado em áreas amplas e mais isoladas, e a principal doença é a begomovirose (Inoue-Nagata 2013). A cultura do tomateiro pode ser afetada por várias espécies de begomovírus. Os sintomas típicos dessa doença, como mosaico, clorose

internerval e das nervuras, deformação foliar e nanismo resultam na produção de frutos menores e em menor quantidade (Mituti et al. 2019; Bergamin-Filho et al. 2016).

No Brasil, a primeira doença causada por begomovírus relatada em tomate foi o mosaico dourado, causado pelo tomato golden mosaic virus (Flores et al. 1960). Este era o único begomovírus detectado nas lavouras, ainda que em baixa incidência e importância, porém na década de 90 este cenário mudou. Concomitantemente à entrada da espécie *Bemisia tabaci* Middle East Asia Minor 1 (MEAM1) no país surgiu um complexo de begomovírus em tomateiro que teve um impacto dramático para a tomaticultura brasileira (Inoue-nagata et al. 2016). Desde então, diversas novas espécies foram descritas e altas taxas de infecção começaram a ser observadas. As begomovirose se disseminaram causando drásticas reduções de produtividade, principalmente em casos de infecção precoce e em tomateiro de crescimento determinado, onde perdas de 100% foram observadas (Bergamin-Filho et al. 2016).

Considerando a importância da cultura do tomateiro em todo o mundo e os problemas que as doenças ocasionadas por begomovírus causam aos produtores, estudos que gerem informações que podem ser utilizadas na tomada de decisão sobre as medidas de controle são muito importantes (Seal et al. 2006).

O gênero *Begomovirus*

A família *Geminiviridae* inclui vírus fitopatogênicos que infectam uma ampla gama de hospedeiros, sendo transmitidos por insetos como cigarrinhas, moscas-brancas e pulgões (Zerbini et al. 2017). Esses vírus possuem partículas virais não envelopadas, compostas por subunidades da capa proteica que formam dois icosaedros incompletos unidos, conferindo um aspecto geminado às partículas (Lazarowitz 1992; Hesketh et al. 2018; Xu, Zhang, et al. 2019). Seu genoma, composto de DNA circular fita simples cujo tamanho pode variar entre 2,5 e 3,2 kilobases (kb), pode ser monopartido, quando apresenta apenas um componente (DNA-A) ou bipartido, quando apresenta dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) (Varsani et al. 2017; Harrison 1985).

Atualmente, os geminivírus estão divididos em nove gêneros definidos de acordo com o grupo de hospedeiros, o tipo de vetor, organização do genoma e as relações filogenéticas. Os vírus dos gêneros *Becurtovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus* possuem genoma monopartido, sendo que apenas os vírus do gênero *Begomovirus* possuem genoma monopartido ou bipartido (Brown et al. 2015; Varsani et al. 2017; Zerbini et al. 2017).

Baseado em estudos filogenéticos e características do genoma, os begomovírus podem ser divididos em begomovírus do Velho Mundo (Europa, África e Ásia) e Novo Mundo (Américas) (Bridson et al. 2010). No Velho Mundo, a maioria dos begomovírus encontrados são monopartidos, muitas vezes associados a DNAs alfa e betassatélites (Zhou 2013). Nas américas, a maior parte é bipartido, porém há exceções como tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV), o tomato leaf deformation virus (ToLDeV) e o tomato leaf curl purple vein virus (ToLCPVV) (Melgarejo et al. 2013; Vu et al. 2015; Macedo et al. 2018).

O DNA genômico dos begomovírus monopartidos é homólogo ao DNA-A dos bipartidos. No sentido viral (positivo), são codificadas as ORFs *V1* (AV1 em bipartidos) e *V2* (presente apenas em monopartidos e bipartidos do Velho Mundo), que codificam a capa proteica (CP) e a proteína de movimento (Priyadarshini et al. 2011). Sabe-se ainda que a proteína codificada por *V2* pode atuar também na supressão do silenciamento gênico (Zhang et al. 2012).

No sentido complementar (negativo), a ORF *C1*, codifica a proteína Rep (*replication-associated protein*), responsável pela clivagem do sítio de iniciação da replicação e pela replicação viral. A ORF *C2* codifica a Trap (*transcriptional activator protein*), necessária para ativar a expressão da CP e de NSP (proteína de transporte nuclear codificada pelo DNA-B) (Sunter et al. 2001). A ORF *C3* codifica a REn, responsável pela intensificação da replicação, ou seja, pelo aumento do acúmulo de DNA viral (Sunter et al. 1990), e a *C4*, que está inserida na *C1* em fase de leitura diferente, codifica proteína que pode determinar a severidade dos sintomas, atuar no movimento do vírus na planta e auxiliar na supressão de silenciamento gênico pós-transcricional (Vanitharani et al. 2004; Gopal et al. 2007).

O DNA-B dos bipartidos contém apenas duas ORFs, *BV1* no sentido positivo e *BC1* no sentido negativo, que codificam a proteína de transporte nuclear (*nuclear shuttle protein* - NSP) e a proteína de movimento (*movement protein* - MP). A NSP atua no tráfego intracelular do DNA viral do núcleo, local de replicação do vírus, para o citoplasma (Noueiry et al. 1994). A MP é responsável pelo movimento viral célula-a-célula, aumentando o limite de exclusão dos plasmodesmos (Sanderfoot e Lazarowitz 1996; Hanley-Bowdoin et al. 2013).

O DNA-A e o DNA-B dos begomovírus bipartidos compartilham uma região altamente conservada com aproximadamente 200 nucleotídeos, localizada na região intergênica (*intergenic region* - IR) e conhecida como região comum (*common region* - CR). A região comum contém uma origem de replicação (*ori*), que inclui uma estrutura altamente conservada em forma de “grampo” contendo uma sequência de nonanucleotídeos invariante TAATATTAC (Lazarowitz 1992; Xu, Qian, et al. 2019).

A amplificação do DNA genômico dos begomovírus ocorre por replicação de círculo-rolante (*rolling-circle replication*; Jeske et al. 2001). A proteína Rep liga-se especificamente a ori viral e introduz um corte na sequência de nonanucleotídeos conservada para possibilitar o início da síntese do DNA pela polimerase da hospedeira (Orozco e Hanley-Bowdoin 1996; Gutierrez 1999). O reconhecimento da ori viral pela Rep é mediado por elementos essenciais de sequência curta localizados próximos ao TATA box, conhecidos como “iterons” (Londoño et al. 2010). A Rep contém um domínio de reconhecimento específico de iteron e essa ligação Rep-iteron é essencial para a replicação do vírus e evita a replicação de componentes não-cognatos que limitam o rearranjo do genoma (Lazarowitz 1992; Xu, Qian, et al. 2019).

Além dos componentes genômicos DNA-A e DNA-B, recentemente foi descoberto que existem DNAs satélites associados a alguns begomovírus monopartidos e bipartidos. Atualmente esses satélites estão divididos em três tipos: alfassatélites, betassatélites e deltassatélites (Kumar et al. 2017, 2015; ICTV 2021). Os alfassatélites possuem cerca de 1.350 nucleotídeos, codificam uma proteína Rep e possuem uma região rica em adenina e uma estrutura em forma de “grampo” contendo a sequência TAGTATTAC. Essas moléculas se autorreplicam na planta hospedeira mas precisam do seu vírus auxiliar para movimento e transmissão pelo inseto-vetor (Zhou 2013; Briddon et al. 2018).

Os betassatélites possuem cerca de 1.360 nucleotídeos e não compartilham identidade de nucleotídeos com o genoma de seu vírus auxiliar, mas necessitam do mesmo para sua replicação, encapsidação, movimento célula a célula e a longa distância, bem como para transmissão pelo vetor (Gnanasekaran et al. 2019). Essa molécula também possui uma estrutura em forma de “grampo” com a sequência TAAGTATTAC e uma ORF única que codifica a proteína β C1, que desempenha papel na indução de sintomas em certos hospedeiros e na supressão de silenciamento gênico transcricional e pós-transcricional (Gopal et al. 2007; Rosario et al. 2016; Gnanasekaran et al. 2019).

Os deltassatélites possuem um genoma menor, com cerca de 700 nucleotídeos que não codificam nenhuma proteína. São completamente dependentes do seu vírus auxiliar para replicação, movimentação e transmissão (Dry et al. 1997; Fiallo-Olivé et al. 2012). Sua presença já foi associada a um menor acúmulo de begomovírus e/ou expressão atenuada de sintomas (Hassan et al. 2016).

A transmissão dos begomovírus no campo ocorre através do seu inseto-vetor, a mosca-branca, sendo possível a transmissão via enxertia e mecanicamente, de algumas espécies que notadamente são capazes de infectar células do parênquima da planta (Morin et al. 1999; Ghanim et al. 2001; Patil et al. 2017).

A transmissão pela mosca-branca ocorre de forma circulativa não-propagativa (Morin et al. 1999; Ghanim et al. 2001). Em linhas gerais, a mosca-branca ingere as partículas virais com seu estilete enquanto se alimenta no floema de plantas infectadas (Figura 1). Tais partículas são transportadas através do canal alimentar, pelo esôfago, e alcançam o intestino. A partir da câmara de filtro e do intestino médio, as partículas são deslocadas para a hemolinfa e alcançam as glândulas salivares primárias (GSPs), onde se acumulam. Posteriormente, o vírus é liberado com a saliva ao longo do canal salivar para o floema da planta (Morin et al. 2000; Ghanim et al. 2001).

O comportamento dos begomovírus no vetor não foi completamente elucidado. Um estudo pioneiro confirmou a transmissão transovariana de tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) por sete espécies de *B. tabaci*, com a capacidade de transmissão variando de acordo com a espécie do vetor, e o estágio adulto não é atingido (Guo et al. 2019; Ghanim et al. 1998). Outro trabalho avaliou o potencial de transmissão transovariana dos begomovírus em *B. tabaci* MEAM1 e MED e verificou que o tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV) pode ser detectado em ovos e ninfas e, em menor extensão, nos adultos da primeira geração (Bosco et al. 2004).

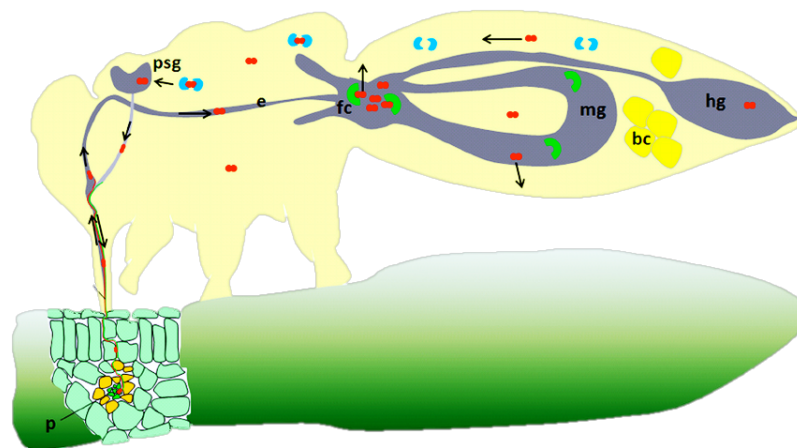


Figura 1. Esquema do caminho percorrido pelas partículas dos begomovírus no corpo das moscas-brancas. As partículas vermelhas representam os begomovírus, que normalmente são vírus restritos ao floema (p), local onde as moscas-brancas alimentam-se a partir da sucção da seiva utilizando o estilete. A endocitose para a internalização do vírus começa a ocorrer na câmara de filtro (fc), localizada no intestino médio (mg), onde também ocorre a interação das partículas com a proteína HSP70 (partículas verdes). Após alcançar a hemolinfa, o vírus interage com as proteínas GroEL (partículas azuis), produzidas pelos endossimbiontes presentes nos bacteriócitos (bc), depois entra nas glândulas salivares primárias (psg) por endocitose e é secretado na saliva (Ghanim 2014). e=esôfago.

Em relação à replicação do vírus no vetor, existem relatos de transcrição e replicação do begomovírus tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) em insetos submetidos a condições de estresse (Pakkianathan et al. 2015). Outros trabalhos demonstram que não há replicação do vírus no vetor após a aquisição (Sánchez-Campos et al. 2016). Apesar da controvérsia, um trabalho posterior indicou que a maioria dos begomovírus fica associada ao intestino e à câmara de filtro na mosca-branca, e, no caso do TYLCV, pode ser transcrito e replicado nesses tecidos, porém a ativação de uma resposta imune do inseto provoca inibição de replicação e eliminação do vírus (Czosnek et al. 2017).

Durante o processo de alimentação das moscas-brancas, os begomovírus são adquiridos em períodos curtos (aproximadamente 10 minutos) e o período de latência do vírus no vetor pode variar de quatro a 21 h (Costa 1998). A espécie do inseto, idade, gênero e a concentração de vírus na planta são fatores que influenciam a cinética do acúmulo de vírus e a capacidade de transmissão do vírus às plantas (Czosnek et al., 2017).

O gênero *Begomovirus* possui mais de 400 espécies descritas (ICTV, 2021), muitas delas com grande importância como patógenos vegetais por infectar uma ampla gama de plantas cultivadas, causando doenças que acarretam prejuízos econômicos. As culturas afetadas incluem feijão, algodão, cucurbitáceas, quiabo, mamão, pimentão, tomate, mandioca, dentre outras (Rojas et al. 2018). As plantas infectadas mostram sintomas que podem incluir nanismo, distorção foliar, mosaico ou mosqueado, clorose das nervuras ou internerval e amarelecimento (Inoue-nagata et al. 2016). A presença e/ou severidade de sintomas variam de acordo com fatores que incluem a espécie ou estirpe viral e a planta hospedeira.

Begomoviroses em tomateiro

O tomateiro é infectado pelo maior número de espécies do gênero *Begomovirus* do que qualquer outra cultura (aproximadamente 90 espécies; Rojas et al. 2018). No Brasil, os primeiros relatos da detecção de begomovírus foram em plantas não-cultivadas (Costa e Bennett 1950; Costa e Carvalho 1955) e hoje esse é considerado o grupo de vírus mais importante para a cultura do tomateiro, devido à sua alta incidência e as dificuldades para o seu controle (Inoue-nagata et al. 2016).

O primeiro registro de begomovírus em tomateiro no Brasil foi em 1960, em plantas infectadas por tomato golden mosaic virus (Flores et al. 1960; Matyis et al. 1975), mas a doença do mosaico dourado não era relevante devido à sua baixa incidência. Até meados de 1990, poucas espécies novas foram detectadas e não havia relatos de danos de importância econômica, porém essa realidade mudou a partir da entrada e disseminação de *B. tabaci*

MEAM1 no país, que foi seguida pelo surgimento de diversas espécies na cultura (Calegario et al. 2007; Fernandes et al. 2006; Ribeiro et al. 2007; Firmino et al. 2009). Atualmente, são pelo menos 27 espécies de begomovírus relatadas nas lavouras de tomateiro do país (Tabela 1).

Diversos estudos já demonstraram a alta variabilidade genética dos begomovírus, que contribuiu para esse crescimento acentuado na diversidade de espécies. A variabilidade genética nas populações virais ocorre por mutação, recombinação ou pseudo-recombinação e nos begomovírus esses mecanismos ocorrem com frequência, com taxas de substituição tão altas quanto aquelas de vírus com genoma de RNA, facilitando o surgimento de novas variantes (Padidam et al. 1999; Seal et al. 2006; Lima et al. 2017; Claverie et al. 2018).

Outro fator que contribuiu para esse aumento acentuado na diversidade de espécies foi a alta adaptabilidade ao tomateiro de *B. tabaci* MEAM1 (Lourenco e Nagai 1994; Ribeiro et al. 1998; Gilbertson et al. 2015). Acredita-se que antes da entrada e disseminação de MEAM1, predominavam as espécies *B. tabaci* New World 1 (NW1) e *B. tabaci* New World 2 (NW2), correspondentes ao biótipo A, que não colonizavam o tomateiro com eficiência (Bedford et al. 1994). As moscas-brancas do grupo NW foram quase extintas após a disseminação de MEAM1, uma espécie altamente polífaga, que transmite vírus com alta eficiência (Barbosa et al. 2014; Gilbertson et al. 2015; Inoue-nagata et al. 2016).

A disseminação da mosca-branca MEAM1 aumentou as interações entre as espécies de begomovírus provenientes de diferentes plantas hospedeiras e também contribuiu para o aumento da variabilidade genética e da diversidade de espécies de begomovírus em tomateiro (Rodrigues e Silva 2018; Trindade et al. 2019; García-Arenal e Zerbini 2019). Os dados da incidência das espécies de begomovírus em tomateiro e em espécies selvagens ou plantas daninhas fortalecem a hipótese da origem das espécies em hospedeiros silvestres locais e posterior migração e adaptação ao tomateiro devido à ampla gama de hospedeiras de *B. tabaci* MEAM1 (Barbosa et al. 2009; Roshan et al. 2018; M.F. Duarte et al. 2021; García-Arenal e Zerbini 2019; Barreto et al. 2013).

A espécie *B. tabaci* Mediterranean (MED; biótipo Q) foi introduzida no país e está se disseminando, visto que foi relatada em diversos estados (da Fonseca Barbosa et al. 2015; de Moraes et al. 2017, 2018; Borges et al. 2019; Bello et al. 2020; Rodrigues et al. 2021). MED apresenta alta resistência a inseticidas, adaptação a ambientes fechados como estufas e casas-de-vegetação e alta eficiência de transmissão de TYLCV, o que vem gerando preocupações aos pesquisadores e produtores (Horowitz e Ishaaya 2014; Horowitz et al. 2005; Li et al. 2010).

Tabela 1. Lista das espécies de begomovírus relatadas ou descritas nos campos de tomateiro do Brasil.

Begomovírus (acrônimo)	Referência
Tomato golden mosaic virus (TGMV)	Flores et al. 1960
Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV)	Faria et al., 1997
Sida micrantha mosaic virus (SiMMV)	Jovel et al. 2004
Tomato rugose mosaic virus (ToRMV)	Fernandes et al., 2006
Tomato yellow spot virus (ToYSV)	Andrade et al., 2006
Sida mottle virus (SiMoV)	Cotrim et al., 2007
Tomato severe rugose virus (ToSRV)	
Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV)	Ribeiro et al., 2007
Tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV)	Fernandes et al., 2008
Tomato leaf distortion virus (ToLDV)	Castillo-Urquiza et al., 2008
Tomato mild mosaic virus (ToMMV)	
Tomato common mosaic virus (ToCmMV)	
Sida yellow net virus (SiYNV)	Tavares et al., 2012
Tomato interveinal chlorosis virus (ToICV)	Albuquerque et al., 2012
Tomato golden vein virus (TGVV)	
Euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV)	Barreto et al., 2013
Tomato leaf deformation virus (ToLDeV)	Melgarejo et al., 2013
Chino del tomate Amazonas virus (CdTAV)	Adams et al. 2014
Tomato rugose yellow leaf curl virus (TRYLCV)	
Tomato leaf curl purple vein virus (ToLCPVV)	Macedo et al., 2018
Tomato interveinal chlorosis virus 2 (ToICV2)	Rego-Machado et al., 2019
Tomato chlorotic leaf curl virus (ToCLCV)	Quadros et al., 2019
Sida common mosaic virus (SiCMV)	M F Duarte, Fonseca, et al. 2021
Tomato golden leaf spot virus (ToGLSV)	
Tomato bright yellow mosaic virus (ToBYMV)	NCBI 2021*
Tomato bright yellow mottle virus (ToBYMoV)	
Tomato golden leaf distortion virus (ToGLDV)	

*Sequências depositadas no GenBank.

Assim como ocorreu com MEAM1, a entrada e disseminação de MED podem gerar mudanças na composição de espécies de begomovírus nas lavouras. MED pode colonizar diferentes hospedeiras, o que facilita a transferência de espécies de uma hospedeira a outra. Essa interação entre as espécies favorece a ocorrência de eventos de mutação, recombinação e pseudo-recombinação. Tudo isso contribui para a geração de novas variantes que podem ter capacidade de superar genes de resistência já utilizados e desencadear prejuízos para a produção.

Embora o histórico de diversidade revele um aumento do número de espécies identificadas, atualmente a maioria dos begomovírus apresenta pouca importância econômica pelos seus sintomas mais leves e sua baixa incidência (Inoue-Nagata et al. 2016). No atual cenário, considerando a severidade dos sintomas e a incidência na maioria das regiões produtoras, ToSRV e ToMoLCV são considerados os begomovírus mais importantes economicamente (Souza et al. 2020). Os sintomas causados por ToSRV são severos, sua incidência é alta (podendo chegar a 100% em alguns casos) e as perdas de produção podem chegar a cerca de 80% (Fernandes et al. 2008; Barbosa et al. 2011; Macedo et al. 2015; Lemos et al. 2010).

O ToMoLCV também pode induzir sintomas mais severos se comparados a outros begomovírus do país e tem maior predominância em regiões mais quentes, tendo alta importância principalmente nas regiões Nordeste e centro-sul do Brasil. Porém, diversos levantamentos realizados indicaram sua prevalência também na região Centro-Oeste (Ferro et al. 2017; Macedo et al. 2018; Mituti et al. 2019).

Nos últimos anos, diversos trabalhos mostraram que os begomovírus detectados com frequência há cerca de 20 anos, como TGVV e ToRMV, diminuíram suas incidências até desaparecerem ou ficarem restritos a pequenas regiões (Souza et al., 2020). Em contraste, begomovírus que anteriormente apresentavam menor incidência, como ToSRV e ToMoLCV, se disseminaram até chegar ao ponto de serem detectadas na grande maioria das áreas produtoras (Mituti et al. 2019; Souza et al. 2020; M F Duarte et al. 2021).

As mudanças na composição de espécies de begomovírus em tomateiro ao longo dos anos vêm sendo foco de diversos estudos. A maior acessibilidade a técnicas de sequenciamento em larga escala intensificou o avanço desses estudos e a grande quantidade de informações de sequências geradas tornam a identificação e descoberta de espécies mais rápida e precisa (Villamor et al. 2019).

A baixa incidência ou desaparecimento de algumas espécies e prevalência de outras foi atribuída, em parte, a variações na eficiência de transmissão do vetor MEAM1, visto que Macedo et al. (2015) constataram uma baixa eficiência de transmissão de TGVV em contraste com a alta eficiência de transmissão de ToSRV. Adicionalmente, a interação entre o vírus e a sua hospedeira também define a adaptação e permanência do vírus em uma cultura, essa interação é responsável por uma maior ou menor aptidão viral, que é a capacidade de um vírus de produzir progênes infecciosas em um determinado ambiente (Wargo e Kurath 2012; Péréfarres et al. 2014). Quanto maior o acúmulo de DNA viral após certo período de tempo, maior a aptidão viral e a adaptabilidade do vírus à hospedeira (Cervera e Elena 2016).

Junto com a permanência de espécies mais adaptadas que se disseminam nos campos, observa-se que o número de espécies novas relatadas em tomateiro é alto e continua crescendo. Como o controle do vírus e do vetor é complicado e muitas vezes ineficiente, os vírus conseguem manter altos títulos e alta incidência, o que garante um grande potencial evolutivo que pode gerar novas variantes conforme mutações favoráveis são acumuladas (Seal et al. 2006).

Considerando a alta variabilidade das populações de begomovírus associadas às culturas de tomate e a ampla área em que o fruto é cultivado no país e no mundo, devido à sua importância, o monitoramento frequente dos begomovírus nos campos é essencial para verificar e identificar precocemente o surgimento de novas variantes, fornecendo informações preliminares que podem contribuir na prevenção de surtos que causem danos devastadores nas lavouras.

O inseto-vetor *B. tabaci*

A mosca-branca (*B. tabaci*) foi descrita pela primeira vez na Grécia em 1889, quando foi nomeada *Aleyrodes tabaci*. Atualmente, pertence à ordem Hemiptera, sub-ordem Sternorrhyncha, família Aleyrodidae (Byrne e Bellows 1991). Seu ciclo de vida consiste em seis estádios que incluem ovo, ninfa de primeiro, segundo, terceiro e quarto instares e adulto (Figura 2; Walker et al., 2010).

Na fase adulta, esses insetos apresentam de 1-2 mm de comprimento, coloração amarelo clara, com dois pares de asas cobertas por uma pulverulência branca. Sua reprodução sexuada gera proles compostas por machos e fêmeas e sua reprodução assexuada, por partenogênese, gera apenas machos a partir de ovos não fecundados (Byrne e Bellows 1991; Villas Bôas et al. 1997; Villas-Bôas e Castelo-Branco 2009).

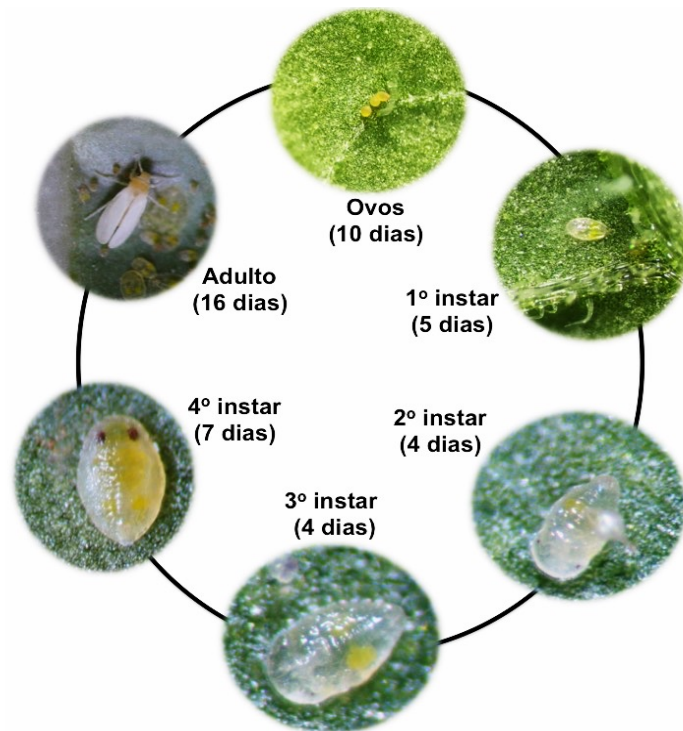


Figura 2. Fases de desenvolvimento da mosca-branca (*B. tabaci*) em tomateiro, MEAM1 (biótipo B). Fotos dos ovos, de todos os estádios ninfaís e o adulto com a duração aproximada de cada fase em dias.

As moscas-brancas causam danos diretos durante sua alimentação, através da sucção da seiva do floema, quando injeta toxinas na planta que podem causar problemas no crescimento e desenvolvimento de folhas e frutos. Como exemplos dessas anomalias, cita-se o prateamento de folhas em plantas de abóbora e o amadurecimento irregular dos frutos de tomate (Brown et al. 1995; Villas-Bôas e Castelo-Branco 2009). O aumento da densidade de ninfas e adultos por folha leva a uma redução no rendimento dos frutos (Gusmão et al. 2006).

Danos indiretos também são causados pela liberação de secreção açucarada, denominada “honeydew”, que favorece a proliferação de fungos denominados fumagina (*Capnodium* sp.), reduzindo assim a captação de luz e capacidade fotossintética da planta (Oliveira et al. 2001). Porém, o principal dano é provocado pela transmissão de vírus fitopatogênicos pertencentes aos gêneros *Crinivirus*, *Carlavirus*, *Ipomovirus*, *Torradovirus*, *Polerovirus*, *Cytorhabdovirus* e *Begomovirus* (Navas-Castillo et al. 2011; Gilbertson et al. 2015; Inoue-Nagata et al. 2016; Ghosh et al. 2019; Pinheiro-Lima et al. 2020).

No Brasil, as principais culturas infestadas pela mosca-branca incluem o tomate, o feijão, o melão e a batata, nas quais a transmissão de viroses é expressiva, além do algodão, da soja, abóbora, melancia, videira e diversas hortaliças e ornamentais, nas quais os ataques têm sido cada vez mais intensos (Lourenção et al. 2015; Inoue-Nagata et al. 2016).

Em termos taxonômicos, diferentes populações de moscas-brancas eram classificadas anteriormente em biótipos, que são morfologicamente indistinguíveis, mas ecologicamente e geneticamente distintos. A partir de uma análise molecular do gene mitocondrial *citocromo c oxidase I* (mtCOI) que mostrou correlação entre este gene e caracteres biológicos, as diferentes populações de *B. tabaci* foram reclassificadas em um complexo com pelo menos 44 espécies biológicas crípticas (De Barro et al. 2011; Lee et al. 2013; Kanakala e Ghanim 2019).

Esse inseto começou a ganhar destaque como praga global a partir da disseminação mundial de MEAM1, uma das principais espécies, principalmente através do comércio de plantas ornamentais (Lima et al. 2000; Morales e Anderson 2001; Dalton 2006; Morales 2007; Kriticos et al. 2020). As espécies de *B. tabaci* MEAM1 e MED estão distribuídas mundialmente em regiões com as mais diversas condições climáticas, ambas apresentam alta adaptabilidade e ampla gama de hospedeiras e se reproduzem rapidamente, sendo consideradas mais invasivas e prejudiciais que outras espécies de *B. tabaci* (Dinsdale et al. 2010; Perring et al. 2018).

No Brasil há relatos de moscas-brancas desde a década de 1920 e atualmente já foram reportadas as espécies NW1 e NW2 (biótipo A), MEAM1 (biótipo B) e MED (biótipo Q) (Bondar 1928; Rodrigues et al. 2021). Até a década de 1980, acredita-se que no Brasil predominavam as espécies *B. tabaci* NW1 e *B. tabaci* NW2, consideradas nativas das Américas. Na década de 1990, MEAM1 chegou ao Brasil e se disseminou rapidamente, substituindo gradualmente as populações de *B. tabaci* NW (Lourenco e Nagai 1994; Marubayashi et al. 2013; Barbosa et al. 2014). Embora a NW tenha sido detectada no país em plantas daninhas e em soja nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, MEAM1 é a predominante em campos de tomate estritamente intensivos e comerciais sob uso massivo de pesticidas (Gilbertson et al. 2015; de Moraes et al. 2018).

Um estudo que avaliou as espécies de moscas-brancas presentes no Distrito Federal indicou que a compra de plantas ornamentais infestadas provenientes de outras regiões vem contribuindo para a disseminação da mosca-branca MED, que foi detectada em lojas de jardinagem em áreas urbanas e cultivos próximos (Rodrigues et al. 2021). As populações de moscas-brancas MED estabelecidas nessas áreas tendem a migrar gradualmente para propriedades de grande porte com áreas de cultivo mais amplas.

Na cultura de tomate, mudanças na composição de espécies podem ocorrer justamente devido a essa diferença na eficiência de transmissão dos begomovírus de acordo com a espécie de mosca-branca (Fiallo-Olivé et al. 2020). Como *B. tabaci* MED é bem adaptada a

outras hospedeiras, como o pimentão, pode ocorrer a transferência de begomovírus para os cultivos de tomate e tais espécies podem ter um potencial de causar danos por quebra de resistência e adaptação a cultura (Muñiz e Nombela 2001).

Todos esses fatores contribuem para que esses insetos sejam considerados pragas globais altamente invasivas e prejudiciais e, visto que as perdas econômicas causadas por eles são estimadas em cerca de cem milhões de dólares anualmente, o seu controle é essencial para garantir safras com produtivas e de boa qualidade (De Barro et al. 2011; Horowitz et al. 2020).

O controle dos begomovírus e da mosca-branca em tomateiro

Para amenizar os danos causados pelas begomoviroses são necessárias medidas de controle que procuram reduzir o inóculo do vírus e a população do inseto-vetor por meios biológicos, químicos, culturais e físicos, e pelo cultivo de variedades com algum grau de resistência ou tolerância (Bergamin-Filho et al. 2020).

As plantas resistentes/tolerantes possuem genes de resistência dominantes ou recessivos (Kumar et al. 2017). Esses genes são provenientes de espécies selvagens de *Solanum* e foram introgrididos nas principais variedades comerciais, mostrando-se eficientes contra diferentes espécies de begomovirus monopartidos e bipartidos (Verlaan et al. 2013). Economicamente, o uso de cultivares resistentes do hospedeiro é uma boa estratégia, sustentável e de baixo impacto relativo no meio ambiente (Yao et al. 2017). Dos vários genes caracterizados até o momento em tomate, destacam-se os genes alélicos *Ty-1* e *Ty-3*. Tais genes fornecem altos níveis de resistência ou tolerância, logo, as plantas resistentes infectadas manifestam sintomas leves e apresentam uma recuperação conforme a planta se desenvolve (Verlaan et al. 2013; Boiteux et al. 2007).

A introgressão de *Ty-1* e *Ty-3* em tomateiro cultivado vem sendo o principal foco dos programas de melhoramento, porém há relatos de ineficácia da resistência mediada por *Ty-1* no campo e em casos de infecções mistas (Yan et al. 2021; Voorburg et al. 2020; Butterbach et al. 2014; Michelson et al. 1994). Além disso, a detecção de recombinantes de begomovírus reforçou suspeitas que o gene de resistência da hospedeira possa estar funcionando como um fator de seleção nas populações virais (Panno et al. 2018; Granier et al. 2019). Embora a diferença na diversidade viral em cultivos com plantas resistentes e suscetíveis ainda não tenha sido amplamente estudada e esclarecida, estudos preliminares verificaram maior diversidade viral em amostras de plantas suscetíveis e maior quantidade de mutações, novas

espécies e agentes subvirais em isolados provenientes de cultivares resistentes (Reis et al. 2020).

Os estudos sobre a evolução dos vírus de plantas também apoiam o uso de medidas de controle para reduzir as populações de vetores, pois modelos epidemiológicos sugerem que uma alta densidade de vetores pode favorecer a evolução de maior virulência nas populações de vírus (Escriu et al. 2003; Seal et al. 2006). O manejo das moscas-brancas tornou-se então essencial para evitar a disseminação das begomoviroses nos campos de cultivo e ele é realizado principalmente com uso de inseticidas (Rojas et al. 2018; Bergamin-Filho et al. 2020, 2016).

O inseticida utilizado para reduzir as populações do inseto vetor *B. tabaci* deve agir rapidamente, matando o vetor antes que ele consiga transmitir o vírus. Em geral, são utilizados inseticidas sistêmicos tais como neonicotinóides ou uma diamida disponibilizada recentemente, cyazypyr (Gilbertson et al. 2011; Rojas et al. 2018). Essa estratégia é mais eficaz e segura quando está incluída em um programa de manejo integrado que também vise o monitoramento das populações de moscas-brancas, direcionando a decisão sobre o momento certo e o tipo de produto que deve ser aplicado, além de um limite para as aplicações de inseticidas (Rojas et al. 2018).

O uso inadequado dos produtos químicos pode provocar contaminação ambiental e efeitos em organismos não-alvos (Whitehorn et al. 2012). O manejo baseado apenas na aplicação de inseticidas é ineficaz e contribuiu para o surgimento de populações resistentes aos inseticidas. Já se observou alto grau de resistência a diversas classes de inseticidas por populações de moscas-brancas, inclusive das principais espécies, MEAM1 e MED (Horowitz et al. 2004, 2020; Naveen et al. 2017; Dângelo et al. 2018). Adicionalmente, no Brasil as pulverizações de inseticidas têm falhado na maior parte das áreas de produção porque os compostos são incapazes de reduzir a disseminação primária, causada por moscas-brancas virulíferas provenientes de fontes externas de inóculo (Gouvêa et al. 2017; Bergamin-Filho et al. 2020).

O controle biológico pode ser implementado para combater o inseto vetor, alguns agentes de biocontrole podem atingir altas taxas de parasitismo e predação, principalmente em cultivos protegidos. Os principais agentes utilizados são predadores, parasitóides e fungos (Chen et al. 2015; Sani et al. 2020). A busca por isolados de fungos entomopatogênicos tem sido o alvo de muitos grupos de estudos. Os fungos *Clonostachys rosea* e *Cordyceps fumosorosea*, por exemplo, têm alta capacidade parasitária em moscas-brancas *B. tabaci*,

indicando eficiência e potencial para o controle (Anwar et al. 2018; Maina et al. 2018; Huang et al. 2009; X. Wang et al. 2019).

Há também perspectivas quanto à utilização de insetos e ácaros predadores para implementação de biocontrole de moscas-brancas. O primeiro passo nesse caso é a identificação de espécies predadoras para desenvolvimento das diretrizes de criação e liberação desses agentes (Moro et al. 2021). O ácaro predador *Amblydromalus limonicus*, vespas parasitóides *Encarsia formosa* e *E. sophia*, e a joaninha predadora *Harmonia axyridis* são alguns dos organismos que apresentaram eficácia promissora para o uso como agente de biocontrole de moscas-brancas (Lee e Zhang 2018; Tan et al. 2016).

Embora um grande número de artrópodes predadores, parasitóides e espécies de fungos sejam conhecidos por atacar moscas-brancas em uma variedade de sistemas agrícolas em todo o mundo, poucos foram estudados e avaliados para uso em programas de manejo integrado (Perring et al. 2018). Uma das dificuldades é estabelecer a compatibilidade entre o controle químico e o biológico, permitindo um manejo integrado com produtos químicos seletivos que sejam inofensivos aos organismos não-alvo (Wang et al. 2019). Assim, muito trabalho será necessário antes que o controle biológico assuma um papel mais dominante nos sistemas de manejo de pragas para *B. tabaci* nas lavouras afetadas (Perring et al. 2018).

Outras medidas de controle devem ser implementadas como a seleção de datas e locais apropriados para plantio e o cultivo protegido em casas de vegetação (Rojas et al. 2018). Desde 2003, devido à alta incidência begomovirose nas lavouras, foi implementada uma medida legislativa de vazio sanitário, em que se proíbe o cultivo de tomate para processamento durante dois meses no ano (Inoue-Nagata et al. 2016).

Apesar dos esforços, as begomovirose persistem nas lavouras provocando doenças que acarretam em prejuízos. É essencial a implementação de um programa de manejo integrado de pragas, que consiste na utilização de diversos métodos concomitantes para o controle das principais doenças e pragas; para tanto, são necessárias novas abordagens que atuem de formas diferentes e possam somar dentro do programa de controle. Para reduzir os danos ambientais causados pelo uso excessivo e indiscriminado de produtos químicos, é necessária a disponibilização de novas estratégias.

Muitos grupos de pesquisa têm empregado esforços para desenvolver métodos alternativos de controle de moscas-brancas, baseados em técnicas moleculares modernas, para um controle eficiente e específico. Os avanços da biotecnologia apontam para a possibilidade de produção de tecnologias inovadoras e específicas, ajudando assim a reduzir os impactos negativos do uso de produtos químicos. No cenário atual de alta complexidade do controle do

patossistema begomovírus e mosca-branca nos cultivos de tomate nas últimas décadas, é urgente a oferta de novas opções de controle.

Nos últimos anos, o RNA interferente (RNAi), um mecanismo natural de defesa celular em eucariotos, mostrou seu potencial como nova tecnologia para o controle de pragas de culturas importantes (Raza et al. 2016; Ibrahim et al. 2017). O mecanismo consiste basicamente no silenciamento da expressão de genes essenciais através da administração de RNA fita dupla sequência-específico (Asokan et al. 2015; Malik et al. 2016; Ibrahim et al. 2017; Suhag et al. 2020). Os avanços dessa abordagem serão discutidos em seguida.

O uso do silenciamento gênico no controle de *B. tabaci*

O mecanismo de RNA interferente (RNAi) consiste na redução da expressão gênica através da clivagem do RNA mensageiro (mRNA) alvo, desencadeada de maneira sequência-específica por uma molécula de RNA fita dupla (dsRNA) (Fire et al. 1998). Após o reconhecimento pela Dicer, pertencente ao grupo da RNase III, o dsRNA é clivado em fragmentos de 20 a 25 bp (sRNAs). Tais fragmentos são incorporados a um complexo multi-proteico de silenciamento induzido por RNA (RNA-induced silencing complex – RISC) e o componente catalítico do RISC, semelhante à RNase H de uma proteína Argonauta, cliva moléculas de RNA mensageiro (mRNA) alvo com sequência complementar ao sRNA “guia” incorporado (Scott et al. 2013; Suhag et al. 2020).

O RNAi é um processo natural de regulação gênica e defesa antiviral de células eucarióticas e desde a sua descoberta é usado como ferramenta para elucidar a função de genes e conferir resistência contra vírus e insetos em plantas (Upadhyay et al. 2013; Vogel et al. 2019). Esse processo trouxe uma nova perspectiva para o manejo de insetos-praga através do controle da expressão de genes visando causar mortalidade em insetos (Huvenne e Smagghe 2010; Vogel et al. 2019).

Uma resposta de RNAi sistêmica e intensa é pré-requisito para o controle de pragas utilizando dsRNAs. A resposta com caráter sistêmico permite que a administração dos dsRNAs resulte na geração de uma resposta pelo corpo todo enquanto a resposta intensa reduz a expressão dos genes a níveis significativamente menores (Upadhyay et al. 2013; Vogel et al. 2019).

Desde a elucidação do mecanismo de RNAi nos eucariotos, avanços importantes foram realizados no manejo de algumas pragas como lepidópteros e coleópteros (Baum et al. 2007; Mao et al. 2007; Gillet et al. 2017). É importante destacar o SmartStax da Bayer, o milho que controla *Diabrotica virgifera virgifera* expressando dsRNAs contra Snf7 (essencial no tráfego

de proteínas) que foi aprovado em diversos países (Estados Unidos, Canadá, Japão, México), incluindo o Brasil, o que representou um grande passo para o uso da tecnologia RNAi em campo (Bachman et al. 2013; Head et al. 2017; ISAAA 2021).

A ação do mecanismo de RNAi na degradação específica de RNA também foi confirmada em dípteros e em hemípteros, incluindo os pulgões *Myzus persicae* e *Aphis glycines*, e a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Lin et al. 2014; Shakesby et al. 2009; Mao e Zeng 2014; Murphy et al. 2016; Yan et al. 2020). A maquinaria de RNAi em *B. tabaci* é completa e em seu genoma encontram-se genes com sequências homólogas às encontradas em outros insetos que codificam para Dicer2, Argonata2, R2D2, Loquacious e Sid1, proteínas que estão associadas ao funcionamento do mecanismo (Upadhyay et al. 2013). Análises da expressão dessas proteínas em diferentes fases de desenvolvimento de *B. tabaci* indicaram níveis de expressão altos e comparáveis aos níveis de transcritos de Actina. A abundância de transcritos indica uma alta resposta RNAi na mosca-branca (Upadhyay et al. 2013; Tian et al. 2019).

Os sRNAs gerados pela Dicer podem ser divididos em três grupos: os pequenos RNAs de interferência (small interfering RNAs – siRNAs), derivados de moléculas de dsRNAs que fornecem defesa contra vírus e elementos transponíveis, os microRNAs (miRNAs), envolvidos na regulação da expressão gênica, e os RNAs de interação piwi (piRNAs), associados a todas essas funções citadas anteriormente (Asgari 2013; Suhag et al. 2020). Os piRNAs possuem um tamanho pouco maior que os demais, que varia de 26 a 31 nucleotídeos, e, além das diferenças na biogênese, foi sugerida uma associação com a transmissão de vírus (Shamimuzzaman et al. 2019).

A especificidade da sequência e a possibilidade teórica de silenciar qualquer gene "letal" não conservado, tornam o RNAi um candidato ideal para posterior aplicação como um inseticida espécie-específico (Vogel et al. 2019). No caso das moscas-brancas, soma-se a alta disponibilidade de dados genômicos e transcriptômicos, o que facilita a escolha de alvos potenciais não redundantes (Scott et al. 2013; Suhag et al. 2020).

Até o momento, visando controlar as populações de moscas-brancas, há relatos de silenciamento de genes que codificam proteínas como actina, translocase ADP/ATP, alfa tubulina, proteína ribossomal L9, glutatona S-transferase, heat shock protein 70, ciclofilina B, acetilcolinesterase, receptor de ecdisona, v-ATPase, aquaporina, sucrase, alfa glucosidase, distrofina, hormônio esterase juvenil, dentre outros (Ghanim et al. 2007; Upadhyay et al. 2011; Thakur et al. 2014; Asokan et al. 2015; Shim et al. 2015; Malik et al. 2016; Raza et al.

2016; Ibrahim et al. 2017; Luo et al. 2017; Vyas et al. 2017; Grover et al. 2018; Eakteiman et al. 2018; Bar et al. 2019; Kanakala et al. 2019).

Dentre os alvos já testados, destaca-se o silenciamento da Acetilcolinesterase (AChE) e do Receptor de Ecdisona (EcR), que causaram 98 e 100% de mortalidade em moscas-brancas, após 4 e 9 dias de alimentação, respectivamente. As moscas-brancas alimentaram-se em plantas contendo dsRNAs expressos utilizando tobacco rattle virus-induced gene silencing (TRV-VIGS) (Malik et al. 2016). A expressão transiente de dsRNAs utilizando TRV-VIGS consiste na inserção da sequência do dsRNA do gene alvo nos dois sentidos, no componente genômico RNA2 (Malik et al., 2016). Após a infecção da planta com o vírus recombinante, quando este se espalha sistemicamente, há a formação do dsRNA na fase de replicação do vírus. Essa é uma alternativa rápida para regular negativamente um gene sem a necessidade de transgenia (Liu et al. 2002).

A capacidade de expressar o dsRNA em plantas transgênicas é uma abordagem eficaz e de importância econômica (Malik et al., 2016). O silenciamento do gene da v-ATPase através da expressão de dsRNA em plantas transgênicas também mostrou efeitos, com taxas de mortalidade que variaram de 84 a 95% após 5 dias, além da redução no número de ovos em alface (Ibrahim et al., 2017).

A entrega do dsRNA para moscas-brancas foi bem estabelecida através de injeção, ou por via oral utilizando dietas artificiais, expressão dos dsRNAs em plantas, ou absorção através das raízes de plântulas de tomate (Ghanim et al. 2007; Asokan et al. 2015; Malik et al. 2016; Vyas et al. 2017; Arora et al. 2021; Bar et al. 2019). A entrega através da expressão do dsRNA no fungo entomopatogênico *Cordyceps fumosorosea* (antes conhecido como *Isaria fumosorosea*) também foi bem sucedida na indução do silenciamento gênico na hospedeira (Chen et al. 2015).

Abordagens não transgênicas que envolvem a administração de dsRNAs sintetizados *in vitro* estão bem estabelecidas em experimentos laboratoriais e sendo consideradas para escala de campo devido a possibilidade de produção de grandes quantidades de dsRNAs (Luan et al. 2013; Gogoi et al. 2017). As técnicas que não introduzem mudanças hereditárias no genoma das plantas têm maior aceitação pública e a absorção tópica também é ecologicamente favorável porque o dsRNA não persiste por muito tempo nas folhas (Cagliari et al. 2019).

A síntese *in vitro* representa um método de baixo custo para produzir as grandes quantidades de dsRNAs que podem ser necessárias para o manejo de pragas, visto que o custo de produção de dsRNAs caiu de aproximadamente 12.500 dólares por grama em 2008 para menos de 60 dólares em 2018, e há expectativas de mais reduções dos preços nos próximos

anos (Palli 2014; Cagliari et al. 2018). A empresa Genolution (Coréia do Sul), por exemplo, possui um setor denominado AgroRNA que produz e comercializa dsRNAs em quantidades que variam de 1 grama a 1 quilograma (<http://genolution.co.kr/agrona/service-overview/>), de acordo com a preferência do cliente.

Alternativamente, pode-se optar por kits comerciais que contêm todos os reagentes necessários para a produção e purificação de dsRNAs (exceto iniciadores e DNA do gene-alvo). O MEGAscript RNAi Kit (Thermo Fisher Scientific), por exemplo, realiza a síntese em reação de transcrição com a enzima T7 RNA polimerase e promete a obtenção de 50 a 100 µg de dsRNAs em uma única reação (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM1626#/AM1626>).

O sucesso do controle de pragas utilizando RNAi é significativamente dependente da seleção do gene a ser silenciado, o alvo ideal deve ser transcrito (Scott et al. 2013). Além disso, o desenho do dsRNA deve ser escolhido em regiões do RNA mensageiro pouco conservadas entre espécies, para manter a especificidade (Vogel et al. 2019).

A seleção do gene-alvo apropriado é realizada de acordo com o papel da proteína nos processos essenciais à sobrevivência, como neurotransmissão, osmorregulação, tolerância térmica, metabolismo, dentre outros (Shelby et al. 2020). O efeito desejado frequentemente considerado para o controle de pragas é a letalidade após redução dos transcritos do gene-alvo, porém o silenciamento de alvos que causem efeitos subletais vem sendo considerados pois oferecem um caminho que desacelera a evolução de resistência, diminui as preocupações relacionadas a organismos não-alvo e facilita a combinação do RNAi com outras abordagens que podem aumentar a eficácia e diminuir os custos do controle (Shelby et al. 2020).

Considerando a eficácia da entrega de dsRNAs produzidos *in vitro* às moscas-brancas por via oral e a ampla variedade de genes-alvo que ainda podem ser testados, alguns genes foram escolhidos para o silenciamento através da ingestão de dsRNAs homólogos. Foram selecionados os genes que codificam as proteínas Distroglicana, Laminina, Tuberina e Loquacious.

A Distroglicana foi escolhida porque faz parte de um complexo conhecido como dys-glicoproteico (Figura 3), que estabelece uma ligação entre a Laminina e a Distrofina e outras proteínas que compõe o complexo, localizadas no citosol (Straub et al. 1997). Esse complexo liga a fibra muscular à matriz extracelular e tem um papel importante na contração muscular (Ehmsen et al. 2002; Bar et al. 2019).

Ainda visando desestabilizar o complexo dys-glicoproteico, o gene da Laminina foi selecionado. Essa proteína, localizada na matriz extracelular, forma uma rede proteica que

organiza a própria formação da matriz extracelular e é composta por três subunidades, alfa, beta e gama (Hutter et al. 2000). Ela é fundamental no desenvolvimento embrionário e tem um papel importante em processos de diferenciação, migração e adesão celular. Ela controla o crescimento celular e é um fator de sobrevivência para alguns tipos celulares (Sánchez-Sánchez et al. 2017; Li et al. 2003).

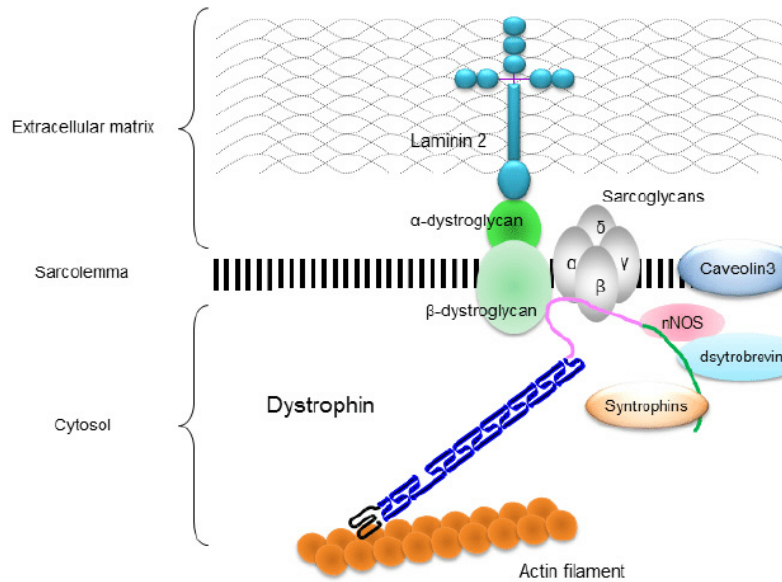


Figura 3. Localização da Laminina (laminin 2) na matriz extracelular e da Distroglicana (α -dystroglycan e β -dystroglycan), no sarcolema, formando o complexo dys-glicoproteico na célula muscular (Nakamura 2015).

O gene da Tuberina também foi escolhido para o silenciamento porque esta proteína age como uma GAP específica inativadora de Rheb, que é responsável pela ativação de TORC1. TORC1 é um complexo de proteínas que regula a produção de recursos necessários para o crescimento e a proliferação das células (Saxton e Sabatini 2017). A ação da Tuberina, também conhecida como TSC2, impede a ativação de TORC1, limitando então o crescimento e a proliferação celular, sendo então classificada como uma supressora tumoral.

O papel essencial da proteína Loquacious na biogênese de miRNAs através da interação com a proteína Dicer-1 motivou a escolha do seu gene como um alvo para o silenciamento. Nos insetos, os miRNAs estão envolvidos na regulação de processos como o metabolismo, o desenvolvimento, apoptose e resposta imune inata (Lucas e Raikhel 2013). Loquacious tem o papel de estimular e direcionar o processamento de miRNAs que atuam como guias na regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional (Saito et al. 2005; Zhou et al. 2009).

Após anos de pesquisas, nota-se que muitos aspectos essenciais para o sucesso do controle de moscas-brancas utilizando o RNAi estão sendo esclarecidos. As variações que ocorrem de acordo com a importância dos genes, o método de entrega e até mesmo em diferentes populações de insetos da mesma espécie direcionam os estudos futuros à avaliação de múltiplos genes para o rastreamento de diversos alvos eficientes (Scott et al. 2013; Shelby et al. 2020).

REFERÊNCIAS

- Alvarenga, M. A. R. 2013. Origem, botânica e descrição da planta. In *Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia*, Lavras, MG: Editora Universitária de Lavras, p. 13–21.
- Alvarenga, M. A. R., e Coelho, F. B. 2013. Valor nutricional. In *Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia*, Lavras-MG: Editora Universitária de Lavras, p. 23–29.
- Andrade, E. C., Manhani, G. G., Alfenas, P. F., Calegario, R. F., Fontes, E. P. B., e Zerbini, F. M. 2006. Tomato yellow spot virus, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *J. Gen. Virol.* 87:3687–3696.
- Anwar, W., Ali, S., Nawaz, K., Iftikhar, S., Javed, M., Hashem, A., et al. 2018. Entomopathogenic fungus *Clonostachys rosea* as a biocontrol agent against whitefly (*Bemisia tabaci*). *Biocontrol Sci. Technol.* 28:1–11.
- Arora, A. K., Ho Chung, S., e Douglas, A. E. 2021. Empirical analysis of non-target effects of dsRNA molecules in hemipteran insects. *Genes* 2021. 12.
- Asgari, S. 2013. MicroRNA functions in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43:388–397.
- Asokan, R., Rebijith, K. B., Roopa, H. K., e Kumar, N. K. K. 2015. Non-invasive delivery of dsGST is lethal to the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (G.) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175:2288–2299.
- Bachman, P. M., Bolognesi, R., Moar, W. J., Mueller, G. M., Paradise, M. S., Ramaseshadri, P., et al. 2013. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *Transgenic Res.* 22:1207–1222.
- Bar, L., Czosnek, H., Sobol, I., Ghanim, M., e Hariton Shalev, A. 2019. Downregulation of dystrophin expression in pupae of the whitefly *Bemisia tabaci* inhibits the emergence of adults. *Insect Mol. Biol.* 28:662–675.
- Barbosa, J. C., Barreto, S. S., Inoue-Nagata, A. K., Reis, M. S., Firmino, A. C., Filho, A. B., et al. 2009. Natural infection of *Nicandra physaloides* by Tomato severe rugose virus in Brazil. *J. Gen. Plant Pathol.* 75:440–443.
- Barbosa, J. C., da Silva Barreto, S. D., Inoue-Nagata, A. K., e Rezende, J. A. M. 2011. Characterization and experimental host range of a Brazilian tomato isolate of Tomato severe rugose virus. *J. Phytopathol.* 159:644–646.
- Barbosa, L. da F., Marubayashi, J. M., De Marchi, B. R., Yuki, V. A., Pavan, M. A., Moriones, E., et al. 2014. Indigenous American species of the *Bemisia tabaci* complex are still widespread in the Americas. *Pest Manag. Sci.* 70:1440–1445.
- Barreto, S. S., Hallwass, M., Aquino, O. M., e Inoue-Nagata, A. K. 2013. A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato-infecting begomovirus in central Brazil. *Phytopathology.* 103:436–444.
- De Barro, P. J., Liu, S.-S., Boykin, L. M., e Dinsdale, A. B. 2011. *Bemisia tabaci*: A statement of species status. *Annu. Rev. Entomol.* 56:1–19.

- Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., et al. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 25:1322–1326.
- Bedford, I. D., Briddon, R. W., Brown, J. K., Rosell, R. C., e Markham, P. G. 1994. Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Ann. Appl. Biol.* 125:311–325.
- Bello, V. H., Watanabe, L. F. M., Fusco, L. M. H., De Marchi, B. R., Da Silva, F. B., Gorayeb, E. S., et al. 2020. Outbreaks of *Bemisia tabaci* Mediterranean species in vegetable crops in São Paulo and Paraná States, Brazil. *Bull. Entomol. Res.* 110:487–496.
- Bergamin-Filho, A., Inoue-Nagata, A. K., Bassanezi, R. B., Belasque, J., Amorim, L., Macedo, M. A., et al. 2016. The importance of primary inoculum and area-wide disease management to crop health and food security. *Food Secur.* 8:221–238.
- Bergamin-Filho, A., Macedo, M. A., Favara, G. M., Bampi, D., Oliveira, de F. F., e Rezende, J. A. M. 2020. Amplifier hosts may play an essential role in tomato begomovirus epidemics in Brazil. *Front. Plant Sci.* 11:1–6.
- Boiteux, L., Oliveira, V., Silva, C., Makishima, N., Inoue-Nagata, A., e Giordano, L. 2007. Reaction of tomato hybrids carrying the *Ty-1* locus to Brazilian bipartite begomovirus species. *Hortic. Bras.* 25.
- Bondar, G. 1928. Aleyrodídeos do Brasil. In *Boletim do laboratório de patologia vegetal do estado da Bahia, Bahia*, p. 1–37.
- Borges, R., Fontes, M., Macedo, M., Lima, M., Boiteux, L., e Fonseca, M. 2019. First report of tomato chlorosis virus infecting *Tectona grandis* associated with infestation of *Bemisia tabaci*. Mediterranean in Central Brazil. *Plant Dis.* 103:2704.
- Bosco, D., Mason, G., e Accotto, G. P. 2004. TYLCSV DNA, but not infectivity, can be transovarially inherited by the progeny of the whitefly vector *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Virology.* 323:276–283.
- Boteon, M., Deleo, J. P. B., e Moreira, M. M. 2020. Tomaticultura em números. *Hortifruti Bras.* 201:13–18.
- Brahimi, M., Boukhalifa, K., e Moussaoui, A. 2017. Deep learning for tomato diseases: classification and symptoms visualization. *Appl. Artif. Intell.* 31:299–315.
- Briddon, R. W., Martin, D. P., Roumagnac, P., Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., Moriones, E., et al. 2018. Alphasatellitidae: a new family with two subfamilies for the classification of geminivirus- and nanovirus-associated alphasatellites. *Arch. Virol.* 163:2587–2600.
- Briddon, R. W., Patil, B. L., Bagewadi, B., Nawaz-Ul-Rehman, M. S., e Fauquet, C. M. 2010. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evol. Biol.* 10.
- Brown, J. K., Frohlich, D. R., e Rosell, R. C. 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annu. Rev. Entomol.* 40:511–534.
- Brown, J. K., Zerbini, F. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J. C. F., et al. 2015. Revision of begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch. Virol.* 160:1593–1619.
- Buso, J. A., Lopes, C. A., e de Avila, A. C. 2005. Doenças do tomateiro. 2ª edição. orgs. R.A. Souza, A.L.X. Souza, e L.X. Souza. Brasília - DF: Embrapa Hortaliças.

- Butterbach, P., Verlaan, M. G., Dullemans, A., Lohuis, D., Visser, R. G. F., Bai, Y., et al. 2014. Tomato yellow leaf curl virus resistance by *Ty-1* involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by cucumber mosaic virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111:12942–12947.
- Byrne, D. N., e Bellows, T. S. 1991. Whitefly biology. *Annu. Rev. Entomol.* Vol. 36: 431-457.
- Cagliari, D., Avila dos Santos, E., Dias, N., Smagghe, G., e Zotti, M. 2018. Nontransformative strategies for RNAi in crop protection. In *Modul. Gene Expr. - Abridging RNAi Cris. Technol.*
- Cagliari, D., Dias, N. P., Galdeano, D. M., dos Santos, E. Á., Smagghe, G., e Zotti, M. J. 2019. Management of pest insects and plant diseases by non-transformative RNAi. *Front. Plant Sci.* Vol. 10: 1319.
- Calegario, R. F., Ferreira, S. D. S., De Andrade, E. C., e Zerbini, F. M. 2007. Characterization of tomato yellow spot virus, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 42:1335–1343.
- Castillo-Urquiza, G. P., Beserra, J. E. A., Bruckner, F. P., Lima, A. T. M., Varsani, A., Alfenas-Zerbini, P., et al. 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Arch. Virol.* 153:1985–1989.
- Cervera, H., e Elena, S. F. 2016. Genetic variation in fitness within a clonal population of a plant RNA virus. *Virus Evol.* 2:1–8.
- Chen, X., Li, L., Hu, Q., Zhang, B., Wu, W., Jin, F., et al. 2015. Expression of dsRNA in recombinant *Isaria fumosorosea* strain targets the TLR7 gene in *Bemisia tabaci*. *BMC Biotechnol.* 15:1–8.
- Claverie, S., Bernardo, P., Kraberger, S., Hartnady, P., Lefeuvre, P., Lett, J. M., et al. 2018. From spatial metagenomics to molecular characterization of plant viruses: a geminivirus case study. 1^a ed Elsevier Inc.
- Costa, A. S., e Bennett, C. w. 1950. Whitefly transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. *Phytopathology.* 40:266–283.
- Costa, A. S., e Carvalho, A. M. 1955. Comparative studies between Abutilon and Euphorbia mosaic viruses. *Phytopathol. Zeitschrift.* 38:129–132.
- Costa, C. L. 1998. Vetores de vírus de plantas - Insetos. *Revisão Anu. Patol. Plantas.* 6:103–171.
- Cotrim, M. A. de A., Krause-Sakate, R., Narita, N., Zerbini, F. M., e Pavan, M. A. 2007. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no centro-oeste paulista. *Summa Phytopathol.* 33:300–303.
- Czosnek, H., Hariton-Shalev, A., Sobol, I., Gorovits, R., e Ghanim, M. 2017. The incredible journey of Begomoviruses in their whitefly vector. *Viruses.* 9.
- Dalton, R. 2006. The Christmas Invasion. *Nature.* 443:898–900.
- Dângelo, R. A. C., Michereff-Filho, M., Campos, M. R., da Silva, P. S., e Guedes, R. N. C. 2018. Insecticide resistance and control failure likelihood of the whitefly *Bemisia tabaci* (MEAM1; B biotype): a Neotropical scenario. *Ann. Appl. Biol.* 172:88–99.

- Dinsdale, A., Cook, L., Riginos, C., Buckley, Y. M., e De Barro, P. 2010. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 103:196–208.
- Domingo, E., Sheldon, J., e Perales, C. 2012. Viral quasispecies evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76:159–216.
- Dry, I. B., Krake, L. R., Rigden, J. E., e Rezaian, M. A. 1997. A novel subviral agent associated with a geminivirus: The first report of a DNA satellite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:7088–7093.
- Duarte, M F, Fonseca, M. E. N., Costa, H., Fernandes, N. A. N., Reis, A., Boiteux, L. S., et al. 2021. Diversity of tomato-infecting begomoviruses and spatiotemporal dynamics of an endemic viral species of the Brazilian Atlantic rain forest biome. *Virus Genes.* 57:83–93.
- Duarte, M.F., Pereira-Carvalho, R. C., Reis, L. N. A., Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Costa, H., et al. 2021. Natural infection of tomatoes (*Solanum lycopersicum*) by euphorbia yellow mosaic virus isolates across four brazilian states. *Plant Dis.* 105:518.
- Duffy, S., e Holmes, E. C. 2009. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *J. Gen. Virol.* 90:1539–1547.
- Eakteiman, G., Moses-Koch, R., Moshitzky, P., Mestre-Rincon, N., Vassão, D. G., Luck, K., et al. 2018. Targeting detoxification genes by phloem-mediated RNAi: A new approach for controlling phloem-feeding insect pests. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 100:10–21.
- Ehmsen, J., Poon, E., e Davies, K. 2002. Dystrophin-associated protein complex and heart failure. *J. Cell Sci.* 115:2801–2803.
- Escriu, F., Fraile, A., e García-Arenal, F. 2003. The evolution of virulence in a plant virus. *Evolution (N. Y).* 57:755–765.
- Faostat. 2021. Food Agric. Organ.
- Faria, J. C., Souza-dias, J. A. C., Slack, S. A., e Maxwell, D. P. 1997. A new geminivirus associated with tomato in the state of São Paulo, Brazil. *Plant Dis.* 81:423.
- Fernandes, F. R., De Albuquerque, L. C., De Britto Giordano, L., Boiteux, L. S., De ávila, A. C., e Inoue-Nagata, A. K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes.* 36:251–258.
- Fernandes, J. J., Carvalho, M. G., Andrade, E. C., Brommonschenkel, S. H., Fontes, E. P. B., e Zerbini, F. M. 2006. Biological and molecular properties of tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathol.* 55:513–522.
- Ferro, M. M. M., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J. T., Assunção, I. P., e Lima, G. S. A. 2017. Genetic structure of populations of the begomoviruses tomato mottle leaf curl virus and sida mottle Alagoas virus infecting tomato (*Solanum lycopersicum*) and *Sida* spp., respectively. *Trop. Plant Pathol.* 42:39–45.
- Fiallo-Olivé, E., Martínez-Zubiaur, Y., Moriones, E., e Navas-Castillo, J. 2012. A novel class of DNA satellites associated with New World begomoviruses. *Virology.* 426:1–6.
- Fiallo-Olivé, E., Pan, L. L., Liu, S. S., e Navas-Castillo, J. 2020. Transmission of begomoviruses and other whitefly-borne viruses: dependence on the vector species. *Phytopathology.* 110:10–17.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., e Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:806–811.
- Firmino, A. C., Yuki, V. A., Moreira, A. G., e Rezende, J. A. M. 2009. Tomato yellow vein streak virus: interação com a *Bemisia tabaci* biótipo B e gama de hospedeiros. *Sci. Agric*. 66:793–799.
- Flores, E., Silberschmidt, K., e Kramer, M. 1960. Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. *Biol*. 26:65–69.
- da Fonseca Barbosa, L., Yuki, V. A., Marubayashi, J. M., De Marchi, B. R., Perini, F. L., Pavan, M. A., et al. 2015. First report of *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. *Pest Manag. Sci*. 71:501–504.
- García-Arenal, F., e Zerbini, F. M. 2019. Life on the edge: geminiviruses at the interface between crops and wild plant hosts. *Annu. Rev. Virol*. 6:411–433.
- Ghanim, M. 2014. A review of the mechanisms and components that determine the transmission efficiency of tomato yellow leaf curl virus (*Geminiviridae; Begomovirus*) by its whitefly vector. *Virus Res*. 186:47–54.
- Ghanim, M., Kontsedalov, S., e Czosnek, H. 2007. Tissue-specific gene silencing by RNA interference in the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Insect Biochem. Mol. Biol*. 37:732–738.
- Ghanim, M., Morin, S., e Czosnek, H. 2001. Rate of Tomato yellow leaf curl virus translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology*. 91:188–196.
- Ghanim, M., Morin, S., Zeidan, M., e Czosnek, H. 1998. Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology*. 240:295–303.
- Ghosh, S., Kanakala, S., Lebedev, G., Kontsedalov, S., Silverman, D., Alon, T., et al. 2019. Transmission of a new polerovirus infecting pepper by the whitefly *Bemisia tabaci*. *J. Virol*. 93:1–14.
- Gilbertson, R. L., Batuman, O., Webster, C. G., e Adkins, S. 2015. Role of the Insect Supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. *Annu. Rev. Virol*. 2:67–93.
- Gilbertson, R. L., Rojas, M., e Natwick, E. 2011. The whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) interaction with geminivirus-infected host plants.
- Gillet, F. X., Garcia, R. A., Macedo, L. L. P., Albuquerque, E. V. S., Silva, M. C. M., e Grossi-de-Sa, M. F. 2017. Investigating engineered ribonucleoprotein particles to improve oral RNAi delivery in crop insect pests. *Front. Physiol*. 8:1–14.
- Gnanasekaran, P., KishoreKumar, R., Bhattacharyya, D., Vinoth Kumar, R., e Chakraborty, S. 2019. Multifaceted role of geminivirus associated betasatellite in pathogenesis. *Mol. Plant Pathol*. 20:1019–1033.
- Gogoi, A., Sarmah, N., Kaldis, A., Perdakis, D., e Voloudakis, A. 2017. Plant insects and mites uptake double-stranded RNA upon its exogenous application on tomato leaves. *Planta*. 246:1233–1241.

- Gopal, P., Pravin Kumar, P., Sinilal, B., Jose, J., Kasin Yadunandam, A., e Usha, R. 2007. Differential roles of C4 and β C1 in mediating suppression of post-transcriptional gene silencing: Evidence for transactivation by the C2 of Bhendi yellow vein mosaic virus, a monopartite begomovirus. *Virus Res.* 123:9–18.
- Gouvêa, M. M., Freitas, D. M. S., Rezende, J. A. M., Watanabe, L. F. M., e Lourenção, A. L. 2017. Bioassay of insecticides on mortality of *Bemisia tabaci* biotype B and transmission of tomato severe rugose virus (ToSRV) on tomatoes. *Phytoparasitica.* 45:95–101.
- Granier, M., Tomassoli, L., Manglii, A., Nannini, M., Peterschmidt, M., e Urbino, C. 2019. First report of TYLCV-IS141, a tomato yellow leaf curl virus recombinant infecting tomato plants carrying the *Ty-1* resistance gene in Sardinia (Italy). *Plant Dis.* 103.
- Grover, S., Jindal, V., Banta, G., Taning, C. N. T., Smagghe, G., e Christiaens, O. 2018. Potential of RNA interference in the study and management of the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 100:1–17.
- Guo, Q., Shu, Y. N., Liu, C., Chi, Y., Liu, Y. Q., e Wang, X. W. 2019. Transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by seven species of the *Bemisia tabaci* complex indigenous to China: Not all whiteflies are the same. *Virology.* 531:240–247.
- Gusmão, M. R., Picanço, M. C., Guedes, R. N. C., Galvan, T. L., e Pereira, E. J. G. 2006. Economic injury level and sequential sampling plan for *Bemisia tabaci* in outdoor tomato. *J. Appl. Entomol.* 130:160–166.
- Gutierrez, C. 1999. Geminivirus DNA replication. *Cell. Mol. Life Sci.* 56:313–329.
- Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E. R., Robertson, D., e Mansoor, S. 2013. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat. Rev. Microbiol.* 11:777–788.
- Harrison, B. D. 1985. Advances in Geminivirus Research. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23:55–82.
- Hassan, I., Orílio, A. F., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R. W., e Navas-Castillo, J. 2016. Infectivity, effects on helper viruses and whitefly transmission of the deltasatellites associated with sweepoviruses (genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*). *Sci. Rep.* 6:1–12.
- Head, G. P., Carroll, M., Evans, S., Rule, D. M., Willse, A., Clark, T., et al. 2017. Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO against WCR and NCR. *Pest Manag. Sci.* 73:1883–1899.
- Hesketh, E. L., Saunders, K., Fisher, C., Potze, J., Stanley, J., Lomonossoff, G. P., et al. 2018. The 3.3 Å structure of a plant geminivirus using cryo-EM. *Nat. Commun.* 9:1–10.
- Horowitz, A. R., Ghanim, M., Roditakis, E., Nauen, R., e Ishaaya, I. 2020. Insecticide resistance and its management in *Bemisia tabaci* species. *J. Pest Sci.* (2004). 93:893–910.
- Horowitz, A. R., e Ishaaya, I. 2014. Dynamics of biotypes B and Q of the whitefly *Bemisia tabaci* and its impact on insecticide resistance. *Pest Manag. Sci.* 70:1568–1572.
- Horowitz, A. R., Kontsedalov, S., e Ishaaya, I. 2004. Dynamics of resistance to the neonicotinoids acetamiprid and thiamethoxam in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol.* 97:2051–2056.
- Horowitz, A. R., Kontsedalov, S., Khasdan, V., e Ishaaya, I. 2005. Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 58:216–225.

- Huang, Z., Ali, S., Ren, S., e Wu, J. 2009. Effect of *Isaria fumosoroseus* on mortality and fecundity of *Bemisia tabaci* and *Plutella xylostella*. *Insect Sci.* 17:140–148.
- Hutter, H., Vogel, B. E., Plenefisch, J. D., Norris, C. R., Proenca, R. B., Spieth, J., et al. 2000. Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science* (80). 287:989–1010.
- Huvenne, H., e Smagghe, G. 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *J. Insect Physiol.* 56:227–235.
- Ibrahim, A. B., Monteiro, T. R., Cabral, G. B., e Aragão, F. J. L. 2017. RNAi-mediated resistance to whitefly (*Bemisia tabaci*) in genetically engineered lettuce (*Lactuca sativa*). *Transgenic Res.* 26:613–624.
- ICTV. 2021. Int. Comm. Taxon. Viruses.
- Inoue-Nagata, A. K. 2013. Doenças viróticas. In *Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia*, Lavras-MG: Editora Universitária de Lavras, p. 329–354.
- Inoue-Nagata, A. K., Carvalho, C. M., Zerbini, F. M., Rezende, J. A. M., Krause-Sakate, R., e Nagata, T. 2016. Vírus transmitidos por moscas-brancas no Brasil: vetores, principais doenças e manejo. *Revisão Annu. Patol. Plantas.* 24:7–29.
- Inoue-nagata, A. K., Lima, M. F., e Gilbertson, R. L. 2016. A review of geminivirus (begomovirus) diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Hortic. Bras.* 34:8–18.
- ISAAA. 2021. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. GM Approv. Database. Available at: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase> [Acessado julho 28, 2021].
- Jain, Robinson, e Mitter. 2019. RNAi-Mediated management of whitefly *Bemisia tabaci* by oral delivery of double-stranded RNAs. *Proceedings.* 36:11.
- Jeske, H., Lütgemeier, M., e Prei, W. 2001. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *EMBO J.* 20:6158–6167.
- Jovel, J., Reski, G., Rothenstein, D., Ringel, M., Frischmuth, T., e Jeske, H. 2004. Sida micrantha mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from abutilon mosaic virus. *Arch. Virol.* 149:829–841.
- Kanakala, S., e Ghanim, M. 2019. Global genetic diversity and geographical distribution of *Bemisia tabaci* and its bacterial endosymbionts. *PLoS One.* 14.
- Kanakala, S., Kontsedalov, S., Lebedev, G., e Ghanim, M. 2019. Plant-mediated silencing of the whitefly *Bemisia tabaci* Cyclophilin B and Heat Shock Protein 70 impairs insect development and virus transmission. *Front. Physiol.* 10:557.
- Kaur, N., Chen, W., Zheng, Y., Hasegawa, D. K., Ling, K. S., Fei, Z., et al. 2017. Transcriptome analysis of the whitefly, *Bemisia tabaci* MEAM1 during feeding on tomato infected with the crinivirus, tomato chlorosis virus, identifies a temporal shift in gene expression and differential regulation of novel orphan genes. *BMC Genomics.* 18:1–20.
- Kriticos, D. J., De Barro, P. J., Yonow, T., Ota, N., e Sutherst, R. W. 2020. The potential geographical distribution and phenology of *Bemisia tabaci* Middle East Asia Minor 1, considering irrigation and glasshouse production. *Bull. Entomol. Res.* 110:567–576.

- Kumar, R., Singh, Achuit Kumar, Singh, Ashish Kumar, Yadav, T., Singh, Achuit Kumar, Kushwaha, N., et al. 2015. Complexity of begomovirus and betasatellite populations associated with chilli leaf curl disease in India. *J. Gen. Virol.* 96:3143–3158.
- Kumar, R., Singh, D., Singh, A. K., e Chakraborty, S. 2017. Molecular diversity, recombination and population structure of alphasatellites associated with begomovirus disease complexes. *Infect. Genet. Evol.* 49:39–47.
- Lazarowitz, S. G. 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 11:327–349.
- Lee, M. H., e Zhang, Z.-Q. 2018. Assessing the augmentation of *Amblydromalus limonicus* with the supplementation of pollen, thread, and substrates to combat greenhouse whitefly populations. *Sci. Rep.* 8:12189.
- Lee, W., Park, J., Lee, G.-S., Lee, S., e Akimoto, S. 2013. Taxonomic status of the *Bemisia tabaci* complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and Reassessment of the number of its constituent species. *PLoS One.* 8:1–10.
- Lemos, P., Martins, M., Almeida, S. De, Bastos, S., e Inoue-nagata, A. K. 2010. Avaliação do efeito da begomovirose na qualidade do fruto de tomate para processamento industrial. *Hortic. Bras.* 2:1142–1147.
- Li, M., Hu, J., Xu, F. C., e Liu, S. S. 2010. Transmission of tomato yellow leaf curl virus by two invasive biotypes and a Chinese indigenous biotype of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Int. J. Pest Manag.* 56:275–280.
- Li, S., Edgar, D., Fässler, R., Wadsworth, W., e Yurchenco, P. D. 2003. The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev. Cell.* 4:613–624.
- Lima, A. T. M., Silva, J. C. F., Silva, F. N., Castillo-Urquiza, G. P., Silva, F. F., Seah, Y. M., et al. 2017. The diversification of begomovirus populations is predominantly driven by mutational dynamics. *Virus Evol.* 3:1–14.
- Lima, L. H. C., Návía, D., Inglis, P. W., e De Oliveira, M. R. V. 2000. Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. *Genet. Mol. Biol.* 23:781–785.
- Lin, X., Yao, Y., Jin, M., e Li, Q. 2014. Characterization of the Distal-less gene homologue, NIDII, in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Gene.* 535:112–118.
- Liu, J., e Wang, X. 2020. Tomato diseases and pests detection based on improved yolo v3 convolutional neural network. *Front. Plant Sci.* 11:1–12.
- Liu, Y., Schiff, M., e Dinesh-Kumar, S. P. 2002. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* 31:777–786.
- Londoño, A., Riego-Ruiz, L., e Argüello-Astorga, G. R. 2010. DNA-binding specificity determinants of replication proteins encoded by eukaryotic ssDNA viruses are adjacent to widely separated RCR conserved motifs. *Arch. Virol.* 155:1033–1046.
- Lourenção, A. L., Krause-Sakate, R., e Valle, G. E. 2015. Mosca-branca, *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B. In *Pragas Introduzidas no Brasil: Insetos e Ácaros.*, orgs. E.F. Vilela e R.A. Zucchi. Piracicaba: FEALQ, p. 682–707.
- Lourenção, A. L., e Nagai, H. 1994. Outbreaks of *Bemisia tabaci* in Sao Paulo State, Brazil. *Bragantia.* 53:53–59.

- Luan, J. B., Ghanim, M., Liu, S. S., e Czosnek, H. 2013. Silencing the ecdysone synthesis and signaling pathway genes disrupts nymphal development in the whitefly. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43:740–746.
- Lucas, K., e Raikhel, A. S. 2013. Insect microRNAs: biogenesis, expression profiling and biological functions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43:24–38.
- Luo, Y., Chen, Q., Luan, J., Chung, S. H., Van Eck, J., Turgeon, R., et al. 2017. Towards an understanding of the molecular basis of effective RNAi against a global insect pest, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 88:21–29.
- Macedo, M. A., Albuquerque, L. C., Maliano, M. R., Souza, J. O., Rojas, M. R., Inoue-Nagata, A. K., et al. 2018. Characterization of tomato leaf curl purple vein virus, a new monopartite New World begomovirus infecting tomato in Northeast Brazil. *Arch. Virol.* 163:737–743.
- Macedo, M. A., Michereff Filho, M., Navas-Castillo, J., e Inoue-Nagata, A. K. 2015. Host range and whitefly transmission efficiency of tomato severe rugose virus and tomato golden vein virus in tomato plants. *Trop. Plant Pathol.* 40:405–409.
- Maina, U. M., Galadima, I. B., Gambo, F. M., e Zakaria, D. 2018. A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. *J. Entomol. Zool. Stud.* 6:27–32.
- Malik, H. J., Raza, A., Amin, I., Scheffler, J. A., Scheffler, B. E., Brown, J. K., et al. 2016. RNAi-mediated mortality of the whitefly through transgenic expression of double-stranded RNA homologous to acetylcholinesterase and ecdysone receptor in tobacco plants. *Sci. Rep.* 6:1–11.
- Mao, J., e Zeng, F. 2014. Plant-mediated RNAi of a gap gene-enhanced tobacco tolerance against the *Myzus persicae*. *Transgenic Res.* 23:145–152.
- Mao, Y. B., Cai, W. J., Wang, J. W., Hong, G. J., Tao, X. Y., Wang, L. J., et al. 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotechnol.* 25:1307–1313.
- Marubayashi, J. M., Yuki, V. A., Rocha, K. C. G., Mituti, T., Pelegrinotti, F. M., Ferreira, F. Z., et al. 2013. At least two indigenous species of the *Bemisia tabaci* complex are present in Brazil. *J. Appl. Entomol.* 137:113–121.
- Matyis, J. C., Silva, D. M., Oliveira, A. R., e Costa, A. S. 1975. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathol.* 1:267–275.
- Melgarejo, T. A., Kon, T., Rojas, M. R., Paz-Carrasco, L., Zerbini, F. M., e Gilbertson, R. L. 2013. Characterization of a new world monopartite begomovirus causing leaf curl disease of tomato in Ecuador and Peru reveals a new direction in geminivirus evolution. *J. Virol.* 87:5397–5413.
- Michelson, I., Zamir, D., e Czosnek, H. 1994. Accumulation and translocation of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gene *Ty-1*. *Phytopathology.* 84:928–933.
- Mituti, T., Moura, M. F., Macedo, M. A., Silva, T. N. Z., Pinto, L. R., Costa, H., et al. 2019. Survey of begomoviruses and the crinivirus, tomato chlorosis virus, in solanaceous in Southeast/Midwest of Brazil. *Trop. Plant Pathol.* 44:468–472.

- de Moraes, L. A., Marubayashi, J. M., Yuki, V. A., Ghanim, M., Bello, V. H., De Marchi, B. R., et al. 2017. New invasion of *Bemisia tabaci* Mediterranean species in Brazil associated to ornamental plants. *Phytoparasitica*. 45:517–525.
- de Moraes, L. A., Muller, C., Bueno, R. C. O. de F., Santos, A., Bello, V. H., De Marchi, B. R., et al. 2018. Distribution and phylogenetics of whiteflies and their endosymbiont relationships after the Mediterranean species invasion in Brazil. *Sci. Rep.* 8:1–13.
- Morales, F. J. 2007. Tropical Whitefly IPM Project. *Adv. Virus Res.* 69:249–311.
- Morales, F. J., e Anderson, P. K. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch. Virol.* 146:415–441.
- Morin, S., Ghanim, M., Sobol, I., e Czosnek, H. 2000. The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system. *Virology*. 276:404–416.
- Morin, S., Ghanim, M., Zeidan, M., Czosnek, H., Verbeek, M., e Van Den Heuvel, J. F. J. M. 1999. A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology*. 256:75–84.
- Moro, D., Wengrat, A. P. G. da S., Costa, V. A., Pozebon, H., Tay, W. T., Bevilaqua, J. G., et al. 2021. Integrative techniques confirms the presence of *Bemisia tabaci* parasitoids: *Encarsia formosa*, *Encarsia porteri* and *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae) on soybean and tomatoes in South Brazil. *Neotrop. Entomol.*
- Muñiz, M., e Nombela, G. 2001. Differential variation in development of the B- and Q-biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on sweet pepper at constant temperatures. *Environ. Entomol.* 30:720–727.
- Murphy, K. A., Tabuloc, C. A., Cervantes, K. R., e Chiu, J. C. 2016. Ingestion of genetically modified yeast symbiont reduces fitness of an insect pest via RNA interference. *Sci. Rep.* 6:1–13.
- Nakamura, A. 2015. X-linked dilated cardiomyopathy: A cardiospecific phenotype of dystrophinopathy. *Pharmaceuticals*. 8:303–320.
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., e Sánchez-Campos, S. 2011. Emerging Virus diseases transmitted by whiteflies. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49:219–248.
- Naveen, N. C., Chaubey, R., Kumar, D., Rebijith, K. B., Rajagopal, R., Subrahmanyam, B., et al. 2017. Insecticide resistance status in the whitefly, *Bemisia tabaci* genetic groups Asia-I, Asia-II-1 and Asia-II-7 on the Indian subcontinent. *Sci. Rep.* 7:40634.
- NCBI. 2021. National Center for Biotechnology Information. GenBank. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Noeiry, A. O., Lucas, W. J., e Gilbertson, R. L. 1994. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*. 76:925–932.
- Oliveira, M. R. V, Henneberry, T. J. e, e Anderson, P. 2001. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Prot.* 20:709–723.
- Orozco, B. M., e Hanley-Bowdoin, L. 1996. A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. *J. Virol.* 70:148–158.
- Padidam, M., Sawyer, S., e Fauquet, C. M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*. 265:218–225.

- Pakkianathan, B. C., Kontsedalov, S., Lebedev, G., Mahadav, A., Zeidan, M., Czosnek, H., et al. 2015. Replication of tomato yellow leaf curl virus in its whitefly vector, *Bemisia tabaci*. *J. Virol.* 89:9791–9803.
- Palli, S. R. 2014. RNA interference in Colorado potato beetle: Steps toward development of dsRNA as a commercial insecticide. *Curr. Opin. Insect Sci.* 6:1–8.
- Panno, S., Caruso, A. G., e Davino, S. 2018. The nucleotide sequence of a recombinant tomato yellow leaf curl virus strain frequently detected in Sicily isolated from tomato plants carrying the *Ty-1* resistance gene. *Arch. Virol.* 163:795–797.
- Patil, C. V., Ramdas, S. V., Premchand, U., e Shankarappa, K. S. 2017. Survey, symptomatology, transmission, host range and characterization of begomovirus associated with yellow mosaic disease of ridge gourd in southern India. *VirusDisease.* 28:146–155.
- Péréfarres, F., Thébaud, G., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Rimbaud, L., Hoareau, M., et al. 2014. Frequency-dependent assistance as a way out of competitive exclusion between two strains of an emerging virus. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281.
- Perring, Thomas M., Stansly, P. A., Liu, T. X., Smith, H. A., e Andreason, S. A. 2018. Whiteflies: biology, ecology, and management. In Sustainable management of arthropod pests of tomato, orgs. Waqas. Wakil, Gerald. Brust, e T.M. Perring. Elsevier Inc., p. 73–110.
- Pinheiro-Lima, B., Pereira-Carvalho, R. C., Alves-Freitas, D. M. T., Kitajima, E. W., Vidal, A. H., Lacorte, C., et al. 2020. Transmission of the Bean-Associated Cytorhabdovirus by the whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1. *Viruses.* 12:1028.
- Priyadarshini, C. G. P., Ambika, M. V., Tippleswamy, R., e Savithri, H. S. 2011. Functional characterization of coat protein and V2 involved in cell to cell movement of cotton leaf curl Kokhran Virus-Dabawali. *PLoS One.* 6.
- Quadros, A. F. F., Silva, J. P., Xavier, C. A. D., Zerbini, F. M., e Boari, A. J. 2019. Two new begomoviruses infecting tomato and *Hibiscus* sp. in the Amazon region of Brazil. *Arch. Virol.* 164:1897–1901.
- Raza, A., Malik, H. J., Shafiq, M., Amin, I., Scheffler, J. A., Scheffler, B. E., et al. 2016. RNA interference based approach to down regulate osmoregulators of whitefly (*Bemisia tabaci*): Potential technology for the control of whitefly. *PLoS One.* 11:1–13.
- Rego-Machado, C. M., Nakasu, E. Y. T., Blawid, R., Nagata, T., e Inoue-Nagata, A. K. 2019. Complete genome sequence of a new bipartite begomovirus infecting tomato in Brazil. *Arch. Virol.* 164:2873–2875.
- Reis, L. N. A., Fonseca, M. E. N., Ribeiro, S. G., Naito, F. Y. B., Boiteux, L. S., e Pereira-Carvalho, R. C. 2020. Metagenomics of neotropical single-stranded DNA viruses in tomato cultivars with and without the *Ty-1* gene. *Viruses.* 12:1–22.
- Ribeiro, S. G., Ávila, A. C., Bezerra, I. C., Fernandes, J. J., Faria, J. C., Lima, M. F., et al. 1998. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. *Plant Dis.* 82:830.
- Ribeiro, S. G., Martin, D. P., Lacorte, C., Simões, I. C., Orlandini, D. R. S., e Inoue-Nagata, A. K. 2007. Molecular and biological characterization of tomato chlorotic mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity of brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology.* 97:702–711.

- Rodrigues, C. S., Nakasu, E. Y. T., Ortiz, G. V., Pereira, J. L., Lucena-Leandro, V. dos S., Rêgo-Machado, C. de M., et al. 2021. Evidence of spread of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) mediated by internal transportation of ornamental plants in Brazil. *Neotrop. Entomol.* 1.
- Rodrigues, S., e Silva, A. F. 2018. Weeds associated with cotton crop and hosting whitefly. *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo).* 85:1–5.
- Rojas, M. R., Macedo, M. A., Maliano, M. R., Soto-Aguilar, M., Souza, J. O., Briddon, R. W., et al. 2018. World management of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 56:637–677.
- Rosario, K., Marr, C., Varsani, A., Kraberger, S., Stainton, D., Moriones, E., et al. 2016. Begomovirus-associated satellite DNA diversity captured through vector-enabled metagenomic (VEM) surveys using whiteflies (Aleyrodidae). *Viruses.* 8:1–16.
- Roshan, P., Kulshreshtha, A., Kumar, S., Purohit, R., e Hallan, V. 2018. AV2 protein of tomato leaf curl Palampur virus promotes systemic necrosis in *Nicotiana benthamiana* and interacts with host Catalase2. *Sci. Rep.* 8:1–15.
- Saito, K., Ishizuka, A., Siomi, H., e Siomi, M. C. 2005. Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in drosophila cells. *PLoS Biol.* 3:1202–1212.
- Sánchez-Campos, S., Domínguez-Huerta, G., Díaz-Martínez, L., Tomás, D. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., et al. 2018. Differential shape of geminivirus mutant spectra across cultivated and wild hosts with invariant viral consensus sequences. *Front. Plant Sci.* 9.
- Sánchez-Campos, S., Rodríguez-Negrete, E. A., Cruzado, L., Grande-Pérez, A., Bejarano, E. R., Navas-Castillo, J., et al. 2016. Tomato yellow leaf curl virus: No evidence for replication in the insect vector *Bemisia tabaci*. *Sci. Rep.* 6:1–6.
- Sánchez-Sánchez, B. J., Urbano, J. M., Comber, K., Dragu, A., Wood, W., Stramer, B., et al. 2017. *Drosophila* embryonic hemocytes produce laminins to strengthen migratory response. *Cell Rep.* 21:1461–1470.
- Sanderfoot, A. A., e Lazarowitz, S. C. 1996. Getting it together in plant virus movement: Cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends Cell Biol.* 6:353–358.
- Sani, I., Izera, S., Abdullah, S., Jalinas, J., Jamian, S., e Saad, N. 2020. A review of the biology and control of whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), with special reference to biological control using entomopathogenic fungi. *Insects.* 11:619.
- Sastry, K. S., e Zitter, T. A. 2014. Plant virus and viroid diseases in the tropics: Volume 2: Epidemiology and management.
- Saxton, R. A., e Sabatini, D. M. 2017. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell.* 168:960–976.
- Scott, J. G., Michel, K., Bartholomay, L. C., Siegfried, B. D., Hunter, W. B., Smagghe, G., et al. 2013. Towards the elements of successful insect RNAi. *J. Insect Physiol.* 59:1212–1221.
- Seal, S. E., VandenBosch, F., e Jeger, M. J. 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 25:23–46.

- Shakesby, A. J., Wallace, I. S., Isaacs, H. V., Pritchard, J., Roberts, D. M., e Douglas, A. E. 2009. A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39:1–10.
- Shamimuzzaman, M., Hasegawa, D. K., Chen, W., Simmons, A. M., Fei, Z., e Ling, K. S. 2019. Genome-wide profiling of piRNAs in the whitefly *Bemisia tabaci* reveals cluster distribution and association with begomovirus transmission. *PLoS One.* 14:1–16.
- Shelby, E. A., Moss, J. B., Andreason, S. A., Simmons, A. M., Moore, A. J., e Moore, P. J. 2020. Debugging: Strategies and considerations for efficient RNAi-mediated control of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Insects.* 11:1–12.
- Shim, J. K., Lee, G. S., Lee, S., e Lee, K. Y. 2015. Oral ingestion of heat shock protein 70 dsRNA is lethal under normal and thermal stress conditions in the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. *J. Asia. Pac. Entomol.* 18:797–800.
- Souza, T. A., Silva, J. M. F., Nagata, T., Martins, T. P., Nakasu, E. Y. T., e Inoue-Nagata, A. K. 2020. A temporal diversity analysis of brazilian begomoviruses in tomato reveals a decrease in species richness between 2003 and 2016. *Front. Plant Sci.* 11:1–13.
- Straub, V., Rafael, J. A., Chamberlain, J. S., e Campbell, K. P. 1997. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J. Cell Biol.* 139:375–385.
- Suhag, A., Yadav, H., Chaudhary, D., Subramanian, S., Jaiwal, R., e Jaiwal, P. K. 2020. Biotechnological interventions for the sustainable management of a global pest, whitefly (*Bemisia tabaci*). *Insect Sci.* :1–22.
- Sunter, G., Hartitz, M. D., Hormuzdi, S. G., Brough, C. L., e Bisaro, D. M. 1990. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology.* 179:69–77.
- Sunter, G., Sunter, J. L., e Bisaro, D. M. 2001. Plants expressing tomato golden mosaic virus AL2 or beet curly top virus L2 transgenes show enhanced susceptibility to infection by DNA and RNA viruses. *Virology.* 285:59–70.
- Tan, X., Hu, N., Zhangfan, Z., Ramirez-Romero, R., Desneux, N., Wang, S., et al. 2016. Mixed release of two parasitoids and a polyphagous ladybird as a potential strategy to control the tobacco whitefly *Bemisia tabaci*. *Sci. Rep.* 6:28245.
- Tavares, S. S., Ramos-Sobrinho, R., González-Aguilera, J., Lima, G. S. A., Assunção, I. P., e Zerbini, F. M. 2012. Futher molecular characterization of weed-associated begomoviruses in Brazil with an emphasis on *Sida* spp. *Planta Daninha.* 30:305–315.
- Thakur, N., Upadhyay, S. K., Verma, P. C., Chandrashekar, K., Tuli, R., e Singh, P. K. 2014. Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of v-ATPase a gene. *PLoS One.* 9:1–9.
- Tian, L., Zeng, Y., Xie, W., Wu, Q., Wang, S., Zhou, X., et al. 2019. Genome-wide identification and analysis of genes associated with RNA interference in *Bemisia tabaci*. *Pest Manag. Sci.* 75:3005–3014.
- Trindade, T. D., Trevisan, H., e Carvalho, A. G. de. 2019. Incidence of *Bemisia tabaci* Gennadius (Aleyrodidae, Aleyrodinae) in four Atlantic Forest fragments. *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo).* 86:1–7.

- Upadhyay, S. K., Chandrashekar, K., Thakur, N., Verma, P. C., Borgio, J. F., Singh, P. K., et al. 2011. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. *J. Biosci.* 36:153–161.
- Upadhyay, S. K., Dixit, S., Sharma, S., Singh, H., Kumar, J., Verma, P. C., et al. 2013. SiRNA machinery in whitefly (*Bemisia tabaci*). *PLoS One.* 8:1–10.
- Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J. S., e Fauquet, C. M. 2004. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 78:9487–9498.
- Varsani, A., Roumagnac, P., Fuchs, M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Idris, A., et al. 2017. Capulavirus and Grablovirus: two new genera in the family *Geminiviridae*. *Arch. Virol.* 162:1819–1831.
- Verlaan, M. G., Hutton, S. F., Ibrahim, R. M., Kormelink, R., Visser, R. G. F., Scott, J. W., et al. 2013. The tomato yellow leaf curl virus resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-Class RNA-Dependent RNA polymerases. *PLoS Genet.* 9.
- Villamor, D. E. V., Ho, T., Al Rawhni, M., Martin, R. R., e Tzanetakis, I. E. . 2019. High throughput sequencing for plant virus detection and discovery. *Phytopathology.* 109:716–725.
- Villas-Bôas, G. L., e Castelo-Branco, M. 2009. Manejo Integrado da mosca-branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) em sistema de produção integrada de tomate indústria (PITI). *Circ. Técnica - EMBRAPA.* 1923:16.
- Villas Bôas, G. L., França, F. H., De Ávila, A. C., e Bezerra, I. C. 1997. Manejo integrado da mosca-branca *Bemisia argentifolii*. *Embrapa Hortaliças-Circular Técnica* 9.
- Vogel, E., Santos, D., Mingels, L., Verdonck, T. W., e Broeck, J. Vanden. 2019. RNA interference in insects: Protecting beneficials and controlling pests. *Front. Physiol.* 10:1–21.
- Voorburg, C. M., Yan, Z., Bergua-Vidal, M., Wolters, A.-M. A., Bai, Y., e Kormelink, R. 2020. *Ty-1*, a universal resistance gene against geminiviruses that is compromised by co-replication of a betasatellite. *Mol. Plant Pathol.* 21:160–172.
- Vu, S., Melgarejo, T. A., Chen, L., Souza, J. O., Macedo, M. A., Inoue-Nagata, A. K., et al. 2015. Evidence that tomato mottle leaf curl virus from Northeastern Brazil is an indigenous New World monopartite begomovirus. *Phytopathology.* 105:143.
- Vyas, M., Raza, A., Ali, M. Y., Ashraf, M. A., Mansoor, S., Shahid, A. A., et al. 2017. Knock down of whitefly gut gene expression and mortality by orally delivered gut gene-specific dsRNAs. *PLoS One.* 12.
- Walker, G. P., Perring, T. M., e Freeman, T. P. 2010. Life History, Functional Anatomy, Feeding and Mating Behavior. In *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*, orgs. Philip A Stansly e Steven E Naranjo. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 109–160.
- Wang, X., Xu, J., Wang, Xingmin., Qiu, B., Cuthbertson, A., Du, C., et al. 2019. *Isaria fumosorosea*-based zero-valent iron nanoparticles affect the growth and survival of sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Pest Manag. Sci.* 75:2174–2181.
- Wang, Z., Dai, P., Yang, X., Ruan, C. C., Biondi, A., Desneux, N., et al. 2019. Selectivity of novel and traditional insecticides used for management of whiteflies on the parasitoid *Encarsia formosa*. *Pest Manag. Sci.* 75:2716–2724.

- Wargo, A. R., e Kurath, G. 2012. Viral fitness: Definitions, measurement, and current insights. *Curr. Opin. Virol.* 2:538–545.
- Whitefly genome database. 2021. Available at: www.whiteflygenomics.org.
- Whitehorn, P. R., Connor, S., Wackers, F. L., e Goulson, D. 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* (80). 336:351–352.
- Xu, X., Qian, Y., Wang, Y., Li, Z., Zhou, X., e Simon, A. E. 2019. Iterons Homologous to Helper Geminiviruses Are Essential for Efficient Replication of Betasatellites. *J. Virol.* 93:e01532-18.
- Xu, X., Zhang, Q., Hong, J., Li, Z., Zhang, X., e Zhou, X. 2019. Cryo-EM structure of a begomovirus geminate particle. *Int. J. Mol. Sci.* 20:1–10.
- Yan, S., Qian, J., Cai, C., Ma, Z., Li, J., Yin, M., et al. 2020. Spray method application of transdermal dsRNA delivery system for efficient gene silencing and pest control on soybean aphid *Aphis glycines*. *J. Pest Sci.* (2004). 93:449–459.
- Yan, Z., Wolters, A. M. A., Navas-Castillo, J., e Bai, Y. 2021. The global dimension of tomato yellow leaf curl disease: current status and breeding perspectives. *Microorganisms.* 9:1–19.
- Yang, X., Xie, W., Li, R. M., Zhou, X. M., Wang, S. L., Wu, Q. J., et al. 2017. RNA interference-mediated knockdown of the hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase gene decreases thiamethoxam resistance in adults of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Sci. Rep.* 7:1–10.
- Yao, F.-L., Zheng, Y., Huang, X.-Y., Ding, X.-L., Zhao, J.-W., Desneux, N., et al. 2017. Dynamics of *Bemisia tabaci* biotypes and insecticide resistance in Fujian province in China during 2005–2014. *Sci. Rep.* 7:40803.
- Zerbini, F. M., Briddon, R. W., Idris, A., Martin, D. P., Moriones, E., Navas-Castillo, J., et al. 2017. ICTV virus taxonomy profile: *Geminiviridae*. *J. Gen. Virol.* 98:131–133.
- Zhang, J., Dong, J., Xu, Y., e Wu, J. 2012. V2 protein encoded by tomato yellow leaf curl china virus is an RNA silencing suppressor. *Virus Res.* 163:51–58.
- Zhou, R., Czech, B., Brennecke, J., Sachidanandam, R., Wohlschlegel, J. A., Perrimon, N., et al. 2009. Processing of *Drosophila* endo-siRNAs depends on a specific Loquacious isoform. *Rna.* 15:1886–1895.
- Zhou, X. 2013. Advances in understanding begomovirus satellites. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:357–381.

CAPÍTULO 2

Tomato begomovirus MoLDi, um novo begomovirus bipartido que infecta tomateiro no Brasil

INTRODUÇÃO

A cultura do tomateiro é considerada uma das mais importantes no agronegócio de hortaliças, mas é altamente afetada por doenças que limitam sua produção (Brahimi et al. 2017; Liu e Wang 2020). As doenças de etiologia viral estão entre as mais preocupantes devido à alta incidência, severidade dos sintomas e à inexistência de produtos que possam reestabelecer a planta após a infecção (Inoue-Nagata 2013; Sastry e Zitter 2014).

Os vírus do gênero *Begomovirus* emergiram como importantes patógenos de plantas em regiões tropicais e subtropicais do mundo e são considerados o grupo de vírus mais prejudicial para a produção de tomate no Brasil. Os sintomas em plantas infectadas incluem nanismo, distorção foliar, mosaico ou mosqueado, clorose das nervuras ou internerval e amarelecimento (Inoue-Nagata et al. 2016; Bergamin-Filho et al. 2020).

É bem conhecido que os begomovírus têm alta taxa de variabilidade genética tanto dentro quanto entre as espécies (Padidam et al. 1999; Duffy e Holmes 2009). Os mecanismos de mutação, recombinação e pseudo-recombinação ocorrem com frequência, sendo as taxas de substituição tão altas quanto aquelas de vírus com genoma de RNA, facilitando o surgimento de novas variantes (Padidam et al. 1999; Seal et al. 2006; Lima et al. 2017; Claverie et al. 2018). Desta maneira, os geminivírus em geral formam um conjunto de genomas mutantes e recombinantes, resultando em rápida evolução adaptativa e surgimento de novas variantes e espécies que podem infectar diferentes hospedeiras, causar novas doenças ou superar genes de resistência (Domingo et al. 2012; Lima et al. 2017; Sánchez-Campos et al. 2018).

A transmissão das begomoviroses ocorre através do inseto-vetor, a mosca-branca, de forma circulativa e não-propagativa (Morin et al. 1999). O vetor adquire as partículas virais durante o processo de alimentação e as transfere para outras plantas após um período de latência, que pode variar de 4 a 21 h (Costa 1998).

A partir da análise do gene mitocondrial *citocromo c oxidase I* (mtCOI), as moscas-brancas *B. tabaci* são classificadas em um complexo com pelo menos 44 espécies crípticas (Kanakala e Ghanim 2019). A eficiência de transmissão dos begomovírus varia de acordo com a espécie do vírus e da mosca-branca (Macedo et al. 2015; Fiallo-Olivé et al. 2020).

No Brasil, já foram reportadas as espécies *B. tabaci* NW1 e NW2 (biótipo A), MEAM1 (biótipo B) e MED (biótipo Q; Bondar 1928; Rodrigues et al. 2021). Até a década de 1980, apenas NW1 e NW2 estavam presentes; a entrada e disseminação da espécie *B. tabaci* MEAM1 ocorreu na década de 1990 e foi acompanhada por um aumento acentuado na detecção e descrição de espécies de begomovírus ao longo dos anos (Lourenco e Nagai

1994; Calegario et al. 2007; Fernandes et al. 2006; Ribeiro et al. 2007; Firmino et al. 2009; Marubayashi et al. 2013; Barbosa et al. 2014).

A espécie *B. tabaci* MEAM1 apresenta maior adaptabilidade em tomateiro, ampla gama de hospedeiras e alta eficiência de transmissão dos begomovírus quando comparada às espécies que predominavam anteriormente no Brasil, do grupo NW (Lourenco e Nagai 1994; Ribeiro et al. 1998; Gilbertson et al. 2015). O aumento da incidência de begomovirose que acompanhou a entrada de MEAM1 causou prejuízos drásticos aos produtores de tomate (Gilbertson et al. 2015).

Recentemente, ocorreu a introdução de MED e sua disseminação está sendo observada a partir dos relatos que vêm ocorrendo em diversos estados do Brasil (da Fonseca Barbosa et al. 2015; de Moraes et al. 2017, 2018; Borges et al. 2019; Bello et al. 2020; Rodrigues et al. 2021). A disseminação de MED deixou produtores e pesquisadores alertas devido à sua alta resistência aos inseticidas neonicotinoides, sua adaptação a ambientes fechados como estufas e casas-de-vegetação e sua alta eficiência de transmissão de tomato yellow leaf curl virus (Horowitz et al. 2005; Li et al. 2010; Horowitz e Ishaaya 2014).

Devido à alta variabilidade genética, o número de espécies no gênero *Begomovirus* é alto, com mais de 400 espécies descritas (ICTV 2021). No tomateiro, a disseminação de moscas-brancas que transmitem os begomovírus com alta eficiência (MEAM1 e MED) resultou em um aumento tão acentuado na diversidade que atualmente o tomateiro é infectado pelo maior número de espécies do gênero *Begomovirus* do que qualquer outra cultura (Rojas et al. 2018; Liu e Wang 2020). No Brasil, são pelo menos 27 espécies de begomovírus relatados nos campos de produção (Tabela 1).

Adicionalmente, a maior acessibilidade a técnicas de sequenciamento em larga escala intensificou o avanço dos estudos relacionados à diversidade de espécies de begomovírus na cultura de tomate, a grande quantidade de informações facilitou a descoberta e identificação de novas espécies de forma mais rápida e precisa (Villamor et al. 2019).

O surgimento e evolução de novas espécies de begomovírus nas lavouras de tomateiro, tanto monopartidas quanto bipartidas, têm sido continuamente observados. Neste estudo, descrevemos uma nova espécie de begomovírus bipartido descoberta em lavouras de tomate no estado de Goiás, Brasil.

METODOLOGIA

Coleta e processamento da amostra

A amostra de tomateiro foi coletada em abril de 2020, durante uma visita a um campo de cultivo de tomateiro para processamento localizado em Luziânia, no estado de Goiás, Brasil (16°18'50.8" S, 47°42'35.2" O). A planta, da cultivar AP533, que apresentava sintomas fortes de distorção foliar, manchas cloróticas, clareamento de nervuras, mosqueado e mosaico (Figura 4), foi coletada e nomeada MoLDi. O DNA total foi extraído usando o método CTAB (Doyle e Doyle 1990) e o DNA circular viral foi amplificado por *rolling-circle amplification* (RCA, New England Biolabs – NEB) e digerido com a enzima de restrição MspI (NEB).



Figura 4. Planta de tomateiro (cv. AP533) coletada em Luziânia, Goiás, Brasil, apresentando sintomas de mosqueado, distorção foliar, pontos cloróticos, clareamento de nervuras e enrolamento foliar.

Sequenciamento com a tecnologia Nanopore

Para o sequenciamento completo do genoma desse potencial begomovírus, alíquotas do produto do RCA foram individualmente e parcialmente digeridas com as enzimas de restrição PstI, BglII, NcoI e EcoRI (NEB). Cada digestão foi purificada com Invisorb Fragment CleanUp Kit (Stratec Molecular), conforme as orientações do fabricante, e os purificados foram agrupados para formar amostra única para sequenciamento utilizando Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109 – Oxford Nanopore Technologies, Inglaterra). O DNA digerido foi tratado com NEBNext® Ultra™ II End Repair/dA-Tailing Module (NEB), ligado a adaptadores AMX com NEB Blunt/TA ligation Master Mix (NEB). A biblioteca de DNAs ligados a adaptadores foi então purificada com AMPure beads (Beckman Coulter, Estados

Unidos) e carregado em um Flongle flow cell (FLO-FLG106 – Oxford Nanopore Technologies) em um sequenciador MinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies).

Os arquivos brutos FAST5 foram traduzidos em bases em modo de alta precisão utilizando o Guppy (versão 4.4.2). Os esboços dos genomas foram gerados com TideHunter (Gao et al. 2019) e melhorados com Medaka v1.2.3 (Oxford Nanopore Technologies). Os contigs obtidos foram transferidos para programa Geneious 8.0.5 (Biomatters, Ltd.) e analisados por algoritmo BLAST.

Análises das características moleculares e filogenéticas do novo vírus

As sequências obtidas do DNA-A e do DNA-B foram avaliadas no Open Reading Frame Finder tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) com o objetivo de identificar open reading frames (ORFs) presentes nos componentes.

Uma análise BLASTn foi realizada e as sequências das 12 espécies virais mais próximas do DNA-A e do DNA-B foram selecionadas separadamente e alinhadas com MUSCLE no programa MEGA X (Kumar et al. 2018). Os alinhamentos foram utilizados em análises de identidade par a par utilizando Sequence Demarcation Tool (SDT – Muhire et al. 2014) e em análises filogenéticas no programa MEGA X, para construção de árvores pelo método da máxima-verossimilhança.

Obtenção dos clones do DNA-A e do DNA-B

Para a clonagem do DNA-A, o produto do RCA da amostra MoLDi foi digerido parcialmente com enzima de digestão EcoRI (NEB). O fragmento com ~5,2 kb, correspondente ao dímero do vírus, foi cortado do gel de agarose a 1% e purificado com Invisorb Fragment CleanUp Kit (Stratec Molecular). A ligação do fragmento purificado no vetor binário pCAMBIA0380 (Cambia Laboratory, Austrália) foi realizada com T4 DNA Ligase (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. A ligação foi dialisada em membrana de diálise (Sigma Aldrich) e transformada em *Escherichia coli* cepa DH10 β por choque térmico. O DNA plasmidial dos clones foi extraído de acordo com Sambrook et al. (1989) e digerido com EcoRI para confirmar a presença do inserto.

Para a clonagem do DNA-B, o produto do RCA da amostra MoLDi foi digerido com enzima de digestão BglIII (Pharmacia Biotech). O fragmento de aproximadamente 2,6 kb foi cortado do gel de agarose a 1% e purificado com Invisorb Fragment CleanUp Kit (Stratec Molecular). Uma reação contendo 6,8 μ L do fragmento purificado, 0,4 μ L de dATP (2,5 mM), 1 μ L de tampão da *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 1 μ L de *Taq* DNA Polimerase

(Invitrogen) e 0,8 µL de MgCl₂ (50 mM) foi ajustada para o volume de 10 µL e incubada a 70 °C por uma hora para adenilação das extremidades do fragmento. A ligação do fragmento purificado e adenilado no vetor pGEM-T easy (Promega) foi realizada com T4 DNA Ligase (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. A ligação foi transformada em *Escherichia coli* cepa DH10β por choque térmico. Os clones tiveram seu DNA plasmidial extraído de acordo com o protocolo de Sambrook et al. (1989).

O DNA-plasmidial de dois clones diméricos do DNA-A e um clone do DNAB foram sequenciados pelo método de Sanger na Macrogen (Seoul, Coréia do Sul). Os clones do DNA-A foram sequenciados com os iniciadores Cam380-6500F, Cam380-90Re, 1022F, 2344R e 1565F. O clone do DNA-B foi sequenciado com os iniciadores SP6, T7 e 997F (Tabela 2).

Tabela 2. Iniciadores utilizados para o sequenciamento por Sanger do produto do RCA, e dos clones do DNA-A e do DNA-B de tomate begomovirus MoLDi (ToMoLDiV).

Nome	Sequência (5'-3')
Cam380-6500F	AGCTGTTGGCTGGCTGGTG
Cam380-90R	GGCAACAGGATTCAATCTT
1022F	TTCAAAATGTCTAAGCGGGCTG
2344R	GCAAGAGTGGGCTGATGATTAC
1565F	AGAAGCTGTCACTGAACTCGTC
997F	AACGCCTGTTAGAAAACGATGTC

Para a preparação de um clone infeccioso, o plasmídeo C16A, composto pelo dímero do DNA-A, foi transformado em *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101) por eletroporação em um eletroporador Micropulser (Bio-Rad).

Agroinoculação de plantas com clone C16A

Alguns ensaios iniciais de infectividade foram conduzidos apenas com o clone do DNA-A, a partir de agroinoculação da construção dimérica em diversas espécies de plantas.

Para agroinoculação, o clone foi cultivado em 25 mL de LB líquido contendo 20 µM de acetoseringona, 100 µM de estreptomicina e 50 µM de canamicina sob agitação, a 28 °C, por 16 h. No dia seguinte, a cultura foi centrifugada (5.000 x g por 15 min.), ressuspensa em tampão de agroinoculação (10 mM de MgCl₂, 10 mM MES-K, pH 5,6 e 100 µM de acetoseringona) e incubada à temperatura ambiente, por aproximadamente 3 h. A agroinoculação foi realizada na parte abaxial das folhas com o auxílio de seringa de 1 mL.

Foram realizados três ensaios, no primeiro (agroinoculação 1) foram inoculadas *Solanum lycopersicum* (tomate) cv. Santa Clara, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, *Nicotiana rustica*, *Datura stramonium*, *Datura metel*, *Nicandra physaloides*, *Chenopodium amaranticolor*, *Physalis pubescens* e *Capsicum chinense* PI159236.

Na agroinoculação 2 foram inoculadas plantas de *S. lycopersicum* (tomate) cv. Heinz 9553, *N. rustica*, *D. stramonium*, *N. physaloides*, *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *P. pubescens*, *C. annuum* cv. Ikeda, *C. chinense* PI159236 e *N. tabacum* cv. Xanthi e Turkish.

Na agroinoculação 3, foram inoculadas *S. lycopersicum* (tomate) cv. Santa Clara, Heinz 9553, Lanai e Sena, *D. metel*, *N. physaloides* e *C. annuum* cv. Ikeda.

Uma cultura de *A. tumefaciens* com vetor pCAMBIA0380 vazio foi agroinoculada em plantas como controle negativo. Um clone infeccioso de tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV) em pCAMBIA0380 (Souza et al., não publicado), já usado anteriormente, foi agroinoculado como controle positivo.

As plantas agroinoculadas foram mantidas em uma câmara de crescimento livre de moscas-brancas, com o fotoperíodo de 16h:8h e temperaturas entre 26 e 30° C. Após 12 dias, as folhas apicais foram coletadas e o DNA total foi extraído para testes de detecção por PCR com os primers degenerados PAR1c496 e PAL1v1978 (Rojas et al. 1993), que amplificam um fragmento de ~1.1 kb do DNA-A. Os DNAs das amostras positivas por PCR foram amplificados por RCA e digeridos com *MspI* para análise do perfil de digestão em gel de agarose a 1%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo dos anos, o complexo de espécies de begomovírus nas lavouras de tomate vem sendo monitorado. Novas espécies estão sendo detectadas frequentemente e sendo descritas (Souza et al. 2020). A alta variabilidade genética dos begomovírus e a disseminação de vetores que os transmitem com alta eficiência favorece o surgimento de novas espécies. Neste trabalho, uma visita a um campo de cultivo em Luziânia e a coleta de uma planta de tomate sintomática resultou na descoberta e descrição da nova espécie tomato begomovirus MoLDi (ToMoLDiV).

Na planta de tomateiro (cv. AP533) coletada em Luziânia, um DNA circular foi detectado a partir de sua amplificação por RCA e digestão com enzima de restrição. O perfil de restrição da amostra apresentou quatro fragmentos de ~1.4, 0,9, 0,7 e 0,5 kb, totalizando ~3.5 kb, em gel de agarose a 1% (Figura 5), indicando uma possível infecção por begomovírus com genoma bipartido.

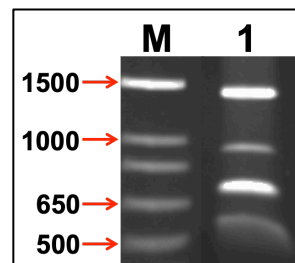


Figura 5. Perfil obtido a partir da digestão do produto do RCA da amostra MoLDi com enzima de restrição MspI. M=marcador 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen); 1=amostra MoLDi.

A partir do sequenciamento com a tecnologia Nanopore, contigs com alta identidade de nucleotídeos com DNA-A e DNA-B de begomovírus foram detectados e as sequências do genoma completo de um potencial novo begomovírus foram identificadas. A confirmação das sequências foi realizada a partir do sequenciamento pela técnica de Sanger, onde foram obtidas mais três sequências: duas provenientes do sequenciamento do produto do RCA da amostra MoLDi e do sequenciamento do clone C16A (DNA-A), e uma proveniente do sequenciamento do clone BG14B (DNA-B).

A sequência do DNA-A obtida em sequenciamento por Nanopore e as sequências do produto de RCA e do clone C16A, apresentaram alta identidade entre elas com apenas 0-2 nucleotídeos diferentes. A sequência do clone C16A (depositada no GenBank no acesso MW561191) tem 2.596 nucleotídeos e foi utilizada nas análises posteriores. A sequência do

DNA-B proveniente do sequenciamento por Nanopore e do clone BG14B, sequenciado pelo método Sanger, apresentou sequência idêntica com 2.578 nucleotídeos (GenBank MW650837).

A análise da identidade de nucleotídeos par a par feita no SDT (Figura 6) mostrou que o genoma completo do DNA-A tem maior identidade com tomate golden leaf distortion virus (81,65%; ToGLDV; acesso HM357456), enquanto o DNA-B compartilha a maior identidade, de 82,57%, com tomate interveinal chlorosis virus-2 (ToICV2; acesso MK087039). Logo, visto que o critério de demarcação de espécies no gênero *Begomovirus* é de 91% de identidade do DNA-A, concluímos que este isolado é um novo membro do gênero, e o vírus foi tentativamente nomeado como tomate begomovirus MoLDi, com o acrônimo ToMoLDiV.

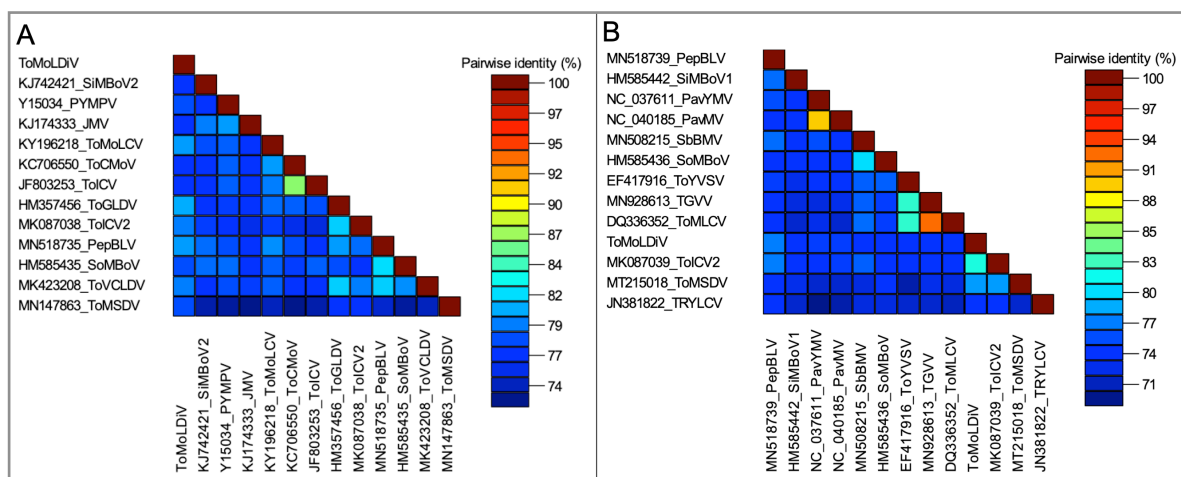


Figura 6. Matrizes de identidade par a par dos genomas do DNA-A (A) e DNA-B (B) de ToMoLDiV com os 12 vírus mais próximos (identificados por análise BLASTn) inferidas usando a ferramenta de demarcação de espécies SDT. Os nomes completos dos vírus são encontrados em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae/479/member-species-begomovirus.

A organização genômica observada é essencialmente idêntica a de um begomovírus bipartido do novo mundo, com o DNA-A contendo a ORF da CP no sentido viral e as ORFs da Rep, TrAP, REn e AC4 no sentido anti-viral, e o DNA-B contendo a ORF da NSP no sentido viral, e da MP no sentido anti-viral.

A sequência conservada do nonanucleotídeo geminiviral (5'-TAATATTAC-3') foi detectada em ambos os componentes, na estrutura estável denominada *stem-loop*, que marca o sítio de clivagem do DNA para o início da replicação. Além disso, os prováveis sítios de ligação da Rep (iterons) que ficam próximos ao TATA box, foram identificados em ambos os

segmentos com as sequências TGTA e TGTAC, sugerindo fortemente que os dois componentes pertencem à mesma espécie viral.

Esses possíveis iterons foram observados em dois isolados de tomate mottle leaf curl virus, enquanto outros isolados de begomovírus que são mais próximos de ToMoLDiV apresentam outras sequências (Figura 7). O domínio relacionado ao iteron, FQLN, estava presente na sequência de aminoácidos da proteína Rep e são idênticos ao observado em isolados de ToMoLCV (AY049217, AY049215).

ToMoLDiV DNA-A	GGTACAATTT AAAATGTAA-CTTGTACC-CA-TTTATAGA
ToMoLDiV DNA-B	GGTACAATTT GAAATGTAA-CTTGTACC-CA-TTTATAGA
ToMoLCV_AY049217	GGTACAAGAA AAAATGTAA-CATGTACCAACA--TATAGA
ToMoLCV_AY049215	GGTACAAGAA AAAATGTAA-CATGTACCAA--TATATAGA
ToGLDV_HM357456	TACCCCGATT AATCGGTGTAAAGGGGTACAA-TATATACT
PepBLV_MN518735	TCTCCAATTG GAATTGGAG-ACTGGAGTACAATTTATACA
ToVCLDeV_MK423208	TCTCCAATTG GAATTGGAG-ACTGGAGTACAATATATACA
ToMoLCV_KY196218	GGTACCGGTT AATCGGTAGAACGGTACCCCAATATATACT
ToICV2_MK087039	GCTACCGATT AAACGGTAGT-TGGTAG-CTCTTATATAGT

Figura 7. Alinhamento da região contendo TATA box (sublinhado) no DNA-A e DNA-B de ToMoLDiV (negrito), e vírus próximos com o número de acesso: tomate mottle leaf curl virus (ToMoLCV), tomate golden leaf distortion (ToGLDV), pepper blistering leaf virus (PepBLV), tomate vein clearing leaf deformation virus (ToVCLDeV) e tomate interveinal chlorosis-2 (ToICV2). As possíveis sequências dos iterons estão agrupadas e realçadas.

Nas análises filogenéticas com o método da máxima-verossimilhança, as árvores filogenéticas foram geradas com 3.000 replicações de bootstrap, usando o modelo general time-reversible para o DNA-A e o modelo Hasegawa-Kishino-Yano para o DNA-B. Apesar da sequência do DNA-A ser mais próxima de ToGLDV, na árvore filogenética ela agrupou-se com tomate mosaic severe dwarf virus (ToMSDV; acesso MN147863; Figura 8a). Já o DNA-B agrupou-se com tomate interveinal chlorosis virus 2 (ToICV2; acesso MK087039), no mesmo clado com ToMSDV (acesso MT215018; Figura 8b).

Os resultados indicaram que o ToMoLDiV está intimamente relacionado e mais próximo aos begomovírus ToGLDV, ToMSDV e ToICV2. Sendo que o último também foi descrito a partir de uma amostra coletada na mesma região, em 2015 (Rego-Machado et al. 2019).

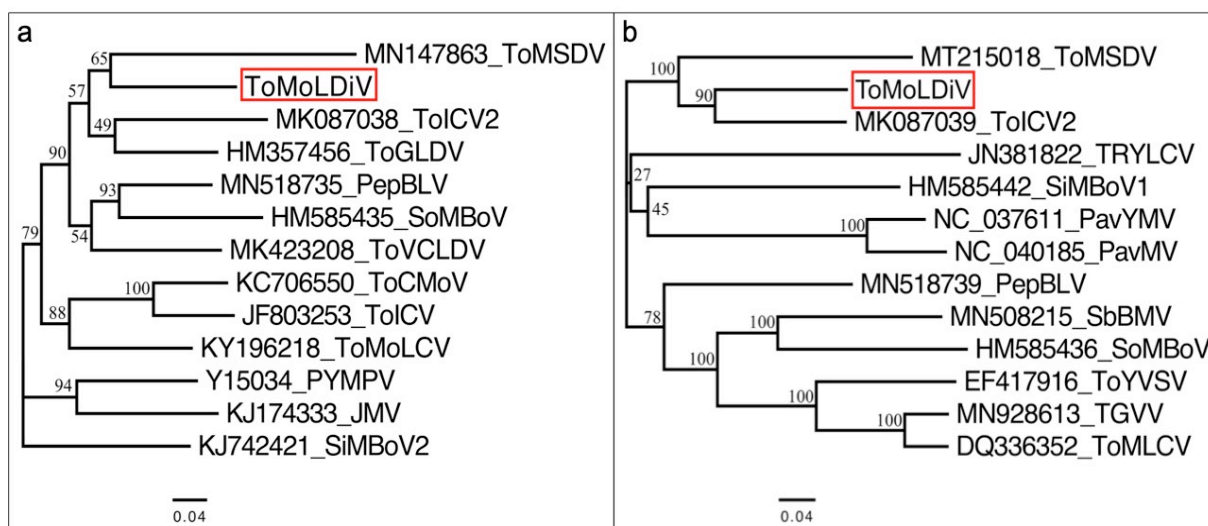


Figura 8. Árvores filogenéticas não enraizadas de ToMoLDiV e os begomovírus mais próximos geradas com o método da máxima verossimilhança (3.000 réplicas), realizado em Mega X (Kumar et al. 2018) usando os modelos general time-reversible (a, DNA-A) e Hasegawa-Kishino-Yano (b, DNA-B). Os valores de bootstrap estão incluídos e os nomes completos dos vírus são encontrados em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae/479/member-species-begomovirus. Barra=substituições por sítio.

O clone dimérico do DNA-A, C16A, foi inoculado em 103 plantas de 11 espécies diferentes. Nenhuma planta apresentou sintomas claros de infecção viral, no entanto, a extração do DNA e a PCR com os iniciadores degenerados PAR1c496 e PAL1v1978 confirmaram que o genoma viral movimentou-se sistemicamente em 12 das 103 plantas que foram inoculadas, sendo uma de *S. lycopersicum* cv. Santa Clara, três de *S. lycopersicum* cv. Lanai, três de *N. tabacum* cv. Samsun, quatro de *N. rustica* e uma *N. physaloides* (Tabela 3).

A digestão com a enzima de restrição MspI do produto de RCA das amostras positivas para PCR resultou em três fragmentos de DNA em gel de agarose a 1%, com tamanhos de ~ 1,5 e 0,7 kb. A soma dos fragmentos observados é de ~ 2,6 kb, correspondente ao tamanho aproximado do DNA-A de ToMoLDiV. Isso sugere que o DNA-A pode ser infectivo para algumas plantas, apesar de não induzir sintomas.

Na localidade onde a amostra foi coletada, o tomateiro para processamento é continuamente plantado, pelo menos uma vez por ano. Além do ToMoLDiV e do ToICV2, observa-se na área também a presença do ToSRV (dados não mostrados), o begomovírus mais amplamente disperso no Brasil (Mituti et al. 2019; Souza et al. 2020). Esses dados sugerem a rica diversidade de espécies presentes nessa região agrícola, o que potencialmente promove a emergência de novos begomovírus.

Tabela 3. Detecção do DNA-A do begomovírus por PCR com iniciadores degenerados, 12 dias após a inoculação do clone dimérico C16A em plantas de 11 espécies.

Espécie	Agroinoculação			Total
	1	2	3	
<i>C. amaranticolor</i>	0/3	0/4	NA	0/7
<i>C. annuum</i> cv. Ikeda	NA	0/4	0/4	0/8
<i>C. chinense</i> cv. PI159236	0/3	0/4	NA	0/7
<i>C. quinoa</i>	NA	0/4	NA	0/4
<i>D. metel</i>	0/3	NA	0/4	0/7
<i>D. stramonium</i>	0/3	0/4	NA	0/7
<i>N. physaloides</i>	1/3	0/4	0/4	1/11
<i>N. rustica</i>	3/3	1/4	NA	4/7
<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	3/3	NA	NA	3/3
<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi	NA	0/4	NA	0/4
<i>N. tabacum</i> cv. Turkish	NA	0/4	NA	0/4
<i>P. pubescens</i>	0/3	0/3	NA	0/6
<i>S. lycopersicum</i> cv. Heinz 9553	NA	0/3	0/4	0/7
<i>S. lycopersicum</i> cv. Lanai	NA	NA	3/7	3/7
<i>S. lycopersicum</i> cv. Santa Clara	1/6	NA	0/4	1/10
<i>S. lycopersicum</i> cv. Sena	NA	NA	0/4	0/4
Total	12/103			

O isolado de ToMoLDiV foi encontrado em uma cultivar suscetível a begomovirose (AP533), logo, não é conhecido se infecta ou causa sintomas em cultivares com genes de resistência a begomovírus. A partir dos experimentos de agroinoculação do clone dimérico do DNA-A, não foi possível observar sintomas claros, apesar de o genoma viral ter sido encontrado em algumas plantas. O clone dimérico do DNA-B é necessário para que os postulados de Koch sejam cumpridos, e sua clonagem está em andamento para a realização da caracterização biológica.

Na cultura do tomate, têm sido observadas mudanças significativas na composição de espécies de begomovírus. Independente das causas dessas mudanças, o constante monitoramento das espécies conhecidas e a caracterização das espécies novas nas lavouras é muito importante. As novas espécies que emergem podem apresentar resistência aos genes utilizados atualmente, podendo assim causar perdas drásticas. Pensando nisso, os levantamentos são essenciais para ajudar a desenvolver e manter cultivares resistentes duráveis e eficientes.

Parte desse capítulo foi publicada na revista Archives of Virology, o texto completo da publicação nomeada “Nanopore sequencing of tomato mottle leaf distortion virus, a new bipartite begomovirus infecting tomato in Brazil” encontra-se no anexo I.

CONCLUSÕES

Foi descoberta uma nova espécie de begomovírus com genoma bipartido infectando um tomateiro da cultivar suscetível AP533 em lavoura de Luziânia, no estado de Goiás, e o nome tomato begomovirus MoLDi (ToMoLDiV) foi proposto.

As análises da amostra MoLDi confirmam a rica diversidade de espécies de begomovírus que foi observada também em outras amostras provenientes da mesma região produtora, onde já foi descrita a espécie ToICV2, intimamente relacionada ao ToMoLDiV.

O DNA-A de ToMoLDiV aparentemente é infectivo, porém não induziu sintomas nas espécies de plantas avaliadas, após a agroinoculação do clone C16A.

É muito importante o monitoramento das espécies de begomovírus na região produtora de Luziânia-GO, visto que o tomateiro para processamento é plantado todos os anos e os trabalhos anteriores já indicaram alta diversidade e frequência no surgimento de novas espécies.

REFERÊNCIAS

- Barbosa, L. da F., Marubayashi, J. M., De Marchi, B. R., Yuki, V. A., Pavan, M. A., Moriones, E., et al. 2014. Indigenous american species of the *Bemisia tabaci* complex are still widespread in the Americas. *Pest Manag. Sci.* 70:1440–1445.
- Bello, V. H., Watanabe, L. F. M., Fusco, L. M. H., De Marchi, B. R., Da Silva, F. B., Gorayeb, E. S., et al. 2020. Outbreaks of *Bemisia tabaci* Mediterranean species in vegetable crops in São Paulo and Paraná States, Brazil. *Bull. Entomol. Res.* 110:487–496.
- Bergamin-Filho, A., Macedo, M. A., Favara, G. M., Bampi, D., Oliveira, de F. F., e Rezende, J. A. M. 2020. amplifier hosts may play an essential role in tomato begomovirus epidemics in Brazil. *Front. Plant Sci.* 11:1–6.
- Bondar, G. 1928. Aleyrodídeos do Brasil. In Boletim do laboratório de patologia vegetal do estado da Bahia, Bahia, p. 1–37.
- Borges, R., Fontes, M., Macedo, M., Lima, M., Boiteux, L., e Fonseca, M. 2019. First report of tomato chlorosis virus infecting *Tectona grandis* associated with infestation of *Bemisia tabaci* Mediterranean in Central Brazil. *Plant Dis.* 103:2704.
- Brahimi, M., Boukhalifa, K., e Moussaoui, A. 2017. Deep learning for tomato diseases: classification and symptoms visualization. *Appl. Artif. Intell.* 31:299–315.
- Calegario, R. F., Ferreira, S. D. S., De Andrade, E. C., e Zerbini, F. M. 2007. Characterization of tomato yellow spot virus, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 42:1335–1343.
- Claverie, S., Bernardo, P., Kraberger, S., Hartnady, P., Lefeuvre, P., Lett, J. M., et al. 2018. From spatial metagenomics to molecular characterization of plant viruses: a geminivirus case study. 1^a ed Elsevier Inc.
- Costa, C. L. 1998. Vetores de vírus de plantas - insetos. *Revisão Anu. Patol. Plantas.* 6:103–171.
- da Fonseca Barbosa, L., Yuki, V. A., Marubayashi, J. M., De Marchi, B. R., Perini, F. L., Pavan, M. A., et al. 2015. First report of *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. *Pest Manag. Sci.* 71:501–504.
- de Moraes, L. A., Marubayashi, J. M., Yuki, V. A., Ghanim, M., Bello, V. H., De Marchi, B. R., et al. 2017. New invasion of *Bemisia tabaci* Mediterranean species in Brazil associated to ornamental plants. *Phytoparasitica.* 45:517–525.
- Domingo, E., Sheldon, J., e Perales, C. 2012. Viral quasispecies evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76:159–216.
- Doyle, J. J., e Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus (Madison).* 12:39–40.
- Duffy, S., e Holmes, E. C. 2009. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *J. Gen. Virol.* 90:1539–1547.

- Fernandes, J. J., Carvalho, M. G., Andrade, E. C., Brommonschenkel, S. H., Fontes, E. P. B., e Zerbini, F. M. 2006. Biological and molecular properties of tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathol.* 55:513–522.
- Fiallo-Olivé, E., Pan, L. L., Liu, S. S., e Navas-Castillo, J. 2020. Transmission of begomoviruses and other whitefly-borne viruses: dependence on the vector species. *Phytopathology.* 110:10–17.
- Firmino, A. C., Yuki, V. A., Moreira, A. G., e Rezende, J. A. M. 2009. Tomato yellow vein streak virus: Interação com a *Bemisia tabaci* biótipo B e gama de hospedeiros. *Sci. Agric.* 66:793–799.
- Gao, Y., Liu, B., Wang, Y., e Xing, Y. 2019. TideHunter: Efficient and sensitive tandem repeat detection from noisy long-reads using seed-and-chain. *Bioinformatics.* 35:i200–i207.
- Gilbertson, R. L., Batuman, O., Webster, C. G., e Adkins, S. 2015. Role of the Insect Supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the Emergence and Global Spread of Plant Viruses. *Annu. Rev. Virol.* 2:67–93.
- Horowitz, A. R., e Ishaaya, I. 2014. Dynamics of biotypes B and Q of the whitefly *Bemisia tabaci* and its impact on insecticide resistance. *Pest Manag. Sci.* 70:1568–1572.
- Horowitz, A. R., Kontsedalov, S., Khasdan, V., e Ishaaya, I. 2005. Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 58:216–225.
- ICTV. 2021. Int. Comm. Taxon. Viruses.
- Inoue-Nagata, A. K. 2013. Doenças viróticas. In *Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia*, Lavras-MG: Editora Universitária de Lavras, p. 329–354.
- Inoue-Nagata, A. K., Carvalho, C. M., Zerbini, F. M., Rezende, J. A. M., Krause-Sakate, R., e Nagata, T. 2016. Vírus transmitidos por moscas-brancas no Brasil: vetores, principais doenças e manejo. *Revisão Annu. Patol. Plantas.* 24:7–29.
- Inoue-nagata, A. K., Lima, M. F., e Gilbertson, R. L. 2016. A review of geminivirus (begomovirus) diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Hortic. Bras.* 34:8–18.
- Kanakala, S., e Ghanim, M. 2019. Global genetic diversity and geographical distribution of *Bemisia tabaci* and its bacterial endosymbionts. *PLoS One.* 14.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., e Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35:1547–1549.
- Li, M., Hu, J., Xu, F. C., e Liu, S. S. 2010. Transmission of tomato yellow leaf curl virus by two invasive biotypes and a Chinese indigenous biotype of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Int. J. Pest Manag.* 56:275–280.
- Lima, A. T. M., Silva, J. C. F., Silva, F. N., Castillo-Urquiza, G. P., Silva, F. F., Seah, Y. M., et al. 2017. The diversification of begomovirus populations is predominantly driven by mutational dynamics. *Virus Evol.* 3:1–14.
- Liu, J., e Wang, X. 2020. Tomato diseases and pests detection based on improved yolo v3 convolutional neural network. *Front. Plant Sci.* 11:1–12.

- Lourencao, A. L., e Nagai, H. 1994. Outbreaks of *Bemisia tabaci* in Sao Paulo State, Brazil. *Bragantia*. 53:53–59.
- Macedo, M. A., Michereff Filho, M., Navas-Castillo, J., e Inoue-Nagata, A. K. 2015. Host range and whitefly transmission efficiency of tomato severe rugose virus and Tomato golden vein virus in tomato plants. *Trop. Plant Pathol.* 40:405–409.
- Marubayashi, J. M., Yuki, V. A., Rocha, K. C. G., Mituti, T., Pelegrinotti, F. M., Ferreira, F. Z., et al. 2013. At least two indigenous species of the *Bemisia tabaci* complex are present in Brazil. *J. Appl. Entomol.* 137:113–121.
- Mituti, T., Moura, M. F., Macedo, M. A., Silva, T. N. Z., Pinto, L. R., Costa, H., et al. 2019. Survey of begomoviruses and the crinivirus, tomato chlorosis virus, in solanaceous in Southeast/Midwest of Brazil. *Trop. Plant Pathol.* 44:468–472.
- Morin, S., Ghanim, M., Zeidan, M., Czosnek, H., Verbeek, M., e Van Den Heuvel, J. F. J. M. 1999. A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology*. 256:75–84.
- Muhire, B. M., Varsani, A., e Martin, D. P. 2014. SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS One*. 9:1–8.
- NCBI. 2021. National Center for Biotechnology Information. GenBank. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Padidam, M., Sawyer, S., e Fauquet, C. M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*. 265:218–225.
- Rego-Machado, C. M., Nakasu, E. Y. T., Blawid, R., Nagata, T., e Inoue-Nagata, A. K. 2019. Complete genome sequence of a new bipartite begomovirus infecting tomato in Brazil. *Arch. Virol.* 164:2873–2875.
- Ribeiro, S. G., Ávila, A. C., Bezerra, I. C., Fernandes, J. J., Faria, J. C., Lima, M. F., et al. 1998. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. *Plant Dis.* 82:830.
- Ribeiro, S. G., Martin, D. P., Lacorte, C., Simões, I. C., Orlandini, D. R. S., e Inoue-Nagata, A. K. 2007. Molecular and biological characterization of tomato chlorotic mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity of brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology*. 97:702–711.
- Rodrigues, C. S., Nakasu, E. Y. T., Ortiz, G. V., Pereira, J. L., Lucena-Leandro, V. dos S., Rêgo-Machado, C. de M., et al. 2021. Evidence of spread of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) mediated by internal transportation of ornamental plants in Brazil. *Neotrop. Entomol.* 1.
- Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russel, D. R., e Maxwell, D. P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis.* 77:340.
- Rojas, M. R., Macedo, M. A., Maliano, M. R., Soto-Aguilar, M., Souza, J. O., Briddon, R. W., et al. 2018. World management of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 56:637–677.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., e Maniat, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2a ed. New York, USA.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sánchez-Campos, S., Domínguez-Huerta, G., Díaz-Martínez, L., Tomás, D. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., et al. 2018. Differential shape of geminivirus mutant spectra across cultivated and wild hosts with invariant viral consensus sequences. *Front. Plant Sci.* 9.
- Sastry, K. S., e Zitter, T. A. 2014. *Plant virus and viroid diseases in the tropics: Volume 2: Epidemiology and management.*
- Seal, S. E., VandenBosch, F., e Jeger, M. J. 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 25:23–46.
- Souza, T. A., Silva, J. M. F., Nagata, T., Martins, T. P., Nakasu, E. Y. T., e Inoue-Nagata, A. K. 2020. A temporal diversity analysis of brazilian begomoviruses in tomato reveals a decrease in species richness between 2003 and 2016. *Front. Plant Sci.* 11:1–13.
- Villamor, D. E. V., Ho, T., Al Rawhni, M., Martin, R. R., e Tzanetakis, I. E. . 2019. High throughput sequencing for plant virus detection and discovery. *Phytopathology.* 109:716–725.

CAPÍTULO 3

**Controle de *B. tabaci*, o inseto-vetor dos begomovírus,
utilizando RNA interferente (RNAi)**

INTRODUÇÃO

A mosca-branca *Bemisia tabaci* foi listada como uma das 100 espécies exóticas e invasores mais importantes (Barbosa et al. 2014; van der Weijden et al. 2007). As moscas-brancas causam sérios danos na cultura do tomateiro e são especialmente danosas devido à sua capacidade de transmitir vírus fitopatogênicos, principalmente os begomovírus (Kanakala e Ghanim 2019).

A intensificação da atividade agrícola e outros fatores, como o aumento da área plantada com monoculturas e irrigação, o uso excessivo de pesticidas e fertilizantes e o transporte de plantas e produtos vegetais pelo mundo, levaram a um aumento das populações de *B. tabaci*, favorecendo sua disseminação e a consequente transmissão de begomovírus. Há uma interação íntima entre o vírus, a mosca-branca e a planta; por exemplo, as populações de moscas-brancas que se alimentam em plantas infectadas por begomovírus podem ter fecundidade aumentada, causando um “feedback positivo” contínuo, resultando em aumento da incidência do vírus e da infestação de populações de vetores (Seal et al. 2006).

O surgimento de variantes mais adaptadas de begomovírus e populações de moscas-brancas mais eficientes na colonização de diferentes hospedeiras e transmissão de viroses são consequências coevolutivas inevitáveis auxiliadas pela interação entre vírus, mosca-branca e hospedeira; logo, variados métodos de manejo precisam ser empregados para controlar os problemas causados por esse patossistema (Seal et al. 2006).

Um dos pilares do manejo é focado na redução das populações de moscas-brancas, isso porque a diversidade genética aumenta em uma população mais densa, o que pode resultar em uma pressão de seleção que influenciará a diversidade dos begomovírus e favorecerá o surgimento de novas espécies (Colvin et al. 2004; Escriu et al. 2003; Seal et al. 2006).

Diversas medidas para o manejo da mosca-branca podem ser adotadas de forma integrada. Entretanto, o controle químico tem sido a principal forma de controle aplicada, principalmente em cultivos abertos (Brito et al. 2009; Perring et al. 2018). Nos últimos anos, as populações de moscas-brancas têm demonstrado resistência aos produtos utilizados, com relatos de genótipos resistentes a mais de 60 princípios ativos (Mota-Sanchez e Wise, 2021; Horowitz et al., 2020). No Brasil, já foram reportados altos níveis de resistência aos diversos inseticidas usados com frequência, inclusive neonicotinóides (Dângelo et al. 2018; Silva et al. 2009).

Esses problemas dificultam o controle efetivo das populações de moscas-brancas e realçam a necessidade de integração de diferentes ferramentas de controle, aumentando as

chances de desenvolvimento de programas de manejo econômicos e sustentáveis (Perring et al. 2018).

O mecanismo do RNAi é um processo natural de regulação gênica e defesa antiviral das células eucarióticas que vem sendo utilizado no controle de pragas através do uso da molécula de dsRNA com sequência-específica ao gene-alvo para desencadear o mecanismo e silenciar genes essenciais à sobrevivência de algum organismo (Scott et al. 2013; Upadhyay et al. 2013).

A descoberta do mecanismo de RNAi abriu um horizonte de opções para o controle de diversas pragas como lepidópteros, coleópteros, dípteros e hemípteros, sendo o seu uso para este fim investigado ao longo dos anos (Gillet et al. 2017; Baum et al. 2007; Mao et al. 2007; Yan et al. 2020; Mao e Zeng 2014; Murphy et al. 2016).

A resposta RNAi também foi confirmada em *B. tabaci*, e análises do seu transcrito indicaram altos níveis de expressão de proteínas associadas ao mecanismo (Upadhyay et al. 2013; Tian et al. 2019). Os trabalhos mostram a eficiência do silenciamento de vários genes na mortalidade de moscas-brancas, e muitas opções relacionadas ao modo de entrega dos dsRNAs específicos (Grover et al. 2018; Eakteiman et al. 2018; Shim et al. 2015; Vyas et al. 2017; Malik et al. 2016; Luan et al. 2013; Asokan et al. 2015; Raza et al. 2016; Yang et al. 2017; Thakur et al. 2014; Jain et al. 2019).

A tecnologia do RNAi tem sido associada à utilização de plantas transgênicas, porém abordagens não transgênicas com entrega de dsRNAs produzidos *in vitro* vêm sendo investigadas graças à possibilidade de produção de grandes quantidades de dsRNA (Suhag et al. 2020). O sucesso do silenciamento de genes-alvo a partir da alimentação de insetos com dieta artificial contendo dsRNAs sintetizados *in vitro* trouxe facilidade e agilidade aos estudos que têm o objetivo de verificar ou comparar fatores que influenciam a eficácia da resposta RNAi, como organismo, genes-alvo, dosagens, dentre outros (Whyard et al. 2009; Terenius et al. 2011; Scott et al. 2013; Vogel et al. 2019).

A aplicação do dsRNA produzido *in vitro* para o controle de moscas-brancas exige pureza da molécula (Suhag et al. 2020). Atualmente é possível adquirir o dsRNA ou sintetizá-lo em laboratório com a utilização de kits disponíveis no mercado. Em moscas-brancas, dsRNAs sintetizados *in vitro* entregues em dietas artificiais já foram usados com sucesso para o silenciamento de proteínas como V-ATPase A, ribossomal protein 9 (RPL9) (Upadhyay et al. 2011), glutathione S-transferase (Asokan et al. 2015), aquaporina, sucrase (Luo et al. 2017), dentre outras.

A alta disponibilidade de informações genéticas das moscas-brancas gera uma ampla gama de opções de possíveis alvos. Os experimentos aqui descritos foram realizados com o objetivo de rastrear e selecionar genes-alvo para avaliação dos efeitos do seu silenciamento através da administração de dsRNAs sintetizados *in vitro* e entregues por via oral em dieta artificial, antes da implementação da tecnologia com técnicas mais complexas e voltadas ao uso em campo, como plantas transgênicas.

METODOLOGIA

Seleção dos genes para a produção de dsRNAs

Os genes foram selecionados através de pesquisa na literatura em trabalhos científicos de análises da expressão gênica de moscas-brancas. Foram selecionadas proteínas com indicativo de expressão abundante, que ao serem reduzidas poderiam levar à mortalidade de moscas-brancas devido às suas funções (Geng et al. 2018; Wang et al. 2011; Kaur et al. 2017; Wang et al. 2010).

As sequências dos RNAs mensageiros (mRNAs) de Loquacious (gene ID Bta01704), Tuberina (gene ID Bta08468), Distroglicana (gene ID Bta00881), Laminina (gene ID Bta05890) e HSP70 (gene ID Bta11631) de *B. tabaci* MEAM1 foram obtidas em um banco de dados de genoma de moscas-brancas coletadas na Carolina do Norte, nos Estados Unidos (Chen et al. 2016; Whitefly genome database 2021).

Os dsRNAs foram desenhados utilizando recurso computacional para o desenho otimizado de dsRNAs - o serviço online e-RNAi (www.dkfz.de; Horn e Boutros 2010). A partir da sequência de mRNA, o e-RNAi gera diversas opções de dsRNAs com os respectivos iniciadores usados para a síntese por transcrição *in vitro*. As sequências e os tamanhos dos dsRNAs são definidos de acordo com algoritmos que calculam a eficiência dos dsRNAs a partir dos possíveis siRNAs gerados por ele. Foram escolhidos dois dsRNA para Loquacious, dois dsRNAs para HSP70 e um para cada um dos demais genes.

A escolha dos dsRNAs considerou pesquisas que mostraram que tamanhos entre 200 e 500 pares de bases são ótimos para a maioria dos insetos (Vogel et al. 2019). Os dsRNAs escolhidos foram avaliados no programa si-Fi21 (Lück et al. 2019) e por BLASTn para verificar a existência de efeitos fora do alvo, as moscas-brancas.

O programa si-Fi21 verifica efeitos fora do alvo através da divisão da sequência de dsRNA em pequenos RNAs, que são utilizados para sondar um banco de dados de sequências de mRNAs na busca por sequências correspondentes (Lück et al. 2019). A análises foram executadas com o modo de alta sensibilidade, que usa parâmetros menos rigorosos na busca por semelhanças entre sequências, projetado para localizar um número máximo de potenciais efeitos fora do alvo.

Na análise BLASTn foi utilizado o algoritmo MEGABLAST descontínuo, que identifica sequências de nucleotídeos semelhantes, mas não idênticas, a partir da divisão da sequências em subsequências curtas. Os parâmetros dessa análise são mais indicados para verificar alinhamentos com sequências relacionadas a outros organismos (NCBI 2021).

Obtenção dos dsRNAs

O dsRNA de tomate mosaico vírus - ToMV (denominado dsToMV, 456 nucleotídeos; Rego-Machado et al., 2020), o dsLOQ-A e o dsHSP70-A foram sintetizados pela empresa Genolution (Seul, Coreia do Sul; <http://genolution.co.kr/agrona/ordering/>) e diluídos em água (tratada com 0,1% de DEPC e autoclavada) no laboratório. Inicialmente, no bioensaio 1 os dsRNAs foram utilizados sem nenhum tratamento. Para os bioensaios 2 e 3, o dsToMV sintetizado pela Genolution foi previamente precipitado com acetato de sódio e etanol, ou dialisado com membrana de diálise (Sigma Aldrich) em água tratada com DEPC por 16 h, ou purificado com MEGAscript RNAi Kit (Life Technologies). Adicionalmente, devido a um problema de alta mortalidade no controle dos bioensaios 1 e 2, dsToMV foi sintetizado com este kit para realização do bioensaio 3. Para a síntese de dsToMV, dsLOQ-B, dsHSP70-B, dsTUBE, dsLAMI e dsDIS com o kit comercial, inicialmente foram produzidos os fragmentos de cDNA a partir do dsRNA de ToMV comercial (100 ng) e do RNA extraído de ~100 moscas-brancas da espécie MEAM1, coletadas na criação da Embrapa Hortaliças (Gama-DF).

Para a extração do RNA, a amostra de moscas-brancas foi macerada em 250 μ L de Trizol (Thermo Fisher Scientific) e foram adicionados 25 μ L de solução clorofórmio:etanol absoluto (24:1). A mistura foi agitada vigorosamente, resfriada no gelo por 5 min e submetida à centrifugação por 15 min a 4°C (13.000g). Após a centrifugação, 100 a 120 μ L do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e foi adicionado um volume de isopropanol. Foi realizada outra centrifugação a 13.000 g por 30 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 μ L de etanol 70% gelado sob centrifugação a 13.000 g por 5 min. O álcool foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 20 μ L de H₂O DEPC autoclavada. O tubo foi incubado a 65 °C por 5 min para facilitar a ressuspensão. Os RNAs foram tratados com DNase RQ1 RNase-free (Promega), conforme as recomendações do fabricante.

Os cDNAs foram amplificados por transcrição reversa com M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) utilizando o iniciador dsToMV-R (Tabela 4) e iniciador randômico. Os cDNAs foram amplificados em reação de PCR com Platinum High Fidelity *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e os iniciadores específicos, sem a região do promotor T7 (Tabela 4). Os fragmentos de cada gene-alvo e de ToMV foram ligados em pGEM-T-Easy (Promega) utilizando DNA Ligase (Invitrogen). A ligação foi dialisada com membrana de diálise (Merck Millipore) e transformada em *E. coli* (DH10 β) por eletroporação. Os DNAs plasmidiais foram extraídos utilizando protocolo descrito em Sambrook et al. (1989) e dois clones de cada gene foram sequenciados para confirmação da correta clonagem na empresa

MacroGen (Coréia do Sul). Após a confirmação da clonagem, o plasmídeo de um clone por gene foi utilizado para produção dos amplicons com iniciadores que adicionaram o sítio de iniciação de transcrição T7 na extremidade 5' (Tabela 4) em reação de PCR com *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen).

Posteriormente, foram realizadas as reações de transcrição *in vitro* com o MEGAscript T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Cada uma das duas fitas de RNA foi produzida separadamente e posteriormente misturadas, incubadas a 75 °C por 5 min e esfriadas a temperatura ambiente para o anelamento das duas fitas complementares. Os dsRNAs foram purificados utilizando Purelink RNA Mini Kit (Life Technologies), conforme o protocolo do fabricante, e verificados em gel de agarose a 1%.

Tabela 4. Sequências dos iniciadores utilizados para a produção de dsRNAs de ToMV e das proteínas Loquacious, Tuberina, Distroglicana, Laminina e HSP70. As letras minúsculas representam a sequência do promotor T7.

Nome	Sequência (5'-3')
T7dsToMV-F	taatacgactcactatagggagaTACTCAATCACTTCTCCATCGCA
T7dsToMV-R	taatacgactcactatagggagaGGTCCAGACCAACCCAGAC
dsToMV-F	TACTCAATCACTTCTCCATCGCA
dsToMV-R	GGTCCAGACCAACCCAGAC
T7Loq823F	taatacgactcactatagggagaCTGATTCAGAGACTGTCCCGTT
T7Loq1020R	taatacgactcactatagggagaTTGAAGAAAAGCGAAGAAGTCC
Loq823F	CTGATTCAGAGACTGTCCCGTT
Loq1020R	TTGAAGAAAAGCGAAGAAGTCC
T7Lami6312-F	taatacgactcactatagggagaTCAAACCAGTTGGCTCCTATTT
T7Lami6681-R	taatacgactcactatagggagaGGCTTTCTTCATCAATGTTTCC
Lami6312-F	TCAAACCAGTTGGCTCCTATTT
Lami6681-R	GGCTTTCTTCATCAATGTTTCC
T7Tub1654F	taatacgactcactatagggagaAAACAGAAGCAGCAGACATCAA
T7Tub1854R	taatacgactcactatagggagaGCGAAGGAAACATTCAAAAATC
Tub1654F	AAACAGAAGCAGCAGACATCAA
Tub1854R	GCGAAGGAAACATTCAAAAATC
T7Dis629F	taatacgactcactatagggagaAGGTGTACCGTCTGAACAGGATA
T7Dis876R	taatacgactcactatagggagaCAGCAAGATTTTTAATTGACGCT
Dis629F	AGGTGTACCGTCTGAACAGGATA
Dis876R	CAGCAAGATTTTTAATTGACGCT
T7dsHSP70-475-F	taatacgactcactatagggagaACACAAAACAACCCCTTTTGTC
T7dsHSP70-773-R	taatacgactcactatagggagaCCCATTTGAACACATCTCATCTC
dsHSP70-475-F	ACACAAAACAACCCCTTTTGTC
dsHSP70-773-R	CCCATTTGAACACATCTCATCTC

Coleta de moscas-brancas em diferentes fases de desenvolvimento para quantificação de Loquacious e HSP70

Três plantas de tomateiro (cv. Santa Clara) foram mantidas por 48 h no compartimento de criação de moscas-brancas para oviposição. As moscas-brancas adultas foram retiradas das plantas e essas plantas foram transferidas para gaiolas de organza, que foram colocadas em uma câmara de crescimento mantida a temperaturas entre 26 e 30 °C e fotoperíodo de 16 h. Após a eclosão das ninfas, ~30 indivíduos do 1º ao 4º instares, e ~15 adultos foram coletados. De cada planta de tomateiro foi retirada uma réplica biológica por fase de desenvolvimento. Os indivíduos coletados foram imediatamente transferidos para microtubos de 1,5 mL contendo 20 µL de Trizol (Thermo Fisher Scientific). Um pistilo foi usado para macerar as amostras e o RNA total foi armazenado em freezer a -80 °C. O RNA foi extraído conforme protocolo descrito anteriormente.

Bioensaios de alimentação em dieta artificial contendo dsRNAs

Todos os bioensaios foram realizados em tubos de polietileno de 50 mL com fundo removido e fechado com tecido organza preso com um elástico. A parte superior do tubo foi moldada em uma chama e coberta com duas películas de parafilme (Parafilm M), contendo a dieta artificial entre elas. As paredes dos tubos foram cobertas com papel alumínio para induzir o deslocamento das moscas-brancas em direção à dieta (Figura 9).

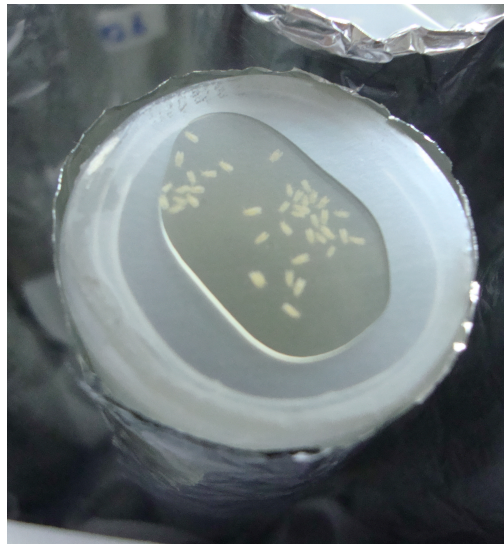


Figura 9. Moscas-brancas se alimentando em solução contendo dieta artificial em um dos lados do tubo de polietileno coberto com papel alumínio.

Foram utilizadas moscas-brancas MEAM1 provenientes da criação, mantidas em couve na Embrapa Hortaliças. Antes da realização dos experimentos, algumas folhas de couve eram destacadas e os adultos retirados. O pecíolo das folhas foi inserido em recipiente limpo

contendo água e esses recipientes colocados em gaiolas mantidas em câmara de crescimento com temperaturas entre 26 °C e 30 °C e fotoperíodo de 16 h.

Os adultos com 1 a 5 dias de idade após eclosão foram utilizados nos experimentos. As moscas-brancas foram transferidas para um recipiente escuro e aspiradas com um sugador com uma ponteira fechada com organza na abertura maior e cortada na ponta menor. Após a transferência dos insetos para o tubo, estes eram mantidos em incubadoras a 28 °C.

Em todos os bioensaios as moscas-brancas mortas eram contadas e retiradas do fundo do tubo a cada 24 h e, ao final, os indivíduos vivos também eram contabilizados para as análises. Nos bioensaios 1, 2 e 3 a avaliação foi realizada até 48 h e nos ensaios seguintes até 120 h de experimento.

Inicialmente, foram realizados três bioensaios com o objetivo de definir a dieta artificial mais adequada, bem como comprovar a inocuidade do controle negativo, dsToMV, às moscas-brancas. Cada bioensaio foi realizado em três repetições por tratamento e ~30 moscas-brancas por repetição. No bioensaio 1, foram utilizados dsToMV, dsLOQ-A e dsHSP70-A sintetizados pela Genolution na concentração de 1 µg/µL de dieta artificial (Dadd e Mittler 1966). No bioensaio 2, apenas dsToMV em diferentes concentrações preparadas de duas formas, precipitado e dialisado, foi utilizado. Para realização do bioensaio 3, a dieta foi trocada por solução de sacarose a 30% e foram usadas diferentes concentrações de dsToMV (não precipitado, precipitado, purificado e sintetizado com kit comercial).

Uma vez definido o conteúdo da dieta artificial mais adequado à realização dos ensaios e o controle negativo, foram utilizados dsRNAs para os genes-alvo sintetizados com kit comercial na concentração de 0,5 µg/µL de solução de sacarose a 30% nos bioensaios seguintes. Os dsRNAs para o silenciamento de Loquacious e HSP70 utilizados foram dsLOQ-B e dsHSP70-B. Tratamentos controle com sacarose e com dsToMV foram incluídos. A contagem e retirada de moscas-brancas mortas e a substituição da dieta foi realizada a cada 24 h; ao final as moscas-brancas vivas foram contabilizadas para as análises.

Para avaliar os efeitos da ingestão dos dsRNAs contra as proteínas-alvo, foram realizados oito novos bioensaios que contabilizaram seis repetições com dsLOQ-B, dsHSP70-B e dsTUBE, nove repetições com dsDIS e doze repetições com dsLAMI. Em cada repetição foram usadas ~50 moscas-brancas.

Coleta de moscas-brancas para quantificação da expressão de Laminina

Ao final do experimento com dsRNA para o gene-alvo da Laminina (120 h), aproximadamente 20 moscas-brancas vivas foram coletadas separadamente de 8 repetições

dos tratamentos SAC e dsLAMI. As moscas-brancas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo 20 μ L de Trizol (Thermo Fisher Scientific) e um pistilo foi usado para macerar as amostras, que foram armazenadas em freezer a -80 °C logo em seguida. O RNA das amostras foi extraído utilizando Purelink RNA Mini Kit (Life Technologies) e o reagente Trizol (Thermo Fisher Scientific) conforme protocolo indicado pelo fabricante.

RT-PCR quantitativo para verificar níveis de expressão de Loquacious, HSP70 e Laminina em moscas-brancas

Os RNAs extraídos das amostras de diferentes fases de desenvolvimentos das moscas-brancas e dos ensaios de dsLAMI foram tratados com DNase RQ1 RNase-free (Promega) e utilizados para síntese dos cDNAs com iniciadores randômicos com a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma-Aldrich). Ambas as reações foram realizadas conforme as orientações dos respectivos fabricantes.

O gene da Actina foi utilizado como controle endógeno com os iniciadores Actina-F e R (Li et al. 2013). Os iniciadores específicos para Loquacious, HSP70 e Laminina (Tabela 5) foram desenhados com auxílio das ferramentas PrimerQuest e OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies), e cada par foi avaliado quanto à sua eficiência de amplificação em reações com as diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} .

Tabela 5. Sequências dos iniciadores utilizados para verificar os níveis de expressão das proteínas Loquacious, HSP70 e Laminina por RT-PCR quantitativo.

Nome	Sequência (5'-3')
Actina-F	TCTTCCAGCCATCCTTCTTG
Actina-R	CGGTGATTTCCTTCTGCATT
Lami2972F	TCGTGTACCCTTGTGTTTCTG
Lami3143R	TCCATATTTTCCACGCCCTC
Loq529F	TGCCTGGTGATGCCAGAAAT
Loq653R	TGTGGTAATCCCTCCTCGGT
HSP70-115F	CCTTCCTACGTGGCCTTCAC
HSP70-229R	TCTTCCAGCCATCCTTCTTG

A quantificação foi realizada em ensaios utilizando QuantiNova SYBR Green PCR kit (Qiagen). As reações foram incubadas a 95 °C por 2 min e submetidas a 40 ciclos de 95 °C por 5 s e 60 °C por 15 s no termociclador CFX96 Thermal Cycler (Bio-Rad). Para cada réplica biológica foram realizadas três réplicas técnicas. Os valores de *cycle threshold* (Ct) mensurados foram normalizados em relação ao controle endógeno, e os níveis de expressão foram obtidos utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para a quantificação de Loquacious e HSP70 nos

estádios de desenvolvimento, amostra do 1^o-2^o estágio ninfal foi utilizada como referência. A expressão de Laminina nos bioensaios com dsLAMI foi quantificada utilizando amostra do tratamento de dieta artificial com sacarose (SAC) como referência.

Testes estatísticos e análise de sobrevivência

Para comparar a letalidade entre os tratamentos foram aplicados testes de comparações múltiplas de Tukey, que também foi utilizado na análise de expressão da Laminina. Análises de sobrevivência e comparações entre pares com o método Holm-Sidak foram realizadas nos ensaios das proteínas selecionadas como alvo (Loquacious, HSP70, Tuberina, Distroglicana e Laminina). Os gráficos e as análises foram obtidos com os programas Microsoft Excel 2011 (Microsoft Corporation) e Prism 9 (GraphPad Software).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção dos genes para silenciamento por RNAi

Os genes-alvo que codificam as proteínas Loquacious, HSP70, Distroglicana (α e β), Tuberina e Laminina (sub-unidade α) foram selecionados para verificação dos efeitos da alimentação de moscas-brancas com dsRNAs complementares a regiões de suas sequências.

A “heat shock protein” (HSP70) tem função de proteção contra choque térmico e de chaperona; seu silenciamento em moscas-brancas foi realizado em ensaios que indicaram letalidade média a alta devido a intolerância a flutuações de temperatura, principalmente quando os insetos são submetidos a temperaturas mais altas (Shim et al. 2015; Vyas et al. 2017; Lü e Wan 2011). Os dsRNAs contra HSP70 foram desenhados e testados como um indicador da ativação efetiva do mecanismo de RNAi nas moscas-brancas.

A proteína Loquacious processa pré-miRNAs em miRNAs, estimulando a regulação da expressão gênica pós-transcricional que mantém os processos ligados ao metabolismo e ao desenvolvimento dos insetos (Lucas e Raikhel 2013). O seu silenciamento em *Drosophila* causou redução do tempo de vida e deterioração de tecido cerebral no início da idade adulta (Liu et al. 2012).

A Tuberina é classificada como supressora tumoral e regula o crescimento e a proliferação das células (Saxton e Sabatini 2017). Sua supressão em *Drosophila* causou crescimento excessivo e aumento no tamanho das células (March e Bentley 2006; Tapon et al. 2001).

As proteínas Distroglicana e Laminina fazem parte do complexo conhecido como dys-glicoproteico, sua estabilidade mantém funções essenciais do sistema muscular (Ehmsen et al. 2002). Há relatos de degeneração muscular progressiva em larvas e adultos de *Drosophila* e de inibição da emergência de adultos de moscas-brancas após a desestabilização do complexo dys-glicoproteico pelo silenciamento da Distrofina (Bar et al. 2019; Taghli-Lamalle et al. 2008).

A partir das pesquisas em banco de dados e em publicações científicas, estas proteínas foram selecionadas como potencialmente promissoras para o controle de moscas-brancas. Os dsRNAs de Loquacious e HSP70 selecionados no e-RNAi têm 496 (dsLOQ-A), 198 (dsLOQ-B), 467 (dsHSP70-A) e 299 (dsHSP70-B) nucleotídeos, enquanto dsTUBE, dsDISTRO e dsLAMI têm 200, 248 e 300 nucleotídeos, respectivamente. As análises com o programa si-Fi21 e por BLASTn verificaram que não há identidade de nucleotídeos dos dsRNAs escolhidos com mRNAs de outros organismos presentes nos bancos de dados (GenBank –

NCBI), indicando que não existem efeitos relacionados a silenciamento desses genes em organismos não-alvos cujas sequências de referência estão disponibilizadas.

Níveis de expressão de Loquacious e HSP70 em ninfas e adultos de moscas-brancas

A verificação dos níveis de expressão dos genes-alvo selecionados nas fases de desenvolvimento do inseto que se deseja controlar indica em qual fase o gene é mais expresso e tem maiores chances de causar letalidade quando silenciado.

Os genes Loquacious e HSP70 foram os primeiros a serem utilizados, então sua quantificação nas fases de desenvolvimento de *B. tabaci* foi realizada. Inicialmente, os testes de eficiência de amplificação para RT-qPCR realizados com os respectivos pares de iniciadores (Tabela 5) indicaram eficiências de 96% (Loquacious), 96% (HSP70) e 103% (Actina), então os iniciadores são adequados para a realização da quantificação relativa da expressão de genes.

Os níveis de expressão de Loquacious foram mais altos nos estádios ninfais, apresentando um aumento do 1^o-2^o para 3^o ínstar. Uma queda brusca foi observada a partir do 4^o ínstar e na fase adulta em relação às fases ninfais (Figura 10). Tian et al. (2019) relataram níveis de expressão de Loquacious muito próximos nos estádios ninfais, mas não observaram diminuição bruscas no 4^o ínstar. Aqui, os adultos mantiveram a baixa expressão apresentada pelas ninfas de 4^o ínstar. Como a diferenciação do sexo dos indivíduos não foi realizada na nossa amostragem, é possível que a queda da expressão na fase adulta tenha sido causada pela coleta de mais fêmeas, já que os machos apresentam um aumento no nível de expressão de Loquacious na fase adulta em relação aos estádios ninfais (Tian et al. 2019).

A expressão de HSP70 foi maior em 1^o-2^o ínstar do estágio ninfal, com um decaimento a partir do 3^o ínstar que persistiu até a fase adulta (Figura 10). Os níveis de expressão de HSP70 apresentam uma forte associação com as temperaturas às quais as moscas-brancas são submetidas e com o sexo dos indivíduos avaliados (Lü e Wan 2011). O decaimento dos níveis de expressão de HSP70 observados aqui podem ser explicados pelas temperaturas amenas, entre 26 e 30 °C, utilizadas na criação das moscas-brancas que foram coletadas. A expressão de HSP70 aumenta significativamente quando as moscas-brancas são submetidas a temperaturas de 35 ° a 44 °C (Lü e Wan 2011).

Em contraste com os trabalhos já publicados, esse ensaio indicou que os dois genes não seriam alvos promissores de silenciamento com o objetivo de controlar moscas-brancas adultas ou ninfas, no caso de HSP70. Os resultados indicam que a melhor fase alvo seria a ninfal para estes dois genes. Entretanto, sabe-se que conduzir bioensaios de alimentação em

dieta artificial com ninfas é inviável, devido à natureza sésil das ninfas. Muitos trabalhos relatam a letalidade do silenciamento de HSP70 em adultos, e ainda não há relatos dos efeitos do silenciamento de Loquacious em nenhuma fase de vida das moscas-brancas, assim, decidiu-se pela continuidade da avaliação da ingestão de dsRNAs contra esses genes utilizando moscas-brancas na fase adulta. Dessa forma, foi possível concluir que existe uma expressão diferencial de cada gene nas diferentes fases do inseto e isso precisa ser considerado na análise dos resultados. O nível de expressão não foi avaliado para os demais genes.

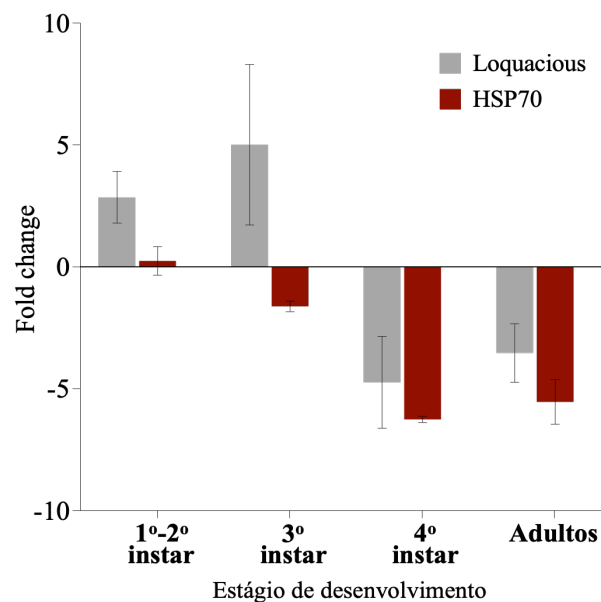


Figura 10. Expressão relativa dos genes para as proteínas Loquacious (barras cinzas) e HSP70 (barras vermelhas) em amostras do 1º-2º, 3º e 4º instares e em adultos de mosca-branca. Gene-alvo foi normalizado em relação ao gene da Actina e quantificado utilizando método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os valores são médias + erro padrão da média. A expressão dos genes está representada utilizando como referência amostra 1º-2º instar.

Bioensaio 1 - Teste inicial com dsRNAs comerciais

No primeiro bioensaio foram investigados os efeitos da ingestão de dsRNAs contra as proteínas Loquacious e HSP70. Também foi avaliado o efeito da ingestão de dieta contendo os dsRNAs contra estas duas proteínas simultaneamente (tratamento dsHL). As moscas-brancas foram alimentadas com dsRNAs sintetizados na empresa Genolution, que foram diluídos em H₂O DEPC autoclavada e adicionados à dieta artificial. O dsToMV foi administrado para verificar a especificidade dos dsRNAs contra as proteínas-alvo selecionadas.

Após 48 h de alimentação, foi observada uma taxa de letalidade de 23% no controle contendo apenas dieta artificial (DA; Tabela 6). Esse valor é aceitável, considerando que a realização dos procedimentos de transferência do inseto das plantas para os tubos é altamente estressante para as moscas-brancas. A alimentação com dsLOQ-A e de dsHSP70-A, separadamente, causaram taxas de letalidade de 54 e 78%, e o uso dos dois dsRNAs (tratamento dsHL) provocou um aumento na taxa de letalidade, que foi de ~95%.

Houve diferença significativa entre os tratamentos dsHSP70-A e dsHL em relação a DA ($p < 0,007$ e $p = 0,0009$), porém no tratamento DA, foi observada também diferença em relação ao dsToMV ($p < 0,05$). O tratamento dsToMV apresentou uma taxa de letalidade (64%) mais próxima à observada nos tratamentos com os genes-alvo, dsLOQ-A, dsHSP70-A e dsHL, que não apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento dsToMV.

Tabela 6. Taxas de letalidade de moscas-brancas no bioensaio 1 após 48 h de alimentação em dieta contendo dsRNAs adquiridos comercialmente.

BIOENSAIO 1	Tratamento	Nº de mortas (48h)	Nº Total	Letalidade (%)
	DA	27	117	23 a B*
	dsToMV	90	140	64 b A
	dsHSP-A	105	135	78 b A
	dsLOQ-A	77	143	54 a A
	dsHL	143	150	95 b A

*As letras indicam as diferenças significativas com $p < 0,05$ de acordo com teste de comparações múltiplas de Tukey. As letras minúsculas indicam diferença em relação ao tratamento DA e as maiúsculas em relação a dsToMV.

A baixa taxa de letalidade obtida no controle contendo apenas dieta artificial indicou ser um método útil para a condução do experimento e manipulação das moscas-brancas. Foram observadas taxas de letalidade elevadas (54, 78 e 95%) após 48 h de alimentação das moscas-brancas com dsRNAs para os genes-alvo Loquacious e HSP70, tanto separados (dsLOQ-A e dsHSP70-A) quanto juntos (dsHL).

Como dsRNA de ToMV é um dsRNA homólogo à parte do genoma do vírus fitopatogênico tomato mosaic virus, era esperado que seu uso na alimentação apresentasse um baixo efeito nas moscas-brancas, porém foi observada uma taxa de 64% de letalidade. A alta taxa apresentada em dsToMV colocou em dúvida as razões da alta letalidade nos tratamentos com os genes-alvo, se seria devido ao silenciamento ou devido à presença de compostos tóxicos na suspensão de dsRNA.

Considerando a alta taxa de letalidade de dsToMV no bioensaio 1, o dsRNA comercial de ToMV foi purificado para utilização no bioensaio 2.

Bioensaio 2 - Purificação de dsToMV por precipitação com acetato de sódio ou diálise

O bioensaio 2 foi conduzido para verificar a hipótese da presença de compostos tóxicos nos dsRNA sintetizados pela empresa. Para isso, o dsToMV foi precipitado com acetato de sódio e etanol e, em outro tratamento, dialisado em membrana de diálise em água tratada com DEPC. O dsToMV precipitado foi utilizado em duas concentrações, de 0,3 e 0,5 µg/µL (tratamentos P-0,3 e P-0,5) e dsToMV o dialisado foi utilizado a 1 µg/µL (tratamento D-1).

Foi observada letalidade de 39% no tratamento P-0,3, porém o aumento da concentração do dsRNA para 0,5 µg/µL resultou em maior letalidade em P-0,5 (61%; Tabela 7). A letalidade de moscas-brancas em D-1 foi de 52%, menor do que a observada no tratamento com a mesma concentração de dsToMV não precipitado (NP-1, do bioensaio 1). Não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 7. Taxas de letalidade de moscas-brancas no bioensaio 2 após 48 h de alimentação em dieta artificial contendo dsToMV adquirido comercialmente precipitado ou dialisado.

BIOENSAIO 2	Tratamento	Nº de mortas (48h)	Nº Total	Letalidade (%)
	DA	145	408	36 a*
	**NP-1	90	140	64 a
	P-0,3	65	166	39 a
	P-0,5	28	46	61 a
	D-1	27	52	52 a

*As letras indicam diferenças significativas com $p < 0,05$ de acordo com teste de comparações múltiplas de Tukey;

**O tratamento NP-1 foi realizado no bioensaio 1, mas seus resultados estão incluídos aqui para fim de comparação.

A maior letalidade de acordo com o aumento da concentração de dsToMV precipitado observada nos tratamentos P-0,3 e P-0,5 indica que o processo de precipitação com acetato de sódio não foi capaz de remover possíveis impurezas do dsRNA comercial. Visto que a taxa de letalidade observada em P-0,5 foi bem próxima da obtida com o uso do dsRNA não precipitado em maior concentração (tratamento NP-1), esse processo de precipitação aparentemente foi ineficaz.

A letalidade observada no tratamento D-1 indicou que o processo de diálise possivelmente também não teve eficácia na remoção de moléculas tóxicas. Apesar de D-1 apresentar menor letalidade (52%) comparada à mesma concentração do dsToMV não precipitado (NP-1), a taxa de letalidade ainda não é a desejável para controle com dsRNAs inespecíficos em experimentos de alimentação em dieta artificial de moscas-brancas.

O tratamento DA apresentou maior letalidade (36%) do que a observada no bioensaio anterior (23%). O aumento pode estar apenas relacionado à manipulação dos insetos ou pode ser um alerta para possível rejeição da mosca-branca à dieta artificial utilizada.

O objetivo do experimento de verificar a presença de compostos tóxicos nas soluções de dsRNAs não foi alcançado com a purificação por precipitação ou por diálise. A taxa de letalidade de dsToMV continuou alta e a do controle com dieta artificial aumentou, por isso, o bioensaio 3 foi realizado com o mesmo objetivo, porém com outros métodos de purificação empregados, com síntese de dsToMV com kit comercial e dieta artificial composta por solução de sacarose a 30%.

Bioensaio 3 - Troca de dieta, purificação e síntese de dsToMV com kit comercial

Com a realização de precipitação e diálise do dsRNA não foi possível diminuir as taxas de letalidade de dsToMV e verificar presença de compostos tóxicos para as moscas-brancas. No bioensaio 3 foi utilizada outra dieta composta por solução de sacarose a 30% e duas concentrações de dsToMV não precipitado (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), e 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de dsRNA precipitado foram testadas para verificar a continuidade da alta letalidade mesmo com a troca de dieta. Além disso, o MEGAscript RNAi Kit (Life Technologies) foi utilizado para purificar o dsToMV comercial e para sintetizar um novo dsToMV, com a mesma sequência.

A utilização de 1 μg de dsToMV (comercial) não precipitado por μL de solução de sacarose 30% (tratamento NP-1) apresentou taxa de letalidade de 78% (Tabela 8). O tratamento com dsRNA não precipitado NP-0,4, e dsToMV precipitado, P-0,4, resultaram em 48 e 34% de letalidade, respectivamente. O dsToMV purificado com o MEGAscript RNAi kit (C-0,4) apresentou menor letalidade de moscas-brancas, de 26%, do que o dsToMV sintetizado com o mesmo kit (Kit-0,4), que causou letalidade de 31%. O controle com solução de sacarose a 30% (SAC) apresentou 29% de taxa de letalidade.

A utilização do dsToMV não precipitado (NP-1) continuou apresentando alta taxa de letalidade (78%) com o uso de sacarose a 30% como dieta. Esse foi o único tratamento que apresentou diferença significativa em relação ao controle SAC ($p < 0,05$). Conforme o esperado, a utilização de uma concentração menor em NP-0,4 resultou em letalidade

ligeiramente mais baixa (48%). Esses dados e a baixa letalidade observada no controle (SAC) descartam suspeitas de efeitos tóxicos nas moscas-brancas devido às diferentes dietas e não à solução de dsRNA comercial.

Tabela 8. Taxas de letalidade no bioensaio 3, após 48 h de alimentação das moscas-brancas em solução de sacarose a 30% contendo dsToMV não precipitado, precipitado, purificado e sintetizado com MEGAscript RNAi kit.

BIOENSAIO 3	Tratamento	Nº de mortas (48h)	Nº Total	Letalidade (%)
	SAC	72	329	29 a*
	NP-1	63	81	78 b
	NP-0,4	44	92	48 a
	P-0,4	25	73	34 a
	C-0,4	25	97	26 a
	Kit-0,4	26	84	31 a

*As letras indicam diferenças significativas com $p < 0,05$ de acordo com teste de comparações múltiplas de Tukey.

O uso de dsRNA precipitado na concentração de 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ com sacarose (P-0,4) nesse bioensaio apresentou letalidade mais baixa (34%). De acordo com esses experimentos e outros testes pilotos não incluídos, o processo de precipitação em alguns casos pode ser eficaz e retirar impurezas, causando menor letalidade como ocorreu aqui. Em contrapartida, após a realização de várias precipitações com resultados variáveis, foi observado que maior pureza estava relacionada a obtenção de menor concentração do dsRNA ao final do procedimento.

Os tratamentos com dsToMV purificado e sintetizado com kit (C-0,4 e Kit-0,4) apresentaram as menores taxas de letalidade, principalmente o purificado C-0,4, que apresentou letalidade de 26% (Tabela 8), bem próxima à obtida no controle SAC. Apesar do resultado com baixa letalidade, a purificação do dsRNA comercial com os produtos o MEGAscript RNAi kit foi acompanhada pela perda de grande parte das moléculas. A perda da alta concentração associada ao alto custo dos reagentes inviabiliza o uso dessa estratégia de obtenção de dsRNAs para experimentos de alimentação em dieta artificial que visam rastrear e testar o efeito do silenciamento de diversos genes.

As taxas de letalidade em tratamentos controle com dsRNAs inespecíficos em outros trabalhos publicados são relatadas em torno de 25% após cinco dias de alimentação (Upadhyay et al. 2011; Asokan et al. 2015; Wang et al. 2017). Como o dsToMV não possui sequências homólogas conhecidas nas moscas-brancas, logo, as taxas de letalidade devem ser próximas a esse valor, não ultrapassando a causada pela manipulação. Aqui, observamos que

o dsRNA comercial contém moléculas tóxicas a moscas-brancas, pois causaram letalidade de 64% (com DA) e de 78% (com SAC), então uma etapa de purificação do dsRNA é requerida para uso em bioensaios de alimentação em dieta artificial com esses insetos.

Após os três experimentos, concluímos que a purificação do dsRNA comercial, apesar de reduzir a quantidade da molécula letal às moscas-brancas, tem eficácia variável quando feita por precipitação ou com os kits comerciais, podendo resultar em perda de reagentes e materiais que tem custos elevados, já que a taxa de recuperação de dsRNA (comercial) no processo foi baixa (dados não mostrados).

O objetivo da próxima e principal etapa destes experimentos foi selecionar e avaliar os efeitos do silenciamento de diversos genes, visando rastrear proteínas-alvo que têm potencial para serem utilizadas no manejo da mosca-branca. Considerando os resultados obtidos nesses bioensaios e os nossos objetivos, optamos por trabalhar com a produção dos dsRNAs com kit comercial – MEGAscript T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific).

Efeitos da ingestão de dsRNAs homólogos aos genes selecionados

Após os testes iniciais para definir a melhor estratégia de síntese e purificação de dsRNAs, foram realizados experimentos para o silenciamento dos genes para as proteínas selecionadas Loquacious, HSP70, Tuberina, Distroglicana e Laminina. No bioensaio 1, não foi possível avaliar os efeitos de dsLOQ-A e dsHSP70-A devido aos compostos presentes nos dsRNAs comerciais que são tóxicos às moscas-brancas, por isso as proteínas Loquacious e HSP70 voltaram a ser testadas, porém com dsRNAs com sequências diferentes (dsLOQ-B e dsHSP70-B). Como as moscas-brancas apresentaram baixa taxa de letalidade em resposta à dieta composta por solução de sacarose a 30%, prosseguiu-se com o uso dessa dieta nos experimentos com os genes-alvo.

A alimentação de moscas-brancas com o dsLOQ-B causou 13% de letalidade após 5 dias. Foram observadas diferenças significativas entre as taxas de letalidade de dsToMV e dsLOQ-B em relação a SAC (Figura 11B) e diferenças nas curvas de sobrevivência dos tratamentos dsLOQ-B e SAC (Figura 11A), porém tais diferenças estão relacionadas a maior letalidade observada no controle SAC (27%) em relação aos demais tratamentos. A administração de 0,5 µg/µL de dsRNA contra o gene Loquacious em moscas-brancas por 120 h não provocou alta letalidade.

O tratamento com o uso de dsRNA contra a tuberina (dsTUBE) causou 24% de letalidade em moscas-brancas após 5 dias. Não foram observadas diferenças significativas entre as taxas de letalidade dos tratamentos (Figura 11D). A análise das curvas de

sobrevivência indicou diferença entre os tratamentos dsTUBE e dsToMV (Figura 11C), que apresentou 10% de taxa de letalidade. Assim como ocorreu no experimento com dsLOQ-B, essa diferença encontrada está ligada à letalidade ligeiramente maior obtida no controle SAC (25%), visto que também foi indicada diferença significativa entre as curvas de sobrevivência de SAC e dsToMV (Figura 11C). Isso indica que a alimentação das moscas-brancas com 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de dsTUBE não causou efeitos relevantes de letalidade.

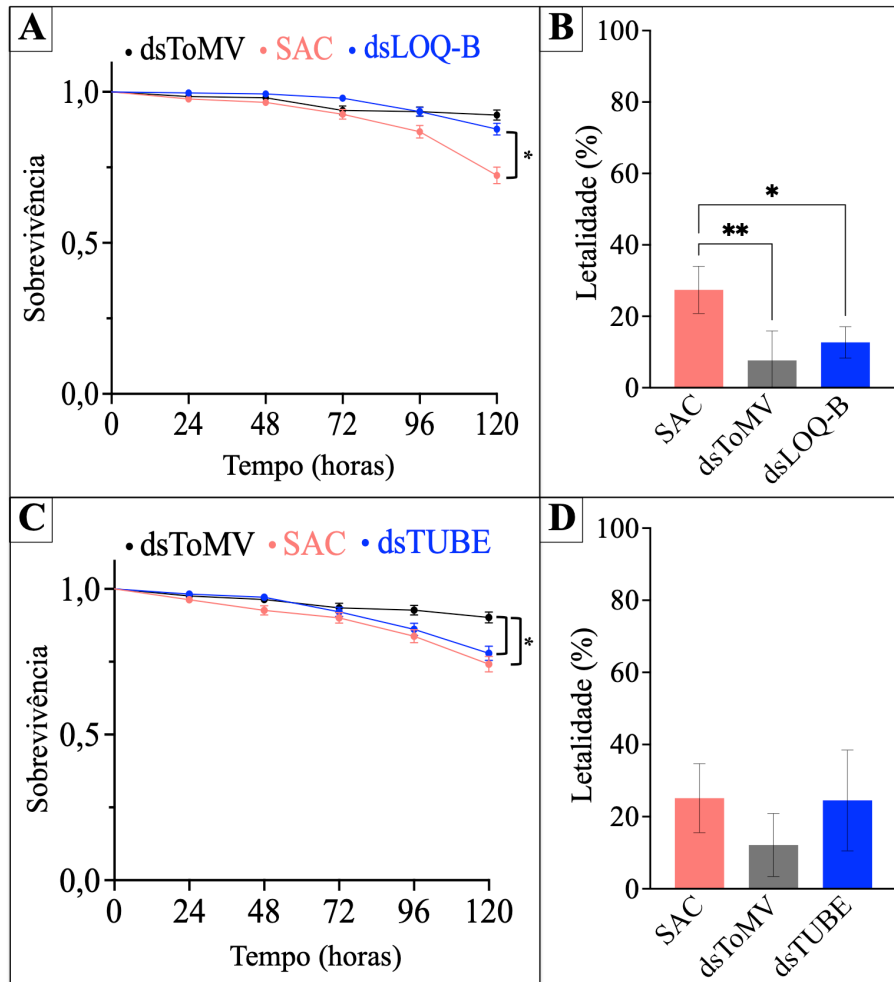


Figura 11. Curvas de sobrevivência log rank comparando efeitos da administração de sacarose (SAC), dsToMV e dsRNAs contra o gene Loquacious (A) e Tuberina (C). Taxas de letalidade obtidas após 120 h de alimentação com dsLOQ-B (B) e com dsTUBE (D). Estão representadas as médias com o erro padrão da média, e as diferenças significativas indicadas com asteriscos, de acordo com teste de comparações múltiplas de Tukey (em B e D).

As proteínas Distroglicana e Laminina fazem parte do complexo dys-glicoproteico que liga a fibra muscular à matriz extracelular (Ehmsen et al. 2002). Trabalhos anteriores relataram efeitos negativos em moscas-brancas após o silenciamento da Distrofina, outra proteína que faz parte desse complexo (Bar et al. 2019). Aqui, após cinco dias de ingestão de

dsDIS visando silenciar Distroglicana, foi obtida taxa de letalidade de 20%. Não foram observadas diferenças significativas entre as taxas de letalidade e entre as curvas de sobrevivência dos tratamentos controle com dsDIS (Figura 12A,B), indicando que a alimentação com dsDIS também não causou efeitos relevantes nas moscas-brancas.

O uso de dsLAMI, também realizado com o objetivo de desestabilizar o complexo dysglicoproteico, resultou em 30% de letalidade em moscas-brancas. Não foi encontrada diferença significativa entre a taxa de letalidade de dsLAMI em relação aos controles dsToMV e SAC (Figura 12D), porém as comparações realizadas na análise de sobrevivência indicaram diferença significativa entre as curvas dos tratamentos dsLAMI e dsToMV, que apresentou 19% de letalidade (Figura 12C).

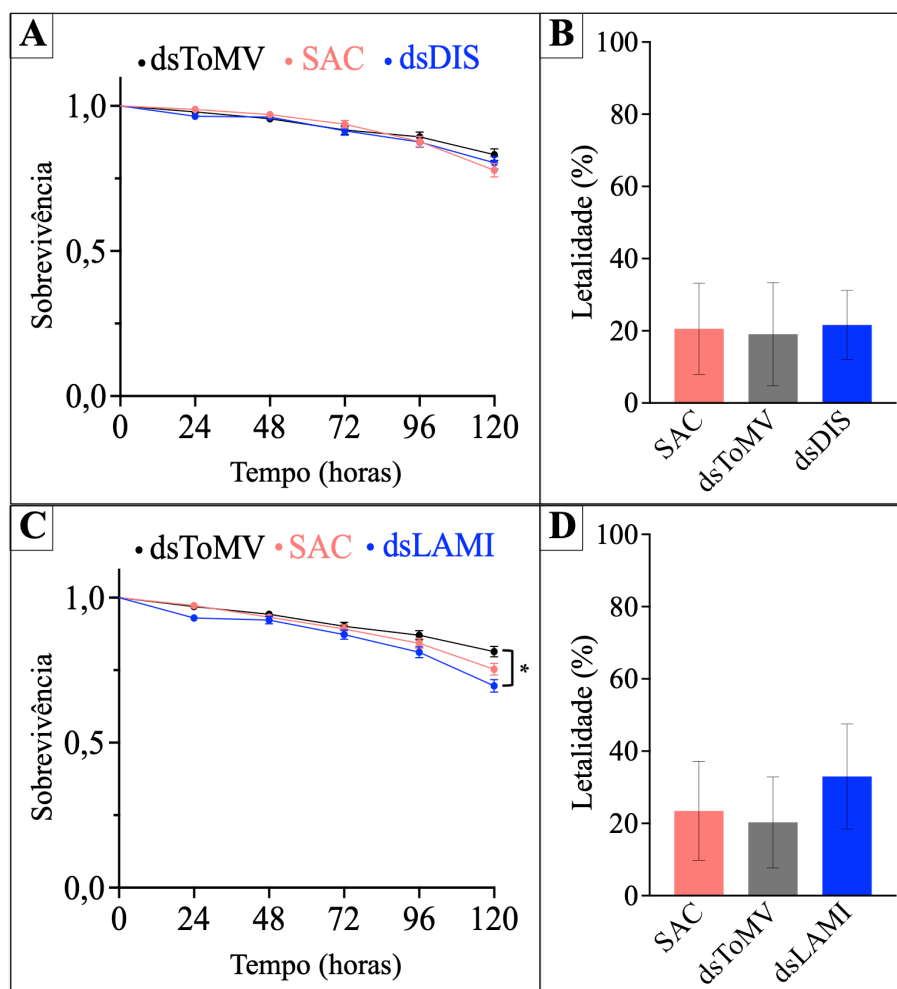


Figura 12. Curvas de sobrevivência log rank comparando efeitos da administração de sacarose (SAC), dsToMV e dsRNAs contra a proteína Distroglicana (A) e Laminina (C). Taxas de letalidade obtidas após 120 h de alimentação com dsDIS (B) e com dsLAMI (D). Estão representadas as médias com o erro padrão da média e as diferenças significativas indicadas com asteriscos, de acordo com teste de comparações múltiplas de Tukey (em B e D).

O uso de dsRNA contra a proteína Laminina apresentou os efeitos mais relevantes dentre todas as proteínas-alvo selecionadas, por isso, os níveis de expressão de Laminina nos tratamentos realizados foram avaliados com o objetivo de verificar o silenciamento da proteína nas moscas-brancas após 120 h ingerindo continuamente dsLAMI.

Conforme o esperado, foi verificado que os níveis de expressão de Laminina estavam significativamente mais baixos em moscas-brancas alimentadas com dsRNAs do que no tratamento controle, SAC (Figura 13). As moscas-brancas de dsLAMI expressaram aproximadamente 45% menos o gene-alvo. A expressão em dsToMV também foi alta, porém não apresentou diferença significativa em relação a dsLAMI.

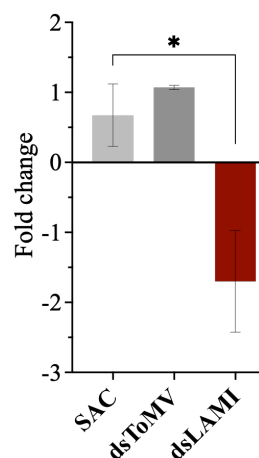


Figura 13. Expressão relativa do gene da proteína Laminina em adultos de mosca-branca após 120 h de alimentação com SAC, dsToMV ou dsLAMI. Gene-alvo foi normalizado em relação ao gene da Actina e quantificado utilizando método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os valores são médias + erro padrão da média. A expressão dos genes está representada utilizando como referência a expressão na amostra SAC.

A avaliação da expressão de Laminina nos insetos alimentados com dsLAMI indicou que há uma baixa detecção de RNA específico de Laminina nos insetos, quando comparado com moscas-brancas que não se alimentaram com o dsLAMI. Isso indica que a administração de dsRNAs induz o silenciamento gênico e esta é uma técnica promissora que necessita de alguns ajustes no método.

Após 120 h de alimentação em dieta contendo $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de dsHSP70-B, apenas 18% das moscas-brancas morreram (Figura 14B). As comparações realizadas na análise de sobrevivência indicaram diferenças estatisticamente significativas entre os três tratamentos dsHSP70-B, dsToMV e SAC (Figura 14A), porém esse resultado não é relevante e foi resultado da letalidade mais alta apresentada em SAC, de 27% (Figura 14B). O silenciamento do gene da proteína HSP70 já foi relatado por alguns trabalhos como letal às moscas-brancas

(Lü e Wan 2011; Shim et al. 2015; Vyas et al. 2017), porém em nossos resultados essa letalidade não foi observada.

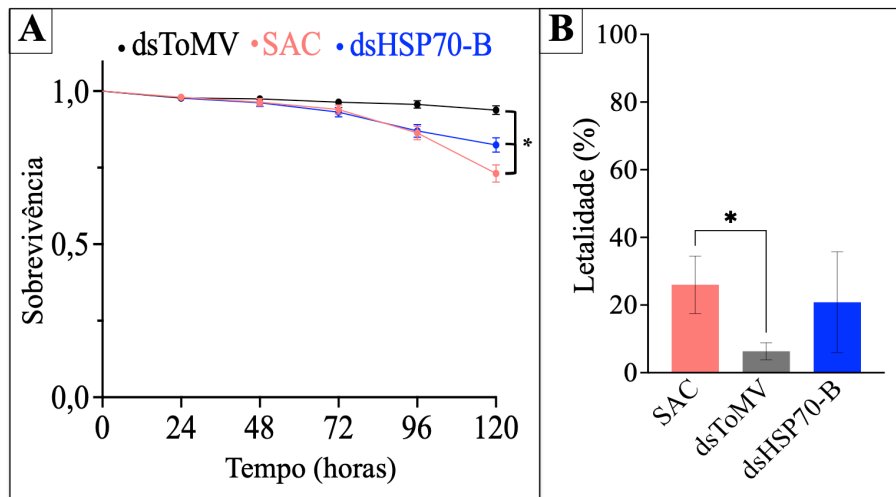


Figura 14. Curvas de sobrevivência log rank comparando efeitos da administração de sacarose (SAC), dsToMV e dsRNAs contra a proteína HSP90 (A). Taxas de letalidade obtidas após 120 h de alimentação com dsHSP70-B (B). Estão representadas as médias com o erro padrão da média, e as diferenças significativas indicadas com asteriscos, de acordo com teste de comparações múltiplas de Tukey (em B e D).

Os efeitos da administração de dsRNA contra os genes para as proteínas-alvo Loquacious, Distroglucana, Tuberina e HSP70 foram de baixas taxas de letalidade, com curvas de sobrevivência similares àquelas dos controles negativos, sem evidenciar os efeitos negativos esperados.

A proteína Loquacious tem um papel importante na biogênese dos miRNAs, importantes na regulação de processos essenciais no organismo dos insetos. A ausência de efeitos negativos após seu silenciamento pode ter sido causada pela continuidade da expressão de outras proteínas capazes de processar pré-miRNAs, como por exemplo a proteína Argonauta-1 (Saito et al. 2005). Outra justificativa para o resultado seria a expressão mais elevada da proteína Loquacious em ninfas do que em adultos (Figura 10); portanto, estão sendo consideradas outras estratégias para realização de experimentos que investiguem os efeitos do silenciamento desse gene em ninfas.

Bar et al. (2019) entregaram dsRNAs a ninfas que estavam se desenvolvendo em folhas de tomate a partir da inserção das raízes das plântulas em solução contendo dsRNAs. Essa é uma alternativa que pode ser empregada para a avaliação dos efeitos da ingestão de dsLOQ, dsDIS e dsTUBE por moscas-branca desde os primeiros estádios ninfais.

A ausência dos efeitos esperados no tratamento dsHSP70-B (Lü e Wan 2011; Shim et al. 2015; Vyas et al. 2017) pode ter ocorrido devido aos níveis de expressão dessa proteína ser mais baixo em adultos (Figura 10), como ocorreu em Loquacious, ou devido à expressão compensatória de um homólogo. A alta expressão de HSP70 é essencial para a proteção

contra o calor e o experimento foi realizado em temperaturas de 26 a 30 °C, logo, a ausência de estresse térmico também pode ter contribuído para os resultados obtidos aqui.

A baixa letalidade dos insetos após ingestão de dsHSP70-B e dos outros dsRNAs também pode indicar a ocorrência de degradação dos dsRNAs por RNases no intestino das moscas-brancas. Shim et al. (2015) observaram taxas de letalidade maiores que 40% após o silenciamento de HSP70 em moscas-brancas após 120 h de alimentação. Apesar de muitos autores relatarem a administração de dsRNAs “sem proteção” e sucesso no silenciamento com a estratégia (Lü e Wan 2011; Vyas et al. 2017; Grover et al. 2018; Upadhyay et al. 2011), outros vêm alertando quanto à limitação imposta por essa degradação inespecífica dos dsRNAs que leva ao decaimento da eficiência de silenciamento dos genes-alvo (Luo et al. 2017; Wang et al. 2016).

Já foram sugeridas opções para contornar o problema de degradação, como por exemplo a conjugação dos dsRNAs a nanopartículas antes da administração às moscas-brancas por via oral. A conjugação com “Carbon quantum dots” (CQD) resultou em proteção contra a degradação por nucleases do intestino e aumentou a eficiência de silenciamento de diversos genes-alvo. A eficiência de silenciamento de HSP40 em relação ao controle, por exemplo, foi de 61,7% utilizando apenas dsHSP40 para 99,4% administrando dsRNAs conjugados com CQD contra HSP40 e RNases (Kaur et al. 2020).

Outra opção é a administração concomitante de dsRNAs contra os genes que codificam as nucleases intestinais responsáveis pela degradação. Essa estratégia foi testada e também reduziu a degradação não específica do dsRNA e aumentou a eficácia do mecanismo de RNAi em moscas-brancas (Luo et al. 2017). O uso de vários dsRNAs pode ser uma estratégia potencial para prolongar a eficácia do controle, visto que as moscas-brancas já são conhecidas pela vulnerabilidade a mutações genéticas e desenvolvimento de resistência (Grover et al. 2018).

Devido ao papel das proteínas Distroglicana e Tuberina, considera-se que baixa letalidade observada após a alimentação das moscas-brancas com dsDIS e dsTUBE pode ter ocorrido devido à baixa eficiência do silenciamento por conta de fatores como a dose de dsRNAs utilizada e/ou degradação dos dsRNAs no intestino. Ensaio que verifiquem a expressão dessas proteínas após a ingestão dos dsRNAs e a degradação desses dsRNAs no intestino serão necessários para maiores conclusões sobre as taxas de letalidade observadas.

O uso do dsLAMI, apesar de apresentar letalidade abaixo da desejada, indicou alguma tendência à letalidade nas análises das curvas de sobrevivência. Embora tenha sido obtido um resultado mais promissor com a ingestão de dsLAMI, nenhum dos dsRNAs causaram taxas de

letalidade elevadas que justifiquem o avanço do seu uso para abordagens de entrega mais complexas. Entretanto, a hipótese de degradação dos dsRNAs indicada pelos resultados obtidos no tratamento dsHSP70-B será investigada, pois pode estar atuando como principal fator limitante para obtenção de letalidades mais altas.

Para isso, serão realizados ensaios com dsLAMI e o emprego de dsRNAs contra a principal RNase que atua no lúmen do intestino. O silenciamento da RNase visa reduzir a degradação dos dsRNAs e aumentar a eficiência do silenciamento dos genes-alvo, para verificar se os efeitos negativos serão mais intensos e se resultarão em maiores taxas de letalidade.

A técnica utilizada para a entrega dos dsRNAs às moscas-brancas, utilizando tubos com membranas de parafilmes contendo a dieta artificial é relativamente simples de ser executada, entretanto alguns cuidados devem ser considerados para sua realização. A correta manipulação para a montagem inicial dos tubos e para a troca da dieta é um fator que define o sucesso do experimento. Adicionalmente, as mesmas dificuldades encontradas por Upadhyay et al. (2011) para a manutenção de um número fixo de insetos por repetição foram enfrentadas aqui.

Tomados os cuidados necessários, o uso do dsRNA produzido *in vitro* com kit próprio mostrou-se um método efetivo para a regulação da expressão gênica. Aqui, a ingestão de dsLAMI foi capaz de reduzir a expressão gênica da Laminina. A estratégia também foi eficiente para indicar que a concentração de dsLOQ, dsDIS, dsTUBE e dsHSP70 “sem proteção” utilizada não foi eficiente e devem ser feitas mudanças na concentração, na composição ou nos estádios da mosca-branca avaliados. É importante frisar que a ausência de letalidade com o silenciamento de um gene selecionado também é um resultado importante para guiar os passos seguintes dos estudos relacionados ao controle das moscas-brancas utilizando a tecnologia RNAi.

CONCLUSÕES

Os níveis de expressão da proteína Loquacious em moscas-brancas é maior até o 3º estágio ninfal e há decaimento a partir do 4º, indicando o estágio ninfal como mais adequado para o silenciamento deste gene visando o controle do inseto.

A expressão da proteína HSP70 decresce a partir do 3º estágio ninfal de moscas-brancas criadas em temperaturas entre 26 e 30 °C, indicando que os estádios iniciais (1º e 2º) são alvos mais adequados para o silenciamento deste gene visando causar a letalidade das moscas-brancas.

O dsRNA comercial adquirido continha compostos tóxicos às moscas-brancas e precisou ser purificado antes do uso em bioensaios de entrega por via oral em dieta artificial.

A purificação de dsRNAs comerciais tem eficiência variável e pode gerar desperdícios e custos adicionais devido à baixa taxa de recuperação de moléculas de dsRNA após os procedimentos.

O uso de dieta de solução de sacarose a 30% e de kits comerciais para a síntese do dsRNA em laboratório é a estratégia mais adequada para realização de experimentos de entrega de dsRNA por via oral em dieta artificial às moscas-brancas.

A administração de 0,5 µg/µL de dsRNAs contra os genes para as proteínas Loquacious, Distroglicana, Tuberina e HSP70 por 120 h não causou efeitos letais ou interferências na curva de sobrevivência dos insetos.

A baixas taxas de letalidade observadas podem estar relacionadas a baixa expressão dos genes em adultos, dose insuficiente para desencadear o mecanismo de RNAi ou degradação dos dsRNAs no intestino causando baixa eficiência de silenciamento.

A expressão da Laminina decaiu no tratamento com ingestão de dsLAMI e causou a letalidade mais alta dentre os genes utilizados nesse trabalho, com diferença significativa na análise de sobrevivência em relação a dsToMV. Aparentemente há tendência de letalidade como consequência de seu silenciamento, porém a eficiência pode não ter sido suficiente para causar efeitos maiores, necessitando de doses mais altas de dsRNAs ou técnicas que protejam o dsLAMI contra a degradação no intestino.

A utilização de alimentação em dieta artificial se mostrou como um método adequado para o rastreamento de genes-alvo e, feitas as correções necessárias para diminuir a degradação do dsRNA, estudos futuros com a Laminina, o gene mais promissor, serão realizados para a obtenção de maior eficiência de silenciamento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os surtos de viroses nos campos de cultivo de tomateiro, causados pelas moscas-brancas e os begomovírus transmitidos por elas, e as dificuldades para conter os prejuízos decorrentes enfatizam a importância das pesquisas relacionadas a esse patossistema. O levantamento das espécies de begomovírus presentes nos campos de produção gera informações essenciais que irão auxiliar na detecção precoce de novas variantes e espécies.

A descrição precoce de novas espécies ou variantes permite a verificação prévia de características do isolado que envolvem quebra de resistência dos genes utilizados, sintomas e danos causados em cultivares resistentes, suscetíveis e/ou em outras espécies de plantas, eficiência de transmissão pelo vetor, dentre outros. O conhecimento dessas características contribui para o desenvolvimento e a implementação de medidas de controle duráveis e eficientes.

A descrição do tomate begomovirus MoLDi foi realizada nesse trabalho; algumas características moleculares já foram verificadas a partir do seu genoma completo obtido por sequenciamento com Tecnologia Nanopore e por Sanger. Para prosseguir com os estudos que visam verificar seu potencial de impacto na cultura de tomate, o clone infeccioso do seu DNA-A já foi obtido e a construção do clone infeccioso do DNA-B está em andamento. A descoberta de ToMoLDiV confirma o aumento do surgimento de novas espécies que é observado nessa cultura nos últimos anos.

O manejo dos begomovírus envolve o controle adequado das moscas-brancas, sendo essencial evitar densas populações com alta diversidade genética, que favorecem o desenvolvimento de resistência aos produtos químicos utilizados e o surgimento de novas espécies de begomovírus, devido a continuidade da disseminação desses vírus nos campos.

O surgimento de populações do inseto-vetor resistentes aos princípios ativos utilizados está associado ao uso inadequado desses produtos químicos. A ineficácia das técnicas atuais para o controle das moscas-brancas serviu como um incentivo para os estudos que investigam o uso do RNAi para o controle dessas pragas. Pesquisas que buscam novos genes-alvo potenciais permitirão avanços necessários para a posterior implementação dessa técnica no campo.

No presente trabalho, a estratégia de entrega a moscas-brancas adultas de um dsRNA sintetizado *in vitro* contido em uma dieta artificial foi utilizada para observar os efeitos de letalidade após a ingestão de dsRNAs para o silenciamento dos genes das proteínas Loquacious, Distroglicana, Tuberina, HSP70 e Laminina. Conforme observado em outros

trabalhos científicos presentes na literatura, foi verificado que essa abordagem é adequada para a rastreamento dos genes-alvo candidatos.

Um potencial maior foi observado no uso de dsLAMI, sintetizado para silenciar a proteína Laminina. Sua ingestão causou menor expressão do gene da Laminina em relação ao controle, uma letalidade de 30% e diferenças significativas entre a curva de sobrevivência do tratamento alimentado com dsLAMI e o com o dsRNA controle, dsToMV.

Para continuidade dos estudos, o primeiro passo será a verificação da degradação inespecífica dos dsRNAs dentro do intestino dos insetos. Isso foi relatado como a principal limitação para o sucesso do uso do RNAi para o controle das moscas-brancas, devido à baixa absorção de moléculas de dsRNAs que diminui significativamente a eficiência do silenciamento.

Também será realizada a administração dos dsRNAs para o silenciamento dos genes em outros estádios de vida do inseto. A maior expressão das proteínas Loquacious e HSP70 em estádios ninfais do inseto reforça a necessidade do emprego de uma abordagem que permita a troca da fase de desenvolvimento alvo. A quantificação da expressão dos demais genes nas diferentes fases de desenvolvimento também será realizada para direcionar a continuidade ou não do uso dos seus dsRNAs para o controle das moscas-brancas.

Todos os resultados obtidos aqui contribuem para os avanços na busca pelo controle dos begomovírus e das moscas-brancas que afetam o cultivo de tomate no país e no mundo. Não foi possível obter conclusões que justifiquem o uso desses dsRNAs com abordagens mais avançadas como a expressão em plantas, porém a continuidade das investigações iniciadas irá gerar conhecimento capaz de contribuir futuramente para a tão esperada implementação da tecnologia RNAi para o controle das moscas-brancas no campo.

REFERÊNCIAS

- Asokan, R., Rebijith, K. B., Roopa, H. K., e Kumar, N. K. K. 2015. Non-invasive delivery of dsGST is lethal to the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (G.) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175:2288–2299.
- Bar, L., Czosnek, H., Sobol, I., Ghanim, M., e Hariton Shalev, A. 2019. Downregulation of dystrophin expression in pupae of the whitefly *Bemisia tabaci* inhibits the emergence of adults. *Insect Mol. Biol.* 28:662–675.
- Barbosa, L. da F., Marubayashi, J. M., De Marchi, B. R., Yuki, V. A., Pavan, M. A., Moriones, E., et al. 2014. Indigenous American species of the *Bemisia tabaci* complex are still widespread in the Americas. *Pest Manag. Sci.* 70:1440–1445.
- Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., et al. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 25:1322–1326.
- Brito, P. F. de, Gomide, M., e Câmara, V. de M. 2009. Agrotóxicos e saúde: realidade e desafios para mudança de práticas na agricultura. *Physis Rev. Saúde Coletiva.* 19:207–225.
- Chen, W., Hasegawa, D. K., Kaur, N., Kliot, A., Pinheiro, P. V., Luan, J., et al. 2016. The draft genome of whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1, a global crop pest, provides novel insights into virus transmission, host adaptation, and insecticide resistance. *BMC Biol.* 14:1–15.
- Colvin, J., Omongo, C. A., Maruthi, M. N., Otim-Nape, G. W., e Thresh, J. M. 2004. Dual begomovirus infections and high *Bemisia tabaci* populations: Two factors driving the spread of a cassava mosaic disease pandemic. *Plant Pathol.* 53:577–584.
- Dadd, R. H., e Mittler, T. E. 1966. Permanent culture of an aphid on a totally synthetic diet. *Experientia.* 22:832–833.
- Dângelo, R. A. C., Michereff-Filho, M., Campos, M. R., da Silva, P. S., e Guedes, R. N. C. 2018. Insecticide resistance and control failure likelihood of the whitefly *Bemisia tabaci* (MEAM1; B biotype): a Neotropical scenario. *Ann. Appl. Biol.* 172:88–99.
- Eakteiman, G., Moses-Koch, R., Moshitzky, P., Mestre-Rincon, N., Vassão, D. G., Luck, K., et al. 2018. Targeting detoxification genes by phloem-mediated RNAi: A new approach for controlling phloem-feeding insect pests. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 100:10–21.
- Ehmsen, J., Poon, E., e Davies, K. 2002. Dystrophin-associated protein complex and heart failure. *J. Cell Sci.* 115:2801–2803.
- Escriu, F., Fraile, A., e García-Arenal, F. 2003. The evolution of virulence in a plant virus. *Evolution (N. Y).* 57:755–765.
- Geng, L., Qian, L. X., Shao, R. X., Liu, Y. Q., Liu, S. S., e Wang, X. W. 2018. Transcriptome profiling of whitefly guts in response to Tomato yellow leaf curl virus infection. *Viol. J.* 15:1–12.
- Gillet, F. X., Garcia, R. A., Macedo, L. L. P., Albuquerque, E. V. S., Silva, M. C. M., e Grossi-de-Sa, M. F. 2017. Investigating engineered ribonucleoprotein particles to improve oral RNAi delivery in crop insect pests. *Front. Physiol.* 8:1–14.

- Grover, S., Jindal, V., Banta, G., Taning, C. N. T., Smagghe, G., e Christiaens, O. 2018. Potential of RNA interference in the study and management of the whitefly, *Bemisia tabaci*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 100:1–17.
- Horn, T., e Boutros, M. 2010. E-RNAi: A web application for the multi-species design of RNAi reagents-2010 update. Nucleic Acids Res. 38:332–339.
- Horowitz, A. R., Ghanim, M., Roditakis, E., Nauen, R., e Ishaaya, I. 2020. Insecticide resistance and its management in *Bemisia tabaci* species. J. Pest Sci. (2004). 93:893–910.
- Jain, Robinson, e Mitter. 2019. RNAi-Mediated management of whitefly *Bemisia tabaci* by oral delivery of double-stranded RNAs. Proceedings. 36:11.
- Kanakala, S., e Ghanim, M. 2019. Global genetic diversity and geographical distribution of *Bemisia tabaci* and its bacterial endosymbionts. PLoS One. 14.
- Kaur, R., Gupta, M., Singh, S., Joshi, N., e Sharma, A. 2020. Enhancing RNAi Efficiency to Decipher the Functional Response of Potential Genes in *Bemisia tabaci* AsiaII-1 (Gennadius) Through dsRNA Feeding Assays. Front. Physiol. 11:1–14.
- Li, R., Xie, W., Wang, S., Wu, Q., Yang, N., Yang, X., et al. 2013. Reference Gene Selection for qRT-PCR Analysis in the Sweetpotato Whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). PLoS One. 8:1–8.
- Liu, N., Landreh, M., Cao, K., Abe, M., Hendriks, G. J., Kennerdell, J. R., et al. 2012. The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in *Drosophila*. Nature. 482:519–523.
- Lü, Z. C., e Wan, F. H. 2011. Using double-stranded RNA to explore the role of heat shock protein genes in heat tolerance in *Bemisia tabaci* (Gennadius). J. Exp. Biol. 214:764–769.
- Luan, J. B., Ghanim, M., Liu, S. S., e Czosnek, H. 2013. Silencing the ecdysone synthesis and signaling pathway genes disrupts nymphal development in the whitefly. Insect Biochem. Mol. Biol. 43:740–746.
- Lucas, K., e Raikhel, A. S. 2013. Insect MicroRNAs: Biogenesis, expression profiling and biological functions. Insect Biochem. Mol. Biol. 43:24–38.
- Lück, S., Kreszies, T., Strickert, M., Schweizer, P., Kuhlmann, M., e Douchkov, D. 2019. siRNA-Finder (si-Fi) Software for RNAi-Target Design and Off-Target Prediction. Front. Plant Sci. 10:1023.
- Luo, Y., Chen, Q., Luan, J., Chung, S. H., Van Eck, J., Turgeon, R., et al. 2017. Towards an understanding of the molecular basis of effective RNAi against a global insect pest, the whitefly *Bemisia tabaci*. Insect Biochem. Mol. Biol. 88:21–29.
- Malik, H. J., Raza, A., Amin, I., Scheffler, J. A., Scheffler, B. E., Brown, J. K., et al. 2016. RNAi-mediated mortality of the whitefly through transgenic expression of double-stranded RNA homologous to acetylcholinesterase and ecdysone receptor in tobacco plants. Sci. Rep. 6:1–11.
- Mao, J., e Zeng, F. 2014. Plant-mediated RNAi of a gap gene-enhanced tobacco tolerance against the *Myzus persicae*. Transgenic Res. 23:145–152.
- Mao, Y. B., Cai, W. J., Wang, J. W., Hong, G. J., Tao, X. Y., Wang, L. J., et al. 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. Nat. Biotechnol. 25:1307–1313.

- March, J. C., e Bentley, W. E. 2006. Engineering eukaryotic signal transduction with RNAi: Enhancing *Drosophila* S2 cell growth and recombinant protein synthesis via silencing of TSC1. *Biotechnol. Bioeng.* 95:645–652.
- Mota-Sanchez, D., e Wise, J. J. Arthropod Pesticide Resistance Database.
- Murphy, K. A., Tabuloc, C. A., Cervantes, K. R., e Chiu, J. C. 2016. Ingestion of genetically modified yeast symbiont reduces fitness of an insect pest via RNA interference. *Sci. Rep.* 6:1–13.
- Perring, Thomas M., Stansly, P. A., Liu, T. X., Smith, H. A., e Andreason, S. A. 2018. Whiteflies: Biology, Ecology, and Management. In *Sustainable Management of Arthropod Pests of Tomato*, orgs. Waqas. Wakil, Gerald. Brust, e T.M. Perring. Elsevier Inc., p. 73–110.
- Raza, A., Malik, H. J., Shafiq, M., Amin, I., Scheffler, J. A., Scheffler, B. E., et al. 2016. RNA interference based approach to down regulate osmoregulators of whitefly (*Bemisia tabaci*): Potential technology for the control of whitefly. *PLoS One.* 11:1–13.
- Rego-Machado, C. M., Nakasu, E. Y. T., Silva, J. M. F., Lucinda, N., Nagata, T., e Inoue-Nagata, A. K. 2020. siRNA biogenesis and advances in topically applied dsRNA for controlling virus infections in tomato plants. *Sci. Rep.* 10:1–13.
- Saito, K., Ishizuka, A., Siomi, H., e Siomi, M. C. 2005. Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in drosophila cells. *PLoS Biol.* 3:1202–1212.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., e Maniat, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2a ed. New York, USA.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saxton, R. A., e Sabatini, D. M. 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell.* 168:960–976.
- Scott, J. G., Michel, K., Bartholomay, L. C., Siegfried, B. D., Hunter, W. B., Smagghe, G., et al. 2013. Towards the elements of successful insect RNAi. *J. Insect Physiol.* 59:1212–1221.
- Seal, S. E., VandenBosch, F., e Jeger, M. J. 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 25:23–46.
- Shim, J. K., Lee, G. S., Lee, S., e Lee, K. Y. 2015. Oral ingestion of heat shock protein 70 dsRNA is lethal under normal and thermal stress conditions in the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. *J. Asia. Pac. Entomol.* 18:797–800.
- Silva, L. D., Omoto, C., Bleicher, E., e Dourado, P. M. 2009. Monitoring the susceptibility to insecticides in *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) populations from Brazil. *Neotrop. Entomol.* 38:116–125.
- Suhag, A., Yadav, H., Chaudhary, D., Subramanian, S., Jaiwal, R., e Jaiwal, P. K. 2020. Biotechnological interventions for the sustainable management of a global pest, whitefly (*Bemisia tabaci*). *Insect Sci.* :1–22.
- Taghli-Lamalle, O., Akasaka, T., Hogg, G., Nudel, U., Yaffe, D., Chamberlain, J., et al. 2008. Dystrophin deficiency in *Drosophila* reduces lifespan and causes a dilated cardiomyopathy phenotype. *Aging Cell.* 7:237–249.
- Tapon, N., Ito, N., Dickson, B. J., Treisman, J. E., e Hariharan, I. K. 2001. The *Drosophila* tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation. *Cell.* 105:345–355.

- Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J. S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., et al. 2011. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J. Insect Physiol.* 57:231–245.
- Thakur, N., Upadhyay, S. K., Verma, P. C., Chandrashekar, K., Tuli, R., e Singh, P. K. 2014. Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of v-ATPase a gene. *PLoS One.* 9:1–9.
- Tian, L., Zeng, Y., Xie, W., Wu, Q., Wang, S., Zhou, X., et al. 2019. Genome-wide identification and analysis of genes associated with RNA interference in *Bemisia tabaci*. *Pest Manag. Sci.* 75:3005–3014.
- Upadhyay, S. K., Chandrashekar, K., Thakur, N., Verma, P. C., Borgio, J. F., Singh, P. K., et al. 2011. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. *J. Biosci.* 36:153–161.
- Upadhyay, S. K., Dixit, S., Sharma, S., Singh, H., Kumar, J., Verma, P. C., et al. 2013. SiRNA machinery in whitefly (*Bemisia tabaci*). *PLoS One.* 8:1–10.
- van der Weijden, W., Leewis, R., e Bol, P. 2007. Biological Globalisation: Bio-invasions and their impacts on nature, the economy and public health. In *Biological Globalisation*, KNNV, p. 206–208.
- Vogel, E., Santos, D., Mingels, L., Verdonckt, T. W., e Broeck, J. Vanden. 2019. RNA interference in insects: Protecting beneficials and controlling pests. *Front. Physiol.* 10:1–21.
- Vyas, M., Raza, A., Ali, M. Y., Ashraf, M. A., Mansoor, S., Shahid, A. A., et al. 2017. Knock down of whitefly gut gene expression and mortality by orally delivered gut gene-specific dsRNAs. *PLoS One.* 12.
- Wang, X. W., Luan, J. B., Li, J. M., Bao, Y. Y., Zhang, C. X., e Liu, S. S. 2010. De novo characterization of a whitefly transcriptome and analysis of its gene expression during development. *BMC Genomics.* 11.
- Wang, X. W., Luan, J. B., Li, J. M., Su, Y. L., Xia, J., e Liu, S. S. 2011. Transcriptome analysis and comparison reveal divergence between two invasive whitefly cryptic species. *BMC Genomics.* 12.
- Wang, Z.-Z., Bing, X.-L., Liu, S.-S., e Chen, X.-X. 2017. RNA interference of an antimicrobial peptide, Btdef, reduces tomato yellow leaf curl china virus accumulation in the whitefly *Bemisia tabaci*. *Pest Manag. Sci.* 73:1421–1427.
- Whyard, S., Singh, A. D., e Wong, S. 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39:824–832.
- Yan, S., Qian, J., Cai, C., Ma, Z., Li, J., Yin, M., et al. 2020. Spray method application of transdermal dsRNA delivery system for efficient gene silencing and pest control on soybean aphid *Aphis glycines*. *J. Pest Sci.* (2004). 93:449–459.
- Yang, X., Xie, W., Li, R. M., Zhou, X. M., Wang, S. L., Wu, Q. J., et al. 2017. RNA interference-mediated knockdown of the hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase gene decreases thiamethoxam resistance in adults of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Sci. Rep.* 7:1–10.

Wang, K., Peng, Y., Pu, J., Fu, W., Wang, J., e Han, Z. 2016. Variation in RNAi efficacy among insect species is attributable to dsRNA degradation in vivo. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 77:1–9.

ANEXO I

Archives of Virology – Annotated Sequence Records

Nanopore sequencing of tomato mottle leaf distortion virus, a new bipartite begomovirus infecting tomato in Brazil

Thais P. Martins^{1,2}, Tadeu A. Souza², Patricia S. da Silva², Erich Y.T. Nakasu², Fernando L. Melo¹, Alice K. Inoue-Nagata^{2*}, Tatsuya Nagata^{1*}

¹Department of Molecular Biology, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

²Laboratory of Virology, Embrapa Vegetables, Brasilia, DF, Brazil

*Corresponding author.

Correspondence to Alice Kazuko Inoue-Nagata. Email: alice.nagata@embrapa.br; Tatsuya Nagata. Email: tatsuya@unb.br

ORCID

E.Y.T.Nakasu: 0000-0002-6275-8349

F.L. Melo: 0000-0002-9591-0239

A.K. Inoue-Nagata: 0000-0002-8355-9269

T. Nagata: 0000-0002-7114-017X

Abstract

During a survey in a tomato field in Luziânia (Goiás State, Brazil), a single plant presenting mottling, chlorotic spots, and leaf distortion was found. A new bipartite begomovirus sequence was identified by the Nanopore sequence technology, and confirmed by Sanger sequencing. The highest nucleotide identity match of the DNA-A component (2596 bases) was 81.64% with tomato golden leaf deformation virus (HM357456). Due to the current species demarcation criterion of 91% of nucleotide identity for DNA-A, we propose a new member of the genus Begomovirus, named tomato mottle leaf distortion virus.

Viruses of the genus Begomovirus (family Geminiviridae) have emerged as important plant pathogens in tropical and subtropical regions [1]. Begomoviruses have small, circular, singlestranded DNA genomes and are vectored by whiteflies of the Bemisia tabaci species complex. Their genome is arranged either in two components, referred to as DNA-A and DNA-B, or in a single DNA-A component [2]. Begomoviruses have a wide diversity due to high mutation [3] and recombination frequencies [4]. Notably, tomato plants are hosts to several begomoviruses in Brazil, and the emergence of new species has been continuously observed [5]. Here, we describe the sequence of a new bipartite begomovirus discovered infecting tomato in Brazil.

During a survey in a processing tomato field in Luziânia, Goiás state, Brazil (16°18'50.8" S, 47°42'35.2" W) in April 2020, a tomato plant (cv. AP533) with severe symptoms of mottling, leaf distortion, chlorotic spots, vein clearing, and leaf rolling (Fig. 1a) was observed. This isolate was named #22682 isolate. Total DNA was extracted [6], and the viral circular DNA was amplified using rolling-circle amplification (RCA, New England Biolabs – NEB, Ipswich, USA). The RCA product was then partially digested with PstI, BglIII, NcoI, and EcoRI (NEB), pooled and sequenced using the Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109) (Oxford Nanopore Technologies - ONT, Oxford, UK). Briefly, the digested DNA was treated with NEBNext Ultra™ II End Repair/dA-Tailing Module (NEB), ligated to AMX sequencing adapter with NEB Blunt/TA ligation Master Mix (NEB), and loaded onto the Flongle flowcell

(FLO-FLG106) on a MinION Mk1B (ONT). Raw FAST5 files were base-called under high accuracy mode (Guppy 4.4.2). Draft genomes were generated with TideHunter [7] and polished with Medaka v1.2.3 (<https://github.com/nanoporetech/medaka>). The contigs were transferred to Geneious 8.1.9 software (Biomatters Ltd. Auckland, New Zealand) and analyzed using the BLAST algorithm. Contigs presenting high identity with DNA-A and -B of begomoviruses were detected, and the full genome sequence of a potential new bipartite begomovirus was identified. To confirm it, both DNA-A and -B were Sanger sequenced. The DNA-A sequence was obtained from the direct sequencing of the RCA product, and from two dimeric clones in pCAMBIA0380 (Cambia Laboratory, Canberra, Australia), cloned after partial digestion with NcoI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The DNA-B sequence was obtained from a ligation of the RCA product digested with BglIII (NEB), adenylated with Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific), and cloned into pGEM-T Easy (Promega, Madison, USA).

The assembled DNA-A genomes from the RCA product, two dimeric clones in pCambia, and the Nanopore sequence contig were highly similar with 0-2 nucleotides mismatch. The clone BG14 containing the DNA-B fragment was 100% identical to the Nanopore sequence. The sequence of the DNA-A clone 16 (GenBank MW561191) was 2596 nt-long, while the DNA-B was 2578 nt-long (GenBank MW650837). The genome organization was typical of bipartite New World begomoviruses (Fig. 1b; DNA-A: CP, Rep, TrAP, REn, AC4; DNA-B: NSP, MP). The conserved geminiviral nonanucleotide sequence (TAATATTAC) was detected in both components, and they shared a common region of 180 nt with 98.33% identity. Furthermore, upstream the TATA box, the putative Rep binding sites TGTA and TGTAC were identified in both segments, strongly suggesting that they are cognate DNA segments. These putative core iteron sequences were observed in two tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV) sequences, whereas other ToMoLCV isolates and the closest begomoviruses contained other iteron-like sequences (Supplementary Fig. S1). The putative iteron related domain FQLN was present in the amino acid sequence of the Rep protein, identical to those observed in some isolates of ToMoLCV (AY049217, AY049215).

An SDT analysis [8] of the DNA-A showed the highest genome-wide identity of 81.64% with tomato golden leaf distortion virus (ToGLDV, HM357456), while the DNA-B shared 82.57% identity with tomato interveinal chlorosis virus-2 (ToICV2, MK087039) (Supplementary Fig. S2). Since the current species demarcation criterion of Begomovirus is 91% nucleotide identity of the DNA-A, we conclude that this isolate is a new member of the genus, and the name tomato mottle leaf distortion virus (ToMoLDiV) is proposed. Although ToMoLDiV DNA-A sequence is closer to ToGLDV, it clustered in a phylogenetic tree with tomato mosaic severe dwarf virus (ToMSDV) (Fig. 2a). The DNA-B clustered with ToICV2 (Figure 2b) in the same branch with ToMSDV. ToMoLDiV is thus closely related to ToGLDV, ToMSDV, and ToICV2.

Conflict of interest

The authors declare that they have no known competing interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this article.

Funding

This study was funded by FAP-DF (0193.001460/2016) and FAPESP (2018/18274-3)

Acknowledgement

The authors thank Mauricio Bakalarczyk for enabling collection of the sample. AKIN and TN are CNPq fellows.

Author contributions

All authors contributed to the study conception, design, material preparation, data collection and analysis. The first draft of the manuscript was written by Thais Pereira Martins, Erich Yukio Tempel Nakasu and Alice Kazuko Inoue Nagata, and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Rojas MR, Macedo MA, Maliano MR et al (2018) World Management of Geminiviruses. *Annu Rev Phytopathol* 56:637–677. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100327>
2. Zerbini FM, Briddon RW, Idris A et al (2017). ICTV virus taxonomy profile: Geminiviridae. *J Gen Virol* 98:131-133. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000738>
3. Lima A, Silva JC, Silva FN et al (2017) The diversification of begomovirus populations is predominantly driven by mutational dynamics. *Virus Evol* 3:1-14. <https://doi.org/10.1093/ve/vex005>
4. Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM (1999) Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265: 218–225. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0056>
5. Inoue-Nagata AK, Lima MF, Gilbertson RL (2016) A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Horticult Bras* 34:8–18. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620160000100002>
6. Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bull*, 19(1), 11–15.
7. Gao, Y, Liu, B, Wang, Y et al (2019) TideHunter: efficient and sensitive tandem repeat detection from noisy long-reads using seed-and-chain. *Bioinformatics* 35: i200-i207. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz376>
8. Muhire BM, Varsani A, Martin DP (2014) SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS One* 9:e108277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277>
9. Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol and Evol* 33:1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
10. Edgar, RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

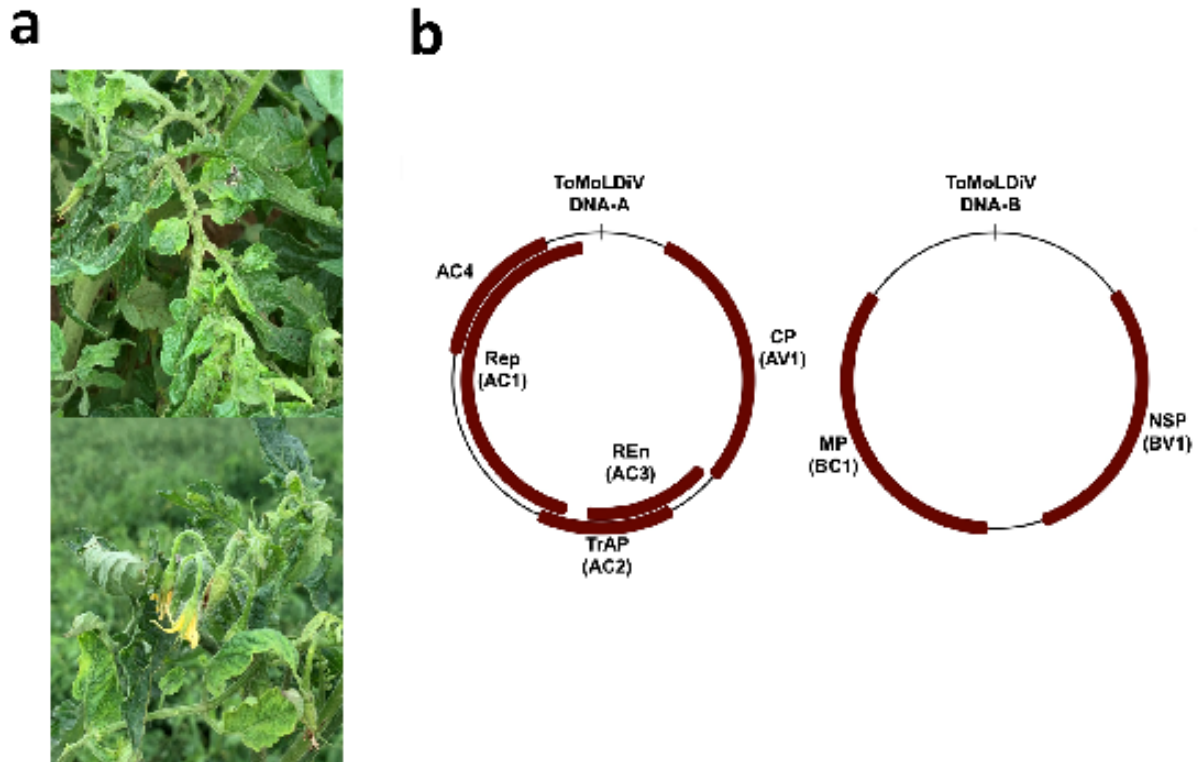


Fig. 1 a. Tomato plant (cv. AP533) showing mottling, leaf distortion, chlorotic spots, vein clearing, and leaf rolling symptoms collected in Luziânia, Goiás state, Brazil. b. Genome of ToMoLDiV containing two segments, and coding 5 ORFs in DNA-A and 2 ORFs in DNA-B.

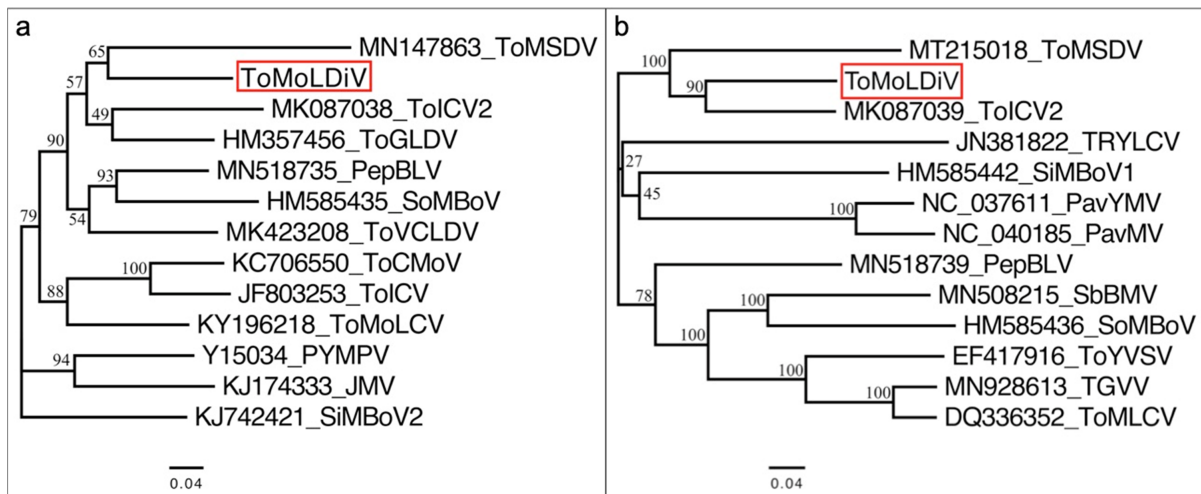


Fig. 2 Phylogenetic unrooted trees of ToMoLDiV and the closest begomoviruses generated with the maximum likelihood method (3000 replications), performed in Mega X [9] using the general time-reversible (a, DNA-A), and Hasegawa-Kishino-Yano (b, DNA-B) models, after aligning with MUSCLE [10]. The bootstrap values are shown at the nodes. The complete virus names are found in: https://talk.ictvonline.org/ictvreports/ictv_online_report/ssdnavirus/w/geminiviridae/479/member-species-begomovirus. Bar = substitutions per site.