



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

RNA de interferência como estratégia para controle de
begomoviroses

Nayhanne Tizzo de Paula

Brasília – DF
2015

Nayhanne Tizzo de Paula

RNA de interferência como estratégia para controle de
begomoviroses

Tese apresentada à Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular, pelo programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Francisco José Lima Aragão

Brasília – DF

2015

Nayhanne Tizzo de Paula

RNA de interferência como estratégia para controle de
begomoviroses

Tese apresentada à Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular, pelo programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular.

Comissão Examinadora

Dr. Francisco J L Aragão
Embrapa Cenargen/ UnB
Orientador

Dra. Diva Maria de Alencar Dusi
Embrapa Cenargen

Dr. Renato de O Resende
UnB

Dra. Simone da Graça Ribeiro
Embrapa Cenargen

Dra. Andrea Rachel Ramos Cruz Souza
Codevasf

Dra. Mirella Pupo Santos
Embrapa Cenargen
Suplente

Brasília – DF

2015

*Dedico este trabalho à minha mãe Rosa Francisca Silva, que sempre me incentivou
e é meu verdadeiro porto seguro.*

AGRADECIMENTOS

Eu começo agradecendo à Deus, por todas as bênçãos na minha vida.

À toda minha família. Em especial à minha mãe Rosa, por seu amor incondicional, suporte e incentivo durante toda a minha vida. Ao meu pai José Carlos e ao meu padrasto Rubismar, que sempre estiveram presentes nos momentos que eu precisei. À minha irmã Julliana e minha avó Irina, por todo seu amor e carinho.

Ao meu noivo André, meu amor, melhor amigo e confidente. Obrigada por ser essa pessoa tão paciente e positiva, que realmente faz a diferença na minha vida;

Ao meu orientador Dr. Francisco Aragão, que me abriu as portas do seu laboratório a cinco anos atrás. Obrigada pela confiança, oportunidade e pelos ensinamentos durante todo esse tempo. Trabalhar com um pesquisador exemplar como você, realmente contribuiu para o meu crescimento.

À Dra. Elisabeth Lampe, minha chefe na Fiocruz, que entendeu a importância do doutorado para minha carreira e permitiu que eu me afastasse do trabalho nesse último ano, para finalizar esse estudo. Muito obrigada pela compreensão e colaboração.

A todos os meus amigos do laboratório, por todo o auxílio. Em especial à minha grande amiga Cristiana Andrade, e ao meu amigo “my friend” Abdulrazak Baba por todo companheirismo e por todas as risadas que sempre fizeram parte da nossa rotina;

Ao meu amigo Leonardo Albuquerque, que foi muito importante no início desse trabalho, e me auxiliou muito em vários aspectos;

Aos pesquisadores Dra. Alice Kazuko Inoue-Nagata, Dr. Eduardo Romano de Campos Pinto, Dra. Simone da Graça Ribeiro e Dra. Andrea Rachel Ramos Cruz Souza por todas as sugestões durante a minha qualificação;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular que contribuíram para a minha formação, e à Ana pela atenção e disponibilidade de sempre;

Aos membros da banca examinadora Dra. Diva Maria de Alencar Dusi, Dr. Renato de O Resende, Dra. Simone da Graça Ribeiro, Dra. Andrea Rachel Ramos Cruz Souza e Dra. Mirella Pupo Santos, pela participação e contribuição na minha tese;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro;

E por fim, a todos aqueles que não foram citados, mas que sempre torceram por mim e me influenciaram positivamente.

Obrigada!

LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
RESUMO GERAL	XII
GENERAL ABSTRACT	XIV
1 CAPÍTULO 1	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 FAMÍLIA <i>GEMINIVIRIDAE</i>	2
1.2 O GÊNERO <i>BEGOMOVIRUS</i>	9
1.3 REPLICAÇÃO POR CÍRCULO ROLANTE (RCR)	21
1.4 TRANSMISSÃO DOS BEGOMOVÍRUS PELA MOSCA BRANCA (<i>Bemisia tabaci</i>)	24
1.5 BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIRO NO BRASIL	27
1.6 BEGOMOVÍRUS EM FEIJOEIRO NO BRASIL	31
1.7 RNA DE INTERFERÊNCIA	32
1.8 RNA DE INTERFERÊNCIA COMO ESTRATÉGIA PARA RESISTÊNCIA AOS BEGOMOVÍRUS	37
1.9 <i>Nicotiana benthamiana</i> COMO PLANTA MODELO	40
1.10 OBJETIVO GERAL	42
2 CAPÍTULO 2	43
REDUÇÃO DA CARGA VIRAL EM MOSCA BRANCA (<i>Bemisia tabaci</i> GEN.) SE ALIMENTANDO EM PLANTAS DE FEIJÃO TRANSGÊNICAS, RESISTENTES AO BEAN GOLDEN MOSAIC VIRUS, VIA RNAI	43
2.1 RESUMO	44
2.2 ABSTRACT	45
2.3 INTRODUÇÃO	46
2.4 MATERIAIS E MÉTODOS	48
2.4.1 ENSAIO BIOLÓGICO	48

2.4.2	PCR SEMI-QUANTITATIVA	48
2.4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51

3	CAPÍTULO 3	55
----------	-------------------	-----------

RNA DE INTERFERÊNCIA COMO ESTRATÉGIA PARA RESISTÊNCIA AMPLA A BEGOMOVÍRUS QUE INFECTAM TOMATEIRO (<i>Solanum lycopersicum</i>) NO BRASIL	55
---	-----------

3.1	RESUMO	56
3.2	ABSTRACT	57
3.3	INTRODUÇÃO	58
3.4	OBJETIVOS	60
3.4.1	OBJETIVO GERAL	60
3.4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
3.5	MATERIAIS E MÉTODOS	61
3.5.1	IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS CONSERVADAS DO GENE <i>REP</i>	61
3.5.2	CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO DE <i>hpRNA</i>	65
3.5.3	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DO CASSETE DE EXPRESSÃO DE <i>hpRNA</i>	68
3.5.4	TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS	68
3.5.5	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Nicotiana benthamiana</i> , VIA <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	71
3.5.6	TRIAGEM DAS LINHAGENS DE <i>N. benthamiana</i> TRANSGÊNICAS	72
3.5.7	TESTE DE PROGÊNIE	74
3.5.8	PREPARO DOS CLONES INFECCIOSOS	75
3.5.9	DESAFIO DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS, VIA BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS E ANÁLISE DAS PLANTAS DESAFIADAS:	78
3.5.10	ANÁLISE DA ZIGOSE DO TRANSGENE POR PCR QUANTITATIVA EM TEMPO-REAL (qPCR)	81
3.6	RESULTADOS	84

3.6.1	VETOR PC3300-FOURGEMINI	84
3.6.2	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DO <i>hpRNA</i> E SEQUÊNCIAS ALVO	87
3.6.3	LINHAGENS TRANSGÊNICAS DE <i>N. benthamiana</i>	90
3.6.4	TESTE DE PROGÊNIE	91
3.6.5	DESAFIO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS (T ₁) COM BEGOMOVÍRUS ASSOCIADOS A TOMATEIRO (<i>S. LYCOPERSICUM</i>)	93
3.6.6	DESAFIO DA GERAÇÃO T ₂ COM O VÍRUS TGVV	96
3.6.7	DESAFIO COM O VÍRUS ToRMV	105
3.6.8	DESAFIO COM O VÍRUS ToCMoV	109
3.6.9	DESAFIO COM RCA	112
3.7	DISCUSSÃO	116
3.8	CONCLUSÃO	122
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	123
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
6	ANEXO 1	157
7	ANEXO 2	161

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 3: RNA de interferência como estratégia para resistência ampla a begomovírus que infectam tomateiro (*Solanum lycopersicum*) no Brasil

Tabela 1: Lista dos 11 vírus que infectam tomateiro no Brasil, selecionados para a análise da sequência do gene <i>rep</i>	61
Tabela 2: Potenciais sequências de siRNAs identificadas pelo programa DSIR para a região alvo do gene <i>rep</i> . siRNA_id: identificação de cada siRNA. Position: Posição de cada siRNA na sequência alvo. SS Sequence: <i>Sense strand</i> (fita passageira). AS Sequence: <i>Antisense strand</i> (fita guia). Score: Predição de eficiência do siRNA. Corrected score: Predição de eficiência corrigida diante de alguns fatores intrínsecos da sequência-alvo, que podem influenciar a eficiência do siRNA.	88
Tabela 3: Análise do padrão de segregação da geração T ₁ de 20 linhagens transgênicas de <i>N. benthamiana</i> transformadas com o vetor pC3300-fourgemini	92
Tabela 4: Proporção de plantas da geração T ₁ infectadas, 30 dias após a inoculação com o vírus tomato golden vein virus (TGVV)	94
Tabela 5: Análise da zigose do transgene, via qPCR, em plantas da geração T ₂ inoculadas com TGVV (1000ng/μL).....	99
Tabela 6: Análise da zigose do transgene, via qPCR, em plantas da geração T ₂ inoculadas com ToRMV.....	107

Tabela 7: Análise da zigose do transgene, via qPCR, em plantas da geração T ₂ inoculadas com ToCMoV.....	110
Tabela 8: Análise da zigose do transgene, via qPCR, em plantas da geração T ₂ inoculadas com RCA do vírus tomato interveinal chlorosis virus (ToICV).....	114

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1: Revisão Bibliográfica

- Figura 1:** Organização genômica dos diferentes gêneros da família *Geminiviridae*. Os gêneros *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus* possuem organização do genoma similares, enquanto os *Mastrevirus*, *Becurtovirus* e *Eragrovirus* são bastante diversos e distintos dos outros geminivírus (LIR, Região intergênica longa; SIR, região intergênica curta; CR, região comum; rep, proteína associada à replicação; ren, potencializador de replicação; trap, proteína transativadora; ss, supressor de silenciamento; sd, determinante de sintomas; cp, proteína do capsídeo; mp, proteína do movimento; reg, gene regulatório; NSP, *nuclear shuttle protein*). É importante notar que o DNA-A de begomovírus bipartidos do velho mundo (África, Ásia, Austrália e Europa) contém a ORF V2, diferente daqueles encontrados nas Américas (Varsani et al., 2014)..... 8
- Figura 2:** Representação da proteína iniciadora da replicação (Rep) dos geminivírus. O tamanho da proteína é demonstrado pelo retângulo com linhas sólidas definindo as regiões responsáveis pela ligação ao DNA (aminoácidos 1-130), clivagem (aminoácidos 1–120) e oligomerização (aminoácidos 120–180). Na região N-terminal são demonstrados os motivos I, II e III (laranja), conservado entre as proteínas iniciadoras de replicação por círculo rolante e o motivo GRS (“Geminivirus rep sequence”) (azul). Em cinza estão representadas as regiões em alfa-hélice. A região C-terminal tem um domínio ATPase e engloba os motivos Walker A e Walker B (verde). O motivo walker C, presente na região C-terminal não está demonstrado na figura (Modificado de Rizvi et al., 2015).. 11
- Figura 3:** Organização genômica das moléculas satélites associadas a begomovírus. Betasatélites e alfasatélites codificam as proteínas β C1 e Rep respectivamente, e satélites defectivos não possuem ORF. A-rich, região rica em adenina; SCR, região conservada do satellite (Zhou, 2013). 18

Figura 4: Modelo para a replicação por círculo rolante dos geminivírus. O DNA fita-simples (ssDNA) é convertido em uma forma replicativa de DNA dupla-fita (dsDNA). A proteína Rep se liga a sequências específicas na região intergênica (IR), sofre oligomerização e cliva dentro da sequência de nove nucleotídeos conservada nos geminivírus em geral. Uma força replicativa, composta por diversos fatores do hospedeiro e virais, é formada na hidroxila-3' da fita de DNA clivada. A força de replicação é estendida e novas fitas de DNA viral vão sendo formadas, e clivadas novamente na sequência de nove nucleotídeos pela Rep, formando assim monômeros circulares. A síntese continuada resulta em formas concataméricas de DNA. Os vários fatores virais e do hospedeiro são demonstrados por diversas formas na figura. Proteína de replicação A32 (RPA32), fator de replicação C (RFC), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), DNA polimerase, e minicromossomo de manutenção 2 (MCM2) (Modificado de Rizvi et al., 2015).23

Figura 5: Mecanismo de RNA de interferência (RNAi): RNAs dupla-fita (dsRNAs) longos ou RNAs em forma de grampo (*hairpin* RNA-*hpRNA*) são clivados pela DICER em pequenos (20-25nt) RNAs interferentes (siRNAs), com 2nt *overhangs* nas regiões 3' e 5'. Eses siRNAs são incorporados em um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que contém uma proteína argonauta, a proteína DICER e outros fatores celulares. O RISC ativo, o qual contém a fita-guia de RNA, passa a reconhecer e clivar sequências de mRNA complementares. O RISC é novamente reutilizado em vários eventos de clivagem (Modificado de Rana et al., 2007)..... 35

Figura 6: Estratégia para obtenção de resistência a begomovírus, através do mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS). Plantas transgênicas modificadas para expressar um RNA em forma de grampo (*hpRNA*) com uma sequência do gene viral *rep* (que codifica para a proteína Rep, essencial para que ocorra a replicação viral). O *hpRNA* é convertido em siRNAs de dupla fita através da ação da DICER (DCL). Uma das fitas dos siRNAs é subsequente incorporada ao RISC. Guiado pela fita-guia proteínas Argonauta (AGO1) clivam o

mRNA alvo, resultando em silenciamento gênico. Após a infecção das células vegetais, begomovírus expressam a proteína Rep, que é essencial para que ocorra a replicação viral. No entanto, em plantas geneticamente modificadas, o gene *rep* é silenciado, resultando na não expressão dessa proteína, e interferindo no ciclo viral. 39

CAPÍTULO 2: Redução da carga viral em mosca branca (*Bemisia tabaci* Gen.) se alimentando em plantas de feijão transgênicas, resistentes ao bean golden mosaic virus, via RNAi

Figura 1: Detecção de pequenos RNAs interferentes (siRNAs), isolados a partir de folhas de plantas de feijão transgênicas (T) e não-transgênicas (NT). O RNA foi hibridizado com uma sonda de DNA, correspondente a um fragmento do gene *rep*, entre as posições 1.838 e 2.232 no genoma do bean golden mosaic virus (BGMV). O gel do RNA, corado com brometo de etídeo, está demonstrado (loading control). 53

Figura 2: Quantificação de DNA do bean golden mosaic virus (BGMV) em moscas brancas (*Bemisia tabaci*), se alimentando em plantas de feijão geneticamente modificadas (GM) e não-GM, por 4 e 8 dias. Para a análise semi-quantitativa, reações de PCR foram submetidas a um tratamento inicial a 95°C (5 min) e 25 ciclos de amplificação (95°C por 1 min, 55°C por 1 min, e 72°C por 1 min), com um ciclo de extensão de 5 min a 72°C. O gene da subunidade I da citocromo oxidase de *B. tabaci* (*BtCOI*) foi usado como controle interno. Dados representam a média ± desvio-padrão de três replicatas biológicas. ** P<0.05. 54

CAPÍTULO 3: RNA de interferência como estratégia para resistência ampla a begomovírus que infectam tomateiro (*Solanum lycopersicum*) no Brasil

Figura 1: Árvore filogenética baseada no alinhamento de 11 sequências do gene *rep* de diferentes isolados de begomovírus que infectam tomateiro no Brasil. Os vírus utilizados no alinhamento foram: tomato rugose mosaic virus (ToRMV), tomato severe rugose virus (ToSRV), tomato golden mosaic virus (TGMV), tomato mild mosaic virus (ToMIMV), tomato yellow spot virus (ToYSV), tomato leaf distortion virus (ToLDV), tomato yellow vein streak virus (ToYVSV), tomato golden vein virus (TGVV), tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV), tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) e tomato interveinal chlorosis virus (ToICV). A árvore foi construída pelo método *Neighbor-Joining*, com 1000 repetições “bootstraps”, utilizando o programa Mega 5.0 (Koichiro et al., 2011). Os quatro grupos com maior identidade nucleotídica são demonstrados por ramos de diferentes cores, sendo: verde para o grupo do vírus ToSRV, bege para o grupo do vírus ToLDV, cinza para o grupo do vírus TGVV e amarelo para o grupo do vírus ToMLCV. Os números abaixo dos ramos representam a porcentagem de vezes que cada ramo é repetido nas repetições “bootstraps” (Felsenstein, 1985)..... 63

Figura 2: Representação das regiões do gene *rep*, escolhidas para construção do cassete de expressão de *hpRNA*. As figuras representam o DNA-A completo dos vírus selecionados, com a localização do gene *rep* (roxo) no genoma, e a localização dentro desse gene das sequências escolhidas para construção do DNA quimérico para expressão do *hpRNA* (transgene *rep*). a) tomato severe rugose virus (ToSRV), com um DNA-A de 2.593 pb e a região de 326 pb, selecionada para construção do cassete de interferência, demonstrada em verde. b) tomato leaf distortion virus (ToLDV), com DNA-A de 2.645 pb, e a região selecionada de 320 pb demonstrada em bege. c) tomato golden vein virus (TGVV), com 2.564 pb e a região selecionada de 319 pb em cinza. d) tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV), com 2.631 pb, e a região de 321 pb selecionada demonstrada em amarelo. 64

Figura 3: Estratégia para construção de um cassete de expressão de *hpRNA* quimérico para silenciamento do gene *rep* de begomovírus. Uma sequência de DNA quimérico, formada por sequências de quatro grupos virais, dispostas *in*

tandem, foi clonada no vetor pSIU, entre os sítios XbaI e KpnI, resultando no vetor pSIU-fourgemini1. A mesma sequência foi clonada nesse vetor, em sentido contrário, entre os sítios SpeI e ApaI, resultando no vetor pSIU-fourgemini2. Isso permitiu a formação de um cassete de *hpRNA*, direcionado para o gene *rep*, entre os sítios EcoRI e HindIII. Tomato severe rugose virus (ToSRV), tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV), tomato golden vein virus (TGVV), tomato leaf distortion virus (ToLDV), promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (35SCaMV), íntron 3 do gene da malato sintase de *Arabidopsis thaliana* (AtMS intron), terminador do gene da nopalina sintase (*nos3'*). O cassete de interferência (3.951 pb) retirado do vetor pSIU-fourgemini2 foi clonado, entre os sítios EcoRI e HindIII do vetor binário pCambia-3300, resultando no vetor pC3300-fourgemini (12.325 pb). Tomato severe rugose virus (ToSRV), tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV), tomato Golden vein virus (TGVV), tomato leaf distortion virus (ToLDV), promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (35SCaMV), íntron 3 do gene da malato sintase de *Arabidopsis thaliana* (AtMS intron), terminador do gene da nopalina sintase (*nos3'*), gene de resistência à canamicina (Kanamycin), regiões entre as quais o DNA de interesse é clonado (T-border), gene de resistência ao herbicida glufosinato de amônio (*bar*), replicon para replicação em *A. tumefaciens* (pVS1 rep), região para estabilidade em *A. tumefaciens* (PVS1 sta).....67

Figura 4: Vetor final pC3300-fourgemini (12.325 pb) desenvolvido para silenciamento do gene *rep* de diferentes espécies de begomovírus que infectam tomateiro no Brasil. Tomato severe rugose virus (ToSRV), tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV), tomato golden vein virus (TGVV), tomato leaf distortion virus (ToLDV), promotor 35S do vírus cauliflower mosaic virus (35SCaMV), íntron 3 do gene da malato sintase de *Arabidopsis thaliana* (AtMS intron), terminador do gene da nopalina sintase (*nos3'*), gene de resistência à canamicina (Kanamycin), regiões entre as quais o DNA de interesse é clonado (T-border), gene de resistência ao herbicida glufosinato de amônio (*bar*), sequência 5' *untranslated region* do RNA viral de alfafa mosaic virus (AMV), porção alpha do gene LacZ (LacZ alpha).86

Figura 5: Linhagens de *Nicotiana benthamiana* transgênicas (T_0), transformadas com o vetor pC3300-fourgemini. a) Análise de imunocromatografia de fluxo lateral, demonstrando a presença da proteína PAT (phosphinothricin-N-acetyltransferase) em 20 linhagens de plantas transformadas. b) Reação em cadeia pela polimerase (PCR), para confirmação da presença do transgene nas 20 plantas T_0 transformadas, utilizando os primers 35SAMVF e 4geminiR, resultando na amplificação de um fragmento específico de 1.089 pb. Os números acima das figuras demonstram as diferentes linhagens T_0 geradas (2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 30, 35), NT: planta controle não-transgênica. 90

Figura 6: Seleção de plantas transgênicas da geração T_2 , através de pulverização com o herbicida glufosinato de amônio a 1%. Mudas a serem desafiadas foram inicialmente selecionadas. a) Plantas transgênicas apresentando desenvolvimento normal, sem nenhuma alteração fenotípica. b) Plantas não-transgênicas (segregantes) apresentando alterações fenotípicas como folhas murchas e parada no desenvolvimento..... 95

Figura 7: Sintomas desenvolvidos por plantas inoculadas com o vírus tomato golden vein virus (TGVV). A) Planta não-transgênica (NT) apresentando sintoma de encarquilhamento severo, e planta transgênica (T) sem a presença de sintomas. B) Planta NT apresentando sintoma de mosaico, com o amarelecimento das nervuras. C) Planta transgênica sem a presença de sintomas virais. D) Planta controle não inoculada. 98

Figura 8: Plantas da geração T_2 , inoculadas com o vírus TGVV (1000ng/ μ L). As linhagens transgênicas 22, 29 e 19 são denominadas Nb4G22, Nb4G29 e Nb4G19, respectivamente. Cada quadrado corresponde à uma planta inoculada. Assim, estão representadas as 22 plantas transgênicas desafiadas da linhagem Nb4G 22, 28 plantas transgênicas da linhagem Nb4G29, 31 plantas transgênicas da linhagem Nb4G19 e 22 plantas não-transgênicas, utilizadas como controle. Os diferentes períodos de início da infecção, variando de 10 a 35 dias pós-inoculação (dpi) estão

representados por diferentes tons de cinza. Plantas que não apresentaram infecção durante todo o período de análise estão representadas por quadrados brancos. Plantas homozigotas estão marcadas com um círculo amarelo. 100

Figura 9: Plantas da geração T₂, inoculadas com o vírus TGVV (500ng/μL). As linhagens transgênicas 22, 29 e 19 são denominadas Nb4G22, Nb4G29 e Nb4G19, respectivamente. Os quadrados representam as 17 plantas transgênicas inoculadas da linhagem Nb4G 22, 15 plantas transgênicas da linhagem Nb4G29, 19 plantas transgênicas da linhagem Nb4G19 e 15 plantas não-transgênicas, utilizadas como controle. Os diferentes períodos de início da infecção, variando de 10 a 35 dias pós-inoculação (dpi) estão representados por diferentes tons de cinza. Plantas que não apresentaram infecção durante todo o período de análise estão representadas por quadrados brancos..... 102

Figura 10: Plantas da geração T₂, inoculadas com o vírus TGVV (250ng/μL). As linhagens transgênicas 22, 29 e 19 são denominadas Nb4G22, Nb4G29 e Nb4G19, respectivamente. Os quadrados representam as 17 plantas transgênicas da linhagem Nb4G 22, 18 plantas transgênicas da linhagem Nb4G29, 16 plantas transgênicas da linhagem Nb4G19 e 15 plantas não-transgênicas, utilizadas como controle. Os diferentes períodos de início da infecção, variando de 10 a 35 dias pós-inoculação (dpi) estão representados por diferentes tons de cinza. Plantas que não apresentaram infecção durante todo o período de análise estão representadas por quadrados brancos..... 104

Figura 11: Sintomas desenvolvidos por plantas inoculadas com o vírus tomato rugose mosaic virus (ToRMV). A) Planta não-transgênica inoculada com DNA viral, apresentando sintoma de mosaico e rugosidade foliar. B) Planta transgênica sem a presença de sintomas. C) Planta controle não inoculada. D) Comparação de uma folha transgênica (T), sem sintomas de infecção viral, e uma folha não-transgênica (NT), apresentando sintomas de infecção..... 106

Figura 12: Plantas da geração T₂, inoculadas com o vírus ToRMV. As linhagens transgênicas 22, 29 e 19 são denominadas Nb4G22, Nb4G29 e Nb4G19, respectivamente. Os quadrados representam as 29 plantas transgênicas da linhagem Nb4G 22, 24 plantas transgênicas da linhagem Nb4G29, 32 plantas transgênicas da linhagem Nb4G19 e 20 plantas não-transgênicas, utilizadas como controle. Os diferentes períodos de início da infecção, variando de 10 a 35 dias pós-inoculação (dpi) estão representados por diferentes tons de cinza. Plantas que não apresentaram infecção durante todo o período de análise estão representadas por quadrados brancos. Plantas homozigotas estão marcadas com um círculo amarelo..... 108

Figura 13: Sintomas desenvolvidos por plantas inoculadas com o vírus tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV). A) Planta transgênica não infectada, sem a presença de sintomas. B) Planta não-transgênica apresentando sintomas característicos de infecção, como mosaico e deformação foliar. 109

Figura 14: Plantas da geração T₂, inoculadas com o vírus ToCMoV. As linhagens transgênicas 22, 29 e 19 são denominadas Nb4G22, Nb4G29 e Nb4G19, respectivamente. Os quadrados representam as 27 plantas transgênicas da linhagem Nb4G 22, 15 plantas transgênicas da linhagem Nb4G29, 15 plantas transgênicas da linhagem Nb4G19 e 28 plantas não-transgênicas, utilizadas como controle. Os diferentes períodos de início da infecção, variando de 10 a 35 dias pós-inoculação (dpi) estão representados por diferentes tons de cinza. Plantas que não apresentaram infecção durante todo o período de análise estão representadas por quadrados brancos. Plantas homozigotas estão marcadas com um círculo amarelo..... 111

Figura 15: Sintomas desenvolvidos por plantas inoculadas com RCA do vírus tomato interveinal chlorosis virus (ToICV). A) Planta transgênica não infectada, sem a presença de sintomas. B) Planta não-transgênica apresentando sintomas característicos de infecção, como mosaico e deformação de folhas e ramos.113

Figura 16: Plantas da geração T₂, inoculadas com RCA do vírus ToICV. As linhagens transgênicas 22, 29 e 19 são denominadas Nb4G22, Nb4G29 e Nb4G19, respectivamente. Os quadrados representam as 15 plantas transgênicas da linhagem Nb4G 22, 15 plantas transgênicas da linhagem Nb4G29, 15 plantas transgênicas da linhagem Nb4G19 e 15 plantas não-transgênicas, utilizadas como controle. Os diferentes períodos de início da infecção, variando de 10 a 35 dias pós-inoculação (dpi) estão representados por diferentes tons de cinza. Plantas que não apresentaram infecção durante todo o período de análise estão representadas por quadrados brancos. Plantas homozigotas estão marcadas com um círculo amarelo..... 115

Obs: No capítulo 1, o uso das figuras 1, 2 e 4 foi autorizado pela editora Elsevier, a figura 3 foi autorizada pela "Annual Reviews" e a figura 5 foi autorizada pelo grupo "Nature Publishing Group" para uso em teses e dissertações.

Resumo Geral

Os begomovírus (Família *Geminiviridae*) compreendem um importante grupo de patógenos de plantas, capazes de infectar um grande número de culturas e causar impacto na agricultura. Esses agentes possuem um genoma constituído por uma ou duas moléculas de DNA circular de fita simples, e são transmitidos de maneira persistente e circulativa pela mosca branca (*Bemisia tabaci*). No Brasil, esses vírus são altamente incidentes e causam grandes danos às culturas do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e do tomateiro (*Solanum lycopersicum*). O objetivo desse trabalho foi utilizar a estratégia de RNA de interferência (RNAi) como forma de controle genético de begomoviroses associadas a essas duas culturas. Inicialmente, no caso do feijoeiro, o mecanismo de RNAi foi utilizado para gerar uma linhagem de feijão imune ao bean golden mosaic virus (BGMV). Nós avaliamos se moscas brancas virulíferas, infectadas pelo BGMV, poderiam diminuir sua carga de DNA viral, após se alimentarem em plantas de feijão geneticamente modificadas (GM), que expressam moléculas de pequenos RNAs interferentes (siRNAs), que tem como alvo o gene *rep* desse vírus. Esse estudo demonstrou que a quantidade de DNA viral foi significativamente reduzida em moscas brancas que se alimentaram em plantas de feijão GM (comparado a moscas que se alimentaram em plantas não-GM), em 52% e 84%, nos períodos de 4 e 8 dias respectivamente. A segunda parte desse trabalho teve como objetivo, avaliar o mecanismo de RNAi como ferramenta na obtenção de plantas de *Nicotiana benthamiana* transgênicas, com resistência ampla a begomovírus que infectam tomateiro no Brasil. Para isso, um cassete de interferência quimérico - que expressa um *hairpin* RNA (*hpRNA*) correspondendo ao gene *rep* de distintas espécies de begomovírus - foi desenvolvido. Os resultados demonstraram que um maior número de plantas transgênicas permaneceram não infectadas, após terem sido desafiadas com uma menor pressão de inóculo do vírus tomato golden vein virus (TGVV) (≈ 250 ng/ μ L de DNA viral/planta). As plantas transgênicas também foram inoculadas com os vírus tomato rugose mosaic virus (ToRMV), tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) e tomato interveinal chlorosis virus

(ToICV), e foi demonstrado que o fenótipo de resistência a esses agentes possivelmente é dependente da zigose do transgene. Uma proporção de 77% das plantas transgênicas, que apresentaram o fenótipo de resistência, demonstraram ser homozigotas.

General Abstract

The begomovirus (*Geminiviridae* family) are an important group of plant pathogens that cause infection in a large number of crops and impact on agriculture. These agents have one or two molecules of single strand DNA, and are transmitted in a persistent and circulative manner by whitefly (*Bemisia tabaci*). In Brazil, these viruses have a high incidence and cause great damage to bean (*Phaseolus vulgaris*) and tomato (*Solanum lycopersicum*). The aim of this study was to use the molecular tool of RNA interference (RNAi) as a strategy of genetic control of begomovirus associated with these two crops. Initially, with respect to beans, the RNAi mechanism was used to generate a plant line that was immune to the bean golden mosaic virus (BGMV). We investigated if BGMV-viruliferous whiteflies, would reduce DNA viral amount after feeding on genetically modified (GM) bean plants expressing small interfering RNA (siRNAs) molecules, that target *rep* gene of the virus. This study demonstrated that BGMV DNA amount was significantly reduced in whiteflies feeding on GM-plants (compared with insects feeding on non-GM plants) over a period of 4 and 8 days at 52% and 84% respectively. The second part of this study aimed to evaluate the RNAi mechanism as a tool to obtain transgenic *Nicotiana benthamiana* plants with wide resistance to begomovirus infecting tomato in Brazil. For this, a chimeric cassette of interference - that expresses an intron-hairpin RNA (*hpRNA*) directed to the *rep* gene of different species of begomoviruses - was developed. The results showed that a higher number of transgenic plants remained uninfected after being challenged with a lower infection pressure of tomato golden vein virus (TGVV) (≈ 250 ng/ μ L viral DNA/plant). Transgenic plants were also inoculated with tomato rugose mosaic virus (ToRMV), tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) and tomato interveinal chlorosis virus (ToICV), and was demonstrated that phenotype resistance to these agents is possibly dependent on transgene zygosity. A proportion of 77% of the transgenic plants that showed resistance phenotype, proved to be homozygous.

1 Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

1.1 Família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* engloba um grupo de vírus com capacidade de infectar várias espécies vegetais. Esses patógenos compreendem a segunda maior família de vírus de plantas, atrás somente da família *Potyviridae*, e têm grande importância e impacto na agricultura, pois são responsáveis por sérios danos econômicos em culturas como mandioca, feijão, milho, algodão e tomate. De acordo com o ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), atualmente os geminivírus são classificados em sete gêneros – *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, *Mastrevirus*, *Becurtovirus*, *Eragrovirus* e *Turncurtovirus* – com base na organização genômica, similaridade de sequência, gama de hospedeiros e inseto vetor (Morales and Anderson, 2001) (Varma and Malathi, 2003) (Fauquet and Stanley, 2003) (Varsani et al., 2014).

A morfologia dos geminivírus tem como principal característica o aspecto geminado da partícula viral, que abriga uma (monopartidos) ou duas (bipartidos) moléculas de DNA fita simples (ssDNA) circular, de 2.500 a 3.000 nucleotídeos, encapsidada por subunidades de capa proteica (CP) que se organizam na forma de dois icosaedros incompletos. Esses vírus utilizam a transcrição bidirecional do seu genoma, o qual codifica de 5 a 7 proteínas, que estão envolvidas na replicação viral, movimento, transmissão e patogênese (Brown et al., 2011).

Geminivírus são agentes que se replicam no núcleo de células infectadas e tem como característica a presença de uma proteína essencial para sua replicação, conhecida como Rep (*replication-associated protein*), conservada em relação à sequência, posição e função. O genoma desses vírus é formado por uma ou duas regiões intergênicas (IRs), em uma das quais encontra-se uma sequência de nove nucleotídeos - altamente conservada entre a maior parte da família *Geminiviridae* – localizada dentro de uma estrutura em forma de *hairpin* e que funciona como origem de replicação do DNA viral (Rojas et al., 2005). Com exceção da Rep, a maior parte das proteínas necessárias para que ocorra a replicação e consequente sucesso da infecção são oriundas da célula hospedeira infectada, uma vez que esses patógenos não codificam nenhuma DNA polimerase ou fator acessório (Gutierrez, 2002).

Esses vírus replicam seu material genético através de um mecanismo conhecido como Replicação por Círculo Rolante (RCR), também utilizado por grande parte dos vírus ssDNA de procariotos, muitos plasmídeos e alguns transposons. Análises da sequência da proteína Rep demonstraram a similaridade dessa proteína com proteínas homólogas oriundas de plasmídeos bacterianos, indicando uma proximidade evolutiva entre os geminivírus e esses organismos (Koonin and Ilyina, 1992), especificamente a plasmídeos de fitoplasmas (Krupovic et al., 2009) (Nash et al., 2011). Aliado a essa hipótese de evolução a partir de replicons bacterianos, estudos tem observado similaridades entre a proteína capsidial de diferentes vírus ssDNA, que

infectam eucariotos, e vírus do tipo RNA de polaridade positiva (+RNA), o que pode indicar que, agentes como os geminivírus evoluíram a partir de plasmídeos bacterianos, seguido da aquisição de genes da proteína do capsídeo de vírus pré-existentes do tipo +RNA (Koonin et al., 2015).

Dentre os gêneros da família *Geminiviridae*, os mastrevírus englobam agentes com genoma monopartido de 2.600-2.800 nucleotídeos - encontrados no chamado velho mundo (África, Ásia, Austrália e Europa) - que podem infectar diferentes espécies de plantas, mono e dicotiledôneas, e são transmitidos por cigarrinhas (Homiptera: *Cicadellidae*). O genoma desses vírus codifica quatro genes, sendo dois no sentido viral – relacionados à encapsidação da partícula viral (CP – “coat protein”) e transporte intra e intercelular (MP – “movement protein”) - e dois no sentido complementar – que darão origem a proteínas relacionados à replicação viral (Rep e RepA). Outra característica desses vírus é a presença de duas regiões intergênicas, uma longa (LIR- “Long intergenic region”) e uma curta (SIR-“Short intergenic region”), localizadas em lados opostos no genoma (Gutierrez, 1999) (Boulton Margaret, 2002) (Figura 1).

O gênero *Begomovirus* constitui o maior grupo dentro da família *Geminiviridae* e compreende 307 espécies estabelecidas atualmente (Brown et al., 2015). Esses vírus possuem um genoma com cerca de 2.700 nucleotídeos - monopartido ou bipartido - infectam diversas espécies de plantas dicotiledôneas, e tem como vetor o inseto comumente conhecido como mosca

branca (*Bemisia tabaci*) (Rojas et al., 2005). Nos begomovírus bipartidos, os dois componentes genômicos são denominados DNA-A e DNA-B, sendo o primeiro responsável por codificar genes envolvidos na replicação (*AC1*), regulação da expressão de genes (*AC2*) e encapsidação da partícula viral (*AV1*), uma vez que o segundo codifica proteínas responsáveis pelo movimento viral intra e inter-celular (*BV1/BC1*) e modulação dos sintomas (*BV1*). As ORFs (*Open reading frames*) nos begomovírus monopartidos incluem os genes *V1* e *V2* no sentido viral e os genes *C1*, *C2*, *C3* e *C4* no sentido complementar (Hanley-Bowdoin et al., 1999) (Fondong, 2013).

O gênero *Curtovirus* compreende agentes com genoma monopartido, que são transmitidos de forma persistente e circulativa por cigarrinhas (*Circulifer tenellus*) e causam doenças em plantas dicotiledôneas. Esse gênero inclui agentes virais que são encontrados no velho (África, Ásia, Austrália e Europa) e novo mundo (Américas) e são responsáveis pela doença conhecida como “*curly top disease*” (CTD), que inclui sintomas como crescimento atrofiado e distorcido das plantas, amarelecimento das nervuras e necrose do floema (Rojas et al., 2005) (Baliji et al., 2004) (Klute et al., 1996). O genoma dos curtovírus contém 2.900-3.000 nucleotídeos e está organizado em sete ORFs, sendo três no sentido viral – *V1*, *V2* e *V3* – e quatro no sentido complementar – *C1*, *C2*, *C3* e *C4* – que darão origem a proteínas relacionadas à replicação, encapsidação da partícula viral, movimento e acúmulo de DNA viral em células infectadas (Brown et al., 2011).

O gênero *Topocuvirus* engloba um único vírus, denominado tomato pseudo-curly top virus (TPCTV), que infecta plantas dicotiledôneas. Esse gênero tem como característica a presença de um genoma monopartido dividido em seis ORFs, sendo duas no sentido viral (V1 e V2), e quatro no sentido complementar (C1, C2, C3, e C4), que codificam diferentes proteínas responsáveis pelo sucesso da infecção viral. Esse vírus possui características dos gêneros *Mastrevirus* e *Begomovirus*, indicando ser um recombinante natural, e são transmitidos por membracídeos (*Micrutalis malleifera*) (Simon and Coe, 1958) (Briddon et al., 1996) (Rojas et al., 2005).

Três novos grupos de geminivírus - *Becurtovirus*, *Eragrovirus* e *Turncurtovirus* – bastante divergentes foram estabelecidos recentemente (Varsani et al., 2014). O grupo dos Becurtovírus é composto por dois vírus (Beet curly top Iran virus e spinach curly top Arizona virus) que vem sendo encontrados infectando plantas dicotiledôneas e tem como vetor uma espécie de cigarrinha (*Circulifer haematoceps*). Esses vírus possuem genoma monopartido, com três ORFs no sentido viral (V1, V2 e V3) - similares às encontradas nos curtovírus - e duas ORFs no sentido complementar (C1 e C2). Assim como nos mastrevírus, esses agentes possuem duas regiões intergênicas (Gutierrez, 1999), uma curta (SIR) e uma longa (LIR), na qual está localizada uma sequência de nove nucleotídeos (TAAGATT/CC) - diferente daquela encontrada nos geminivírus em geral - onde ocorre a clivagem da fita

de DNA no início do processo replicativo (Yazdi et al., 2008) (Soleimani et al., 2013).

Dentro do gênero *Eragrovirus* encontra-se um único vírus (*Eragrostis curvula streak virus*), capaz de infectar plantas monocotiledôneas. Esse vírus possui uma organização genômica similar a outros geminivírus, com duas ORFs no sentido viral (V1 e V2) e duas ORFs no sentido complementar (C1 e C2), sendo os produtos dos genes V1 e C1 similares às proteínas CP e Rep de outros geminivírus. Assim como nos mastrevírus, esse agente possui duas regiões intergênicas, onde estão localizados genes potencialmente envolvidos com a replicação e transcrição do genoma viral. Esse gênero, assim como os becurtovírus, possui uma sequência de nove nucleotídeos (TAAGATT/CC) relacionada ao início do processo replicativo, diferente da encontrada na grande maioria dos geminivírus (Varsani et al., 2009).

Dentro do gênero *Turncurtovirus*, o vírus turnip curly top virus é o único agente reconhecido. Esse agente é capaz de infectar plantas dicotiledôneas, e apresenta genoma monopartido – similar ao dos gêneros *Curtovirus* e *Topocuvirus* - organizado em seis ORFs, duas no sentido viral (V1 e V2) e quatro no sentido complementar (C1, C2, C3 e C4). Esse vírus pode ser transmitido pela cigarrinha *Circulifer haematoceps* e plantas doentes apresentam sintomas como enrolamento foliar e inchaço das nervuras na parte inferior das folhas (Briddon et al., 2010) (Razavinejad et al., 2013).

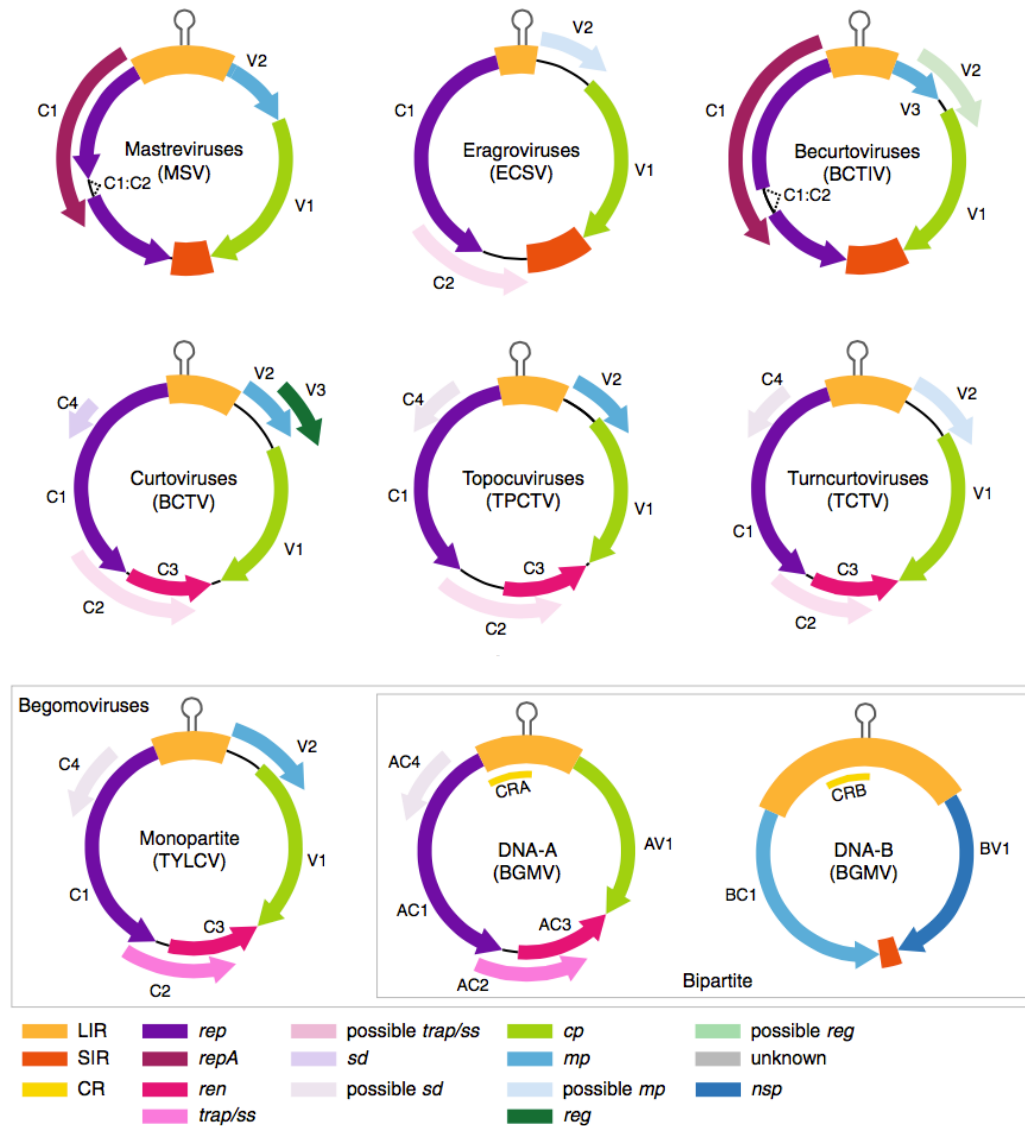


Figura 1: Organização genômica dos diferentes gêneros da família *Geminiviridae*. Os gêneros *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus* possuem organização do genoma similares, enquanto os *Mastrevirus*, *Becurtovirus* e *Eragrovirus* são bastante diversos e distintos dos outros geminivírus (LIR, Região intergênica longa; SIR, região intergênica curta; CR, região comum; Rep, proteína associada à replicação; ren, potencializador de replicação; trap, proteína transativadora; ss, supressor de silenciamento; sd, determinante de sintomas; cp, proteína do capsídeo; mp, proteína do movimento; reg, gene regulatório; NSP, *nuclear shuttle protein*). É importante notar que o DNA-A de begomovírus bipartidos do velho mundo (África, Ásia, Austrália e Europa) contém a ORF V2, diferente daqueles encontrados nas Américas (Varsani et al., 2014).

1.2 O gênero *Begomovirus*

Os begomovírus compreendem o maior e mais divergente grupo dentro da família *Geminiviridae* e tem a espécie *Bean golden yellow mosaic virus* como espécie-tipo. Baseado na organização genômica, diversidade genética e distribuição geográfica, esses vírus tem sido classificados em: 1) Begomovírus do velho mundo, que compreende agentes encontrados na Europa, África, Ásia e Austrália; e 2) Begomovírus do novo mundo, que compreende agentes encontrados nas Américas. Os vírus desse gênero podem apresentar genoma mono ou bipartido. Nos agentes com genoma monopartido, todas as ORFs estão localizadas no único componente genômico existente, já nos bipartidos, as ORFs estão divididas entre dois genomas, denominados DNA-A e DNA-B, ambos necessários para que ocorra o sucesso da infecção. Os dois componentes genômicos dos begomovírus bipartidos apresentam sequência de nucleotídeos diferente, exceto por uma pequena região de aproximadamente 200 nucleotídeos na região intergênica (IR), conhecida como região comum (CR) - bastante conservada dentro da mesma espécie viral – e que possui uma sequência invariável (5' – TAATATTAC – 3'), necessária para que ocorra o início da replicação (Rojas et al., 2005) (Nawaz-ul-Rehman and Fauquet, 2009) (Raja et al., 2010).

A transcrição do genoma dos begomovírus ocorre de maneira bidirecional (sentido viral e complementar). Em vírus bipartidos, o DNA-A é formado por

quatro ORFs no sentido complementar, e uma ou duas ORFs no sentido viral, que dão origem à proteínas responsáveis pela replicação, transcrição e encapsidação da partícula viral. Já o DNA-B desses agentes é formado por duas ORFs, uma no sentido viral e outra no sentido complementar, responsáveis por codificar proteínas relacionadas ao movimento viral e desenvolvimento dos sintomas. Nos begomovírus bipartidos encontrados nas Américas, o DNA-A normalmente depende do DNA-B para o sucesso da infecção sistêmica (Rojas et al., 2005). As proteínas codificadas no sentido complementar do DNA-A são as proteínas Rep (*Replication-associated protein* ou AC1), TrAP (*Transcriptional activator protein* ou AC2), REn (*Replication enhancer protein* ou AC3) e AC4, uma vez que no sentido viral são codificadas a proteína capsidial (CP ou AV1) e a proteína AV2, encontrada somente nos begomovírus do velho mundo. O DNA-B codifica no sentido viral a proteína NSP (*Nuclear shuttle protein* ou BV1), e no sentido complementar a proteína MP (*Movement protein* ou BC1) (Lazarowitz and Shepherd, 1992) (Fondong, 2013) (Rizvi et al., 2015).

A proteína Rep (*Replication-associated protein*), codificada pela ORF AC1 em begomovírus bipartidos, é uma proteína multifuncional, fundamental para que ocorra a replicação nos geminivírus. No que diz respeito à estrutura, a Rep dos geminivírus é formada por vários motivos conservados. Na região N-terminal estão três motivos - Motivos I, II e III - responsáveis pela ligação e clivagem do DNA. Um outro motivo altamente conservado entre os vírus da família *Geminiviridae* é conhecido como GRS (*Geminivirus rep sequence*) e está

localizado entre os motivos II e III na porção N-terminal dessa proteína. A região C-terminal possui um domínio ATPase e abrange o domínio conhecido por S3H – formado pelos motivos Walker A, walker B e walker C - necessário para que ocorra a replicação, bem como outros processos como encapsidação do genoma viral (Koonin et al., 2015). A função de oligomerização da Rep é realizada por um domínio localizado na região central dessa proteína que se sobrepõe ao domínio de ligação ao DNA (Orozco et al., 1997) (Rizvi et al., 2015) (Figura 2).

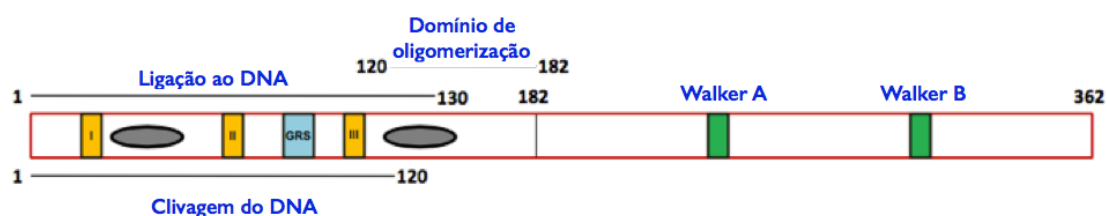


Figura 2: Representação da proteína iniciadora da replicação (Rep) dos geminivírus. O tamanho da proteína é demonstrado pelo retângulo com linhas sólidas definindo as regiões responsáveis pela ligação ao DNA (aminoácidos 1-130), clivagem (aminoácidos 1–120) e oligomerização (aminoácidos 120–180). Na região N-terminal são demonstrados os motivos I, II e III (laranja), conservado entre as proteínas iniciadoras de replicação por círculo rolante e o motivo GRS (“Geminivirus rep sequence”) (azul). Em cinza estão representadas as regiões em alfa-hélice. A região C-terminal tem um domínio ATPase e engloba os motivos Walker A e Walker B (verde) O motivo walker C, presente na região C-terminal não está demonstrado na figura (Modificado de Rizvi et al., 2015).

A Rep é uma proteína que se liga de maneira específica ao DNA viral, em uma região *upstream* à estrutura de *hairpin* presente na região intergênica (IR) desses vírus (Fontes et al., 1992) (Lazarowitz et al., 1992). Análises da IR de diferentes geminivírus que infectam dicotiledôneas demonstrou a presença de

sequências repetitivas, variando de 8 a 12 nucleotídeos, denominadas iterons na porção 5' dessa região, cujo arranjo é conservado entre geminivírus relacionados evolutivamente. Esses iterons constituem os sítios específicos de ligação da Rep ao DNA, e suas sequências normalmente variam entre as diferentes espécies de begomovírus (Argüello-Astorga et al., 1994) (Rizvi et al., 2015). Um domínio hipervariável na porção N-terminal da Rep - associado ao motivo I dessa proteína - chamado de IRD (*Iteron-related-domain*), é uma região envolvida no reconhecimento de elementos de DNA cognatos (Argüello-Astorga and Ruiz-Medrano, 2001).

Além do papel primordial da proteína Rep no reconhecimento de sequências específicas de DNA, a fim de possibilitar o início da replicação viral, essa proteína está envolvida na regulação gênica, apresentando a habilidade de regular sua própria expressão, atuar como ativador transcricional de genes virais tardios (Laufs et al., 1995), e ainda atuar como supressor de silenciamento gênico transcricional (TGS), através da supressão de metiltransferases de manutenção do DNA (Rodríguez-Negrete et al., 2013). A Rep interage com proteínas vegetais homólogas à proteína do retinoblastoma (pRB) em mamíferos – que atua na regulação negativa da progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular – levando à progressão do ciclo celular para a fase S (replicação do DNA) e criando assim um ambiente propício para a síntese de DNA viral na célula hospedeira (Ach et al., 1997) (Hanley-Bowdoin et al., 2004). Outra proteína do hospedeiro que também está relacionada com a

replicação dos geminivírus é o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), que é uma proteína envolvida na síntese do DNA e reparo (Paunesku et al., 2001). Estudo realizado por Nagar et al (1995) demonstrou o acúmulo de PCNA em tecidos diferenciados, infectados por tomato golden mosaic virus.

A proteína TrAP (*Transcriptional activator protein*) codificada pela ORF AC2, é uma proteína multifuncional, que apresenta um domínio de ativação transcricional potente, e possui a capacidade de se ligar de uma maneira não específica a DNAs de fita simples (Hartitz et al., 1999). A TrAP está relacionada à transativação da transcrição dos genes da capa protéica (CP) (Sunter et al., 1990), e da proteína do movimento (MP) de geminivírus (Sunter and Bisaro, 1992), demonstrando nesse caso um papel importante no sucesso da infecção sistêmica por esses vírus. Essa proteína é capaz de suprimir a resposta de defesa do hospedeiro, e ser um determinante na patogenicidade viral, como foi demonstrado em estudo realizado por Sunter et al (2001), no qual plantas transgênicas expressando essa proteína exibiram uma maior susceptibilidade à infecção por tomato golden mosaic virus. A TrAP é identificada como um supressor de silenciamento de RNA, que pode atuar diretamente na maquinaria de silenciamento, através da súper-expressão de proteínas homólogas aos componentes da via de silenciamento, resultando assim em um efeito negativo desse mecanismo, devido à competição dessas proteínas com os efetores positivos dessa via (Voinnet, 2005) (Yong Chung et al., 2014).

A proteína REn (*Replication enhancer protein*), codificada pela ORF AC3 em begomovírus bipartidos, é uma proteína relacionada ao acúmulo das diferentes formas de DNA viral em células infectadas (Sunter et al., 1990). REn não é uma proteína indispensável para que ocorra a replicação (Morris et al., 1991), no entanto desempenha um papel importante nessa etapa do ciclo de vida dos geminivírus, sendo capaz de interagir com a proteína Rep (Settlage et al., 1996) – aumentando consideravelmente a atividade de ATPase dessa proteína (Pasumarthy et al., 2010) - e também com componentes da célula hospedeira relacionados à síntese de DNA, como o PCNA (Castillo et al., 2003). Além disso, estudos envolvendo a mutação dessa proteína sugerem que ela possui um efeito no desenvolvimento de sintomas durante a infecção (Morris et al., 1991) (Hormuzdi and Bisaro, 1995).

A ORF AC4 em begomovírus bipartidos, assim como a ORF C4 em begomovírus monopartidos, está totalmente localizada dentro da ORF AC1 e é a proteína menos conservada dentre as proteínas codificadas pelos geminivírus, apresentando funções biológicas diferentes entre vírus mono e bipartidos (Fondong, 2013). Em agentes com genoma monopartido como tomato yellow leaf curl virus, estudo envolvendo a mutação de C4 resultou em plantas com sintomas mais brandos e o vírus foi incapaz de se movimentar sistemicamente (Jupin et al., 1994). No entanto, em estudos envolvendo begomovírus bipartidos, mutação em AC4 não demonstra relação com o desenvolvimento de sintomas em plantas infectadas (Bull et al., 2007)

(Fontenelle et al., 2007). AC4 atua como supressor de silenciamento gênico, através da ligação a micro-RNAs (miRNAs) - inativando assim essas moléculas e bloqueando a regulação negativa, via miRNAs, de genes em plantas - e resultando em anormalidades no desenvolvimento de plantas transgênicas que expressam essa proteína (Chellappan et al., 2005).

A capa protéica (CP) dos geminivírus é uma proteína estrutural, codificada pela ORF AV1 em begomovírus bipartidos, localizada no sentido complementar do DNA-A desses vírus. CP é uma proteína que possui uma sequência específica de localização nuclear (NLS – *Nuclear localization signal*), e é transportada ativamente entre o núcleo e o citoplasma de células infectadas, uma movimentação dependente de fatores do hospedeiro como as chaperonas HSP-70 (Kunik et al., 1998) (Gorovits et al., 2013). CP parece não estar relacionada ao desenvolvimento de sintomas durante a infecção viral (Bull et al., 2007), porém é uma proteína multifuncional, relacionada à proteção do DNA viral, formação de vírions estáveis e transmissão pelo inseto vetor (Unsel et al., 2004). Essa proteína também está intimamente relacionada à especificidade do inseto vetor (Bridson et al., 1990).

Em estudo realizado por Hohnle et al (2001) a alteração de dois aminoácidos na porção C-terminal da CP foi capaz de gerar transmissibilidade a vírus não-transmissíveis, demonstrando seu papel primordial na eficiência de

transmissão pelo vetor. Essa importância da CP como determinante na transmissão dos begomovírus também foi demonstrada por Hofer et al (1997).

Encontrada somente nos begomovírus do velho mundo, a ORF AV2 codifica um produto ainda com função incerta (Fondong, 2013). No entanto, pesquisadores demonstraram que mutação nessa ORF resulta em menor acúmulo de DNA, com desenvolvimento de sintomas atenuados em plantas infectadas (Padidam et al., 1996) (Bull et al., 2007), além de resultar em efeito negativo na expressão da CP (Bull et al., 2007).

No DNA-B de begomovírus bipartidos encontram-se duas ORFs, sendo uma no sentido viral - ORF BV1 - que codifica a proteína NSP (*Nuclear shuttle protein*), e outra no sentido complementar - ORF BC1 - que codifica a proteína MP (*Movement protein*). Essas duas proteínas possuem funções distintas, porém agem de maneira coordenada a fim de realizar o movimento do DNA viral de maneira eficiente (Noueiry et al., 1994) (Lazarowitz and Beachy, 1999). NSP, localizada no nucleoplasma da célula, é uma proteína que exibe alta afinidade pelo DNA viral, e é responsável por exportar o DNA viral do núcleo para o citoplasma. Já a MP, localizada na periferia celular, é capaz de interagir de maneira específica com o complexo DNA-NSP e direcionar esse complexo para a periferia celular, e então para as células adjacentes via dilatação dos plasmodesmos (Pascal et al., 1994) (Sanderfoot and Lazarowitz, 1995) (Sanderfoot, 1996). Essas duas proteínas apresentam a capacidade de reconhecer e se ligar ao DNA viral - de uma maneira independente da

sequência - de acordo com sua forma (ssDNA ou dsDNA) e tamanho (Rojas et al., 1998). A produção de proteínas do movimento pelos vírus representa uma estratégia fundamental que possibilita a esses agentes transpor a parede celular, uma grande barreira das plantas contra a infecção, resultando assim em infecção sistêmica e doença (Lazarowitz, 1999).

Muitos begomovírus podem se associar a pequenos ácidos nucleicos (ssDNA circular) satélites, com cerca de 1.300 nucleotídeos, e que codificam proteínas que podem aumentar a patogênese viral. Esses satélites dependem dos begomovírus para sua replicação e encapsidação e tem um papel importante no desenvolvimento e progressão da doença causada por esses vírus (Mansoor et al., 2003) (Saunders et al., 2004) (Fauquet et al., 2005).

O primeiro relato de DNAs satélites associados a begomovírus foi feito por Dry et al (1997), no qual esses autores identificaram uma molécula de ssDNA de 682 nucleotídeos, associada ao vírus monopartido tomato leaf curl virus, em plantas de tomate infectadas. Hoje, três tipos de moléculas satélites já foram identificadas em associação com os begomovírus: 1) Betasatélites (DNA- β), 2) alfasatélites (também conhecidos como DNA-1) e 3) satélite defectivo (Figura 3). DNA- β são moléculas de ssDNA circulares, associados a muitos begomovírus monopartidos, e que codificam uma proteína multifuncional - β C1 – associada à patogenicidade da doença, supressão de silenciamento e repressão da resposta de defesa de plantas infectadas. Essas moléculas não compartilham grande similaridade de sequência com seu vírus

auxiliar, e são dependentes para replicação, propagação sistêmica, encapsidação e transmissão pelo vetor. Os alfasatélites, são moléculas capazes de codificar uma proteína iniciadora da replicação por círculo rolante (*alpha-Rep*), possibilitando sua auto-replicação, no entanto necessitam do seu vírus auxiliar para o movimento em plantas infectadas, bem como para transmissão pelo inseto vetor. Já os satélites defectivos são moléculas menores, com cerca de 700 nucleotídeos, e não possuem nenhuma ORF (Bridson and Stanley, 2006) (Zhou, 2013).

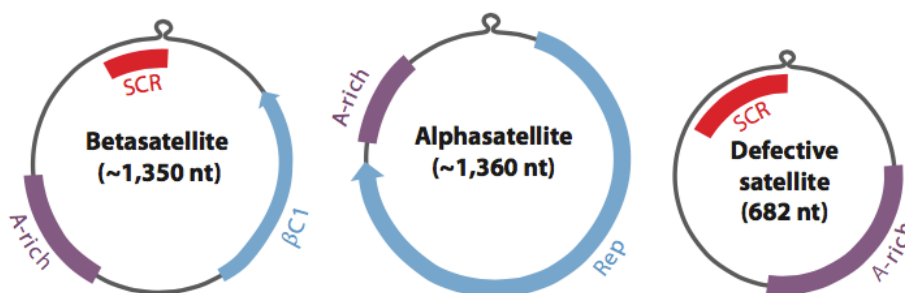


Figura 3: Organização genômica das moléculas satélites associadas a begomovírus. Betasatélites e alfasatélites codificam as proteínas β C1 e Rep respectivamente, e satélites defectivos não possuem ORF. A-rich, região rica em adenina; SCR, região conservada do satellite (Zhou, 2013).

Em relação à alta diversidade genética encontrada nos begomovírus, eventos como mutação, recombinação e pseudo-recombinação são os principais fatores associados à rápida evolução desses agentes, resultando em grande adaptação a novos ambientes e hospedeiros (Lefevre and Moriones, 2015). No que diz respeito às substituições de nucleotídeos, em estudo realizado com begomovírus bipartidos, Duffy & Holmes (2009) demonstraram

que esses vírus sofrem altas taxas de substituições ($1,6 \times 10^{-3}$ para o DNA-A e $1,33 \times 10^{-4}$ substituições/sítio/ano para o DNA-B), que podem ser comparadas àquelas encontradas em vírus do tipo RNA (Jenkins et al., 2002) (Duffy et al., 2008). Lima et al (2013) também detectaram altas taxas de mutações em populações de begomovírus, no entanto, para esses autores os eventos de recombinação demonstraram ser uma importante fonte de variabilidade genética, sendo responsável por até 50% da variação encontrada nesses agentes.

A recombinação tem sido considerada o principal mecanismo de evolução dos geminivírus, capaz de facilitar a transferência de informação genética mesmo entre vírus distantes filogeneticamente (Lefeuvre and Moriones, 2015). De acordo com Padidam et al (1999), eventos de recombinação são altamente frequentes dentro dessa família de vírus, seja entre membros de uma mesma espécie ou entre os diferentes gêneros, o que poderia explicar a grande diversidade entre esses agentes e a emergência de novas doenças associadas a eles. Doenças causadas pelos geminivírus muitas vezes são associadas à ocorrência de infecções mistas, nas quais plantas individuais podem ser infectadas com múltiplos vírus, o que facilita o surgimento de novos recombinantes (Sanz et al., 2000) (García-Andrés et al., 2007) (Silva et al., 2014) (Stewart et al., 2014). Os eventos de recombinação tendem a seguir certos padrões – conservados entre vírus com genoma ssDNA – como regiões mais propícias de quebra no genoma (*Breakpoints*), além de regiões *hot* e *cold*-

spot, onde a frequência de ocorrência desses eventos é maior ou menor respectivamente (Lefeuvre et al., 2009) (Martin et al., 2011). Os *breakpoints* normalmente não estão localizados dentro de regiões codificantes e ocorrem nas bordas dos genes. Nos begomovírus, regiões como a região intergênica, e o gene *AC1* são consideradas *hot-spot* para eventos de recombinação, contrário ao que ocorre com os genes *AV1*, *BV1* e *BC1* (Lefeuvre et al., 2009) (Lima et al., 2013).

No caso dos begomovírus bipartidos, infecções mistas também favorecem eventos de pseudo-recombinação, resultando em rearranjo entre componentes genômicos heterólogos (Andrade et al., 2006) (Silva et al., 2014), com possível surgimento de agentes virais mais patogênicos (Hou and Gilbertson, 1996). A formação de pseudo-recombinantes viáveis está baseada em pelo menos dois fatores principais: 1) Conservação da sequência de iterons (Argüello-Astorga et al., 1994) e 2) Conservação da região IRD (*Iteron-related-domain*) da proteína Rep (Argüello-Astorga and Ruiz-Medrano, 2001).

1.3 Replicação por círculo rolante (RCR)

Os begomovírus replicam seu genoma através do mecanismo conhecido como replicação por círculo rolante (RCR) (Saunders et al., 1991). Através desse sistema esses agentes são capazes de produzir novas moléculas de DNA fita-simples (ssDNA) virais, além de uma forma de DNA dupla-fita (dsDNA) intermediária, que funciona como molde para a transcrição e replicação. O ciclo de replicação se inicia com a clivagem do genoma viral na sequência de nove nucleotídeos conservada, localizada dentro da região intergênica (IR) desses vírus. Os begomovírus não codificam sua própria DNA polimerase, assim vários fatores do hospedeiro são recrutados no início da replicação (Rizvi et al., 2015).

Após a entrada na célula hospedeira, o ssDNA viral é transportado para dentro do núcleo celular, em um movimento que é dependente da proteína capsidial – única proteína do vírus presente nesse momento – e dos mecanismos de transporte do hospedeiro. O vírus inoculado dentro da célula hospedeira se move para o núcleo como um vírion encapsidado ou é desencapsidado e se move na forma de um complexo nucleoprotéico (Kunik et al., 1998) (Gafni and Epel, 2002).

Uma vez no núcleo, com o uso da DNA polimerase da célula hospedeira, o ssDNA viral é convertido em um dsDNA circular - através da extensão de um *primer* de RNA, a partir da região intergênica - que funciona como uma

molécula intermediária, também conhecida como forma replicativa (RF), e que atua como molde para a transcrição e replicação (Saunders et al., 1992). Os genes virais são transcritos de maneira bidirecional pela RNA polimerase II da célula hospedeira, resultando em RNAs mensageiros (mRNAs) correspondentes às ORFs dos sentidos viral e complementar (Hanley-Bowdoin et al., 1999). A proteína Rep, codificada pela ORF AC1, se liga aos iterons, sofre oligomerização e cliva o dsDNA viral, na sequência de nonanucleotídeos (TAATATT/AC), localizada dentro de uma estrutura em forma de *stem-loop* na IR dos geminivírus (Laufs et al., 1995) (Gutierrez, 1999) (Gutierrez, 2002). Após a clivagem do DNA, a Rep permanece ligada ao fosfato-5' formado, enquanto vários fatores do hospedeiro são recrutados para a hidroxila-3' disponível, formando assim uma força de replicação. Essa força de replicação é estendida pela DNA polimerase do hospedeiro e ao passo que novas fitas de DNA vão sendo formadas, as fitas de DNA antigas vão sendo liberadas, formando monômeros circulares. A síntese de DNA contínua resulta em formas concataméricas (Bisaro, 1996) (Rizvi et al., 2015) (Figura 4)

Os genomas de ssDNA maduros podem gerar formas replicativas adicionais, ou na presença da proteína capsidial, esses ácidos nucléicos podem ser encapsidados (Gutierrez, 1999). Por fim, as moléculas de DNA viral são transportadas do núcleo para o citoplasma, e em seguida para as células adjacentes, através da ação conjunta das proteínas de movimento viral NSP e MP, possibilitando assim uma infecção sistêmica (Sanderfoot and Lazarowitz,

1995).

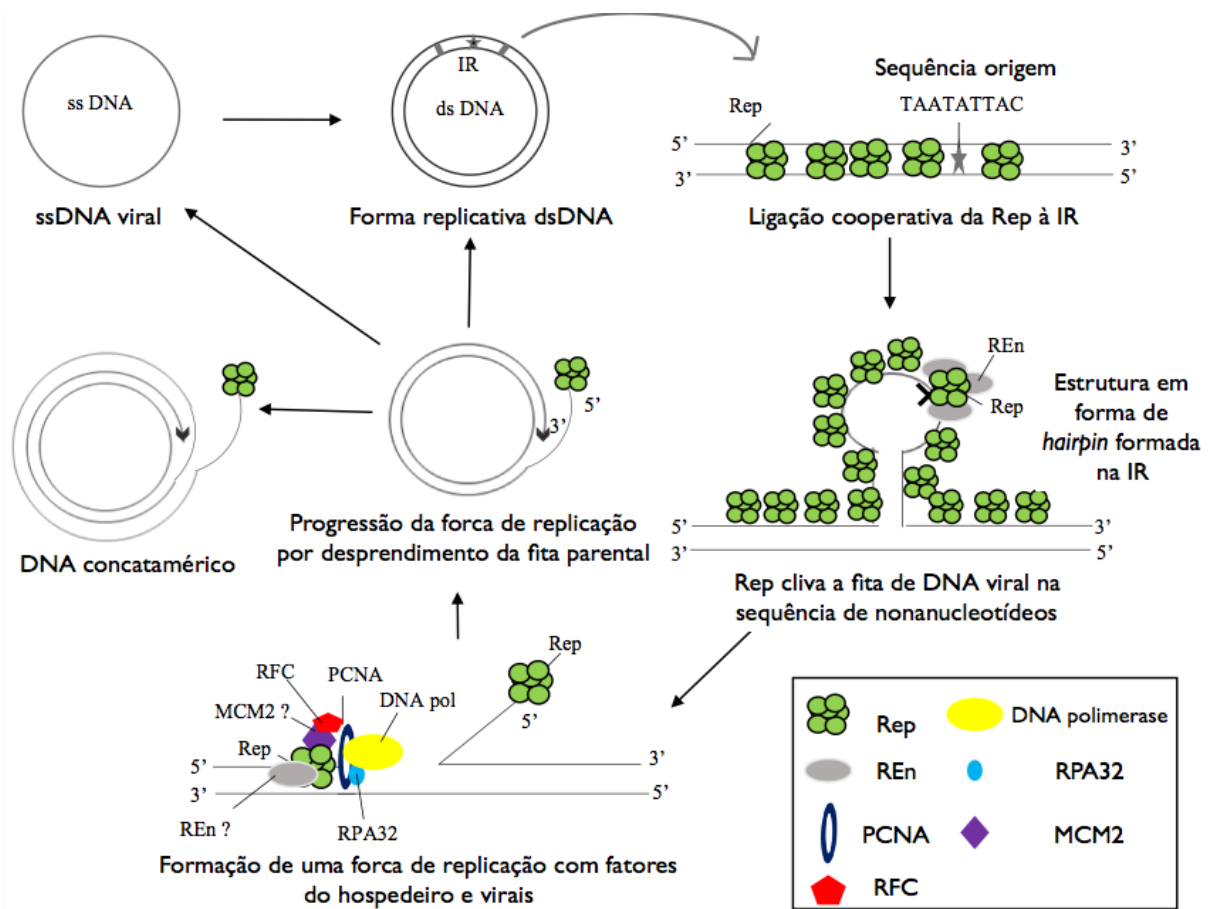


Figura 4: Modelo para a replicação por círculo rolante dos geminivírus. O DNA fita-simples (ssDNA) é convertido em uma forma replicativa de DNA dupla-fita (dsDNA). A proteína Rep se liga a sequências específicas na região intergênica (IR), sofre oligomerização e cliva dentro da sequência de nove nucleotídeos conservada nos geminivírus em geral. Uma força replicativa, composta por diversos fatores do hospedeiro e virais, é formada na hidroxila-3' da fita de DNA clivada. A força de replicação é estendida e novas fitas de DNA viral vão sendo formadas, e clivadas novamente na sequência de nove nucleotídeos pela Rep, formando assim monômeros circulares. A síntese continuada resulta em formas concataméricas de DNA. Os vários fatores virais e do hospedeiro são demonstrados por diversas formas na figura. Proteína de replicação A32 (RPA32), fator de replicação C (RFC), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), DNA polimerase, e minicromossomo de manutenção 2 (MCM2) (Modificado de Rizvi et al., 2015).

1.4 Transmissão dos begomovírus pela mosca branca (*Bemisia tabaci*)

Espécies de begomovírus são consideradas emergentes, responsáveis por sérios danos à produção de diversas culturas em todo o mundo, fato que está intimamente relacionado a um aumento na prevalência do seu inseto vetor. Esses vírus são transmitidos pela mosca branca, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: *Aleyrodidae*), um inseto que se alimenta no floema das plantas, considerado uma praga em diversas culturas e responsável por grandes prejuízos, visto o grande número de vírus que pode transmitir (De Barro et al., 2011). *B. tabaci* compreende um complexo de espécies, composto por pelo menos 31 grupos distintos ou “espécies” com alta diversidade genética (Dinsdale et al., 2010) (Lee et al., 2013). Dentro desse complexo de espécies, biótipos distintos podem ser identificados (Perring, 2001) (De Barro et al., 2011), dentre os quais se destacam o biótipo B, altamente polífago (Seal et al., 2006), e o biótipo Q, resistente a inseticidas (Dalton, 2006).

A transmissão dos begomovírus pela mosca branca ocorre de maneira persistente e circulativa (Polston et al., 1990) (Zeidan and Czosnek, 1991) (Bragard et al., 2013). Esses vírus são adquiridos pelo vetor durante sua alimentação e permanecem por um período de latência até sua transmissão. Após sua aquisição, esses vírus circulam pelo corpo do inseto (Atzmon et al., 1998), pelo sistema digestivo, e através das células epiteliais do intestino

atingem a hemolinfa e as glândulas salivares, onde misturados à saliva, serão transmitidos para uma nova planta durante a alimentação (Czosnek and Ghanim, 2012) (Hanley-Bowdoin et al., 2013) (Ghanim, 2014). Alguns begomovírus podem ser transmitidos para a progênie do inseto vetor através do ovo, o que torna a mosca branca um reservatório desses vírus por gerações (Ghanim et al., 1998) (Bosco et al., 2004).

A CP dos begomovírus é uma proteína que está intimamente envolvida na transmissão e especificidade do inseto vetor (Azzam et al., 1994) (Höhnle et al., 2001) (Unselde et al., 2004). A proteína GroEL - membro da família das chaperonas-60 - produzida por bactérias endossimbiontes presentes no inseto, e encontrada na hemolinfa do vetor, é responsável por interagir com a CP dos begomovírus, protegendo esses agentes da degradação na hemolinfa do inseto (Morin et al., 1999) (Morin et al., 2000). Além da GroEL, pesquisadores demonstraram que a proteína HSP-70 (*heat shock protein 70*) de *B. tabaci*, é súper-expressa em insetos virulíferos, e é capaz de interagir com a CP de begomovírus. No entanto, essa interação está provavelmente envolvida na proteção das células do inseto, contra as partículas virais (Götz et al., 2012) (Pakkianathan et al., 2015).

A associação dos begomovírus com seu vetor pode resultar em alteração de parâmetros biológicos do inseto. O DNA viral adquirido durante a alimentação em uma planta infectada permanece detectável no inseto por toda a sua vida, e

resulta em queda da expectativa de vida, menor taxa de fecundidade do inseto e menor *fitness* para transmissão de vírus com o passar do tempo (Rubinstein and Czosnek, 1997).

A possibilidade de replicação dos begomovírus no inseto vetor é uma questão contraditória (Czosnek et al., 2001) (Czosnek and Ghanim, 2012). Sinisterra et al. (2005) demonstraram que tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) possivelmente se replica no corpo de *B. tabaci* (biótipo B), enquanto tomato mottle virus (ToMoV) possivelmente não se replica. Nesse estudo, após se alimentar em plantas infectadas, insetos foram transferidos para plantas de algodão, a qual é imune a ambos os vírus. Os transcritos virais de ToMoV se tornaram rapidamente indetectáveis nos insetos, enquanto os transcritos virais de TYLCV aumentaram após 4 e 7 dias, indicando transcrição ativa.

Recentemente, Pakkianathan et al (2015) também demonstraram que TYLCV é capaz de se replicar em *B. tabaci*. Esses autores demonstraram que, em condições normais TYLCV se replica no inseto – com aumento significativo na concentração de DNA e transcritos virais - no entanto essa replicação é inibida após um curto período de tempo, o que possivelmente está relacionado à ativação de mecanismos de defesa da mosca. Por outro lado, Paula et al (2015) demonstraram que contrário ao que foi observado com TYLCV, o begomovírus bipartido bean golden mosaic virus (BGMV) parece não ser capaz de se replicar com eficiência em *B. tabaci*. Nesse trabalho insetos virulíferos apresentaram

uma queda significativa na quantidade de DNA viral quando esses insetos foram transferidos para plantas de feijão transgênicas imunes ao BGMV.

1.5 Begomovírus em tomateiro no Brasil

O tomate (*Solanum lycopersicum*; Família *Solanaceae*) é uma hortaliça cultivada durante todo o ano em diversas regiões do Brasil, com os estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo se destacando como principais produtores. O país está entre os oito maiores produtores de tomate do mundo (FAOSTAT) e, de acordo com levantamento realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em janeiro de 2015, a estimativa para a produção de tomate nesse ano é superior a 3 milhões de toneladas, em uma área superior a 55 mil hectares, o que demonstra a importância dessa cultura para a economia do país. No entanto, produtores de tomate enfrentam sérios problemas relacionados a doenças causadas pelos begomovírus. Esses agentes têm sido responsáveis por graves epidemias – com impacto na produtividade - que aliado à dificuldade de controle do seu inseto vetor torna as begomoviroses um dos principais problemas do tomateiro (Giordano et al., 2005) (Fernandes et al., 2008).

No Brasil, o primeiro relato de begomovírus associado a tomateiro foi feito em 1960 (Flores et al., 1960) e o vírus foi identificado como tomato golden mosaic virus (TGMV) (Maytis et al., 1975). No entanto, foi a partir da década de

90, que doenças causadas por esses vírus - causando aspecto de mosaico, clareamento das nervuras e distorção foliar – na cultura de tomate começaram a ser relatadas com maior frequência, em diversas regiões geográficas (Ribeiro et al., 1994) (Ribeiro et al., 1996) (Rezende et al., 1996) (Faria et al., 1997) (Lima et al., 2000).

Essas epidemias no país coincidem com a invasão global de uma nova população de *B. Tabaci*, conhecida como biótipo B (*Middle East–Asia Minor 1*), no fim da década de 80 através do comércio de plantas ornamentais, a partir da sua origem no Oriente Médio – Ásia menor, para pelo menos 54 países (De Barro et al., 2011), inclusive para o Brasil (Franca Felix et al., 1996). O biótipo B, de comportamento polífago, apresenta grande eficiência para transmitir diferentes tipos de begomovírus e se adapta facilmente a diferentes plantas hospedeiras, inclusive solanáceas (Bedford et al., 1994). Essa população de inseto também coloniza diversas espécies de plantas daninhas, as quais são potenciais fontes de inóculo de begomovírus para plantas de tomate (Barreto et al., 2013). Assim, a vasta quantidade de hospedeiros de *B. tabaci* - possibilitando a transferência de vírus entre essas espécies - aliado a eventos de mutação e recombinação – bastante frequentes nesse gênero – pode explicar a emergência de um grande número de espécies de begomovírus infectando tomateiro no Brasil (Rocha et al., 2013).

Os begomovírus que infectam tomateiro no Brasil evoluíram isoladamente no país e, possivelmente, emergiram a partir de hospedeiros naturais não

cultiváveis para plantas de tomate. Esses agentes apresentam alta variabilidade genética e se adaptaram a essa cultura rapidamente via eventos de recombinação (Ribeiro et al., 2003) (Rocha et al., 2013). De acordo com Brown et al (2015), atualmente existem pelo menos 16 espécies de begomovírus associados a tomateiro no Brasil: *Tomato golden mosaic virus* (Maytis et al., 1975), *Tomato rugose mosaic virus* (Fernandes et al., 2006), *Tomato chlorotic mottle virus* (Ribeiro et al., 2007), *Tomato yellow spot virus* (Calegario et al., 2007), *Tomato severe rugose virus* (Fernandes et al., 2008), *Tomato common mosaic virus*, *Tomato mild mosaic virus*, *Tomato leaf distortion virus* (Castillo-Urquiza et al., 2008), *Tomato yellow vein streak virus* (Albuquerque et al., 2010), *Tomato interveinal chlorosis virus*, *Tomato mottle leaf curl virus*, e *Tomato golden vein virus* (Albuquerque et al., 2012), *Tomato bright yellow mosaic virus* (Acesso GenBank: KC791690), *Tomato bright yellow mottle virus* (Acesso GenBank: KC791691), *Tomato golden leaf distortion virus* (Acesso GenBank: HM357456) e *Tomato golden leaf spot virus* (Acesso GenBank: KC626021).

Os vírus tomato severe rugose virus (ToSRV), tomato golden vein virus (TGVV), tomato common mosaic virus (ToCmMV), tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) e tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) são os agentes predominantes nas principais áreas produtoras do país (Fernandes et al., 2008) (Albuquerque et al., 2012) (Rocha et al., 2013) (Barbosa et al., 2015). No entanto, as populações de begomovírus ao longo do tempo demonstram alta

instabilidade, e podem ser bastante variáveis entre diferentes regiões geográficas (Ribeiro et al., 2003) (Fernandes et al., 2008).

Atualmente, não existem variedades comerciais de tomateiro imunes aos diferentes begomovírus que ocorrem no Brasil. Algumas cultivares que apresentam tolerância a alguns vírus estão disponíveis no mercado e são amplamente utilizadas pelos produtores (Quezado-Duval et al., 2014) (Inoue-Nagata et al., 2014) (<http://www.cnph.embrapa.br>). A busca por novas fontes de resistência em plantas de tomate selvagens também vem sendo objeto de estudo de alguns grupos de pesquisa (Santana et al., 2001) (Santos et al., 2015).

Em trabalho realizado por Pereira-Carvalho et al (2010), foram avaliados diferentes acessos de espécies selvagens de *Solanum*, para resistência à infecção pelo vírus tomato rugose mosaic virus (ToRMV), e demonstrado que espécies como *S. pimpinellifolium*, *S. chilense*, *S. habrochaites*, e *S. peruvianum* podem ser utilizadas como potenciais fontes de resistência a begomovírus. No entanto, existem limitações para introgressão de genes de algumas dessas espécies selvagens para espécies cultivadas, devido ao isolamento genético existente entre elas. Isso torna necessário a aplicação de técnicas especiais, como resgate de embrião em meios artificiais após o cruzamento (Bhatia et al., 2004).

1.6 Begomovírus em feijoeiro no Brasil

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*; Família: *Fabaceae*), é uma leguminosa que representa uma importante fonte de proteínas na alimentação humana, principalmente em países em desenvolvimento. O Brasil é um grande produtor mundial dessa cultura, com uma produção média de 3 milhões de toneladas nos últimos anos (FAOSTAT). No entanto, desde 1972 a produção de feijão no Brasil vem sofrendo uma queda significativa associada à ocorrência de uma begomovirose importante, conhecida como mosaico dourado do feijoeiro (Morales and Anderson, 2001).

O mosaico dourado é uma doença causada pelo begomovírus bipartido bean golden mosaic virus (BGMV), e cuja infecção resulta em sintomas como aspecto de mosaico, com amarelecimento/enrolamento das folhas e nanismo (Faria et al., 2000). Só no Brasil, o mosaico dourado causa perdas anuais que variam de 90.000 a 280.000 toneladas na produção de feijão, e em muitas regiões o cultivo dessa leguminosa tem sido inviabilizado devido à alta prevalência do BGMV (Aragão, 2014).

Diferente do que é observado em relação à diversidade de espécies que infectam tomateiro no Brasil, poucas espécies de begomovírus associados a feijoeiro tem sido identificadas até hoje no país (Brown et al., 2015). O BGMV é

um dos principais agentes, apresentando pouca variabilidade genética entre diferentes isolados (Faria and Maxwell, 1999) (Sobrinho et al., 2014) .

As tentativas dos programas de melhoramento em encontrar germoplasma para resistência ao BGMV, não tem gerado genótipos imunes a esse vírus (Bianchini, 1999). No entanto, uma linhagem de feijão geneticamente modificada - que demonstra imunidade ao BGMV - foi obtida por Bonfim et al (2007). Essa linhagem, denominada Embrapa 5.1, expressa de forma constitutiva um *intron-hairpin* RNA (*hpRNA*) para silenciamento do gene *rep* de BGMV, gene indispensável para que ocorra a replicação desse vírus (Aragão and Faria, 2009) (Aragão et al., 2013). Em 2011, após avaliações de biossegurança, essa linhagem de feijoeiro foi liberada para cultivo e consumo no Brasil pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), e poderá beneficiar produtores, gerando maior produtividade, diminuição do uso de inseticidas e assim resultar em grande redução de custos (Cipriano et al., 2014).

1.7 RNA de interferência

RNA de interferência é um mecanismo bioquímico, potente e específico de silenciamento de genes, que ocorre em uma variedade de organismos como mamíferos, fungos e plantas (Hannon, 2002) (Mello and Conte, 2004) (Saurabh et al., 2014) (Rana, 2007). Esse mecanismo foi identificado pela primeira vez em *Caenorhabditis elegans* por Fire et al (1998). Esses pesquisadores

demonstraram que a injeção de um RNA dupla-fita (dsRNA), com sequência homóloga a um gene-alvo, foi capaz de gerar uma interferência altamente específica no produto desse gene, resultando em queda drástica na sua expressão. Eles demonstraram ainda que o dsRNA deve ter uma sequência homóloga ao RNA mensageiro já processado, sem a presença de íntrons, o que demonstra que esse mecanismo funciona a nível pós-transcricional.

Desde então, diversos trabalhos tem validado e demonstrado a importância do mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) - altamente específico e robusto – em diversas áreas do conhecimento (Ketting and Plasterk, 2005) (Aragão and Faria, 2009). Estudos bioquímicos e genéticos revelaram o mecanismo pelo qual dsRNAs podem mediar o silenciamento pós-transcricional de genes. Em geral esse mecanismo envolve duas etapas: etapa iniciadora e etapa efetora (Figura 5).

Inicialmente, dsRNAs longos - produzidos por genes endógenos, partículas virais, elementos de transposição ou transgenes experimentais - são reconhecidos e clivados pela DICER, uma enzima altamente conservada evolutivamente, que possui grande afinidade por dsRNA. Estruturalmente, a DICER é uma proteína que contém um domínio com afinidade ao dsRNA (dsRBD), dois sítios catalíticos tipo RNase III, um domínio com função helicase e um domínio PAZ (Bernstein et al., 2001), provavelmente relacionado à montagem do complexo de silenciamento . A DICER se liga ao dsRNA e cliva essas moléculas em moléculas menores, com cerca de 25nt de extensão e

overhangs de 2nt nas regiões 5`e 3`, denominados *small interfering* RNAs (siRNAs) (Hamilton, 1999) (Hannon, 2002).

Já na etapa efetora, os siRNAs por sua vez são rearranjados em um complexo regulatório multi-protéico, denominado complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (Hammond et al., 2000). Esse complexo de silenciamento, formado por uma das fitas do siRNA (fita guia), enzima Dicer e proteínas da família Argonata, é responsável por identificar e catalisar a clivagem ou, bloquear a tradução, de mRNAs complementares dentro da célula (Preall and Sontheimer, 2005). No início da formação do RISC, os siRNAs dupla-fita formados pela DICER, são inicialmente incorporados ao complexo - em um processo ativo dependente de ATP - e uma das fitas desse RNA é então degradada, para que o complexo de silenciamento seja ativado. Aparentemente o siRNA dupla-fita se associa à proteína Argonata no complexo RISC, e uma das fitas torna-se substrato dessa nuclease (fita passageira). A clivagem e subsequente dissociação dos fragmentos da fita passageira resulta na ativação do RISC - em um processo que é independente de ATP - que passa a reconhecer e clivar sequências de mRNA complementares à fita guia (Rand et al., 2005). Vários fatores estão envolvidos no momento de escolha da fita-guia, porém fatores como menor estabilidade na região 5` e, determinadas características de sequência, parecem favorecer que determinada fita seja retida no complexo (Czech and Hannon, 2011).

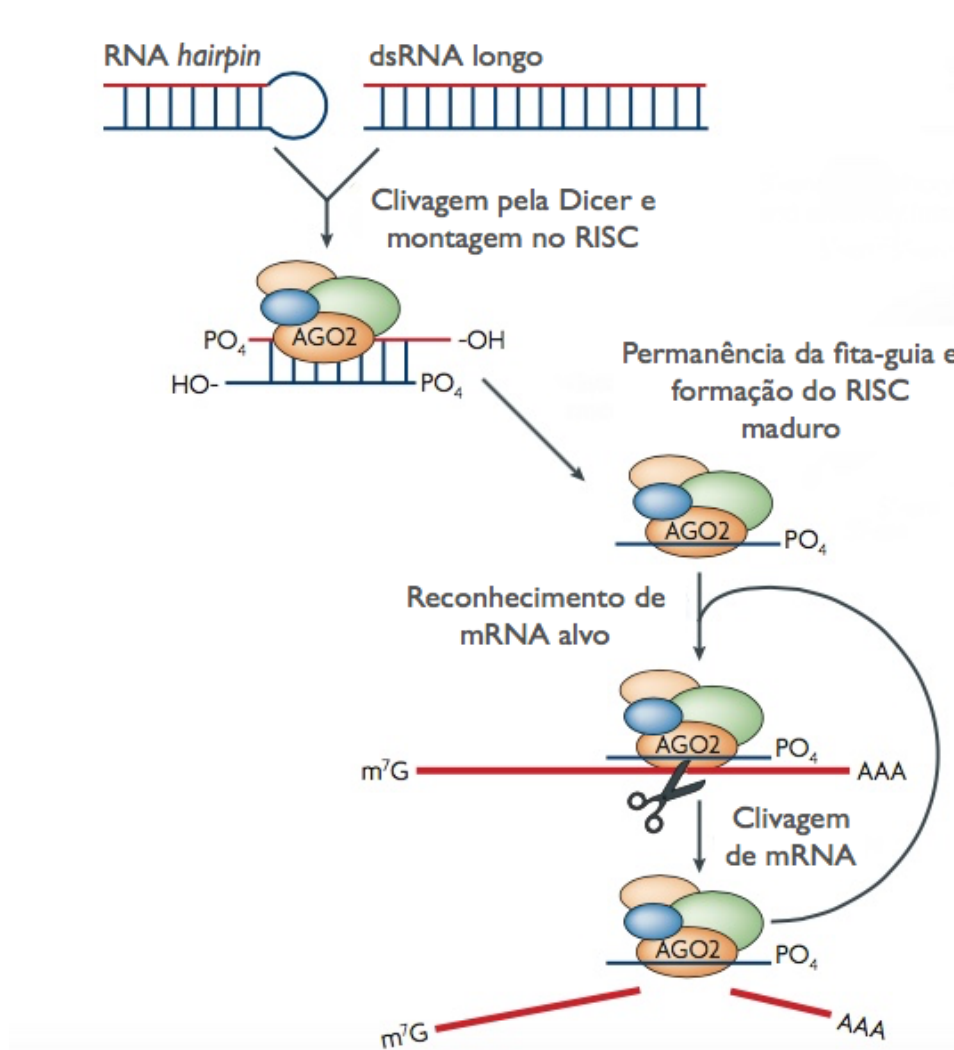


Figura 5: Mecanismo de RNA de interferência (RNAi): RNAs dupla-fita (dsRNAs) longos ou RNAs em forma de grampo (*hairpin* RNA-*hp*RNA) são clivados pela DICER em pequenos (20-25nt) RNAs interferentes (siRNAs), com 2nt *overhangs* nas regiões 3' e 5'. Esses siRNAs são incorporados em um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que contém uma proteína argonauta, a proteína DICER e outros fatores celulares. O RISC ativo, o qual contém a fita-guia de RNA, passa a reconhecer e clivar sequências de mRNA complementares. O RISC é novamente reutilizado em vários eventos de clivagem (Modificado de Rana, 2007).

Em plantas, as RNA polimerases dependentes de RNA (RdRps) atuam na via de silenciamento, resultando na amplificação do sinal dessa via. Essas proteínas agem como *primers* e, a partir de um RNA fita-simples, produzem RNAs de dupla-fita, que novamente são reconhecidos pela DICER, resultando em maior quantidade de moléculas de siRNAs e amplificação da via de silenciamento (Ahlquist, 2002). Ainda não é muito claro como as RdRps diferenciam RNAs endógenos, que não devem ser silenciados, de RNAs virais ou de elementos de transposição, mas alterações na estrutura do RNA podem estar envolvidas nesse processo (Baulcombe, 2004) (Abernathy and Glaunsinger, 2015).

Além do mecanismo de PTGS, em plantas, moléculas de RNA dupla-fita, podem desencadear a metilação de DNA de sequências homólogas, resultando em silenciamento gênico a nível transcricional (TGS) (Mette et al., 2000). Transcritos gênicos se associam a moléculas de RdRp, resultando em RNAs de dupla-fita no núcleo. Esses RNAs são clivados pela DICER - assim como no mecanismo de PTGS - formando siRNAs que são transportados para o citoplasma, onde se associam a proteínas Argonauta e, são novamente importados para o núcleo. No núcleo, esses siRNAs direcionam a metilação de sequências de DNA homólogas, resultando no processo de metilação de DNA dependente de RNA (RdDM), com consequente formação de regiões heterocromáticas e supressão da transcrição (Matzke et al., 2001) (Castel and Martienssen, 2013). Essa etapa de metilação inicial, é seguida por uma etapa

de manutenção, onde o padrão de metilação é mantido, de forma dependente ou independente dos siRNAs (Bond and Baulcombe, 2014).

Uma outra via de silenciamento, relacionada ao silenciamento de genes endógenos, envolve uma classe de moléculas de RNAs pequenos (20-24nt), denominados micro RNAs (miRNAs), que desempenham um importante papel biológico no desenvolvimento de plantas e animais. miRNAs atuam em transcritos celulares alvo, induzindo sua clivagem ou supressão da tradução. Nessa via de silenciamento, RNAs não codificantes em forma de grampo, denominados pri-miRNA, são sintetizados pela RNA polimerase II, e em seguida processados por uma proteína tipo-DICER (DCL1). pri-miRNAs sofrem uma clivagem inicial para a produção dos pre-miRNAs, que são exportados do núcleo para o citoplasma, onde são reconhecidos e clivados pela DICER, formando miRNAs maduros. Esses miRNAs são associados ao RISC e, de acordo com a complementariedade ao RNA alvo, resultarão em clivagem (complementariedade perfeita) ou supressão da tradução (complementariedade imperfeita) (Brodersen and Voinnet, 2006) (Czech and Hannon, 2011).

1.8 RNA de interferência como estratégia para resistência aos begomovírus

Em plantas, o mecanismo de silenciamento gênico, via RNA de interferência, é um mecanismo de defesa inato que atua contra patógenos

virais (Voinnet, 2005). Durante uma infecção por geminivírus, plantas são capazes de ativar naturalmente as vias de silenciamento - PTGS e TGS - e produzir siRNAs específicos contra o vírus responsável pela infecção (Rodríguez-Negrete et al., 2009) (Aregger et al., 2012). No entanto, esses siRNAs muitas vezes são detectados em uma etapa tardia da infecção, o que não é favorável ao controle do patógeno (Ibrahim and Aragão, 2015).

Em plantas transgênicas, o mecanismo de RNAi pode ser engatilhado através da expressão constitutiva de moléculas de RNA em forma de grampo (*intron-hairpin* RNA - *hpRNA*) (Figura 6). Smith et al (2000) demonstraram que os *hpRNAs*, são moléculas efetoras altamente eficientes, e desde então essa tecnologia vem sendo amplamente utilizada no melhoramento de plantas, visando resistência a diferentes espécies de begomovírus (Pooggin et al., 2003) (Fuentes et al., 2006) (Ramesh et al., 2007) (Ammara et al., 2015) (Chen et al., 2015), resultando em níveis variados de tolerância.

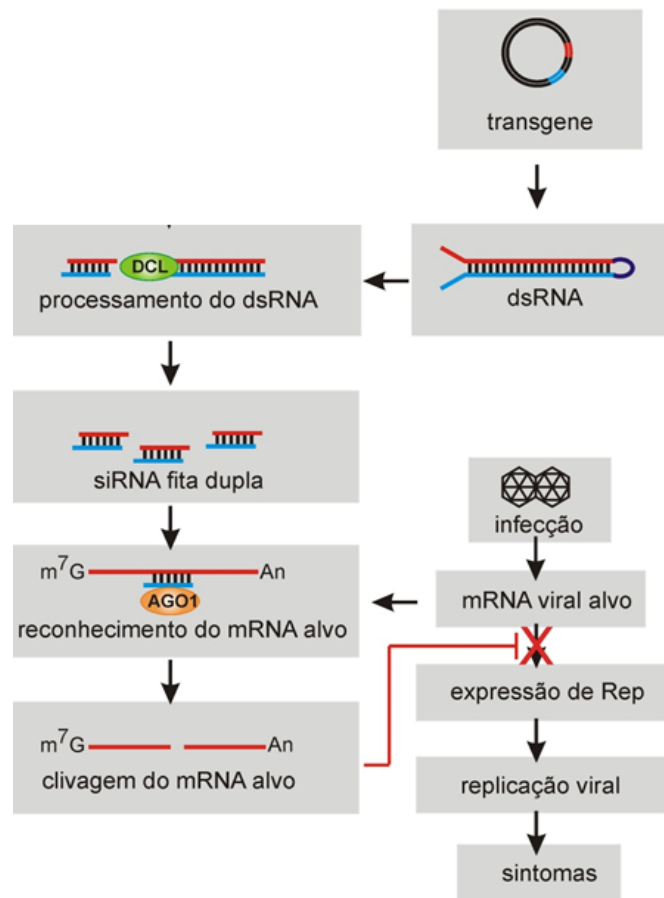


Figura 6: Estratégia para obtenção de resistência a begomovírus, através do mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS). Plantas transgênicas modificadas para expressar um RNA em forma de grampo (*hpRNA*) com uma seqüência do gene viral *rep* (que codifica para a proteína Rep, essencial para que ocorra a replicação viral). O *hpRNA* é convertido em siRNAs de dupla fita através da ação da DICER (DCL). Uma das fitas dos siRNAs é subsequentemente incorporada ao RISC. Guiado pela fita-guia proteínas Argonauta (AGO1) clivam o mRNA alvo, resultando em silenciamento gênico. Após a infecção das células vegetais, begomovírus expressam a proteína Rep, que é essencial para que ocorra a replicação viral. No entanto, em plantas geneticamente modificadas, o gene *rep* é silenciado, resultando na não expressão dessa proteína, e interferindo no ciclo viral.

Casos de imunidade a esses vírus utilizando essa estratégia também têm sido relatados. Fuentes et al (2006) demonstraram que uma linhagem de tomate transgênica, expressando um *hpRNA* complementar ao gene *C1* de tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), foi imune a esse vírus. Resultado similar foi demonstrado em trabalho realizado por Bonfim et al (2007), no qual plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) transgênicas, expressando um *hpRNA* complementar ao gene *rep* do bean golden mosaic virus (BGMV), foram imunes a esse vírus, mesmo sob alta pressão de inóculo.

Além de imunidade a um determinado agente viral, esse mecanismo também vem sendo utilizado para gerar resistência a dois ou mais vírus. Diversas construções gênicas, com alvo em diferentes genes virais (Ammara et al., 2015) (Sharma et al., 2015) (Chen et al., 2015) tem sido avaliadas, e demonstram a aplicabilidade dessa tecnologia na obtenção de plantas com resistência a diferentes begomovírus.

1.9 *Nicotiana benthamiana* como planta modelo

Nicotiana benthamiana, membro da família *Solanaceae*, é uma espécie de planta de origem australiana, amplamente utilizada pela comunidade científica como planta modelo. *N. benthamiana* tornou-se uma espécie importante em estudos de interação patógeno-hospedeiro, particularmente aqueles envolvendo agentes virais. Essa espécie modelo é altamente

susceptível à maioria dos vírus que infectam planta, fato que está intimamente ligado a uma mutação no gene de uma RNA polimerase dependente de RNA (*NbRdRP1m*), que resulta em deficiência na sua via de silenciamento. Aliado a isso, *N. benthamiana* é facilmente transformada geneticamente e regenerada, o que facilita sua utilização como modelo em diversos estudos moleculares, dentre eles, o uso de transgenia visando resistência a vírus (Goodin et al., 2008).

Em 2012, o *draft* do genoma de *N.benthamiana* foi disponibilizado em uma plataforma *on line* (<http://solgenomics.net>), criada para auxiliar pesquisadores de todo o mundo na obtenção da sequência de genes, estudo do genoma dessa espécie e estudos genômicos comparativos entre solanáceas (Bombarely et al., 2012).

1.10 Objetivo Geral

1. Avaliar a ferramenta de RNA de interferência como forma de controle de begomoviroses em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e tomateiro (*Solanum lycopersicum*).

2 Capítulo 2

Redução da carga viral em mosca branca (*Bemisia tabaci* Gen.) se alimentando em plantas de feijão transgênicas, resistentes ao bean golden mosaic virus, via RNAi

2.1 Resumo

O begomovírus bipartido bean golden mosaic virus (BGMV), transmitido pela mosca branca (*Bemisia tabaci*), é o agente responsável pelo mosaico dourado do feijoeiro, uma das doenças mais limitantes para o cultivo de feijão no Brasil. O mecanismo de RNA de interferência (RNAi) foi utilizado para silenciar o gene *rep* do BGMV e uma linhagem de feijão geneticamente modificada (GM), imune a esse vírus, foi previamente gerada. Nesse estudo, nós investigamos se moscas brancas virulíferas, infectadas pelo BGMV, poderiam reduzir sua quantidade de DNA viral, após se alimentarem em plantas de feijão GM. Para isso, moscas virulíferas foram transferidas para plantas de feijão GM e não-GM, onde permaneceram durante um período de 4 e 8 dias. A abundância de DNA viral foi estimada, através de uma PCR semi-quantitativa, para amplificação de fragmentos específicos do gene *REn* (*Replication Enhancer*) do BGMV, e da subunidade I da citocromo oxidase de *B. tabaci* (*BtCOI*). A quantidade de DNA viral foi significativamente reduzida em moscas brancas que se alimentaram em plantas de feijão GM (comparado à moscas que se alimentaram em plantas não-GM), em 52% e 84%, nos períodos de 4 e 8 dias respectivamente.

Palavra-chave: Bean golden mosaic virus, resistência à vírus, carga viral, mosca branca

Capítulo publicado na revista Virus Research (Anexo 1):

Paula, Nayhanna T.de, Faria, Josias C.de, Aragão, Francisco J.L., Reduction of viral load in whitefly (*Bemisia tabaci* Gen.) feeding on RNAi- mediated bean golden mosaic virus resistant transgenic bean plants. Virus Research <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2015.08.012>

2.2 Abstract

The bipartite begomovirus bean golden mosaic virus (BGMV), transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci*, is the responsible agent of golden mosaic, one of the most limiting diseases for bean cultivation in Brazil. The RNA interference (RNAi) mechanism was explored to silence the *rep* gene from BGMV and a genetically modified (GM) bean immune to the virus was previously generated. In this study, we investigated if BGMV-viruliferous whiteflies would reduce DNA viral amount after feeding on GM bean plants. For this, BGMV-viruliferous whiteflies were transferred to GM bean plants and non-GM bean plants, over the period of 4 and 8 days. The viral DNA abundance was estimated by a semi-quantitative PCR, for amplication of specific fragments of *REn* gene (*Replication Enhancer*) of BGMV, and subunit I of cytochrome oxidase from *B. tabaci* (*BtCOI*). BGMV DNA amount was significantly reduced in whiteflies feeding in GM-plants (compared with insects feeding on non-GM plants) for a period of 4 and 8 days in 52% and 84% respectively.

Keywords: Bean golden mosaic virus; virus resistance; viral load; whitefly

2.3 Introdução

O bean golden mosaic virus (Família *Geminiviridae*) - um begomovírus bipartido transmitido pela mosca branca (*Bemisia tabaci*) - é o agente responsável pelo mosaico dourado do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), uma doença limitante para a produção de feijão no continente americano, cujo método de controle é baseado principalmente na aplicação de inseticidas de alta toxidez, para controle do vetor (Aragão, 2014).

Em 2007, uma planta de feijão transgênica imune ao BGMV foi gerada (Bonfim et al., 2007). Pesquisadores utilizaram a estratégia de RNA de interferência (RNAi), para silenciar o gene *rep* do BGMV, um gene fundamental para que ocorra a replicação viral (Figura 1). Esse evento transgênico (conhecido como 5.1, Embrapa 5.1 ou EMB-PV051-1) foi completamente caracterizado (Aragão et al., 2013), e em 2011, autorizado para liberação comercial no Brasil, pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).

A interação existente entre os begomovírus e a mosca branca é complexa. Uma vez adquiridos, esses agentes podem permanecer no inseto durante toda a sua vida, e são capazes de alterar parâmetros biológicos da mosca, como expectativa de vida, taxa de fecundidade e *fitness* para transmitir novos vírus. Diante disso, a possibilidade de replicação dos begomovírus no corpo do inseto, vem sendo especulada (Czosnek et al., 2001) (Hogenhout et

al., 2008). Estudos demonstraram que o begomovírus monopartido tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) parece se replicar em *B. tabaci* (Sinisterra et al., 2005) (Pakkianathan et al., 2015), enquanto o bipartido tomato mottle virus (ToMoV) parece não se replicar (Sinisterra et al., 2005). No entanto, a possibilidade de replicação desses vírus em mosca branca ainda é uma questão controversa e que deve ser melhor investigada.

Nesse trabalho, nós investigamos se moscas brancas virulíferas, infectadas com BGMV, podem reduzir sua carga viral após se alimentarem em plantas de feijão geneticamente modificadas, imunes a esse vírus.

2.4 Materiais e métodos

2.4.1 Ensaio biológico

Grupos de aproximadamente 100 moscas brancas (misto de machos e fêmeas) foram coletados de uma colônia de moscas, se alimentado em uma planta de feijão infectada pelo bean golden mosaic virus (BGMV), e em seguida transferidos para plantas de feijão transgênicas (Embrapa 5.1) e não-transgênicas. As moscas virulíferas foram mantidas nessas plantas durante um período de 4 e 8 dias, e então coletadas para a análise do DNA do BGMV. Três grupos de 2 plantas foram utilizados para cada tratamento, e os experimentos foram repetidos 3 vezes.

2.4.2 PCR semi-quantitativa

DNA total foi isolado das moscas brancas, de acordo com protocolo já descrito (Calderón-Cortés et al., 2010). Resumidamente, os insetos foram maçerados em N₂ líquido, e homogeneizados em 1mL de tampão de extração contendo, 20mM EDTA (pH 8), 100mM Tris-HCl (pH 7,5), 1,4 M NaCl, 2% CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide), 4% PVP (Polivinil-pirrolidona) e 2% de β-mercaptoetanol. Essa mistura foi incubada a 60°C por 30 minutos. Posteriormente foi adicionado 1 volume de clorofane (Fenol-Clorofórmio-Álcool

isoamílico), e a mistura foi centrifugada a 13000 xg por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e precipitado com 2 volumes de etanol absoluto. O precipitado foi lavado em etanol 70% e ressuspenso em H₂O milli-Q autoclavada.

O DNA foi submetido à uma reação em cadeia pela polimerase (PCR) semi-quantitativa, de acordo com Bonfim et al (2007), utilizando o par de *primers* AC3F (5'- TGTTGCGAAACGTACAGCTCTG-3') e AC3R (5'- CACAACGACCAGAGTATACCAC-3') para amplificar um fragmento de 223 pb do gene *REn* (*Replication Enhancer*) de BGMV. Como controle interno, o par de *primers* MOSCA44F (5'-GAGGTATTTGGAAGGTTGGGGA-3') e MOSCA579R (5'- TAATCTGAATATCGGCGAGGCA-3') foi utilizado para amplificar 536 pb do gene da subunidade I da citocromo oxidase de *B. tabaci* (*BtCOI*) (Acesso no GenBank: EU760723.1). O número de ciclos de amplificação foi otimizado para finalizar a reação no estágio exponencial, garantindo uma análise semi-quantitativa

A intensidade relativa das bandas presentes no gel de agarose, foi determinada através do programa Quantity One v4.6.3. A quantificação relativa foi realizada por comparação da intensidade das bandas referentes ao gene *REn* e *BtCOI*. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes.

2.4.3 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média \pm desvio-padrão. Diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste t, através do programa *GraphPad Prism* v. 6.02 (GraphPad Software Inc.). Diferenças apresentando valores de $P < 0.05$, foi consideradas estatisticamente significantes.

2.5 Resultados e discussão

A análise por PCR semi-quantitativa demonstrou que a quantidade de DNA do bean golden mosaic virus (BGMV) diminuiu em moscas brancas virulíferas transferidas para plantas de feijão geneticamente modificadas (GM), quando comparado a insetos transferidos para plantas de feijão não-GM. Os resultados revelaram que após um período de 4 e 8 dias de alimentação em plantas GM, a redução de DNA do BGMV foi de 52% e 84% respectivamente, comparado à moscas que se alimentaram em plantas não-GM (Figura 2).

Contrário ao que foi observado em tomato yellow leaf curl virus (Sinisterra et al., 2005) (Pakkianathan et al., 2015), nossos resultados sugerem que o BGMV parece não ser capaz de se replicar com alta eficiência em mosca branca. A redução na quantidade de DNA desse vírus, observada em moscas expostas ao feijão GM, pode ser atribuída ao fato de que os insetos não adquirem partículas virais sintetizadas *de novo*, uma vez que o BGMV não é capaz de se replicar nessas plantas, como previamente demonstrado (Bonfim et al., 2007). Em adição, o aumento na quantidade de DNA observado em moscas brancas transferidas para plantas de feijão não-GM pode ser atribuído ao aumento de partículas do BGMV, durante o período de 8 dias.

Ainda assim, nós não podemos excluir a possibilidade de que os pequenos RNAs interferentes (siRNAs), expressos pelas plantas GM, para silenciamento do gene *rep*, poderiam interferir na interação vírus-inseto.

Recentemente, pesquisadores demonstraram que siRNAs, são moléculas capazes de silenciar genes em *B. tabaci* (Upadhyay et al., 2011) (Thakur et al., 2014). Embora transcritos virais de begomovírus, como tomato yellow leaf curl virus e tomato mottle virus, tenham sido observados em mosca branca (Mehta et al., 1994) (Sinisterra et al., 2005) (Pakkianathan et al., 2015), ainda não foi estabelecido se o genoma do BGMV pode ou não ser transcrito pelas células do seu vetor.

A redução na quantidade de DNA do BGMV em *B. tabaci* com o uso de variedades GM imunes a esse vírus, poderia ajudar no controle do mosaico dourado tanto em campos de feijão GM, quanto em campos não-GM, através da redução do inóculo viral, e da probabilidade de emergência de novos vírus, associados à co-existência de distintos agentes virais no mesmo campo. Essa possibilidade será posteriormente avaliada sob condições de campo

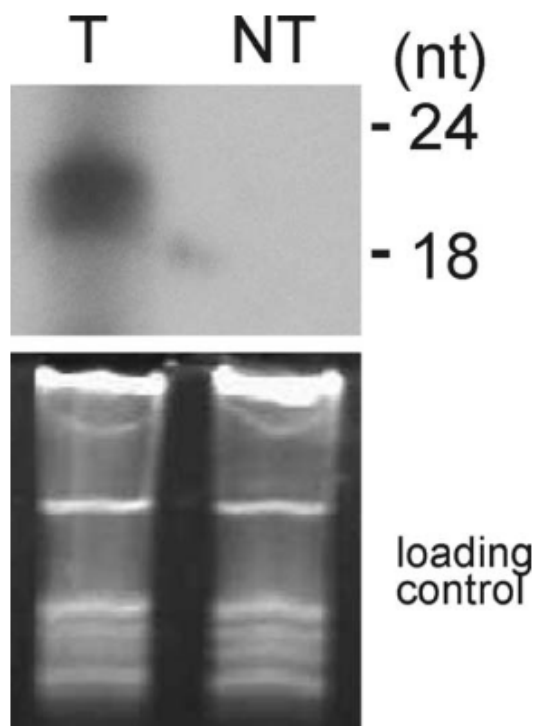


Figura 1: Detecção de pequenos RNAs interferentes (siRNAs), isolados a partir de folhas de plantas de feijão transgênicas (T) e não-transgênicas (NT). O RNA foi hibridizado com uma sonda de DNA, correspondente a um fragmento do gene *rep*, entre as posições 1.838 e 2.232 no genoma do bean golden mosaic virus (BGMV). O gel do RNA, corado com brometo de etídeo, está demonstrado (loading control).

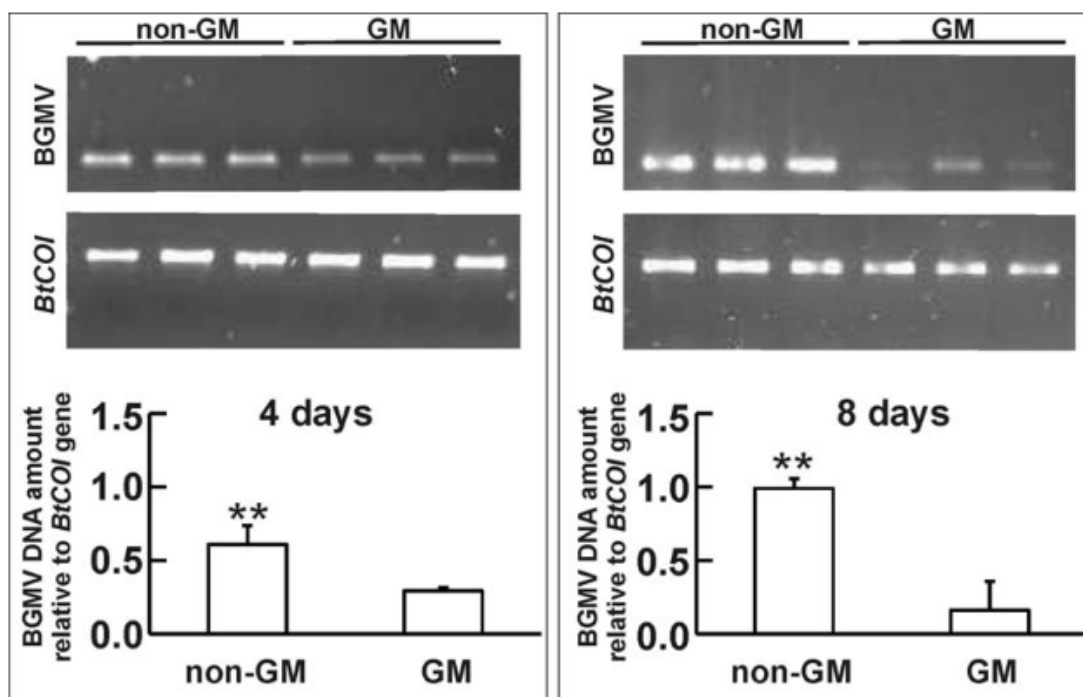


Figura 2: Quantificação de DNA do bean golden mosaic virus (BGMV) em moscas brancas (*Bemisia tabaci*), se alimentando em plantas de feijão geneticamente modificadas (GM) e não-GM, por 4 e 8 dias. Para a análise semi-quantitativa, reações de PCR foram submetidas a um tratamento inicial a 95°C (5 min) e 25 ciclos de amplificação (95°C por 1 min, 55°C por 1 min, e 72°C por 1 min), com um ciclo de extensão de 5 min a 72°C. O gene da subunidade I da citocromo oxidase de *B. tabaci* (*BtCOI*) foi usado como controle interno. Dados representam a média \pm desvio-padrão de três replicatas biológicas. ** $P < 0.05$.

3 Capítulo 3

RNA de interferência como estratégia para resistência ampla a begomovírus que infectam tomateiro (*Solanum lycopersicum*) no Brasil

3.1 Resumo

Os begomovírus (Família *Geminiviridae*) representam um importante grupo de patógenos, que infectam uma grande variedade de espécies de plantas, e causam perdas significativas na agricultura. No Brasil, o cultivo de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é ameaçado por diversas espécies emergentes desses vírus. Nesse estudo, o mecanismo molecular de RNA de interferência (RNAi) foi utilizado como ferramenta para a obtenção de plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana*, com resistência de amplo espectro a begomovírus que infectam tomateiro no Brasil. Uma sequência quimérica de 1.286 nucleotídeos, homóloga ao gene *rep* de quatro importantes espécies associadas a tomateiro - tomato leaf distortion virus (ToLDV), tomato golden vein virus (TGVV), tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV) e tomato severe rugose virus (ToSRV) - foi utilizada para gerar uma construção do tipo *intron-hairpin*. Através do sistema de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, 20 linhagens de plantas de *N. benthamiana* transgênicas foram geradas. Dessas, 3 linhagens demonstraram uma maior proporção de plantas resistentes, quando desafiadas com DNA do TGVV, pelo método de biobalística. Essa proporção de plantas resistentes foi dependente da concentração de DNA viral utilizada no bombardeamento (≈ 1000 ng/ μ L, 500 ng/ μ L ou 250 ng/ μ L de DNA viral/planta), com um maior número de plantas não infectadas, observado quando uma menor pressão de infecção (≈ 250 ng/ μ L de DNA viral/planta) foi utilizada. Essas linhagens também foram desafiadas com os agentes virais tomato rugose mosaic virus (ToRMV), tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) e tomato interveinal chlorosis virus (ToICV). Nossos resultados sugerem que a resistência a todos os vírus avaliados foi dependente da zigose do transgene. Uma proporção de 77% das plantas que apresentaram o fenótipo de resistência, demonstraram ser homozigotas.

Palavra-chave: *Begomovirus*, RNAi, *S. lycopersicum*, *N. benthamiana*

3.2 Abstract

The *Begomovirus* (Family *Geminiviridae*) represents an important group of pathogens that infect a wide range of plant species and cause significant losses in agriculture. In Brazil, tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivation is threatened by diverse species of these viruses. In this study, the molecular mechanism of interfering RNA (RNAi) was used as a tool to generate transgenic plants of *Nicotiana benthamiana* with wide resistance to Brazilian tomato begomoviruses. A chimeric sequence of 1.286 nucleotides, homologous to *rep* gene from four important tomato-begomovirus species - tomato leaf distortion virus (ToLDV), tomato golden vein virus (TGVV), tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV) and tomato severe rugose virus (ToSRV) - was used to generate an intron-hairpin construct. Using *Agrobacterium tumefaciens* system of transformation, 20 lines of transgenic plants of *N. benthamiana* were generated. Of these, three lines demonstrated significant proportion of resistant plants, when challenged with the DNA of TGVV, by biolistic method. The proportion of resistant plants was dependent upon viral DNA load used in bombardment (≈ 1000 ng/ μ L, 500 ng/ μ L or 250 ng/ μ L of DNA/plant), with the higher number of uninfected plants observed when lower infection pressure (≈ 250 ng/ μ L of DNA/plant) was used. These lines were also challenged with viral agents tomato rugose mosaic virus (ToRMV), tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) and tomato interveinal chlorosis virus (ToICV). Our results suggest that resistance to all evaluated viruses was transgene zygosis dependent. A proportion of 77% of the plants that showed resistant phenotype were shown to be homozygous.

Keywords: *Begomovirus*, RNAi, *S. lycopersicum*, *N. benthamiana*

3.3 Introdução

O gênero *Begomovirus* compreende um grupo de agentes virais importantes na agricultura, pois são capazes de infectar e causar danos – resultando em menor produtividade – em várias espécies de plantas economicamente importantes. No Brasil, desde 1990, epidemias causadas por uma grande variedade de espécies de begomovírus, vem sendo relatadas em tomateiro (*Solanum lycopersicum*), com pelo menos 16 espécies já identificadas (Brown et al., 2015), o que caracteriza uma grande ameaça à produção dessa hortaliça no país.

Os begomovírus que infectam tomateiro no Brasil apresentam alta variabilidade genética (Ribeiro et al., 2003) (Rocha et al., 2013). Poucas variedades de tomateiro disponíveis no mercado, que apresentam certo grau de tolerância a alguns vírus, tem sido amplamente utilizadas pelos produtores. No entanto, não existem plantas imunes a esses vírus, e a resistência de amplo espectro ainda é um desafio.

O Silenciamento gênico, via RNA de interferência, é um mecanismo de defesa inato das plantas, que atua contra patógenos virais. Esse mecanismo pode ser induzido em plantas transgênicas, através da expressão de moléculas de RNA em forma de grampo (*intron hairpin* RNA – *hpRNA*), e resultar na degradação de transcritos virais específicos (Smith et al., 2000). Essa estratégia tem sido amplamente utilizada no desenvolvimento de plantas com

resistência a begomovírus, com resultados promissores, inclusive como já foi demonstrado pelo nosso grupo (Bonfim et al., 2007) (Aragão et al., 2013).

Este trabalho descreve a eficiência de um *hpRNA* quimérico, em plantas de *Nicotiana benthamiana* transgênicas, para o silenciamento do gene *rep* de diferentes espécies de begomovírus que infectam tomateiro (*Solanum lycopersicum*) no Brasil.

3.4 Objetivos

3.4.1 Objetivo Geral

Desenvolver um cassete de expressão de *intron-hairpin* RNA (*hpRNA*) quimérico, direcionado para o gene *rep* de diferentes begomovírus que infectam tomateiro (*Solanum lycopersicum*) no Brasil, e avaliar sua eficiência no silenciamento desse gene em plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana*.

3.4.2 Objetivos específicos

1. Identificar em grupos de espécies de begomovírus, baseado na identidade nucleotídica, regiões conservadas dentro do gene *rep*;
2. Construir um cassete de expressão de *hpRNA* quimérico, com sequência homóloga ao gene *rep* de diferentes espécies de begomovírus associados a tomateiro;
3. Avaliar a eficiência desse *hpRNA* no silenciamento do gene *rep*, através do desafio das plantas de *N. benthamiana* transgênicas, via bombardeamento de partículas, com quatro espécies de begomovírus que infectam tomateiro.

3.5 Materiais e métodos

3.5.1 Identificação de sequências conservadas do gene *rep*

Inicialmente, sequências de nucleotídeos correspondentes ao gene *rep* de 11 espécies de begomovírus associados a tomateiro no Brasil, depositadas no GenBank (*National Center for Biotechnology Information – NCBI*), foram selecionadas (Tabela 1). Essas sequências foram alinhadas através do software Mega 5.0 (Koichiro et al., 2011) para análise de regiões conservadas dentre os acessos selecionados.

Tabela 1: Lista dos 11 vírus que infectam tomateiro no Brasil, selecionados para a análise da sequência do gene *rep*.

Vírus	Acesso GenBank
tomato rugose mosaic virus (ToRMV)	AF291705.1
tomato severe rugose virus (ToSRV)	DQ207749.1
tomato golden mosaic virus (TGMV)	JF694490.1
tomato mild mosaic virus (ToMIMV)	KC706611.1
tomato yellow spot virus (ToYSV)	DQ336350.1
tomato leaf distortion virus (ToLDV)	EU710749.1
tomato yellow vein streak virus (ToYVSV)	EF417915.1
tomato golden vein virus (TGVV)	JF803254.1
tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV)	JF803246.1
tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV)	AF490004.1
tomato interveinal chlorosis virus (ToICV)	JF803252.1

O alinhamento das sequências do gene *rep*, foi utilizado para a montagem de uma árvore filogenética, baseada no método *Neighbor-Joining*, com 1.000 repetições “bootstraps”, o que possibilitou a identificação de quatro *clusters* de vírus com maior identidade de nucleotídeos (Figura 1). As sequências virais de cada *cluster* foram alinhadas separadamente e uma região conservada do gene *rep*, de um vírus de cada grupo, foi selecionada para compor o cassete de expressão de *hpRNA*, sendo: Uma região de 326 pb de ToSRV (nucleotídeos 1937 a 2262), uma região de 320 pb do genoma ToLDV (nucleotídeos 2204 a 2523), uma região de 319 pb do genoma de TGVV (nucleotídeos 2088 a 2406), e uma região de 321 pb do genoma de ToMLCV (nucleotídeos 2042 a 2362). A localização das sequências escolhidas, dentro do gene *rep* de cada vírus, é demonstrada na figura 2

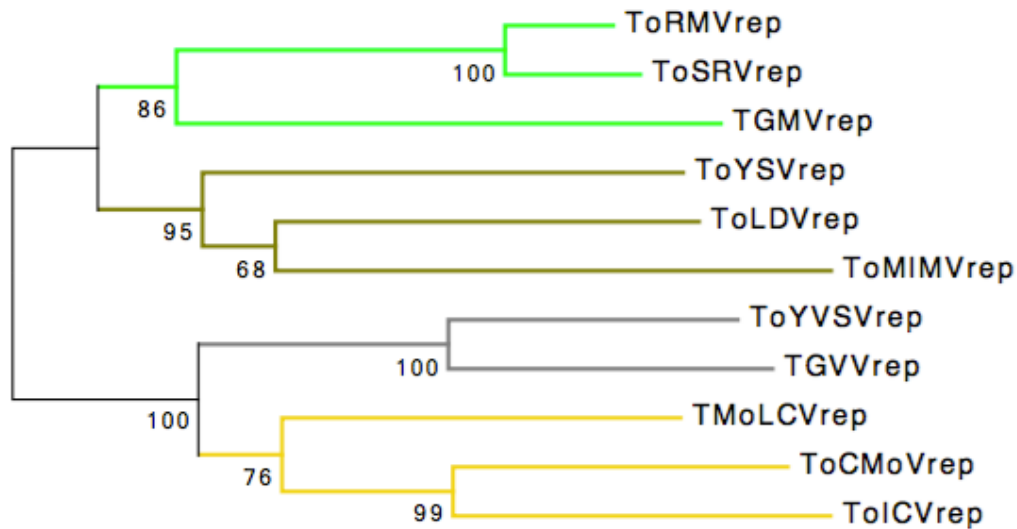


Figura 1: Árvore filogenética baseada no alinhamento de 11 sequências do gene *rep* de diferentes isolados de begomovírus que infectam tomateiro no Brasil. Os vírus utilizados no alinhamento foram: tomate rugose mosaic virus (ToRMV), tomate severe rugose virus (ToSRV), tomate golden mosaic virus (TGMV), tomate mild mosaic virus (ToMIMV), tomate yellow spot virus (ToYSV), tomate leaf distortion virus (ToLDV), tomate yellow vein streak virus (ToYVSV), tomate golden vein virus (TGVV), tomate mottle leaf curl virus (TMoLCV), tomate chlorotic mottle virus (ToCMoV) e tomate interveinal chlorosis virus (ToICV). A árvore foi construída pelo método *Neighbor-Joining*, com 1000 repetições "bootstraps", utilizando o programa Mega 5.0 (Koichiro et al., 2011). Os quatro grupos com maior identidade nucleotídica são demonstrados por ramos de diferentes cores, sendo: verde para o grupo do vírus ToSRV, bege para o grupo do vírus ToLDV, cinza para o grupo do vírus TGVV e amarelo para o grupo do vírus ToMLCV. Os números abaixo dos ramos representam a porcentagem de vezes que cada ramo é repetido nas repetições "bootstraps" (Felsenstein, 1985).

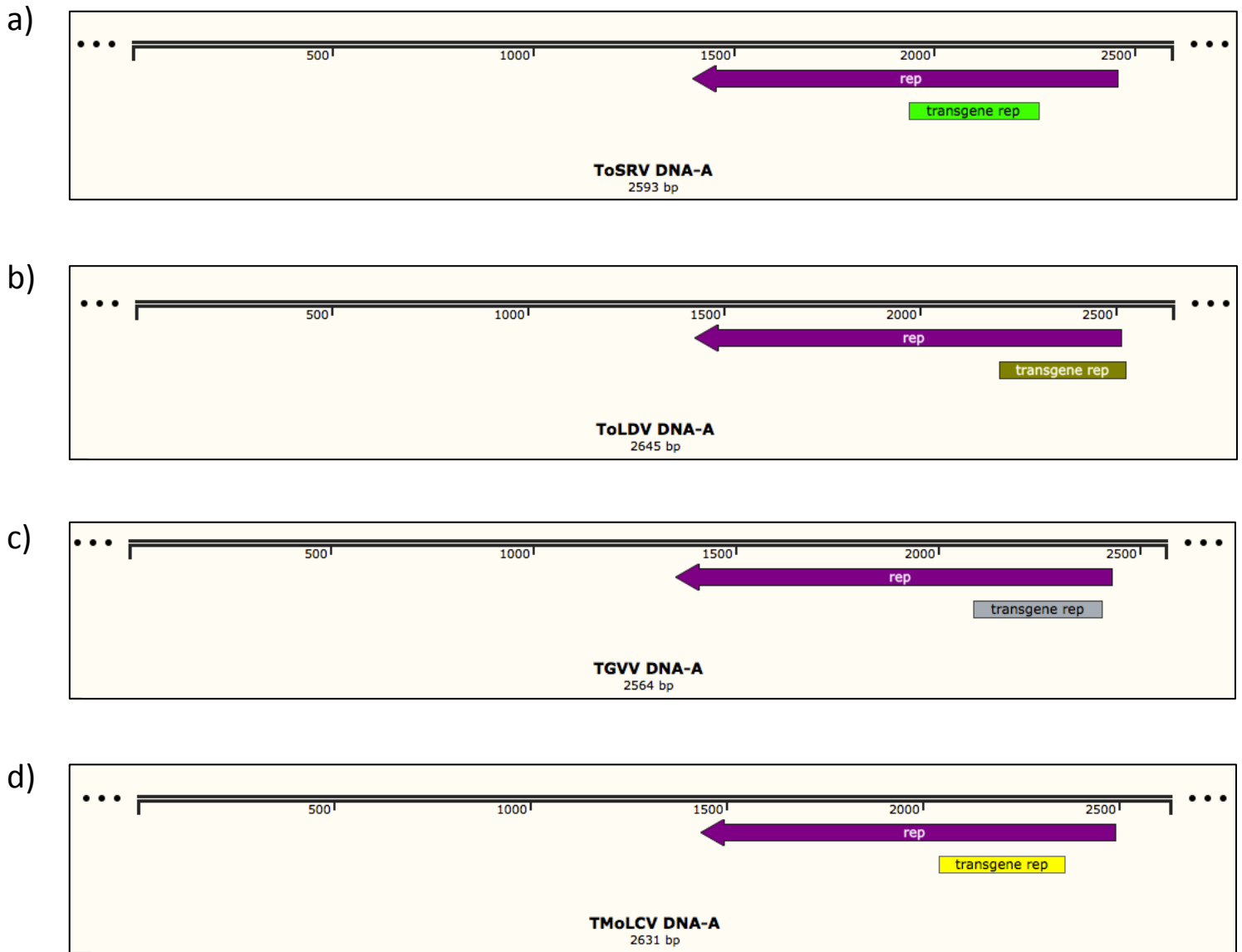


Figura 2: Representação das regiões do gene *rep*, escolhidas para construção do cassete de expressão de *hpRNA*. As figuras representam o DNA-A completo dos vírus selecionados, com a localização do gene *rep* (roxo) no genoma, e a localização dentro desse gene das sequências escolhidas para construção do DNA quimérico para expressão do *hpRNA* (transgene *rep*). a) tomate severe rugose virus (ToSRV), com um DNA-A de 2.593 pb e a região de 326 pb, selecionada para construção do cassete de interferência, demonstrada em verde. b) tomate leaf distortion virus (ToLDV), com DNA-A de 2.645 pb, e a região selecionada de 320 pb demonstrada em bege. c) tomate golden vein virus (TGVV), com 2.564 pb e a região selecionada de 319 pb em cinza. d) tomate mottle leaf curl virus (TMoLCV), com 2.631 pb, e a região de 321 pb selecionada demonstrada em amarelo.

3.5.2 Construção do cassete de expressão de *hpRNA*

As quatro regiões do gene *rep* selecionadas, foram dispostas *in tandem*, e sintetizadas com a adição dos sítios de restrição Apal, XbaI e KpnI, SpeI nas extremidades, resultando em um DNA quimérico de 1.286 pb (Epoch life Science, Inc.). Essa sequência quimérica foi clonada nas orientações *sense* e *antisense*, flanqueando o íntron 3 do gene da malato sintase de *Arabidopsis thaliana* (AtMS), no vetor pSIU, desenvolvido por Tinoco et al (2010), formando um cassete para expressão de um *hpRNA*. Esse cassete foi liberado do vetor pSIU através de digestão com as enzimas EcoRI e HindIII, e clonado no vetor binário pCAMBIA 3300 (Cambia, Austrália), dando origem ao vetor denominado pC3300-fourgemini, de 12.325 pb (Epoch life Science, Inc.) (Figura 3).

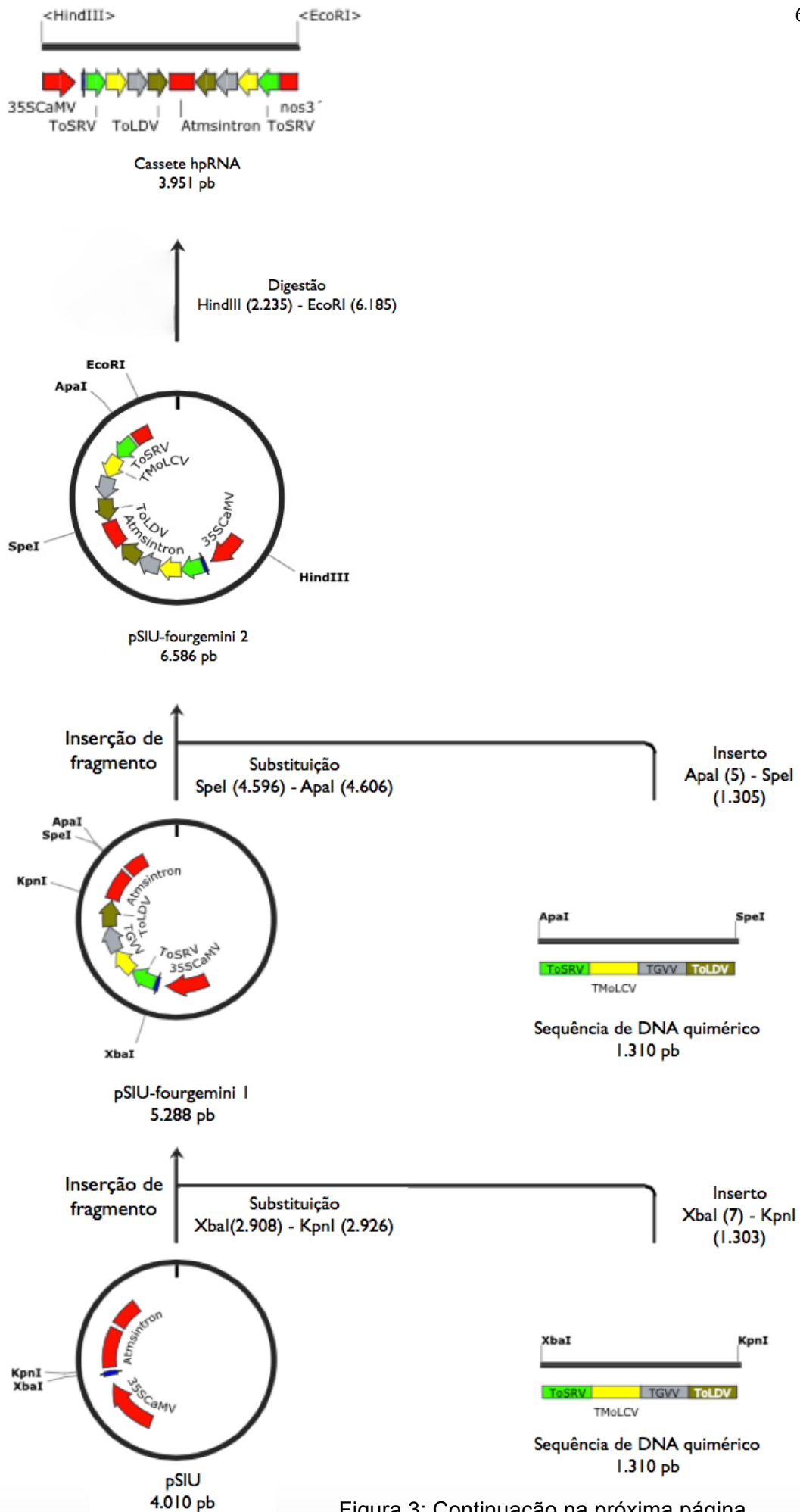


Figura 3: Continuação na próxima página

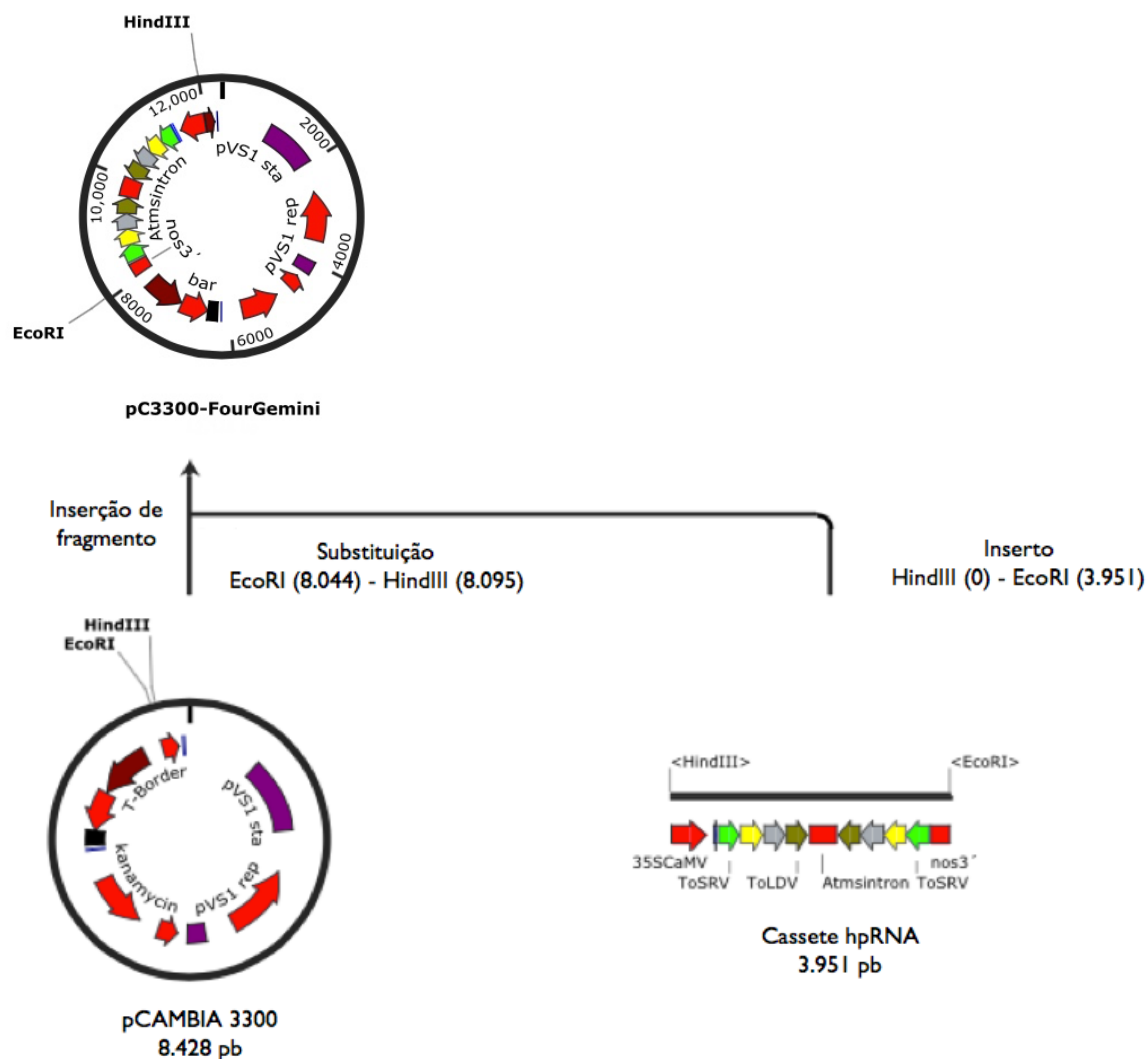


Figura 3: Estratégia para construção de um cassete de expressão de *hpRNA* quimérico para silenciamento do gene *rep* de begomovírus. Uma sequência de DNA quimérico, formada por sequências de quatro grupos virais, dispostas *in tandem*, foi clonada no vetor pSIU, entre os sítios XbaI e KpnI, resultando no vetor pSIU-fourgemini 1. A mesma sequência foi clonada nesse vetor, em sentido contrário, entre os sítios SpeI e ApaI, resultando no vetor pSIU-fourgemini 2. Isso permitiu a formação de um cassete de *hpRNA*, direcionado para o gene *rep*, entre os sítios EcoRI e HindIII. Tomate severe rugose virus (ToSRV), tomate mottle leaf curl virus (TMoLCV), tomate golden vein virus (TGVV), tomate leaf distortion virus (ToLDV), promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (35SCaMV), íntron 3 do gene da malato sintase de *Arabidopsis thaliana* (AtMS intron), terminador do gene da nopalina sintase (nos3'). O cassete de interferência (3.951 pb) retirado do vetor pSIU-fourgemini2 foi clonado, entre os sítios EcoRI e HindIII do vetor binário pCambia-3300, resultando no vetor pC3300-fourgemini (12.325 pb). Tomate severe rugose virus (ToSRV), tomate mottle leaf curl virus (TMoLCV), tomate Golden vein virus (TGVV), tomate leaf distortion virus (ToLDV), promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (35SCaMV), íntron 3 do gene da malato sintase de *Arabidopsis thaliana* (AtMS intron), terminador do gene da nopalina sintase (nos3'), gene de resistência à canamicina (Kanamycin), regiões entre as quais o DNA de interesse é clonado (T-border), gene de resistência ao herbicida glufosinato de amônio (bar), replicon para replicação em *A. tumefaciens* (pVS1 rep), região para estabilidade em *A. tumefaciens* (PVS1 sta).

3.5.3 Análise *in silico* do cassete de expressão de *hpRNA*

O cassete para expressão de *hpRNA* desenvolvido, foi submetido à uma análise *in silico* utilizando as ferramentas *on line* Mfold e DSIR (*Designer of Small Interfering RNA*). O software Mfold (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>) foi utilizado para predição da estrutura secundária formada pelo *hpRNA* e sua estabilidade, conforme descrito por Zuker et al (2003). A análise dessa sequência pelo software DSIR, o qual utiliza um algoritmo descrito por Vert et al (2006), possibilitou a predição de potenciais siRNAs para a região alvo dentro do gene *rep*.

3.5.4 Transformação de bactérias

3.5.4.1 *Escherichia coli* cepa XL1-blue

Células eletrocompetentes de *E. coli* XL1-blue (Stratagene) foram transformadas por eletroporação com 20 ng de DNA do plasmídeo pC3300-fourgemini, de acordo com protocolo pré-estabelecido (BRASILEIRO, A.C.M. CARNEIRO, 1998). Após a transformação, 100 µL da amostra foram plaqueados em meio LB (Luria-Bertani) sólido contendo canamicina (100 mg/L), e incubados a 37°C *overnight*. Clones selecionados foram multiplicados em 3 mL de meio LB líquido, contendo canamicina, e após crescimento por 16hrs a 37°C, o DNA foi purificado (mini-prep) de acordo com protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001). A clonagem foi confirmada por análise de restrição com diferentes

endonucleases, seguindo as recomendações dos fabricantes. Clones que exibiram o perfil de restrição esperado foram sequenciados (Macrogen Inc. Coréia do Sul).

Quinhentos microlitros do clone contendo o plasmídeo de interesse, crescido em meio LB líquido, foram misturados com 500 µL de solução de glicerol 60% (v/v) autoclavado. As bactérias, a uma concentração final de 30% de glicerol, foram armazenadas em freezer -80 °C.

3.5.4.2 *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA-105

A linhagem desarmada EHA-105 de *A. tumefaciens*, que possui o gene de resistência à rifampicina, foi preparada e transformada com DNA do plasmídeo pC3300-fourgemini por eletroporação (BRASILEIRO, A.C.M. CARNEIRO, 1998). Após a transformação, 100 µL da amostra foram plaqueados em meio LB sólido contendo os antibióticos canamicina (100 mg/L) e rifampicina (100 mg/L), e incubados a 28°C por 48 horas.

As colônias obtidas foram submetidas a uma reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de clones positivos. Nessa reação, um fragmento de 577 pb do plasmídeo pC3300-fourgemini foi amplificado, utilizando-se a enzima *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. Nessa reação foi utilizado um par de *primers* denominados 4geminiF (5' - AGCTGATCTGCCGTCGATTT - 3') e

4geminiR (5' - TCCGACGTCAAGTCCTAGTAAA – 3'), desenhados para uma região específica do plasmídeo pC3300-fourgemini, através da ferramenta *Primer designing tool* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), e sintetizados pela Macrogen Inc. (Coreia do Sul). As amostras foram submetidas a um programa de ciclagem com as seguintes condições: 95 °C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e uma extensão final à 72 °C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 1% diluído em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE), com posterior imersão em solução de brometo de etídeo por 15 minutos. Em seguida o gel foi visualizado em transiluminador (Bio Rad Laboratories), e amostras que apresentaram uma banda de 577 pb foram consideradas positivas.

Um clone de *A. tumefaciens* positivo foi selecionado para os posteriores eventos de transformação de *N. benthamiana*. Cento e vinte microlitros desse clone, crescido em meio LB líquido com os antibióticos seletivos, foram misturados com 80 µL de solução de glicerol 50% (v/v) autoclavado. Essas alíquotas de bactérias, a uma concentração final de 20% de glicerol, foram armazenadas em freezer -80 °C.

3.5.5 Transformação genética de *Nicotiana benthamiana*, via *Agrobacterium tumefaciens*

Alíquotas do clone de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo pC3300-fourgemini, armazenados em freezer -80 °C, foram descongelados e plaqueadas em meio AB sólido (Chilton et al., 1974), contendo os antibióticos rifampicina (100 mg/L) e canamicina (100 mg/L). Essa amostra foi incubada à 28°C por 2 dias. Em seguida, toda a cultura bacteriana foi raspada do meio e ressuspendida em meio MS líquido (Murasnige and Skoog, 1962) contendo sacarose (30 g/L). A suspensão bacteriana foi homogeneizada e diluída até a obtenção de uma OD₆₀₀ = 0,5, mensurada em espectrofotômetro (BioPhotometer plus - Eppendorf).

Discos foliares de *N. benthamiana* foram imersos em uma suspensão bacteriana por 15 minutos. Em seguida, esses explantes foram transferidos para um meio MS sólido, suplementado com 30 g/L de sacarose, 0,1 mg/L de ácido naftalenoacético (NAA) e 1 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP) por 2 dias a 24°C. Após esta etapa, os explantes foram transferidos para um meio de regeneração contendo sais de MS, suplementado com 30 g/L de sacarose, 0,1 mg/L de NAA, 1 mg/L de BAP e 250 mg/L do antibiótico cefotaxima, no qual permaneceram durante cinco dias. Após esse período, os explantes foram transferidos para um novo meio de regeneração contendo sais de MS, suplementado com 30 g/L de sacarose, 0,1 mg/L de NAA, 1 mg/L de BAP, 250

mg/L do antibiótico cefotaxima e 6 mg/L de glufosinato de amônio, utilizado como agente seletivo das plantas transgênicas.

Brotos diferenciados e alongados foram transferidos para um meio de enraizamento, composto por sais de MS, suplementado com 30 g/L de sacarose, 0,1 mg/L de NAA, 250 mg/L de cefotaxima e 6 mg/L de glufosinato de amônio, até o aparecimento de raízes. Após o enraizamento as plantas foram aclimatadas e transferidas para a casa de vegetação.

3.5.6 Triagem das linhagens de *N. benthamiana* transgênicas

3.5.6.1 Teste rápido para presença da proteína PAT (phosphinothricin-N-acetyltransferase)

O gene *bar* foi utilizado como marcador de seleção de plantas transgênicas. Plantas regeneradas foram testadas para a presença da proteína PAT (phosphinothricin-N-acetyltransferase), que é codificada por esse gene (Block et al., 1987). PAT é uma enzima que inativa a ação de herbicidas que possuem a fosfotricina (PPT, Glufosinato de Amônio) como composto ativo.

A presença da PAT foi determinada através do teste de imunocromatografia de fluxo lateral AgraStrip® LL Seed & Leaf (Romer Labs), de acordo com as instruções do fabricante. Pedacinhos de folhas das plantas regeneradas foram maceradas em tubos contendo 500 µL de tampão AgraStrip. Em seguida, fitas de detecção foram inseridas no tubo contendo o tecido macerado, e a presença da proteína PAT foi determinada de acordo com o

padrão de marcas coloridas apresentados na fita. Plantas que apresentaram a presença de uma marca colorida (Não expressam a proteína PAT) foram consideradas não transgênicas, e plantas que apresentaram duas marcas coloridas (Expressam a proteína PAT), foram consideradas transgênicas.

3.5.6.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Inicialmente, DNA das folhas foi isolado de acordo com protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987), com modificações. Discos foliares foram coletados, macerados na presença de tampão CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide), contendo 1% de polivinil-pirrolidona (PVP-40), e incubados a 65°C por 20 a 30 minutos. Essa mistura foi tratada com clorofórmio puro e centrifugada a 16000 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e precipitado em 2,5 volume de etanol absoluto. Uma nova etapa de centrifugação foi realizada a 16000 xg por 5 minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em água milli-Q autoclavada.

Um microlitro do DNA foi submetido à PCR, utilizando-se a enzima *Taq* DNA *Polymerase Recombinant* (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. Nessa reação um fragmento de 1.089 pb foi amplificado com a utilização de *primers* específicos para o transgene: 35SAMVF (5'-CCACTATCCTTCGCAAGAC-3') e 4geminiR (5'-TCCGACGTCAAGTCCTAGTAAA-3'). As amostras foram submetidas às seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de

95 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e uma extensão final à 72 °C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 1% diluído TBE, com posterior imersão em solução de brometo de etídeo por 15 minutos. Em seguida o gel foi visualizado em transiluminador (Bio Rad Laboratories).

3.5.7 Teste de progênie

A geração T₁, das linhagens transgênicas geradas, foi analisada para a presença da proteína PAT, pelo teste de imunocromatografia de fluxo lateral AgraStrip® LL Seed & Leaf (Romer Labs), conforme anteriormente descrito (item 3.5.6.1).

Essa análise permitiu a determinação do padrão de segregação do transgene através do teste de qui-quadrado (χ^2), com a seguinte fórmula:

$$X^2 = \sum [(F_o - F_e)^2 / F_e], \text{ onde:}$$

F_o = Frequência observada para cada classe

F_e = Frequência esperada para cada classe com base na proporção de Mendel para um locus, dois ou três loci.

O teste de qui-quadrado com correção de Yates foi utilizado nos casos em que uma das frequências era menor que cinco.

3.5.8 Preparo dos clones infecciosos

3.5.8.1 Preparação do clone infeccioso de tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV)

Vinte nanogramas de DNA do clone infeccioso ToCMoV-[BA-Se1] (DNA-A e DNA-B) (Ribeiro et al., 2007), gentilmente cedido pela Dra. Simone Ribeiro (Embrapa-Cenargen), foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* XL1-blue (Stratagene), por eletroporação (BRASILEIRO, A.C.M. CARNEIRO, 1998). Essa amostra foi plaqueada em meio LB sólido contendo ampicilina (50 mg/L), e incubada a 37°C overnight. Clones selecionados foram multiplicados, e o DNA purificado, conforme descrito por Sambrook & Russell (2001).

Trinta microgramas de ambos componentes genômicos foram digeridos para possibilitar a separação da sequência do vírus do vetor de clonagem pBS KS+ (Stratagene). O DNA-A foi digerido com a enzima de restrição KpnI, e o DNA-B com a enzima HindIII, de acordo com as instruções dos fabricantes. Após confirmação da digestão por eletroforese em gel de agarose 1% diluído em TBE, com posterior imersão em solução de brometo de etídeo por 15 minutos, os fragmentos virais foram ligados com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Em seguida, o DNA foi precipitado com 2,5 vol de etanol absoluto, e posteriormente ressuspendido em 30 µL de água milli-Q autoclavada.

3.5.8.2 Preparação do clone infeccioso de tomate golden vein virus (TGVV)

Uma alíquota do clone infeccioso de TGVV (DNA-A e DNA-B) (Ferreira et al., 2008) , foi gentilmente cedida pela Dra Alice Kasuko Inoue-Nagata (Embrapa Hortaliças). A multiplicação desse clone em *E. coli* foi realizada seguindo os mesmos parâmetros do item anterior, exceto que clones positivos foram selecionados em meio LB sólido contendo canamicina (100 mg/L).

Os clones foram confirmados pelo perfil de restrição a partir da digestão com endonucleases específicas, de acordo com as instruções dos fabricantes. Clones que após a digestão com as enzimas EcoRI e PstI, apresentaram um fragmento de 7 kb (referente ao vetor pCambia 0380) e um segundo fragmento de 5.2 kb (dímero viral) foram considerados positivos.

3.5.8.3 Preparação do clone infeccioso de tomate rugose mosaic virus (ToRMV)

Uma alíquota do clone infeccioso de ToRMV (DNA-A e DNA-B) (Fernandes et al., 2006), foi gentilmente cedida pelo Dr Murilo Zerbini (BIOAGRO-UFV). A multiplicação desse clone em *E. coli* foi realizada seguindo os mesmos parâmetros citados para o clone de ToCMoV, descrito anteriormente.

Os clones foram confirmados pelo perfil de restrição a partir da digestão com endonucleases específicas, de acordo com as instruções dos fabricantes. Clones de *E. coli* transformados com o DNA-A, que após a digestão com a enzima EcoRI, apresentaram um fragmento de 2.600 pb foram considerados positivos. Para o DNA-B, clones que após a digestão com NcoI apresentaram um fragmento de cerca de 863 pb foram considerados positivos.

3.5.8.4 RCA (*Rolling-circle amplification*)

Uma amostra de DNA amplificado por RCA foi gentilmente cedida pela Dra Alice Kasuko Inoue-Nagata (Embrapa Hortaliças). DNA total de um tomateiro com sintoma de begomovirose, foi isolado e submetido à amplificação por RCA, através do uso da *phi-29* DNA polimerase (TempliPhi, GE) como descrito por Inoue-Nagata (2004).

A concentração do produto amplificado foi estimada por um espectrofotômetro de pequena escala (ND-1000 NanoDrop Spectrophotometer-BIORAD), a partir da leitura dos comprimentos de onda 260nm e 280nm. A partir dessa leitura, o DNA foi diluído em água milli-Q autoclavada até atingir uma concentração final de 1 µg/µL. Esse DNA foi utilizado no desafio de plantas transgênicas.

Plantas desafiadas com a amostra de RCA, foram analisadas para identificação do vírus responsável pela infecção. De maneira sucinta, DNA

dessas plantas foi analisado por PCR, com a utilização dos primers pARc496 e pALv1978 (Rojas, 1993). O produto dessa amplificação foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega), de acordo com instruções do fabricante. Esse DNA foi utilizado para transformar células de *E. coli* eletrocompetentes (item 3.5.4.1), clones foram selecionados, e posteriormente sequenciados (Macrogen Inc, Coréia do Sul). A sequência gerada foi analisada por meio da ferramenta BLASTn (*nucleotide Basic local alignment search tool*), para identificação de sequências com 100% de identidade.

3.5.9 Desafio das plantas transgênicas, via bombardeamento de partículas e análise das plantas desafiadas:

Plantas transgênicas (T_0), transformadas com o vetor pC3300-fourgemini, foram mantidas em casa de vegetação para obtenção da geração T_1 . Essa progênie foi inoculada com DNA do vírus TGVV, via bombardeamento de partículas (BRASILEIRO, A.C.M. CARNEIRO, 1998). Pelo menos 4 plantas T_1 transgênicas de cada linhagem foram inoculadas com DNA do TGVV. De maneira sucinta, 5 μ L (1 μ g/ μ L) de cada componente do DNA viral foi precipitado em micropartículas de tungstênio na presença de CaCl_2 1 M, espermidina 13 mM e etanol 70% (v/v). Por fim, 3,2 μ L de DNA foi depositado nas membranas carreadoras, que foram colocadas no acelerador de partículas (*gene gun*) e aceleradas a 1.000-psi contra mudas de aproximadamente três semanas. Essas

plantas foram analisadas para a presença do DNA viral 30 dias pós-inoculação (30-dpi). Plantas não-transgênicas inoculadas com DNA viral foram utilizadas como controle.

DNA das plantas foi isolado, de acordo com os parâmetros citados anteriormente (item 3.5.6.2). Uma reação de amplificação por PCR foi realizada, utilizando-se a enzima *Taq DNA polymerase Recombinant* (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. Para essa reação, os *primers* degenerados pARc496 (5'-AATACTGCAGGGCTTYCTR TACATRGG-3') e pALv1978 (5'-GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT-3'), descritos por Rojas et al (1993), foram utilizados para detecção de um fragmento específico do DNA-A dos begomovírus. Como controle interno dessa reação, o par de *primers* EF1F (5'-TGTTGCTGTTAAGGATTTGAAGCG-3') e EF1R (5'-AACAGTTTGACGCATGTCCCTAAC-3'), que amplificam um fragmento de 358 pb do fator de alongamento EF-1 α (*Elongation factor-1 α*) foi utilizado (Abreu and Aragão, 2007). As amostras foram submetidas a um programa de ciclagem com as seguintes condições: 95 °C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e uma extensão final à 72 °C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram então separados em gel de agarose 1% diluído em TBE, com posterior imersão em solução de brometo de etídeo por 15 minutos. Em seguida o gel foi visualizado em transiluminador (Bio Rad Laboratories), e amostras que apresentaram as bandas de interesse foram consideradas positivas para infecção pelo begomovírus inoculado.

Após análise dos resultados do experimento de trigem, linhagens transgênicas que apresentaram uma maior proporção de plantas não infectadas, foram selecionadas para novos experimentos de desafio. Essas plantas foram mantidas em casa de vegetação para obtenção da geração T₂. Para os experimentos com a geração T₂, pelo menos 15 plantas transgênicas de cada linhagem, e 15 plantas não-transgênicas foram selecionadas para inoculação com DNA de diferentes espécies de begomovírus (ToCMoV, TGVV, ToRMV, RCA). As plantas transgênicas da geração T₂ foram selecionadas através de pulverização das mudas com o herbicida glufosinato de amônio a 1% (FINALE[®], Bayer).

O desafio com o clone infeccioso de TGVV, foi realizado em diferentes concentrações – 1000 ng/μL, 500 ng/ μL e 250 ng/μL - de DNA viral, a fim de avaliar uma possível relação entre a concentração de DNA viral, e a resposta das plantas transgênicas.

Após o bombardeamento, as plantas foram mantidas em casa de vegetação e foram analisadas por PCR, como previamente descrito, até 35-dpi, para detecção de DNA dos vírus inoculados. O primeiro teste de PCR nessas plantas foi realizado em um período de 10-dpi. Em seguida, essa análise por PCR foi realizada a cada 5 dias, até o período de 35-dpi, para análise de plantas infectadas. Os sintomas desenvolvidos pelas plantas foram analisados 30 dias

após a inoculação, e foram classificados conforme descrito por Chakraborty et al (2008).

3.5.10 Análise da zigose do transgene por PCR quantitativa em tempo-real (qPCR)

DNA das plantas inoculadas com distintos vírus foi analisado por PCR quantitativa em tempo-real para determinação da zigose (Homozigose ou hemizigose) do transgene. Essa análise foi realizada pelo laboratório University of Arizona Genetics Core (UAGC), localizado na Universidade do Arizona, Tucson. DNA total das amostras foi liofilizado, e enviado para análise. Esse DNA foi reidratado *overnight* em 100 µL de TE-buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA), e então transferido para placas de PCR. As reações de amplificação foram realizadas em uma plataforma de qPCR (ABI 7300 real-time PCR system) em misturas de 15 µL, contendo:

- 7,5 µL 2X Life Technologies TaqMan® Fast Advanced Master Mix
- 0,75 µL 20X solução *primer* controle/sonda
- 0,75 µL 20X solução *primer* transgene/sonda
- 3,0 µL DNA (20ng)
- 3,0 µL H₂O pura

As soluções *primer/sonda* foram adquiridas através da empresa IDT (Integrated DNA Technologies), e correspondem a ensaios de qPCR *PrimeTime*, desenhados através da ferramenta *online* disponibilizada pela IDT (<http://www.idtdna.com>). As sequências dos *primers* e sondas utilizadas foram:

Ensaio controle (Genoma de *N. benthamiana*)

Primer Forward: 5` - GCTCAGTGCCTAAATCGGAATA - 3`

Primer Reverse: 5` - GTGGTGGTGAAGGTGAAGTAG - 3`

Sonda: /56-FAM/TCACCATCT/ZEN/CCTCCACCACCGTAT/3IABkFQ/

Ensaio transgene (vetor pC3300-fourgemini)

Primer Forward: 5` - TCCTAGTTTGC GCGCTATATTT - 3`

Primer Reverse: 5` - GCATGACGTTATTTATGAGATGGG - 3`

Sonda: /5HEX/CGCGTATTA/ZEN/AATGTATAATTGCGGGACTCT/3IABkFQ/

Os primers direcionados para o genoma de *N. benthamiana* resultaram na amplificação de um fragmento de 129 pb, do gene precursor da proteína tipo-extensina ExT1, cuja sequência (Niben101Ctg00837g00001.1) está disponível na plataforma sol genomics (<http://solgenomics.net>). Os primers direcionados para o transgene, amplificaram um fragmento de 97 pb, específico para o terminador Nos3 do vetor pC3300-fourgemini. Nesse ensaio foram utilizadas sondas contendo duas moléculas *quencher* (ZEN e 3IABkFQ), o que permite a produção de dados com menor *background* e maior sinal.

As condições de ciclagem das reações foram as seguintes:

95°C por 3min

50 ciclos de 95°C, por 30 segundos

61°C por 1min.

Dados foram analisados através do software SDS, v1.4 (Life Technologies), utilizando os parâmetros de Auto Ct (*Cycle threshold*) e Auto

Baseline. Através dessa análise, valores de Ct para cada gene foram estabelecidos.

A identificação de plantas homozigotas foi realizada através do método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), como previamente descrito por Wang et al., (2015). Como plantas homozigotas contém o dobro de sequências do transgene, em relação à plantas hemizigotas, a comparação da proporção controle/transgene entre as plantas transgênicas possibilita um cálculo quantitativo dos produtos da PCR. O valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de uma planta homozigota, deve ser o dobro de uma hemizigota. O valor de Ct comparativo do controle e transgene pode ser calculado através da seguinte fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{controle}} - Ct_{\text{transgene}})_{\text{amostra 2}} - (Ct_{\text{controle}} - Ct_{\text{transgene}})_{\text{amostra 1}}$$

Após a identificação de plantas homozigotas e hemizigotas, os resultados foram analisados através do teste de qui-quadrado (com correção de Yates quando necessário) para verificação da probabilidade das frequências obtidas em cada classe de plantas. A seguinte fórmula foi utilizada:

$$\chi^2 = \sum [(Fo - Fe)^2 / Fe], \text{ onde:}$$

Fo = Frequência observada para cada classe

Fe = Frequência esperada para cada classe com base na proporção de segregação mendeliana de 3:1. Uma vez que, as plantas não transgênicas foram previamente eliminadas, testou-se a proporção de 2:1 (hemizigota: homozigota). Considerou-se $\alpha=0,05$.

3.6 Resultados

3.6.1 Vetor pC3300-fourgemini

A árvore filogenética construída no programa Mega 5.0, a partir do alinhamento de 11 sequências de nucleotídeos do gene *rep*, de distintos begomovírus que infectam tomateiro no Brasil, identificou quatro *clusters* de vírus, que apresentaram maior identidade nucleotídica. O primeiro cluster compreendeu os vírus tomato rugose mosaic virus (ToRMV), tomato severe rugose virus (ToSRV) e tomato golden mosaic virus (TGMV), o segundo foi formado pelos vírus tomato mild mosaic virus (ToMIMV), tomato yellow spot virus (ToYSV) e tomato leaf distortion virus (ToLDV), o terceiro compreendeu os vírus tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) e tomato golden vein virus (TGVV) e por fim o quarto cluster foi formado por tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV), tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) e tomato interveinal chlorosis virus (ToICV).

Um alinhamento das sequências virais de cada *cluster* permitiu a identificação de uma região conservada do gene *rep* entre esses vírus, e uma sequência conservada de um vírus de cada grupo, foi selecionada para compor um cassete de expressão de *hpRNA*. Quatro sequências dispostas *in tandem* resultaram em um DNA quimérico de 1.286 pb (Anexo 2), o qual foi clonado nas disposições *sense* e *anti sense*, flanqueando um íntrom, resultando na formação de um cassete de interferência para silenciamento do gene *rep*.

O vetor binário contendo esse cassete de interferência, foi denominado pC3300-fourgemini (Figura 4). A transcrição do *hpRNA* nesse plasmídeo está sob o controle do promotor 35S do vírus cauliflower mosaic virus (CaMV) e uma região 5' *untranslated region* do RNA viral de alfafa mosaic virus (AMV), que atua como uma sequência enhancer da transcrição (Datla et al., 1993).

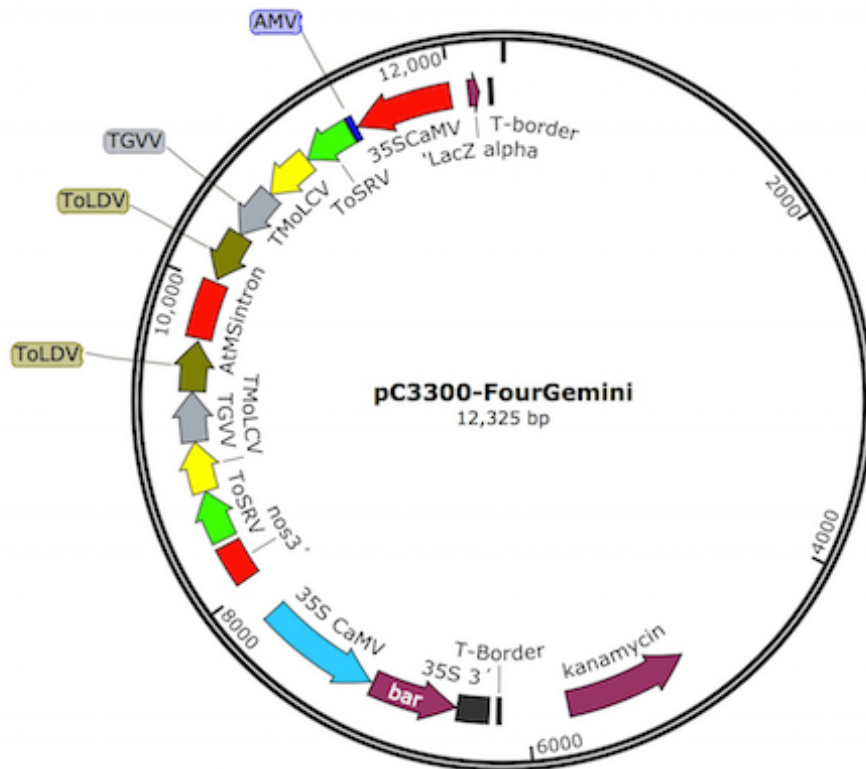


Figura 4: Vetor final pC3300-fourgemini (12.325 pb), desenvolvido para silenciamento do gene *rep* de diferentes espécies de begomovírus que infectam tomateiro no Brasil. Tomato severe rugose virus (ToSRV), tomato mottle leaf curl virus (TMOlCV), tomato golden vein virus (TGWV), tomato leaf distortion virus (ToLDV), promotor 35S do vírus cauliflower mosaic virus (35SCaMV), íntron 3 do gene da malato sintase de *Arabidopsis thaliana* (AtMS intron), terminador do gene da nopalina sintase (nos3'), gene de resistência à canamicina (Kanamycin), regiões entre as quais o DNA de interesse é clonado (T-border), gene de resistência ao herbicida glufosinato de amônio (bar), sequência 5' *untranslated region* do RNA viral de alfafa mosaic virus (AMV), porção alpha do gene LacZ (LacZ alpha).

3.6.2 Análise *in silico* do *hpRNA* e sequências alvo

Uma análise *in silico* do cassete de expressão de *hpRNA* pelo software Mfold demonstrou que a estrutura secundária de *hpRNA*, formada pela expressão desse cassete (sequências *sense* e *antisense*, separadas por um íntrom), é termodinamicamente estável, com uma energia livre mínima (ΔG) de -2.639,37 kcal/mol. A análise da sequência *sense* isolada, demonstrou que essa sequência não forma estruturas secundárias estáveis. Os potenciais siRNAs formados para a região alvo, determinados através do software DSIR são demonstrados na tabela 2. De acordo com a predição do programa, 51 siRNAs com uma porcentagem de eficiência superior a 80% foram detectados.

Tabela 2: Potenciais sequências de siRNAs identificadas pelo programa DSIR para a região alvo do gene *rep*. siRNA_id: identificação de cada siRNA. Position: Posição de cada siRNA na sequência alvo. SS Sequence: *Sense strand* (fita passageira). AS Sequence: *Antisense strand* (fita guia). Score: Predição de eficiência do siRNA. Corrected score: Predição de eficiência corrigida diante de alguns fatores intrínsecos da sequência-alvo, que podem influenciar a eficiência do siRNA.

siRNA_id	Position	SS Sequence	AS Sequence	Score	Corrected Score
1	1255	CAAUCUAAAUAGUAAUUUAGA	UAAAUUACUAAUUUAGAUUGUG	103.7	91.7
2	584	CGUCCGACGUCAAGACCUACA	UAGGUCUUGACGUCGGACGAG	102.5	97.5
3	304	CGACGUCAAGUCCUAGUAAAU	UUACUAGGACUUGACGUCGGA	100.5	97.5
4	300	CGUCCGACGUCAAGUCCUAGU	UAGGACUUGACGUCGGACGAU	99.9	96.9
5	305	GACGUCAAGUCCUAGUAAAU	UUUACUAGGACUUGACGUCGG	99.5	96.5
6	1056	CGUCCGACGUCAAAUCCUAUG	UAGGAUUUGACGUCGGACGAU	99.0	89.0
7	1120	CGACGGAAGAAGUGCUAGAGG	UCUAGCACUUCUUCGUCGAU	98.8	87.8
8	406	CCAACAAACAAGAAUUUUUU	UAAAUUUUCUUGUUUGUUGGUG	98.7	94.7
9	1032	CGAACAUUCAGAGAGCUAAGU	UUAGCUCUCUGAAUGUUCGGA	98.5	88.5
10	206	GGGAAAUACCAGUGCACAAAU	UUGUGCACUGGUUUUCCCUU	97.7	95.7
11	649	CAAGAGAACUACACGAAGAUG	UCUUCGUGUAGUUCUCUUGAG	97.2	91.2
12	638	CAUUCGUGUCUCAAGAGAACU	UUCUCUUGAGACACGAAUGUU	96.3	90.3
13	150	GCAGAGAACUGCAUGAGAAUG	UUCUCAUGCAGUUCUCUGCAG	96.3	95.3
14	414	CAAGAAUUUUUUAUUCGUGUAC	UACACGAAUUUUUUCUUGUU	95.7	91.7
15	1236	AGUUCUUUUUUCAGUUUCACA	UGAAACUGAAUUUAGAACUUU	95.6	83.6
16	187	CGUGCUUUAUACAGUUCGAAGG	UUCGAACUGUUAUAGCACGUG	95.1	94.1
17	643	GUGUCUCAAGAGAACUACACG	UGUAGUUCUCUUGAGACACGA	94.9	88.9
18	882	GGAGGUCAGCAAUCUGCAAU	UUGCAGAUUGCUGACCUCUC	94.7	86.7
19	277	GAACAUUCAGGGAGCUAAAU	UUUAGCUCUCCUGAAUGUUCGG	94.7	92.7
20	863	CGACGGCAGAUACAGCUAGAGG	UCUAGCUGAUCUGCCGUCGAU	94.4	86.4
21	122	CCAACCAACAAGAAGUUAUUC	UAUACUUCUUGUUGGUUGGGG	94.4	93.4
22	471	UGUGCUUUAUUCAAUUCGAAGG	UUCGAAUUGAAUAAGCACAU	93.9	89.9
23	876	GCUAGAGGAGGUCAGCAAUCU	AUUGCUGACCUCUUCUAGCUG	93.7	85.7
24	1036	CAUUCAGAGAGCUAAGUCAUC	UGACUUAGCUCUCUGAAUGUU	93.4	83.4
25	434	CCAGAGAAUUUCACGAAGAUG	UCUUCGUGAAUUUCUCUGGUU	93.4	89.4
26	1050	AGUCAUCGUCCGACGUCAAAU	UUGACGUCGGACGAUGACUUA	93.4	83.4
27	875	AGCUAGAGGAGGUCAGCAAUC	UUGCUGACCUCUUCUAGCUGA	93.4	85.4
28	1079	GAUAAGGACGGAGAUACUAUC	UAGUAUCUCCGUCCUUAUCGA	93.3	83.3
29	435	CAGAGAAUUUCACGAAGAUGG	AUCUUCGUGAAUUUCUCUGGU	93.1	89.1
30	350	CUCAUUGUUCAUUAACCAAAG	UUGGUUAAUGAACAUGAGGG	92.4	89.4
31	123	CAACCAACAAGAAGUUAUUA	AUAUACUUCUUGUUGGUUGGG	92.3	91.3
32	276	CGAACAUUCAGGGAGCUAAAU	UUAGCUCUCCUGAAUGUUCGGA	92.2	90.2
33	775	CGAACAUUCAGGGAGCUAAGA	UUAGCUCUCCUGAAUGUUCGGA	92.2	85.2
34	1243	AUUUCAGUUUCACAAUCUAAA	UAGAUUGUGAAACUGAAAUAA	92.2	80.2

35	1247	CAGUUUCACAAUCUAAAUAGU	UAUUUAGAUUGUGAAACUGAA	92.2	80.2
36	482	AAUUCGAAGGCAAUUCAAAU	UUGAAUUUGCCUUCGAAUUGA	91.7	87.7
37	1031	CCGAACAUUCAGAGAGCUAAG	UAGCUCUCUGAAUGUUCGGAU	91.6	81.6
38	705	GGUAAAUACAACUGCAAGAAC	UCUUGCAGUUGUAUUUACCCU	91.6	84.6
39	709	AAUACAACUGCAAGAACAACC	UUGUUCUUGCAGUUGUAUUUA	91.5	84.5
40	662	CGAAGAUGGGCAACCUCAUCU	AUGAGGUUGCCCAUCUUCGUG	91.3	85.3
41	536	CAACAAGAUUCAGCACAUUUC	AAAUGUGCUGAUCUUGUUGGG	91.3	86.3
42	1064	GUCAAAUCCUAUGUCGAUAAG	UAUCGACAUAGGAUUUGACGU	91.3	81.3
43	407	CAACAAACAAGAAUUUUAUUC	AUAAAUUUCUUGUUUGUUGGU	91.2	87.2
44	721	AGAACAACCGAUUCUUCGACC	UCGAAGAAUCGGUUGUUCUUG	91.1	84.1
45	222	CAAUAACAGAUUCUUCGACU	UCGAAGAAUCUGUUUUUGUG	91.1	89.1
46	229	CAGAUUCUUCGACUUGGUAUC	UACCAAGUCGAAGAAUCUGUU	91.0	89.0
47	728	CCGAUUCUUCGACCUCGUAUC	UACGAGGUCGAAGAAUCGGUU	90.8	83.8
48	66	CUCAUUGUUCUCUGACCAAAG	UUGGUCAGAGAACAAUGAGGG	90.7	90.7
49	89	GAAGCACUUGCCCAACUAAA	UAAGUUGGGCAAGUGCUUCUU	90.3	90.3
50	465	UCUCCAUGUGCUUAUUCAAUU	UUGAAUAAGCACAUGGAGAUG	90.3	86.3
51	785	GGGAGCUAAGAGCUCUUCAGA	UGAAGAGCUCUAGCUCUCCUG	90.3	83.3

3.6.3 Linhagens transgênicas de *N. benthamiana*

O plasmídeo pC3300-fourgemini foi utilizado na transformação genética de *N. benthamiana* e um total de 20 transformantes primários (T_0) foram gerados, via *A. tumefaciens*. As 20 linhagens T_0 foram positivas para a expressão da proteína PAT, e confirmadas para a presença do transgene por PCR (Figura 5).

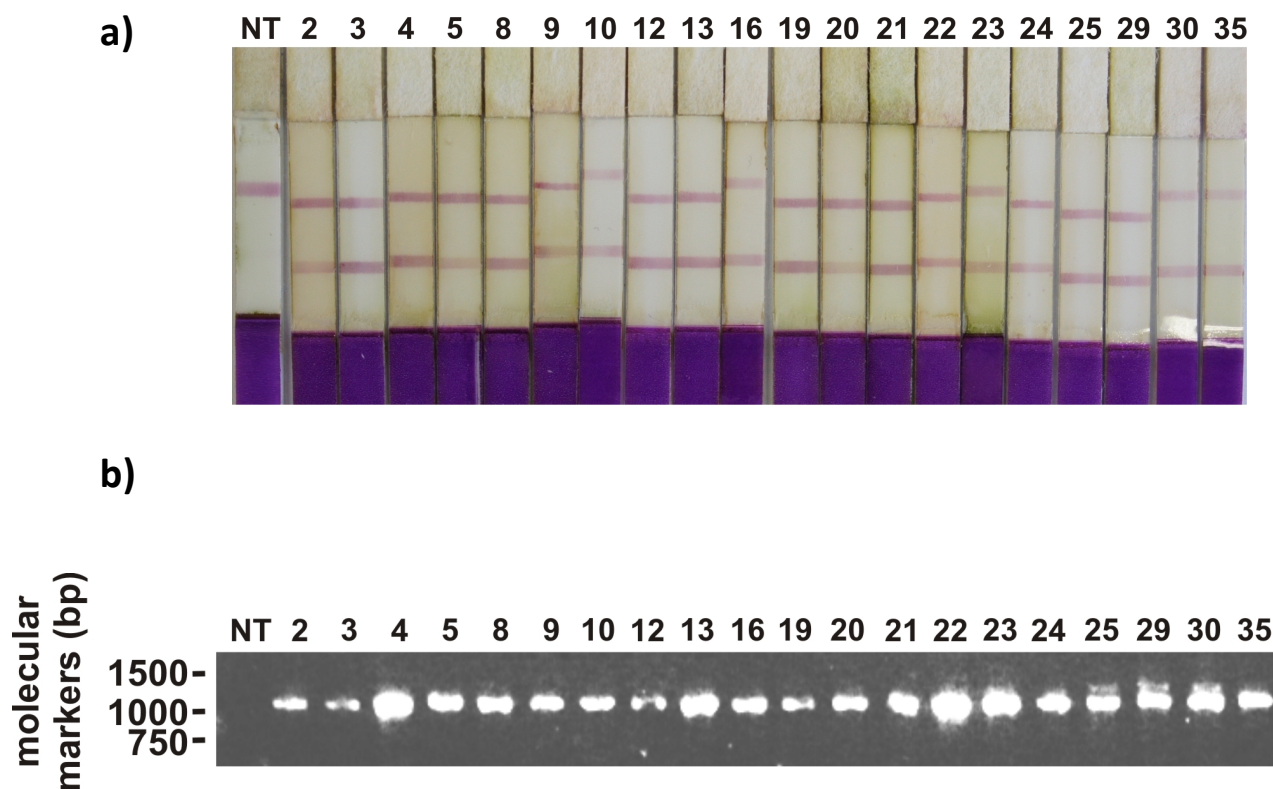


Figura 5: Linhagens de *Nicotiana benthamiana* transgênicas (T_0), transformadas com o vetor pC3300-fourgemini. a) Análise de imunocromatografia de fluxo lateral, demonstrando a presença da proteína PAT (phosphinothricin-N-acetyltransferase) em 20 linhagens de plantas transformadas. b) Reação em cadeia pela polimerase (PCR), para confirmação da presença do transgene nas 20 plantas T_0 transformadas, utilizando os primers 35SAMVF e 4geminiR, resultando na amplificação de um fragmento específico de 1.089 pb. Os números acima das figuras demonstram as diferentes linhagens T_0 geradas (2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 30, 35), NT: planta controle não-transgênica.

3.6.4 Teste de progênie

As 20 linhagens T_0 foram mantidas em casa de vegetação para obtenção da geração seguinte (T_1). As progênies foram analisadas para a presença ou não da proteína PAT, codificada pelo gene bar, o que possibilitou determinar o padrão de segregação do transgene. A análise dessa progênie pelo teste de qui-quadrado (χ^2) (Com correção de Yates quando necessário), demonstrou que todas as linhagens geradas exibiram um padrão de segregação mendeliano (Tabela 3).

Tabela 3: Análise do padrão de segregação da geração T₁ de 20 linhagens transgênicas de *N. benthamiana* transformadas com o vetor pC3300-fourgemini

Linhagem	Geração T ₁ ^(a)		Segregação ^(b)	χ^2 ^(c)	P ^(d)
	Positivas	Negativas			
2	5	0	15:1	2.12	0.56
3	10	0	15:1	2.02	0.41
4	15	1	15:1	0.26	1
5	5	2	3:1	0.14	0.82
8	13	7	3:1	1.06	0.3
9	7	3	3:1	0.13	0.71
10	4	2	3:1	0.22	0.63
12	9	7	3:1	3.0	0.08
13	9	3	3:1	0.11	1
16	4	2	3:1	0.22	0.63
19	4	2	3:1	0.22	0.63
20	11	4	3:1	0.06	0.88
21	17	4	3:1	0.61	0.52
22	14	3	3:1	0.76	0.48
23	16	3	3:1	1.17	0.35
24	16	3	3:1	1.17	0.35
25	14	5	3:1	0.01	0.89
29	8	2	3:1	0.4	0.71
30	15	1	15:1	0.26	1
35	25	0	63:1	2.04	0.53

(a) Plantas positivas e negativas foram determinadas pela presença ou não da proteína PAT, pelo método de imunocromatografia de fluxo lateral. (b) Foram testados os padrões de segregação 3:1, 15:1 e 63:1, e a tabela demonstra a proporção mais provável (menor valor de qui-quadrado). (c) O teste de qui-quadrado com correção de Yates foi utilizado quando uma das frequências (positivas ou negativas) era menor que 5. (d) Probabilidade que as frequências observadas refletem o padrão de segregação obtido. $\alpha=0,05$

3.6.5 Desafio de plantas transgênicas (T₁) com begomovírus associados a tomateiro (*S. lycopersicum*)

A geração T₁, dessas 20 linhagens transgênicas geradas, foi inoculada com DNA do begomovírus tomato golden vein virus (TGVV), para identificar possíveis linhagens resistentes a esse vírus. Trinta dias pós-inoculação (30-dpi) essas plantas foram analisadas para a presença de DNA do vírus. Plantas não-transgênicas e linhagens susceptíveis foram positivas para o DNA viral por PCR, e desenvolveram sintomas característicos da infecção por esse vírus, como amarelecimento das nervuras, folhas curvadas menos desenvolvidas e encarquilhamento. Das 20 linhagens transgênicas testadas, 3 linhagens (Linhagens 19, 22 e 29) apresentaram uma maior proporção de plantas sem a presença de DNA viral, enquanto as outras 17 linhagens apresentaram uma baixa proporção de plantas não infectadas. As linhagens 19, 22 e 29, apresentaram uma proporção de 75%, 80% e 87,5% respectivamente, de plantas não infectadas (Tabela 4). Essas 3 linhagens foram selecionadas para novos experimentos de inoculação, com a geração T₂, com DNA de diferentes begomovírus.

Tabela 4: Proporção de plantas da geração T₁ infectadas, 30 dias após a inoculação com o vírus tomato golden vein virus (TGVV)

Linhagem	% de plantas T₁ infectadas
2	100%
3	80%
4	100%
5	100%
8	100%
9	100%
10	100%
12	100%
13	77%
16	75%
19	25%
20	77%
21	95%
22	20%
23	100%
24	94%
25	71%
29	12,5%
30	78%
35	91%
Controle não transgênico	80%

Plantas transgênicas da geração T_2 das linhagens 19, 22 e 29 foram inicialmente selecionadas para os novos experimentos de desafio, através de pulverização das mudas com o herbicida glufosinato de amônio a 1%. Após um período de 4 dias da aplicação, já era possível diferenciar plantas transgênicas de não-transgênicas (segregantes). As plantas transgênicas não apresentaram nenhuma alteração fenotípica e se desenvolveram normalmente. Já as plantas não-transgênicas, apresentaram alterações como folhas murchas, parada no desenvolvimento, e conseqüente morte da planta (Figura 6).

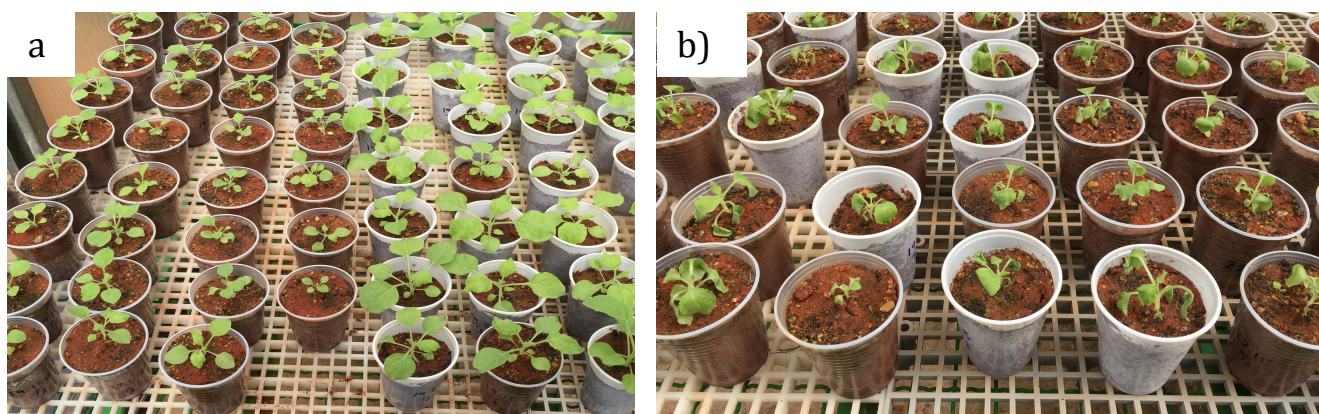


Figura 6: Seleção de plantas transgênicas da geração T_2 , através de pulverização com o herbicida glufosinato de amônio a 1%. Mudas a serem desafiadas foram inicialmente selecionadas. a) Plantas transgênicas apresentando desenvolvimento normal, sem nenhuma alteração fenotípica. b) Plantas não-transgênicas (segregantes) apresentando alterações fenotípicas como folhas murchas e parada no desenvolvimento.

3.6.6 Desafio da geração T₂ com o vírus TGVV

O experimento de inoculação com o clone infeccioso de tomato golden vein virus (TGVV), foi realizado em três diferentes concentrações (1000 ng/μL, 500 ng/μL e 250 ng/μL). Plantas transgênicas da geração T₂, das linhagens 19, 22 e 29, foram inoculadas com esse vírus e analisadas até 35-dpi para a presença de DNA viral e sintomas.

3.6.6.1 Inoculação com 1000 ng/μL de DNA

Nesse experimento, um total 81 plantas transgênicas foram desafiadas, sendo: 22 plantas da linhagem 22, 28 plantas da linhagem 29 e 31 plantas da linhagem 19. Vinte e duas plantas não-transgênicas foram utilizadas como controle.

Com 20-dpi, 100% (22/22) das plantas não transgênicas demonstraram a presença de DNA do vírus inoculado. Essas plantas desenvolveram sintomas característicos da infecção por TGVV, como amarelecimento das nervuras e grande distorção das folhas e ramos (Figura 7 A, B). Até 35-dpi, um total de 9% (2/22) de plantas da linhagem 22 e 7,1% (2/28) da linhagem 29, permaneceram sem a presença de DNA do vírus inoculado, sem sintomas de infecção (Figura 7 A, C) e com desenvolvimento normal, quando comparado a plantas não inoculadas (Figura 7 D). Em relação à linhagem 19, no período de 15-dpi,

100% (31/31) das plantas demonstraram infecção, com desenvolvimento de sintomas similares às plantas não-transgênicas.

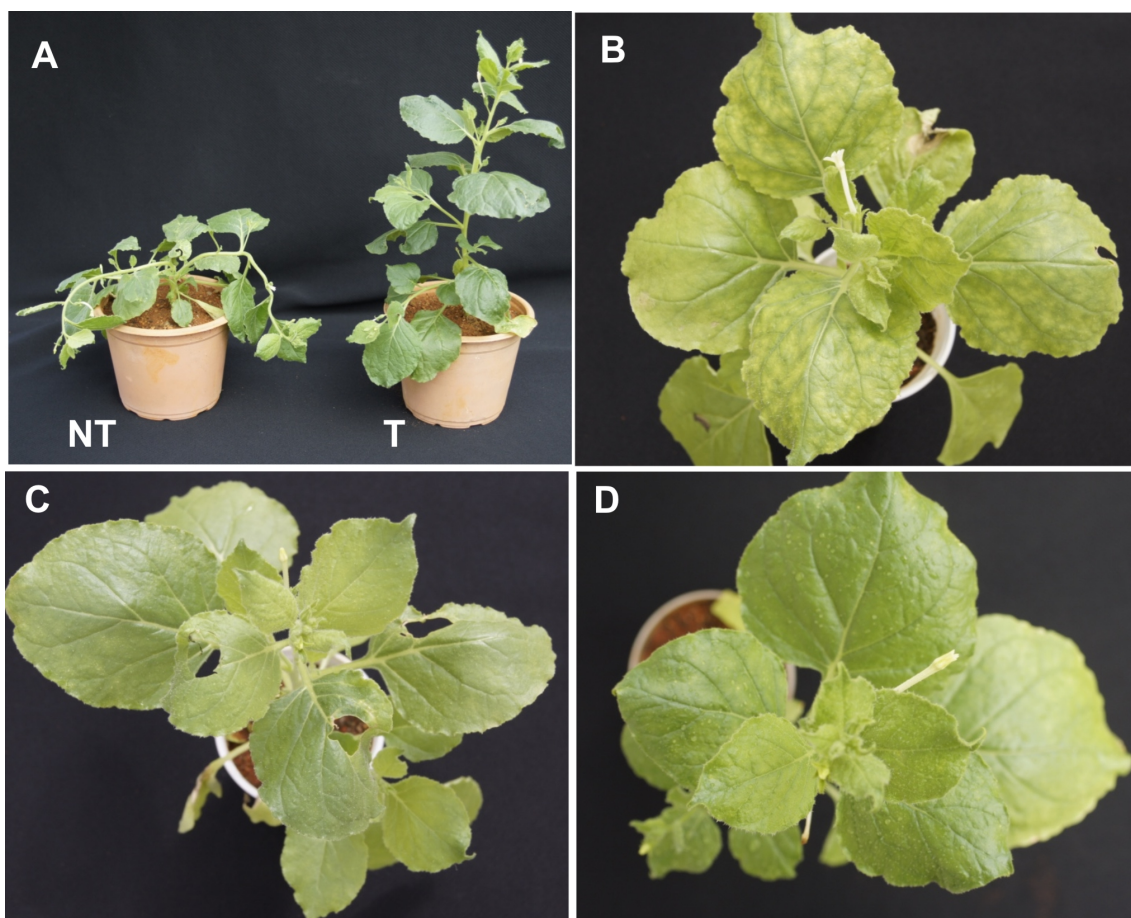


Figura 7: Sintomas desenvolvidos por plantas inoculadas com o vírus tomato golden vein virus (TGVV). A) Planta não-transgênica (NT) apresentando sintoma de encarquilhamento severo, e planta transgênica (T) sem a presença de sintomas. B) Planta NT apresentando sintoma de mosaico, com o amarelecimento das nervuras. C) Planta transgênica sem a presença de sintomas virais. D) Planta controle não inoculada.

A análise por qPCR (PCR-quantitativa) para identificação da zigose do transgene, permitiu diferenciar plantas homozigotas e hemizigotas, dentre as plantas inoculadas (Figura 8). Essa análise demonstrou que, plantas não infectadas durante os 35-dpi, das linhagens 22 e 29, apresentam o transgene em homozigose. O número de plantas homozigotas e hemizigotas, de cada linhagem desafiada, bem como o valor de qui-quadrado, realizado na frequência esperada de 2:1, $df=1$, é demonstrado na tabela 5.

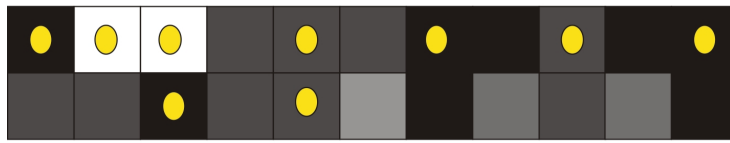
Tabela 5: Análise da zigose do transgene, via qPCR, em plantas da geração T_2 inoculadas com TGVV (1000 ng/ μ L)

Linhagem	Plantas inoculadas T_2		χ^2	$P^{(a)}$
	Homozigotas	Hemizigotas		
22	9	13	0,56	0,45
29	10	18	0,07	0,78
19	9	22	0,25	0,61

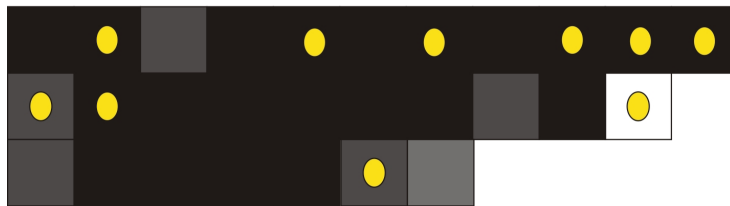
(a) Probabilidade que as frequências observadas refletem o padrão de segregação 2:1 (Hemizigotas:homozigotas), $\alpha=0,05$.

TGVV 1 μ g/ μ L

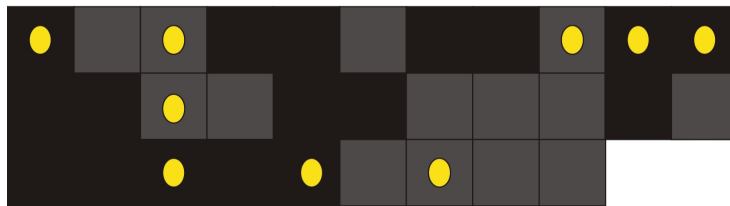
Nb4G22 (T2)



Nb4G29 (T2)



Nb4G19 (T2)



Controle



Figura 8: Plantas da geração T₂, inoculadas com o vírus TGVV (1000 ng/ μ L). As linhagens transgênicas 22, 29 e 19 são denominadas Nb4G22, Nb4G29 e Nb4G19, respectivamente. Cada quadrado corresponde à uma planta inoculada. Assim, estão representadas as 22 plantas transgênicas desafiadas da linhagem Nb4G 22, 28 plantas transgênicas da linhagem Nb4G29, 31 plantas transgênicas da linhagem Nb4G19 e 22 plantas não-transgênicas, utilizadas como controle. Os diferentes períodos de início da infecção, variando de 10 a 35 dias pós-inoculação (dpi) estão representados por diferentes tons de cinza. Plantas que não apresentaram infecção durante todo o período de análise estão representadas por quadrados brancos. Plantas homocigotas estão marcadas com um círculo amarelo.

3.6.6.2 Inoculação com 500 ng/ μ L de DNA

Um total de 66 plantas transgênicas foram desafiadas com o vírus TGVV a uma concentração de 500 ng/ μ L, sendo: 17 plantas da linhagem 22, 15 plantas da linhagem 29 e 19 plantas da linhagem 19. Quinze plantas não transgênicas foram utilizadas como controle (Figura 9).

Com 15-dpi, 80% (12/15) das plantas não-transgênicas demonstraram a presença de DNA do vírus inoculado. Um total de 20% (3/15) das plantas foram consideradas escape do teste, pois não desenvolveram infecção durante os 35 dias de análise. Plantas controle infectadas desenvolveram sintomas característicos da infecção por TGVV, como amarelecimento das nervuras e distorção foliar (Figura 7 B).

Até 35-dpi, um total de 11,8% (2/17) de plantas da linhagem 22 e 10,5% (2/19) da linhagem 19, permaneceram sem a presença de DNA do vírus inoculado, e sem sintomas de infecção. O desafio da linhagem 29 resultou em 100% (15/15) de plantas infectadas com 20-dpi. A análise dos sintomas demonstrou que plantas transgênicas infectadas desenvolveram sintomas similares àqueles de plantas não-transgênicas infectadas.

TGVV 500ng/ μ L

Nb4G22 (T2)



Nb4G29 (T2)



Nb4G19 (T2)



Controle



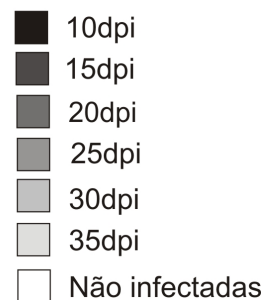
Figura 9: Plantas da geração T₂, inoculadas com o vírus TGVV (500 ng/ μ L). As linhagens transgênicas 22, 29 e 19 são denominadas Nb4G22, Nb4G29 e Nb4G19, respectivamente. Os quadrados representam as 17 plantas transgênicas inoculadas da linhagem Nb4G 22, 15 plantas transgênicas da linhagem Nb4G29, 19 plantas transgênicas da linhagem Nb4G19 e 15 plantas não-transgênicas, utilizadas como controle. Os diferentes períodos de início da infecção, variando de 10 a 35 dias pós-inoculação (dpi) estão representados por diferentes tons de cinza. Plantas que não apresentaram infecção durante todo o período de análise estão representadas por quadrados brancos.

3.6.6.3 Inoculação com 250 ng/ μ L de DNA

Um total de 66 plantas transgênicas foram desafiadas com o vírus TGVV a uma concentração de 250 ng/ μ L, sendo: 17 plantas da linhagem 22, 18 plantas da linhagem 29 e 16 plantas da linhagem 19. Quinze plantas não transgênicas foram utilizadas como controle (Figura 10).

Com 15-dpi, 66,7% (10/15) das plantas não transgênicas demonstraram a presença de DNA do vírus inoculado. Um total de 33,3% (5/15) das plantas foram consideradas escape do teste, uma vez que não desenvolveram infecção durante os 35 dias de análise. Plantas controle infectadas desenvolveram sintomas como amarelecimento das nervuras e distorção foliar (Figura 7 B). Até 35-dpi, 23,5% (4/17) de plantas da linhagem 22, 38,9% (7/18) da linhagem 29 e 18,7% (3/16) de plantas da linhagem 19 demonstraram a ausência de DNA viral, bem como de sintomas causados por esse vírus. Em relação aos sintomas desenvolvidos pelas plantas transgênicas infectadas, essas apresentaram sintomas similares às plantas controle.

Nb4G22 (T2)



Nb4G29 (T2)



Nb4G19 (T2)



Controle



Figura 10: Plantas da geração T₂, inoculadas com o vírus TGVV (250 ng/ μ L). As linhagens transgênicas 22, 29 e 19 são denominadas Nb4G22, Nb4G29 e Nb4G19, respectivamente. Os quadrados representam as 17 plantas transgênicas da linhagem Nb4G 22, 18 plantas transgênicas da linhagem Nb4G29, 16 plantas transgênicas da linhagem Nb4G19 e 15 plantas não-transgênicas, utilizadas como controle. Os diferentes períodos de início da infecção, variando de 10 a 35 dias pós-inoculação (dpi) estão representados por diferentes tons de cinza. Plantas que não apresentaram infecção durante todo o período de análise estão representadas por quadrados brancos.

3.6.7 Desafio com o vírus ToRMV

Um total de 85 plantas transgênicas T₂ foram utilizadas nesse experimento, sendo: 29 plantas da linhagem 22, 24 plantas da linhagem 29 e 32 plantas da linhagem 19. Vinte plantas não transgênicas foram utilizadas como controle.

Com 25-dpi, 100% (20/20) das plantas não transgênicas demonstraram infecção pelo ToRMV. Essas plantas desenvolveram sintomas característicos da infecção por esse vírus, como aspecto de mosaico e rugosidade das folhas (Figura 11 A, D). Nas linhagens transgênicas 22 e 19, DNA viral foi detectado em 100% das plantas desafiadas, no entanto essas linhagens apresentaram plantas infectadas após 35-dpi, o que determina um atraso de 10 dias no início da infecção nessas plantas, em relação às plantas controle. Uma proporção 12,5% (3/24) de plantas da linhagem 29, não apresentaram infecção por ToRMV, e sintomas de infecção viral, durante os 35 dias de análise. Essas plantas transgênicas não infectadas apresentaram desenvolvimento normal, assim como plantas não inoculadas (Figura 11 B, C, D).

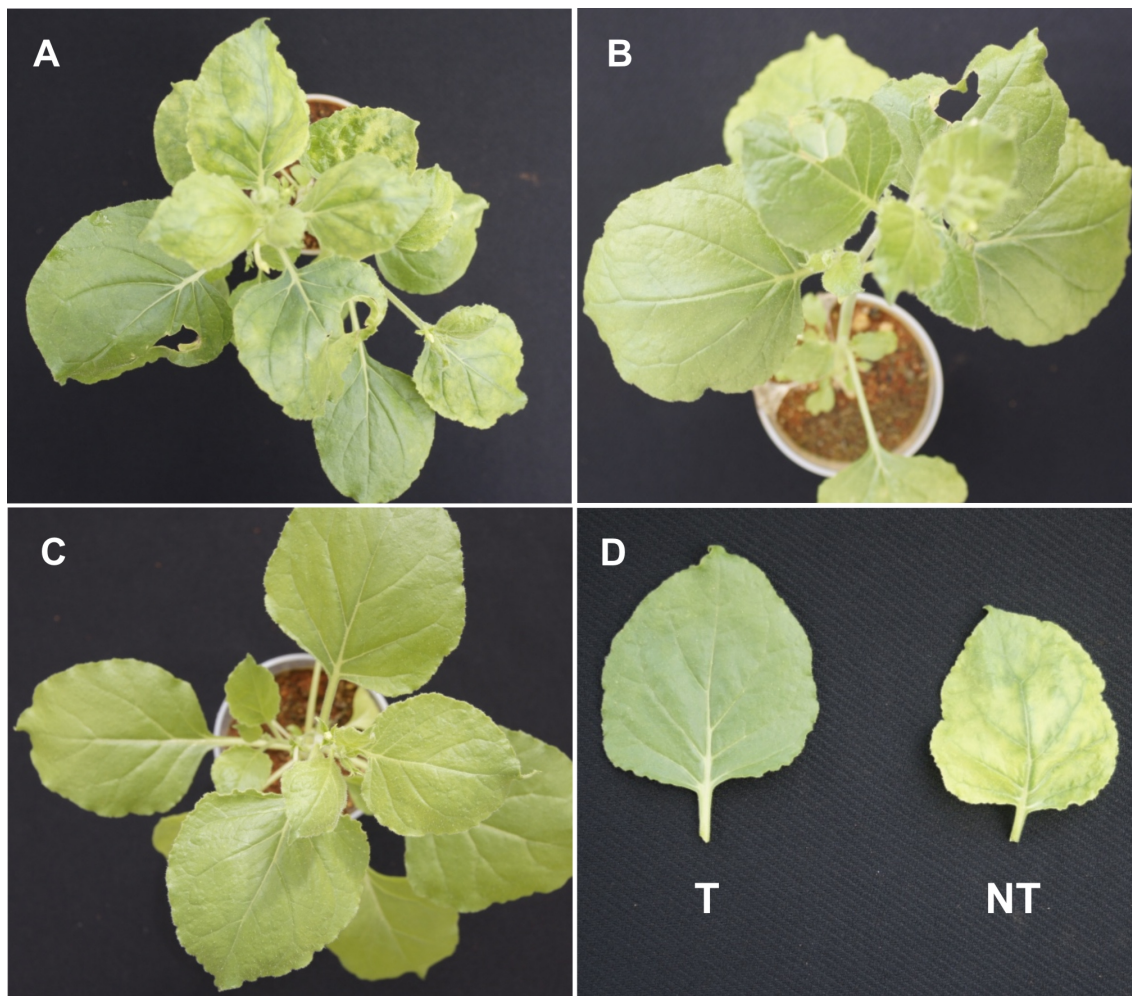


Figura 11: Sintomas desenvolvidos por plantas inoculadas com o vírus tomato rugose mosaic virus (ToRMV). A) Planta não-transgênica inoculada com DNA viral, apresentando sintoma de mosaico e rugosidade foliar. B) Planta transgênica sem a presença de sintomas. C) Planta controle não inoculada. D) Comparação de uma folha transgênica (T), sem sintomas de infecção viral, e uma folha não-transgênica (NT), apresentando sintomas de infecção.

A análise da zigose do transgene demonstrou que as plantas das linhagens 22 e 19, que apresentaram atraso no surgimento da infecção, quando comparadas ao controle, bem como 3 plantas da linhagem 29, que não apresentaram infecção durante o período de 35-dpi, são homozigotas para o transgene (Figura 12). O número de plantas homozigotas e hemizigotas, dentre as plantas desafiadas, bem como o valor de qui-quadrado, realizado na frequência esperada de 2:1, $df=1$, é demonstrado na tabela 6.

Tabela 6: Análise da zigose do transgene, via qPCR, em plantas da geração T_2 inoculadas com ToRMV.

Linhagem	Plantas inoculadas T_2		χ^2	$P^{(a)}$
	Homozigotas	Hemizigotas		
22	12	17	0,84	0,35
29	9	15	0,18	0,66
19	11	21	0,01	0,90

(a) Probabilidade que as frequências observadas refletem o padrão de segregação 2:1, $\alpha=0,05$.

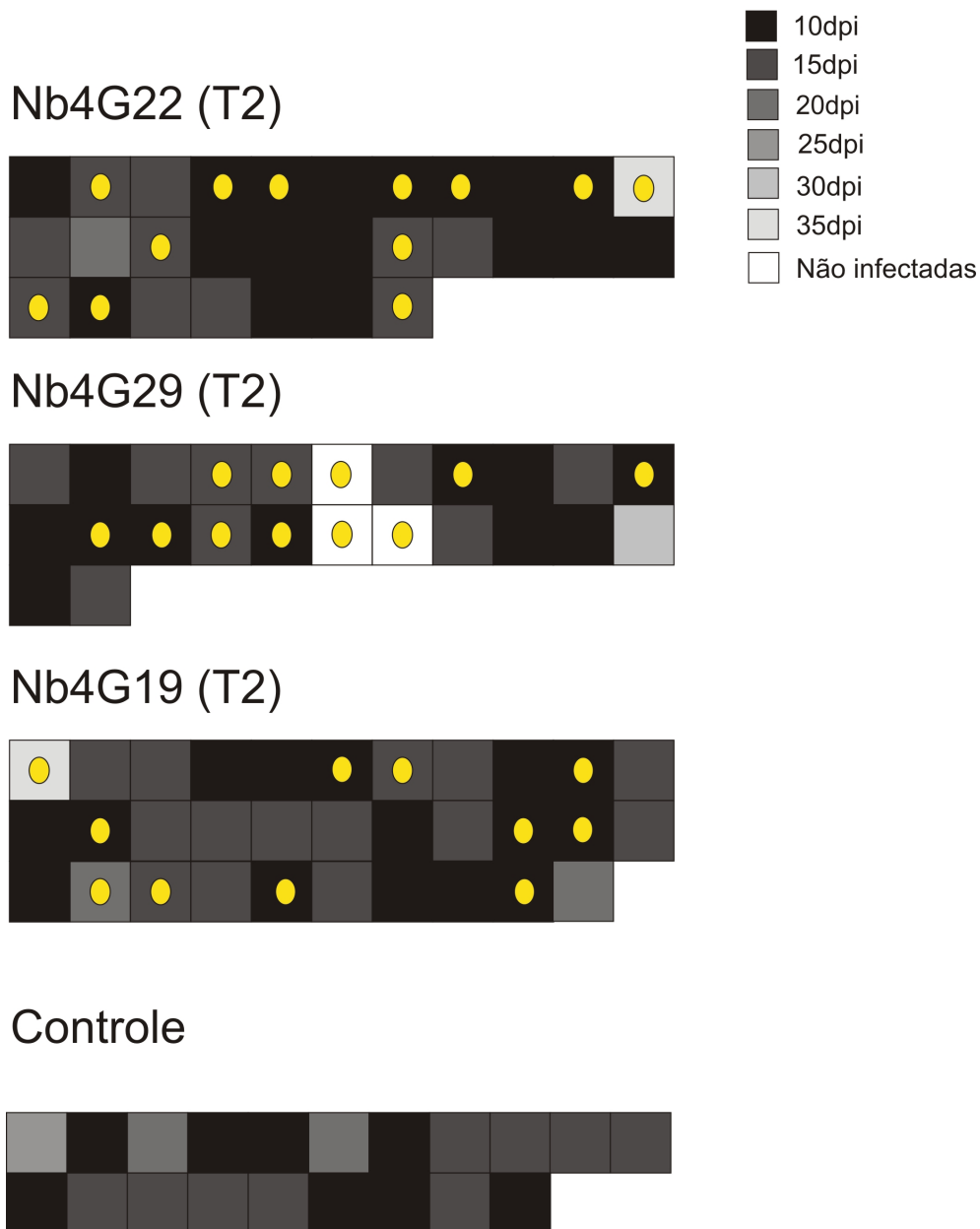


Figura 12: Plantas da geração T₂, inoculadas com o vírus ToRMV. As linhagens transgênicas 22, 29 e 19 são denominadas Nb4G22, Nb4G29 e Nb4G19, respectivamente. Os quadrados representam as 29 plantas transgênicas da linhagem Nb4G 22, 24 plantas transgênicas da linhagem Nb4G29, 32 plantas transgênicas da linhagem Nb4G19 e 20 plantas não-transgênicas, utilizadas como controle. Os diferentes períodos de início da infecção, variando de 10 a 35 dias pós-inoculação (dpi) estão representados por diferentes tons de cinza. Plantas que não apresentaram infecção durante todo o período de análise estão representadas por quadrados brancos. Plantas homocigotas estão marcadas com um círculo amarelo.

3.6.8 Desafio com o vírus ToCMoV

Nesse experimento, um total de 57 plantas transgênicas da geração T₂ foram inoculadas com o clone infeccioso de tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV), sendo: 27 plantas da linhagem 22, 15 plantas da linhagem 29 e 15 plantas da linhagem 19. Vinte e oito plantas não-transgênicas foram utilizadas como controle.

Com 15-dpi, 100% (28/28) das plantas não transgênicas demonstraram infecção pelo vírus inoculado, com desenvolvimento de sintomas característicos como mosaico e deformação das folhas (Figura 13 B). As linhagens transgênicas 22, 29 e 19, exibiram uma proporção de 7,4% (2/27), 6,6% (1/15) e 6,6% (1/15) respectivamente, de plantas não infectadas e que não apresentaram sintomas, durante o período de análise de 35-dpi (Figura 13 A).

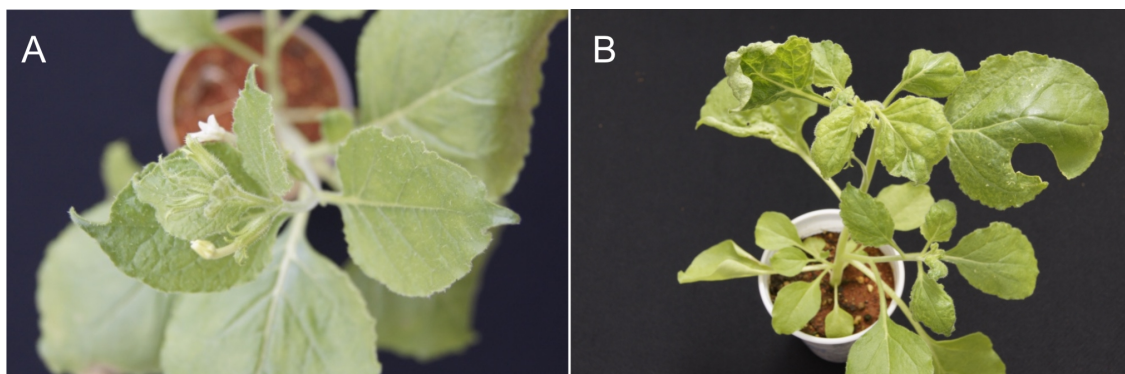


Figura 13: Sintomas desenvolvidos por plantas inoculadas com o vírus tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV). A) Planta transgênica não infectada, sem a presença de sintomas. B) Planta não-transgênica apresentando sintomas característicos de infecção, como mosaico e deformação foliar.

A análise da zigose do transgene demonstrou que na linhagem 22, uma das plantas não infectadas é homocigota para o transgene. O mesmo não ocorreu nas linhagens 29 e 19, e as únicas plantas não infectadas foram detectadas como hemizigotas (Figura 14). A análise das plantas desafiadas por qPCR para análise da zigose do transgene, bem como o valor de qui-quadrado, realizado na frequência esperada de 2:1, $df=1$, é demonstrado na tabela é demonstrada na tabela 7.

Tabela 7: Análise da zigose do transgene, via qPCR, em plantas da geração T_2 inoculadas com ToCMoV.

Linhagem	Plantas inoculadas T_2		χ^2	$P^{(a)}$
	Homocigotas	Hemizigotas		
22	9	18	0,00	1,00
29	6	9	0,30	0,58
19	5	10	0,00	1,00

(a) Probabilidade que as frequências observadas refletem o padrão de segregação 2:1, $\alpha=0,05$.

ToCMoV 1 μ g/ μ L

Nb4G22 (T2)



Nb4G29 (T2)



Nb4G19 (T2)



Controle



Figura 14: Plantas da geração T₂, inoculadas com o vírus ToCMoV. As linhagens transgênicas 22, 29 e 19 são denominadas Nb4G22, Nb4G29 e Nb4G19, respectivamente. Os quadrados representam as 27 plantas transgênicas da linhagem Nb4G 22, 15 plantas transgênicas da linhagem Nb4G29, 15 plantas transgênicas da linhagem Nb4G19 e 28 plantas não-transgênicas, utilizadas como controle. Os diferentes períodos de início da infecção, variando de 10 a 35 dias pós-inoculação (dpi) estão representados por diferentes tons de cinza. Plantas que não apresentaram infecção durante todo o período de análise estão representadas por quadrados brancos. Plantas homocigotas estão marcadas com um círculo amarelo.

3.6.9 Desafio com RCA

Nesse experimento, um total de 45 plantas transgênicas da geração T₂ foram inoculadas, sendo: 15 plantas da linhagem 22, 15 plantas da linhagem 29 e 15 plantas da linhagem 19. Quinze plantas não-transgênicas foram utilizadas como controle.

Com 15-dpi, 73,3% (11/15) das plantas não transgênicas demonstraram infecção pelo vírus inoculado, com desenvolvimento de sintomas característicos de begomovirose como aspecto de mosaico, folhas deformadas e ramos contorcidos (Figura 15 B). Um total de 26,7% (4/15) das plantas foram consideradas escape do teste, pois não desenvolveram infecção durante os 35 dias de análise. Ao fim do período de 35-dpi, a linhagem 22 apresentou 60% (9/15) de plantas não infectadas, a linhagem 29 apresentou uma planta não infectada (1/15) e a linhagem 19, apresentou uma proporção de 13,3% (2/15) de plantas não infectadas. Essas plantas apresentaram desenvolvimento normal, sem nenhum sintoma de infecção viral, diferente das plantas não transgênicas inoculadas (Figura 15 A).

O DNA das plantas infectadas foi analisado para identificação do vírus responsável pela infecção, e as sequências demonstraram 100% de identidade nucleotídica com o vírus tomato interveinal chlorosis virus (ToICV) (GenBank: JF803253.1).

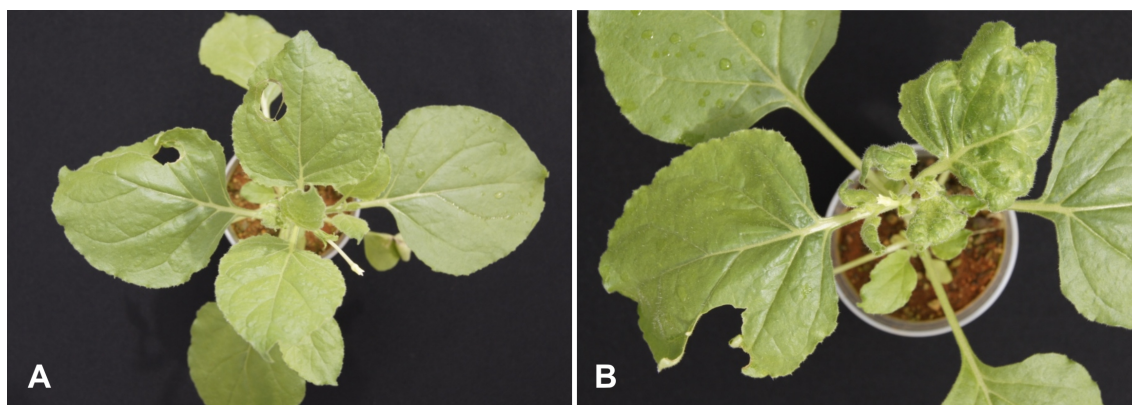


Figura 15: Sintomas desenvolvidos por plantas inoculadas com RCA do vírus tomato interveinal chlorosis virus (ToICV). A) Planta transgênica não infectada, sem a presença de sintomas. B) Planta não-transgênica apresentando sintomas característicos de infecção, como mosaico e deformação de folhas e ramos.

A análise da zigosidade do transgene por qPCR demonstrou que 78% (7/9) das plantas que não apresentaram infecção, durante os 35 dias de análise, referentes à linhagem 22, apresentam o transgene em homozigose. Plantas não infectadas das linhagens 29 e 19 também foram detectadas como homozigotas (Figura 16). O número de plantas homozigotas e hemizigotas, dentre as plantas desafiadas com RCA, bem como o valor de qui-quadrado, realizado na frequência esperada de 2:1, $df=1$, é demonstrado na tabela 8.

Tabela 8: Análise da zigose do transgene, via qPCR, em plantas da geração T₂ inoculadas com RCA do vírus tomato interveinal chlorosis virus (ToICV).

Linhagem	Plantas inoculadas T ₂		χ^2	P ^(a)
	Homozigotas	Hemizigotas		
22	8	7	2,70	0,10
29*	2	3	0,22	0,75
19	6	9	0,30	0,58

(a) Probabilidade que as frequências observadas refletem o padrão de segregação 2:1, $\alpha=0,05$.

* Na linhagem 29, o teste de qPCR foi realizado em 5 plantas desafiadas.

Nb4G22 (T2)



Nb4G29 (T2)



Nb4G19 (T2)



Controle



Figura 16: Plantas da geração T₂, inoculadas com RCA do vírus ToICV. As linhagens transgênicas 22, 29 e 19 são denominadas Nb4G22, Nb4G29 e Nb4G19, respectivamente. Os quadrados representam as 15 plantas transgênicas da linhagem Nb4G 22, 15 plantas transgênicas da linhagem Nb4G29, 15 plantas transgênicas da linhagem Nb4G19 e 15 plantas não-transgênicas, utilizadas como controle. Os diferentes períodos de início da infecção, variando de 10 a 35 dias pós-inoculação (dpi) estão representados por diferentes tons de cinza. Plantas que não apresentaram infecção durante todo o período de análise estão representadas por quadrados brancos. Plantas homocigotas estão marcadas com um círculo amarelo.

3.7 Discussão

Doenças causadas por begomovírus representam um importante problema para a produção de tomate no Brasil e no mundo (Varma and Malathi, 2003) (Fernandes et al., 2008) (Albuquerque et al., 2012). Estratégias para controle desses vírus baseiam-se principalmente no controle do vetor - através da aplicação de inseticidas tóxicos, que geram problemas ambientais e seleção de insetos resistentes (Dalton, 2006) - aliado a técnicas de manejo no campo, como a eliminação de plantas infectadas e a criação de períodos de vazios sanitários, que não são totalmente efetivas, uma vez que diversas plantas daninhas funcionam como potenciais reservatórios e fontes de inóculo de diferentes espécies desses vírus (Barbosa et al., 2009) (Barreto et al., 2013).

Estratégias para gerar plantas com resistência a esses agentes como a expressão de genes da capa protéica (Kunik et al., 1994), expressão de genes virais truncados (Hashmi et al., 2011) e RNA antisense (Day et al., 1991) (Aragão et al., 1998) foram inicialmente investigadas e resultaram em níveis variados de tolerância a esses vírus. Nos últimos anos, o mecanismo molecular de RNA de interferência (RNAi), o qual envolve o silenciamento de genes específicos a nível transcricional (TGS) e pós-transcricional (PTGS), tem se estabelecido como uma ferramenta importante no melhoramento de plantas com resistência a patógenos virais (Tenllado et al., 2004) (Vanderschuren et al., 2007) (Saurabh et al., 2014), e tem sido utilizada com sucesso na obtenção

de plantas transgênicas imunes a diversos begomovírus (Fuentes et al., 2006) (Bonfim et al., 2007) (Vanderschuren et al., 2009).

Nesse trabalho, foi descrita uma estratégia para controle dos begomovírus que infectam tomateiro no Brasil. Essa cultura sofre infecção de uma variedade de espécies desses vírus (Fernandes et al., 2008) (Albuquerque et al., 2012), o que torna a resistência de amplo espectro um desafio. Diante disso, foi desenvolvido um cassete de interferência quimérico, que expressa um *hpRNA*, que tem como alvo sequências conservadas do gene *rep* – fundamental para a replicação viral – de distintas espécies de begomovírus, e sua habilidade no silenciamento desses agentes foi avaliada em plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana*.

De um total de 20 plantas transgênicas geradas, um teste inicial de inoculação com o vírus tomato golden vein virus (TGVV) - um dos principais begomovírus encontrados encontrados no Brasil (Fernandes et al., 2008) - demonstrou que, somente 3 linhagens (Linhagens 19, 22 e 29) apresentaram uma maior proporção de plantas da geração T₁ sem a presença de DNA viral e sintomas. Essa frequência de linhagens apresentando plantas resistentes é relativamente baixa, uma vez que já foi demonstrado que construções gênicas expressando moléculas de *hpRNA*, são capazes de induzir silenciamento gênico de sequências-alvo com 90 a 100% de eficiência (Smith et al., 2000) (Wesley et al., 2001). No entanto, o local de integração de transgenes no genoma é altamente variável (Chyi et al., 1986), e esse resultado pode estar

associado à baixa expressão do *hpRNA*, devido à uma possível inserção em regiões de heterocromatina. Transgenes inseridos em regiões hipermetiladas do genoma, tendem a sofrer esse mesmo padrão de metilação, resultando em completa inibição ou significativa redução da sua expressão (Lindsey, 1998).

Após os experimentos iniciais de inoculação com TGVV, a geração T₂ das 3 linhagens que apresentaram melhores resultados, foram avaliadas quanto à resistência a distintas espécies de begomovírus. Essas plantas foram novamente inoculadas com TGVV, em diferentes concentrações de DNA viral, e com os vírus tomato rugose mosaic virus (ToRMV), tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) e tomato interveinal chlorosis virus (ToICV), que são begomovírus responsáveis por causar infecção em tomateiro no Brasil (Fernandes et al., 2006) (Ribeiro et al., 2007) (Albuquerque et al., 2012). Nossos resultados demonstraram que, a proporção de plantas resistentes a TGVV foi dependente da pressão de DNA viral inoculada. As 3 linhagens analisadas apresentaram uma maior quantidade de plantas não infectadas, à uma pressão de inóculo de aproximadamente 250 ng/μL de DNA viral por planta, quando comparado à infecção com cerca de 1000 ng/μL de DNA viral por planta (Figuras 9 e 11). Zhang et al (2005) também demonstraram que a resistência, baseada em silenciamento gênico, é dependente da carga viral utilizada no momento da inoculação, via bombardeamento. Esses pesquisadores observaram que mesmo plantas transgênicas apresentando resistência ao african cassava mosaic virus (ACMV), quando inoculadas com

alta pressão de DNA desse vírus (200 ng/ μ L de DNA viral/planta), se tornavam infectadas.

Nossos resultados também demonstraram que a resistência de plantas transgênicas a todos os vírus avaliados, parece ser dependente da homozigose do transgene. Uma proporção de 77% das plantas que não apresentaram infecção, demonstraram ser homozigotas. Os 23% de plantas não infectadas e não identificadas como homozigotas, podem ser escape do bombardeamento, uma vez que casos de escape ocorreram nas plantas não-transgênicas. Essa relação entre resistência e homozigose remete ao fenômeno de supressão de genes dependente de dosagem, previamente observado em plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*, nas quais a expressão de um transgene foi totalmente suprimida em plantas homozigotas, e não em plantas hemizigotas (de Carvalho et al., 1992). Posteriormente esse fenômeno foi associado ao mecanismo de silenciamento gênico, direcionado por moléculas de siRNAs (Deng et al., 2013).

Outros trabalhos também tem feito a associação entre resistência a agentes virais e homozigose. Cruz & Aragão (2014) observaram que somente plantas transgênicas de feijão-caupi homozigotas, não apresentaram infecção após terem sido desafiadas com os vírus cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) e cowpea severe mosaic virus (CPSMV). Resultado similar foi demonstrado em plantas de feijão transgênicas, imunes ao bean golden mosaic virus (BGMV), nas quais sob alta pressão de inóculo viral, 100% das plantas

homozigotas permaneceram sem sintomas, enquanto 28,7% das plantas hemizigotas apresentaram sintomas brandos de infecção por esse vírus (Aragão and Faria, 2009).

É importante mencionar que neste trabalho, nós utilizamos o bombardeamento de partículas como metodologia de inoculação de plantas transgênicas. De acordo com Zhang et al (2005), essa forma de infecção é severa e provavelmente bastante diferente das condições que ocorrem no campo. Aliado a isso, o fato de *N. benthamiana* possuir uma mutação no gene da RNA polimerase dependente de RNA 1 (*RdRP1m*) (Yang et al., 2004), faz com que nessas plantas a amplificação do sinal de silenciamento, na via de PTGS, seja prejudicada (Baulcombe, 2007). Juntos, esses fatores também poderiam explicar o padrão de plantas infectadas encontradas nesse estudo, onde plantas transgênicas hemizigotas, e mesmo plantas homozigotas, foram infectadas pelos vírus TGVV, ToRMV, ToCMoV e ToICV.

Begomovírus são agentes que estão sob constante evolução, através de altas taxas de mutação, recombinação e pseudo-recombinação, o que resulta muitas vezes em novas espécies virais (Padidam et al., 1999) (Rocha et al., 2013) (Silva et al., 2014). Nesse estudo, foi descrito uma estratégia baseada em um constructo quimérico para expressão de um *hpRNA*, para resistência de amplo espectro a begomovírus que infectam tomateiro no Brasil. Os resultados demonstrados são animadores, e sugerem uma possível relação entre o fenótipo de resistência e a homozigose do transgene. No entanto, novos

experimentos serão necessários para avaliar a próxima geração das plantas transgênicas (T₃), que não apresentaram infecção pelos vírus avaliados, a fim de confirmar a sua resistência à esses agentes.

3.8 Conclusão

Nesse estudo nós utilizamos o mecanismo molecular de RNA de interferência (RNAi), como ferramenta para resistência de amplo espectro a begomovírus que infectam tomateiro no Brasil. Os ensaios de inoculação das plantas de *Nicotiana benthamiana* transgênicas com diferentes vírus revelaram que, o fenótipo de resistência das diferentes linhagens testadas, possivelmente está relacionado à carga de DNA viral utilizada no bombardeamento, e à homozigose do transgene. Novos experimentos de desafio com a próxima geração (T₃) das plantas homozigotas, deverão ser realizados para a confirmação desse fenótipo. Além disso, ensaios de *Northern blot* para detecção de moléculas de siRNAs nessas plantas, também devem ser realizados para confirmação da resistência baseada em RNAi. No futuro, a estratégia que foi descrita nesse trabalho poderá ser aplicada como forma de resistência anti-viral em plantas de tomate.

4 Considerações finais e perspectivas

Os begomovírus, representam o maior grupo de vírus da família *Geminiviridae*, com 307 espécies aceitas atualmente. Esses agentes infectam uma grande variedade de plantas dicotiledôneas em diversas regiões do mundo, e são responsáveis por grandes perdas na agricultura. No Brasil, desde a década de 90, houve um aumento na incidência e gravidade de epidemias associadas aos begomovírus em diferentes culturas, fato que está associado à introdução do biótipo B de *Bemisia tabaci* no país. O controle das doenças associadas a esses vírus baseiam-se principalmente no controle do vetor, aliado a técnicas de manejo no campo, que não são totalmente efetivas. Assim, diversas estratégias de engenharia genética tem sido utilizadas, na tentativa de gerar plantas com resistência a esses patógenos.

O mecanismo de RNAi tem sido amplamente utilizado como ferramenta para o controle genético de patógenos virais. Estudos demonstraram que esse mecanismo pode ser ativado de maneira eficiente através de moléculas do tipo *hpRNA*, e resultar no silenciamento de genes específicos, de forma eficiente.

Neste trabalho nós avaliamos a ferramenta de RNAi, como forma de controle de begomovirose. Em feijoeiro, essa tecnologia foi utilizada na obtenção de uma planta de feijão transgênica, que é imune ao BGMV. Esse vírus é o agente responsável pelo mosaico dourado do feijoeiro, uma doença que tem limitado a produção de feijão em diversas regiões do Brasil. Nós

demonstramos que moscas brancas virulíferas, infectadas pelo BGMV, após se alimentarem em plantas de feijão transgênicas, apresentaram uma queda significativa na sua quantidade de DNA viral, comparado à moscas que se alimentaram em plantas de feijão não transgênicas. Esse resultado indica que a tecnologia de RNAi pode atuar não somente no controle do mosaico dourado, como também auxiliar no controle do inóculo viral no inseto vetor, o que poderia atuar diretamente na redução da infecção pelo BGMV tanto em campos transgênicos, quanto em campos não transgênicos. Testes em campo serão realizados para comprovar essa hipótese.

O tomate, uma importante hortaliça cultivada no Brasil, sofre constantemente com a alta incidência de diversas espécies de begomovírus. Nós avaliamos a utilização do mecanismo de RNAi, para a obtenção de plantas transgênicas com resistência ampla a esses agentes. Foi demonstrado que o fenótipo de resistência a diferentes vírus provavelmente está associado à carga de DNA viral utilizada para infectar as plantas transgênicas, e também à homozigose do transgene. Novos testes com as plantas que apresentaram o fenótipo de resistência deverão ainda ser realizados, no entanto esse trabalho demonstra uma importante alternativa para o desenvolvimento de cultivares com resistência ampla aos begomovírus. No futuro, a estratégia que foi utilizada nesse estudo será transferida para tomateiro, para a obtenção de plantas com resistência às diferentes espécies de begomovírus que infectam essa cultura.

5 Referências Bibliográficas

- Abernathy, E., Glaunsinger, B., 2015. Emerging roles for RNA degradation in viral replication and antiviral defense. *Virology* 479-480C, 600–608. doi:10.1016/j.virol.2015.02.007
- Abreu, E.F.M., Aragão, F.J.L., 2007. Isolation and characterization of a myo-inositol-1-phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress. *Ann. Bot.* 99, 285–292. doi:10.1093/aob/mcl256
- Ach, R.A., Durfee, T., Miller, A.B., Taranto, P., Hanley-Bowdoin, L., Zambryski, P.C., Gruissem, W., 1997. RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5077–5086.
- Ahlquist, P., 2002. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* 296, 1270–1273. doi:10.1126/science.1069132
- Albuquerque, L.C., Martin, D.P., Ávila, A.C., Inoue-Nagata, A.K., 2010. Characterization of tomato yellow vein streak virus, a begomovirus from Brazil. *Virus Genes* 40, 140–147. doi:10.1007/s11262-009-0426-2
- Albuquerque, L.C., Varsani, A., Fernandes, F.R., Pinheiro, B., Martin, D.P., de Tarso Oliveira Ferreira, P., Lemos, T.O., Inoue-Nagata, A.K., 2012. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Arch. Virol.* 157, 747–752. doi:10.1007/s00705-011-1213-7
- Ammara, U. e, Mansoor, S., Saeed, M., Amin, I., Briddon, R.W., Al-Sadi, A.M., 2015. RNA interference-based resistance in transgenic tomato plants

against Tomato yellow leaf curl virus-Oman (TYLCV-OM) and its associated betasatellite. *Viol. J.* 12, 38. doi:10.1186/s12985-015-0263-y

Andrade, E.C., Manhani, G.G., Alfenas, P.F., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B., 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. doi:10.1099/vir.0.82279-0

Aragão, F.J., 2014. GM plants with RNAi - golden mosaic resistant bean. *BMC Proc.* 8, O24. doi:10.1186/1753-6561-8-S4-O24

Aragão, F.J.L., Faria, J.C., 2009. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. *Nat. Biotechnol.* 27, 1086–1088; author reply 1088–1089. doi:10.1038/nbt1209-1086

Aragão, F.J.L., Nogueira, E.O.P.L., Tinoco, M.L.P., Faria, J.C., 2013. Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus. *J. Biotechnol.* 166, 42–50. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.04.009

Aragão, F.J.L., Ribeiro, S.G., Barros, L.M.G., Brasileiro, A.C.M., Maxwell, D.R., Rech, E.L., Faria, J.C., 1998. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. *Mol. Breed.* 4, 491–499. doi:10.1023/A:1009613607559

Aregger, M., Borah, B.K., Seguin, J., Rajeswaran, R., Gubaeva, E.G., Zvereva, A.S., Windels, D., Vazquez, F., Blevins, T., Farinelli, L., Pooggin, M.M., 2012. Primary and Secondary siRNAs in Geminivirus-induced Gene Silencing. *PLoS Pathog.* 8. doi:10.1371/journal.ppat.1002941

- Argüello-Astorga, G.R., Guevara-González, R.G., Herrera-Estrella, L.R., Rivera-Bustamante, R.F., 1994. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology* 203, 90–100. doi:10.1006/viro.1994.1458
- Argüello-Astorga, G.R., Ruiz-Medrano, R., 2001. An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: Identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Arch. Virol.* 146, 1465–1485. doi:10.1007/s007050170072
- Atzmon, G., Van Oss, H., Czosnek, H., 1998. PCR-amplification of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) DNA from squashes of plants and whitefly vectors: Application to the study of TYLCV acquisition and transmission. *Eur. J. Plant Pathol.* 104, 189–194. doi:10.1023/A:1008699603559
- Azzam, O., Frazer, J., de la Rosa, D., Beaver, J.S., Ahlquist, P., Maxwell, D.P., 1994. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology*. doi:S0042-6822(84)71533-9 [pii]\r10.1006/viro.1994.1533 [doi]
- Baliji, S., Black, M.C., French, R., Stenger, D.C., Sunter, G., 2004. Spinach curly top virus: A Newly Described Curtovirus Species from Southwest Texas with Incongruent Gene Phylogenies. *Phytopathology* 94, 772–779. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.7.772
- Barbosa, J.C., Barreto, S.S., Inoue-Nagata, A.K., Reis, M.S., Firmino, A.C., Filho, A.B., Rezende, J.A.M., 2009. Natural infection of *Nicandra physaloides* by Tomato severe rugose virus in Brazil. *J. Gen. Plant Pathol.* 75, 440–443. doi:10.1007/s10327-009-0198-5

- Barbosa, J.C., Rezende, J.A.M., Amorim, L., Filho, A.B., 2015. Temporal Dynamics of Tomato Severe Rugose Virus and *Bemisia tabaci* in Tomato Fields in São Paulo, Brazil. *J. Phytopathol.* n/a–n/a. doi:10.1111/jph.12402
- Barreto, S.S., Hallwass, M., Aquino, O.M., Inoue-Nagata, a K., 2013. A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato-infecting begomovirus in central Brazil. *Phytopathology* 103, 436–44. doi:10.1094/PHYTO-07-12-0174-R
- Baulcombe, D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356–363. doi:10.1038/nature02874
- Baulcombe, D.C., 2007. Molecular biology. Amplified silencing. *Science* 315, 199–200. doi:10.1126/science.1138030
- Bedford, I.D., Briddon, R.W., Brown, J.K., Rosell, R.C., Markham, P.G., 1994. Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Ann. Appl. Biol.* 125, 311–325. doi:10.1111/j.1744-7348.1994.tb04972.x
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363–366. doi:10.1038/35053110
- Bhatia, P., Ashwath, N., Senaratna, T., Midmore, D., 2004. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* doi:10.1023/B:TICU.0000020430.08558.6e
- Bianchini, A., 1999. Resistance to Bean Golden Mosaic Virus in Bean Genotypes. *Plant Dis.* 83, 615–620. doi:10.1094/PDIS.1999.83.7.615

- Bisaro, D.M., 1996. Geminivirus DNA Replication, in: DNA Replication in Eukariotic Cells. NY, pp. 833–854.
- Block, M.D., Botterman, J., Vandewiele, M., Dockx, J., Thoen, C., Gosselé, V., Movva, N.R., Thompson, C., Montagu, M. V, Leemans, J., 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. EMBO J. 6, 2513–2518.
- Bombarely, A., Rosli, H.G., Vrebalov, J., Moffett, P., Mueller, L., Martin, G., 2012. A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. Mol. Plant-Microbe Interact. doi:10.1094/MPMI-06-12-0148-TA
- Bond, D.M., Baulcombe, D.C., 2014. Small RNAs and heritable epigenetic variation in plants. Trends Cell Biol. doi:10.1016/j.tcb.2013.08.001
- Bonfim, K., Faria, J.C., Nogueira, E.O.P.L., Mendes, E. a, Aragão, F.J.L., 2007. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). Mol. Plant. Microbe. Interact. 20, 717–726.
- Bosco, D., Mason, G., 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. doi:10.1016/j.virol.2004.03.010
- Boulton Margaret, I., 2002. Functions and interactions of mastrevirus gene products. Physiol. Mol. Plant Pathol. 2002; 60, 243–255. URLJ: <http://www.academicpress.com/pmpp>. doi:10.1006/pmpp.2002.0403
- Bragard, C., Caciagli, P., Lemaire, O., Lopez-Moya, J.J., MacFarlane, S., Peters, D., Susi, P., Torrance, L., 2013. Status and prospects of plant virus

control through interference with vector transmission. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 177–201. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102346

BRASILEIRO, A.C.M. CARNEIRO, V.T.C., 1998. Manual de transformação genética de plantas. EmbrapaSPI/Embrapa-Cenargen.

Briddon, R.W., Bedford, I.D., Tsai, J.H., Markham, P.G., 1996. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology* 219, 387–394. doi:10.1006/viro.1996.0264

Briddon, R.W., Heydarnejad, J., Khosrowfar, F., Massumi, H., Martin, D.P., Varsani, A., 2010. Turnip curly top virus, a highly divergent geminivirus infecting turnip in Iran. *Virus Res.* 152, 169–175. doi:10.1016/j.virusres.2010.05.016

Briddon, R.W., Pinner, M.S., Stanley, J., Markham, P.G., 1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177, 85–94. doi:10.1016/0042-6822(90)90462-Z

Briddon, R.W., Stanley, J., 2006. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology*. doi:10.1016/j.virol.2005.09.042

Brodersen, P., Voinnet, O., 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.* doi:10.1016/j.tig.2006.03.003

Brown, J.K., Fauquet, C.M., Briddon, R.W., Zerbini, M., Moriones, E., Navas-Castillo, J., 2011. Family Geminiviridae., in: *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. pp. 351–373. doi:10.1016/B978-0-12-384684-6.00059-8

- Brown, J.K., Zerbini, F.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J.C.F., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R.W., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Malathi, V.G., Martin, D.P., Rivera-Bustamante, R., Ueda, S., Varsani, A., 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch. Virol.* 160, 1593–619. doi:10.1007/s00705-015-2398-y
- Bull, S.E., Briddon, R.W., Sserubombwe, W.S., Ngugi, K., Markham, P.G., Stanley, J., 2007. Infectivity, pseudorecombination and mutagenesis of Kenyan cassava mosaic begomoviruses. *J. Gen. Virol.* 88, 1624–1633. doi:10.1099/vir.0.82662-0
- Calderón-Cortés, N., Quesada, M., Cano-Camacho, H., Zavala-Páramo, G., 2010. A simple and rapid method for DNA isolation from xylophagous insects. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 5056–5064. doi:10.3390/ijms11125056
- Calegario, R.F., Ferreira, S.D.S., De Andrade, E.C., Zerbini, F.M., 2007. Characterization of Tomato yellow spot virus, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 42, 1335–1343. doi:10.1590/S0100-204X2007000900016
- Castel, S.E., Martienssen, R. a, 2013. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 14, 100–112. doi:10.1038/nrg3355
- Castillo, A.G., Collinet, D., Deret, S., Kashoggi, A., Bejarano, E.R., 2003. Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (REn) and viral replication protein (Rep). *Virology* 312, 381–394. doi:10.1016/S0042-6822(03)00234-4
- Castillo-Urquiza, G.P., Beserra, J.E.A., Bruckner, F.P., Lima, A.T.M., Varsani, A., Alfenas-Zerbini, P., Murilo Zerbini, F., 2008. Six novel begomoviruses

- infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Arch. Virol.* 153, 1985–1989. doi:10.1007/s00705-008-0172-0
- Chakraborty, S., Vanitharani, R., Chattopadhyay, B., Fauquet, C.M., 2008. Supervirulent pseudorecombination and asymmetric synergism between genomic components of two distinct species of begomovirus associated with severe tomato leaf curl disease in India. *J. Gen. Virol.* 89, 818–828. doi:10.1099/vir.0.82873-0
- Chellappan, P., Vanitharani, R., Fauquet, C.M., 2005. MicroRNA-binding viral protein interferes with Arabidopsis development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10381–10386. doi:10.1073/pnas.0504439102
- Chen, H., Lin, C., Tsai, W., Kenyon, L., Chan, M., Yen, J., Chang, S., de la Peña, R., Schafleitner, R., 2015. Resistance to viral yellow leaf curl in tomato through RNAi targeting two Begomovirus species strains. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* doi:10.1007/s13562-015-0325-7
- Chilton, M.D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendich, A.J., Gordon, M.P., Nester, E.W., 1974. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 3672–3676. doi:10.1073/pnas.71.9.3672
- Chyi, Y.-S., Jorgensen, R.A., Goldstein, D., Tanksley, S.D., Loaiza-Figueroa, F., 1986. Locations and stability of *Agrobacterium*-mediated T-DNA insertions in the *Lycopersicon* genome. *MGG Mol. Gen. Genet.* 204, 64–69. doi:10.1007/BF00330188
- Cipriano, T., Ibrahim, A., Faria, J., Aragão, F., 2014. Development of transgenic common bean with agronomic traits. *Legum. Perspect.* 27–29.

- Cruz, A.R.R., Aragão, F.J.L., 2014. RNAi-based enhanced resistance to Cowpea severe mosaic virus and Cowpea aphid-borne mosaic virus in transgenic cowpea. *Plant Pathol.* 63, 831–837. doi:10.1111/ppa.12178
- Czech, B., Hannon, G.J., 2011. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat. Rev. Genet.* 12, 19–31. doi:10.1038/nrg2916
- Czosnek, H., Ghanim, M., 2012. Back to Basics: Are Begomoviruses Whitefly Pathogens? *J. Integr. Agric.* doi:10.1016/S2095-3119(12)60007-0
- Czosnek, H., Ghanim, M., Shai, M., Rubinstein, G., Vivian, F., Zeidan, M., 2001. Whiteflies: Vectors, and victims (?), of geminiviruses 57, 291–322.
- Dalton, R., 2006. Whitefly infestations: the Christmas Invasion. *Nature* 443, 898–900. doi:10.1038/443898a
- Datla, R.S.S., Bekkaoui, F., Hammerlindl, J.K., Pilate, G., Dunstan, D.I., Crosby, W.L., 1993. Improved high-level constitutive foreign gene expression in plants using an AMV RNA4 untranslated leader sequence. *Plant Sci.* doi:10.1016/0168-9452(93)90015-R
- Day, A.G., Bejarano, E.R., Buck, K.W., Burrell, M., Lichtenstein, C.P., 1991. Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 6721–6725. doi:10.1073/pnas.88.15.6721
- De Barro, P.J., Liu, S.-S., Boykin, L.M., Dinsdale, A.B., 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annu. Rev. Entomol.* 56, 1–19. doi:10.1146/annurev-ento-112408-085504

- De Carvalho, F., Gheysen, G., Kushnir, S., Van Montagu, M., Inzé, D., Castresana, C., 1992. Suppression of beta-1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO J.* 11, 2595–2602.
- Deng, L., Pan, Y., Chen, X., Chen, G., Hu, Z., 2013. Small RNAs were involved in homozygous state-associated silencing of a marker gene (Neomycin phosphotransferase II: nptII) in transgenic tomato plants. *Plant Physiol. Biochem.* 68, 8–15. doi:10.1016/j.plaphy.2013.03.022
- Dinsdale, A., Cook, L., Riginos, C., Buckley, Y.M., Barro, P. De, 2010. (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) Mitochondrial Cytochrome Oxidase 1 to Identify Species Level Genetic Boundaries. *Ann. Entomol. Soc. Am.* doi:10.1603/AN09061
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11–15. doi:10.2307/4119796
- Dry, I.B., Krake, L.R., Rigden, J.E., Rezaian, M.A., 1997. A novel subviral agent associated with a geminivirus: The first report of a DNA satellite. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 7088–7093. doi:10.1073/pnas.94.13.7088
- Duffy, S., 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. doi:10.1099/vir.0.009266-0
- Duffy, S., Shackelton, L.A., Holmes, E.C., 2008. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat. Rev. Genet.* 9, 267–276. doi:10.1038/nrg2323
- Faria, J., Souza Dias, J., Slack, S., 1997. A new geminivirus associated with tomato in the state of São Paulo, Brazil. *Plant Dis.* 81, 423.

- Faria, J.C., Bezerra, I.C., Zerbini, F.M., Ribeiro, S.G., Lima, M.F. 2000. Current status of diseases caused by geminiviruses in Brazil - Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatol. Bras.*
- Faria, J.C., Maxwell, D.P., 1999. Variability in Geminivirus Isolates Associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology* 89, 262–268. doi:10.1094/PHYTO.1999.89.3.262
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., 2005. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.*
- Fauquet, C.M., Stanley, J., 2003. Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems. *Ann. Appl. Biol.* 142, 165–189. doi:10.1111/j.1744-7348.2003.tb00241.x
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* (N. Y). 39, 783–791. doi:10.2307/2408678
- Fernandes, F.R., De Albuquerque, L.C., De Britto Giordano, L., Boiteux, L.S., De Ávila, A.C., Inoue-Nagata, A.K., 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36, 251–258. doi:10.1007/s11262-007-0184-y
- Fernandes, J.J., Carvalho, M.G., Andrade, E.C., Brommonschenkel, S.H., Fontes, E.P.B., 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. doi:10.1111/j.1365-3059.2006.01395.x

- Ferreira, P. d T. d O., Lemos, T.O., Nagata, T., Inoue-Nagata, A.K., 2008. One-step cloning approach for construction of agroinfectious begomovirus clones. *J. Virol. Methods* 147, 351–354. doi:10.1016/j.jviromet.2007.10.001
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811. doi:10.1038/35888
- Flores, E., Silberschmidt, K., Kramer, M., 1960. Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico* 26, 65–69.
- Fondong, V.N., 2013. Geminivirus protein structure and function. *Mol. Plant Pathol.* doi:10.1111/mpp.12032
- Fontenelle, M.R., Luz, D.F., Gomes, A.P.S., Florentino, L.H., Zerbini, F.M., Fontes, E.P.B., 2007. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus Tomato chlorotic mottle virus. *Virus Res.* 126, 262–7. doi:10.1016/j.virusres.2007.02.009
- Fontes, E.P., Luckow, V.A., Hanley-Bowdoin, L., 1992. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell* 4, 597–608.
- Franca Felix, H., Boas Geni, L.V., Branco Marina, C., 1996. Occurrence of *Bemisia argentifolii* Bellows and Perring (Homoptera: Aleyrodidae) in the Federal District, Brazil. *An. Da Soc. Entomol. do Bras.* 25, 369–372.
- Fuentes, A., Ramos, P.L., Fiallo, E., Callard, D., Sánchez, Y., Peral, R., Rodríguez, R., Pujol, M., 2006. Intron-hairpin RNA derived from replication associated protein C1 gene confers immunity to tomato yellow leaf curl virus infection in transgenic tomato plants. *Transgenic Res.* 15, 291–304. doi:10.1007/s11248-005-5238-0

- Gafni, Y., Epel, B.L., 2002. The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 60, 231–241. doi:10.1006/pmpp.2002.0402
- García-Andrés, S., Tomás, D.M., Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., Moriones, E., 2007. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. *Virology* 365, 210–219. doi:10.1016/j.virol.2007.03.045
- 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.* doi:10.1016/j.virusres.2014.01.022
- Ghanim, M., Morin, S., Zeidan, M., Czosnek, H., 1998. Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology* 240, 295–303. doi:10.1006/viro.1997.8937
- Giordano, L.B., Fonseca, M.E.N., Silva, J.B.C., Inoue-Nagata, A., Boiteux, L., 2005. Efeito da infecção precoce por Begomovirus com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. *Hortic. Bras.* 23, 815–818.
- Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A., Lommel, S.A., 2008. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 21, 1015–1026. doi:10.1094/MPMI-21-8-1015
- Gorovits, R., Moshe, A., Ghanim, M., Czosnek, H., 2013. Recruitment of the Host Plant Heat Shock Protein 70 by Tomato Yellow Leaf Curl Virus Coat Protein Is Required for Virus Infection. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0070280

- Götz, M., Popovski, S., Kollenberg, M., Gorovits, R., Brown, J.K., Cicero, J.M., Czosnek, H., Winter, S., Ghanim, M., 2012. Implication of *Bemisia tabaci* heat shock protein 70 in Begomovirus-whitefly interactions. *J. Virol.* 86, 13241–52. doi:10.1128/JVI.00880-12
- Gutierrez, C., 2002. Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 60, 219–230. doi:10.1006/pmpp.2002.0401
- Gutierrez, C., 1999. Geminivirus DNA replication. *Cell. Mol. Life Sci.* doi:10.1007/s000180050433
- Hamilton, A.J., 1999. A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science.* doi:10.1126/science.286.5441.950
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J., 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293–296. doi:10.1038/35005107
- Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E.R., Robertson, D., Mansoor, S., 2013. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 777–88. doi:10.1038/nrmicro3117
- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S., Robertson, D., 1999. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 18, 71–106. doi:10.1016/S0735-2689(99)00383-4
- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B., Robertson, D., 2004. Reprogramming plant gene expression: A prerequisite to geminivirus DNA replication. *Mol. Plant Pathol.* doi:10.1111/j.1364-3703.2004.00214.x

- Hannon, G.J., 2002. RNA interference. *Nature* 418, 244–251. doi:10.1038/418244a
- Hartitz, M.D., Sunter, G., Bisaro, D.M., 1999. The tomato golden mosaic virus transactivator (TrAP) is a single-stranded DNA and zinc-binding phosphoprotein with an acidic activation domain. *Virology* 263, 1–14. doi:10.1006/viro.1999.9925
- Hashmi, J.A., Zafar, Y., Arshad, M., Mansoor, S., Asad, S., 2011. Engineering cotton (*Gossypium hirsutum* L.) for resistance to cotton leaf curl disease using viral truncated AC1 DNA sequences. *Virus Genes* 42, 286–296. doi:10.1007/s11262-011-0569-9
- Höfer, P., Bedford, I.D., Markham, P.G., Jeske, H., Frischmuth, T., 1997. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology* 236, 288–295. doi:10.1006/viro.1997.8751
- Hogenhout, S.A., Ammar, E.-D., Whitfield, A.E., Redinbaugh, M.G., 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 327–359. doi:10.1146/annurev.phyto.022508.092135
- Höhnle, M., Höfer, P., Bedford, I.D., Briddon, R.W., Markham, P.G., Frischmuth, T., 2001. Exchange of three amino acids in the coat protein results in efficient whitefly transmission of a nontransmissible Abutilon mosaic virus isolate. *Virology* 290, 164–171. doi:10.1006/viro.2001.1140
- Hormuzdi, S.G., Bisaro, D.M., 1995. Genetic analysis of beet curly top virus: examination of the roles of L2 and L3 genes in viral pathogenesis. *Virology* 206, 1044–54. doi:10.1006/viro.1995.1027

- Hou, Y.M., Gilbertson, R.L., 1996. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *J. Virol.* 70, 5430–5436.
- Ibrahim, A.B., Aragão, F.J.L., 2015. RNAi-Mediated Resistance to Viruses in Genetically Engineered Plants, in: *Plant Gene Silencing Methods and Protocols Methods in Molecular Biology*. pp. 81–92.
- Inoue-Nagata, A., Macedo, M., Souza, J., Michereff Filho, M., 2014. Tomate - Manejo Regional. *Cultiv.* HF 10–11.
- Inoue-Nagata, A.K., Albuquerque, L.C., Rocha, W.B., Nagata, T., 2004. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. *J. Virol. Methods* 116, 209–211. doi:10.1016/j.jviromet.2003.11.015
- Jenkins, G.M., Rambaut, A., Pybus, O.G., Holmes, E.C., 2002. Rates of molecular evolution in RNA viruses: A quantitative phylogenetic analysis. *J. Mol. Evol.* 54, 156–165. doi:10.1007/s00239-001-0064-3
- Jupin, I., De Kouchkovsky, F., Jouanneau, F., Gronenborn, B., 1994. Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): involvement of the protein encoded by ORF C4. *Virology* 204, 82–90. doi:10.1006/viro.1994.1512
- Ketting, R., Plasterk, R., 2005. RNAi and its applications. *Nat. Rev. Genet.*
- Klute, K.A., Nadler, S.A., Stenger, D.C., 1996. Horseradish curly top virus is a distinct subgroup II geminivirus species with rep and C4 genes derived from a subgroup III ancestor. *J. Gen. Virol.* 77, 1369–1378. doi:10.1099/0022-1317-77-7-1369

- Koichiro, T., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Koonin, E. V., Dolja, V. V., Krupovic, M., 2015. Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. *Virology* 479-480, 2–25. doi:10.1016/j.virol.2015.02.039
- Koonin, E. V., Ilyina, T. V., 1992. Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. *J. Gen. Virol.* 73, 2763–2766. doi:10.1099/0022-1317-73-10-2763
- Krupovic, M., Ravantti, J.J., Bamford, D.H., 2009. Geminiviruses: a tale of a plasmid becoming a virus. *BMC Evol. Biol.* 9, 112. doi:10.1186/1471-2148-9-112
- Kunik, T., Palanichelvam, K., Czosnek, H., Citovsky, V., Gafni, Y., 1998. Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plant and insect cells. *Plant J.* 13, 393–399.
- Kunik, T., Salomon, R., Zamir, D., Navot, N., Zeidan, M., Michelson, I., Gafni, Y., Czosnek, H., 1994. Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. *Biotechnol. (N Y)* 12, 500–504.
- Laufs, J., Jupin, I., David, C., Schumacher, S., Heyraud-Nitschke, F., Gronenborn, B., 1995. Geminivirus replication: genetic and biochemical characterization of Rep protein function, a review. *Biochimie* 77, 765–773. doi:10.1016/0300-9084(96)88194-6

- Lazarowitz, S., Beachy, R., 1999. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* 11, 535–548. doi:10.1105/tpc.11.4.535
- Lazarowitz, S.G., 1999. Probing plant cell structure and function with viral movement proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 332–338. doi:10.1016/S1369-5266(99)80058-2
- Lazarowitz, S.G., Shepherd, R.J., 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* doi:10.1080/07352689209382350
- Lazarowitz, S.G., Wu, L.C., Rogers, S.G., Elmer, J.S., 1992. Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. *Plant Cell* 4, 799–809. doi:10.2307/3869395
- Lee, W., Park, J., Lee, G.S., Lee, S., Akimoto, S.I., 2013. Taxonomic Status of the *Bemisia tabaci* Complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and Reassessment of the Number of Its Constituent Species. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0063817
- Lefevre, P., Lett, J.-M., Varsani, A., Martin, D.P., 2009. Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *J. Virol.* 83, 2697–2707. doi:10.1128/JVI.02152-08
- Lefevre, P., Moriones, E., 2015. Recombination as a motor of host switches and virus emergence: geminiviruses as case studies. *Curr. Opin. Virol.* 10, 14–9. doi:10.1016/j.coviro.2014.12.005
- Lima, A.T.M., Sobrinho, R.R., González-Aguilera, J., Rocha, C.S., Silva, S.J.C., Xavier, C.A.D., Silva, F.N., Duffy, S., Zerbini, F.M., 2013. Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in

- begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. *J. Gen. Virol.* 94, 418–431. doi:10.1099/vir.0.047241-0
- Lima, J.A.A., Gonçalves, M.F.B., Oliveira, V.B., Torres Filho, J., Miranda, A.C.M.M., 2000. Serological and PCR detection of a Begomovirus infecting tomato fields in Ibiapaba Mountain, Ceará. *Fitopatol. Bras.* 25, 104–108.
- Lindsey, A.R., 1998. Stabilities and instabilities in transgene expression., in: *Transgenic Plant Research*. Amsterdam, pp. 263–275.
- Mansoor, S., Briddon, R.W., Zafar, Y., Stanley, J., 2003. Geminivirus disease complexes: An emerging threat. *Trends Plant Sci.* doi:10.1016/S1360-1385(03)00007-4
- Martin, D.P., Biagini, P., Lefeuvre, P., Golden, M., Roumagnac, P., Varsani, A., 2011. Recombination in eukaryotic single stranded DNA viruses. *Viruses.* doi:10.3390/v3091699
- Matzke, M.A., Matzke, A.J.M., Pruss, G.J., Vance, V.B., 2001. RNA-based silencing strategies in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* doi:10.1016/S0959-437X(00)00183-0
- Maytis, J., Silva, D., Oliveira, A., Costa, A., 1975. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathol.* 1, 267–275.
- Mehta, P., Wyman Jeffrey, a, Nakhla, M.K., Maxwell Douglas, P., 1994. Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol.* 87, 1291–1297.
- Mello, C.C., Conte, D., 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431, 338–342. doi:10.1038/nature02872

- Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A., Matzke, A.J., 2000. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* 19, 5194–5201. doi:10.1093/emboj/19.19.5194
- Morales, F.J., Anderson, P.K., 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America: Brief review. *Arch. Virol.* doi:10.1007/s007050170153
- Morin, S., Ghanim, M., Sobol, I., 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. doi:10.1006/viro.2000.0549
- Morin, S., Ghanim, M., Zeidan, M., Czosnek, H., Verbeek, M., van den Heuvel, J.F., 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. doi:10.1006/viro.1999.9631
- Morris, B., Richardson, K., Eddy, P., Zhan, X., Haley, A., Gardner, R., 1991. Mutagenesis of the AC3 open reading frame of African cassava mosaic virus DNA A reduces DNA B replication and ameliorates disease symptoms. *J. Gen. Virol.* 72, 1205–1213. doi:10.1099/0022-1317-72-6-1205
- Murasnige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *Physiol. Plant* 15, 473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nagar, S., Pedersen, T.J., Carrick, K.M., Hanley-Bowdoin, L., Robertson, D., 1995. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* 7, 705–719. doi:10.1105/tpc.7.6.705

- Nash, T.E., Dallas, M.B., Reyes, M.I., Buhrman, G.K., Ascencio-Ibañez, J.T., Hanley-Bowdoin, L., 2011. Functional analysis of a novel motif conserved across geminivirus Rep proteins. *J. Virol.* 85, 1182–1192. doi:10.1128/JVI.02143-10
- Nawaz-ul-Rehman, M.S., Fauquet, C.M., 2009. Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Lett.* doi:10.1016/j.febslet.2009.05.045
- Noueiry, A.O., Lucas, W.J., Gilbertson, R.L., 1994. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* 76, 925–932. doi:10.1016/0092-8674(94)90366-2
- Orozco, B.M., Miller, A.B., Settlage, S.B., Hanley-Bowdoin, L., 1997. Functional domains of a geminivirus replication protein. *J. Biol. Chem.* 272, 9840–9846. doi:10.1074/jbc.272.15.9840
- Padidam, M., Beachy, R.N., Fauquet, C.M., 1996. The role of AV2 (“precoat”) and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology* 224, 390–404. doi:10.1006/viro.1996.0546
- Padidam, M., Sawyer, S., Fauquet, C.M., 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265, 218–225. doi:10.1006/viro.1999.0056
- Pakkianathan, B.C., Kontsedalov, S., Lebedev, G., Mahadav, A., Zeidan, M., Czosnek, H., Ghanim, M., 2015. Replication of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Its Whitefly Vector, *Bemisia tabaci*. *J. Virol.* 89, 9791–803. doi:10.1128/JVI.00779-15
- Pascal, E., Sanderfoot, A.A., Ward, B.M., Medville, R., Turgeon, R., Lazarowitz, S.G., 1994. The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded

DNA and localizes to the cell nucleus. *Plant Cell* 6, 995–1006.
doi:10.1105/tpc.6.7.995

Pasumarthy, K.K., Choudhury, N.R., Mukherjee, S.K., 2010. Tomato leaf curl Kerala virus (ToLCKeV) AC3 protein forms a higher order oligomer and enhances ATPase activity of replication initiator protein (Rep/AC1). *Virology* 7, 128. doi:10.1186/1743-422X-7-128

Paula, N.T. d., Faria, J.C. d., Aragão, F.J.L., 2015. Reduction of viral load in whitefly (*Bemisia tabaci* Gen.) feeding on RNAi-mediated bean golden mosaic virus resistant transgenic bean plants. *Virus Res.* doi:10.1016/j.virusres.2015.08.012

Paunesku, T., Mittal, S., Protić, M., Oryhon, J., Korolev, S. V, Joachimiak, A., Woloschak, G.E., 2001. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int. J. Radiat. Biol.* 77, 1007–1021.
doi:10.1080/09553000110069335

Pereira-Carvalho, R.C., Boiteux, L.S., Fonseca, M.E.N., Díaz-Pendón, J.A., Moriones, E., Fernández-Muñoz, R., Charchar, J.M., Resende, R.O., 2010. Multiple Resistance to *Meloidogyne* spp. and to Bipartite and Monopartite Begomovirus spp. in Wild *Solanum* (*Lycopersicon*) Accessions. *Plant Dis.* 94, 179–185. doi:10.1094/PDIS-94-2-0179

Perring, T., 2001. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Prot.* 20, 725–737. doi:10.1016/S0261-2194(01)00109-0

Polston, J.E., Al Musa, A., Perring, T.M., Dodds, J.A., 1990. Association of the nucleic acid of squash leaf curl geminivirus with the whitefly *bemisia-tabaci*. *Phytopathol.* . 1990; 80, 850–856.

- Pooggin, M., Shivaprasad, P. V, Veluthambi, K., Hohn, T., 2003. RNAi targeting of DNA virus in plants. *Nat. Biotechnol.* 21, 131–2. doi:10.1038/nbt0203-131b
- Preall, J.B., Sontheimer, E.J., 2005. RNAi: RISC gets loaded. *Cell.* doi:10.1016/j.cell.2005.11.006
- Quezado-Duval, A.M., Nascimento, A. dos R., Pontes, N. de C., Moita, A.W., Assunção, A., Golynski, A., Inoue-Nagata, A.K., Oliveira, R.T., Castro, Y.O., Melo, B.J., 2014. Desempenho de híbridos de tomate para processamento industrial em pressão de begomovirose e de mancha bacteriana. *Hortic. Bras.* doi:10.1590/hb.v32i04.472
- Raja, P., Wolf, J.N., Bisaro, D.M., 2010. RNA silencing directed against geminiviruses: Post-transcriptional and epigenetic components. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* doi:10.1016/j.bbagrm.2010.01.004
- Ramesh, S. V, Mishra, A.K., Praveen, S., 2007. Hairpin RNA-mediated strategies for silencing of tomato leaf curl virus AC1 and AC4 genes for effective resistance in plants. *Oligonucleotides* 17, 251–257. doi:10.1089/oli.2006.0063
- Rana, T.M., 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 23–36. doi:10.1038/nrm2085
- Rand, T.A., Petersen, S., Du, F., Wang, X., 2005. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123, 621–629. doi:10.1016/j.cell.2005.10.020

- Razavinejad, S., Heydarnejad, J., Kamali, M., Massumi, H., Kraberger, S., Varsani, A., 2013. Genetic diversity and host range studies of turnip curly top virus. *Virus Genes* 46, 345–353. doi:10.1007/s11262-012-0858-y
- Rezende, E., Filgueira, F., Zerbini, F., Maciel-Zambolim, E., Fernandes, J., Gilbertson, R., 1996. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlandia-MG, Brasil. *Fitopatol. Bras.* 21, 424.
- Ribeiro, S., Bezerra, I., Lima, M., De Ávila, A., Giordano, L., 1996. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia., in: 8 Encontro Nacional de Virologia. São Lourenço, MG, p. 290.
- Ribeiro, S., Mello, L., Boiteux, L., Kitajima, E., Faria, J., 1994. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District. *Fitopatol. Bras.* 19, 330.
- Ribeiro, S.G., Ambrozevícius, L.P., Ávila, A.C., Bezerra, I.C., Calegario, R.F., Fernandes, J.J., Lima, M.F., De Mello, R.N., Rocha, H., Zerbini, F.M., 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Arch. Virol.* 148, 281–295. doi:10.1007/s00705-002-0917-0
- Ribeiro, S.G., Martin, D.P., Lacorte, C., Simões, I.C., Orlandini, D.R.S., 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. doi:10.1094/PHYTO-97-6-0702
- Rizvi, I., Choudhury, N.R., Tuteja, N., 2015. Insights into the functional characteristics of geminivirus rolling-circle replication initiator protein and its interaction with host factors affecting viral DNA replication. *Arch. Virol.* 160, 375–87. doi:10.1007/s00705-014-2297-7

- Rocha, C.S., Castillo-Urquiza, G.P., Lima, A.T.M., Silva, F.N., Xavier, C. a D., Hora-Júnior, B.T., Beserra-Júnior, J.E. a, Malta, A.W.O., Martin, D.P., Varsani, A., Alfenas-Zerbini, P., Mizubuti, E.S.G., Zerbini, F.M., 2013. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. *J. Virol.* 87, 5784–99. doi:10.1128/JVI.00155-13
- Rodríguez-Negrete, E., Lozano-Durán, R., Piedra-Aguilera, A., Cruzado, L., Bejarano, E.R., Castillo, A.G., 2013. Geminivirus Rep protein interferes with the plant DNA methylation machinery and suppresses transcriptional gene silencing. *New Phytol.* 199, 464–475. doi:10.1111/nph.12286
- Rodríguez-Negrete, E.A., Carrillo-Tripp, J., Rivera-Bustamante, R.F., 2009. RNA silencing against geminivirus: complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *J. Virol.* 83, 1332–1340. doi:10.1128/JVI.01474-08
- Rojas, M.R., 1993. Use of Degenerate Primers in the Polymerase Chain Reaction to Detect Whitefly-Transmitted Geminiviruses. *Plant Dis.* doi:10.1094/PD-77-0340
- Rojas, M.R., Hagen, C., Lucas, W.J., Gilbertson, R.L., 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 361–394. doi:10.1146/annurev.phyto.43.040204.135939
- Rojas, M.R., Noueir, A.O., Lucas, W.J., Gilbertson, R.L., 1998. Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell* 95, 105–113. doi:10.1016/S0092-8674(00)81786-9
- Rubinstein, G., Czosnek, H., 1997. Long-term association of tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: Effect on the insect

transmission capacity, longevity and fecundity. *J. Gen. Virol.* 78, 2683–2689.

Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning - Sambrook & Russel - Vol. 1, 2, 3.pdf*. *Hum. Mutat.* doi:10.1002/humu.1186.abs

Sanderfoot, A., 1996. A viral movement protein as a nuclear shuttle. The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. *PLANT Physiol.* 110, 23–33. doi:10.1104/pp.110.1.23

Sanderfoot, A.A., Lazarowitz, S.G., 1995. Cooperation in Viral Movement: The Geminivirus BL1 Movement Protein Interacts with BR1 and Redirects It from the Nucleus to the Cell Periphery. *Plant Cell* 7, 1185–1194. doi:10.1105/tpc.7.8.1185

Santana, F.M., Ribeiro, S. da G., Moita, A.W., Jr., D.J.M., Giordano, L. de B., 2001. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. *Euphytica* 122, 45–51. doi:10.1023/A:1012632914709

Santos, J.C., Siqueira, W.J., Melo, P.C., Colariccio, A., Lourenção, A.L., Melo, A.M., 2015. Selection of tomato breeding lines with resistance to Tomato yellow vein streak virus. *Hortic. Bras.* 33, 345–351. doi:10.1590/S0102-053620150000300011

Sanz, A.I., Fraile, A., García-Arenal, F., Zhou, X., Robinson, D.J., Khalid, S., Butt, T., Harrison, B.D., 2000. Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *J. Gen. Virol.* 81, 1839–1849.

- Saunders, K., Lucy, A., Stanley, J., 1992. RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus African cassava mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* 20, 6311–6315.
- Saunders, K., Lucy, A., Stanley, J., 1991. DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus consistent with a rolling circle mechanism of replication. *Nucleic Acids Res.* 19, 2325–2330.
- Saunders, K., Norman, A., Gucciardo, S., Stanley, J., 2004. The DNA β satellite component associated with ageratum yellow vein disease encodes an essential pathogenicity protein (β C1). *Virology* 324, 37–47. doi:10.1016/j.virol.2004.03.018
- Saurabh, S., Vidyarthi, A.S., Prasad, D., 2014. RNA interference: concept to reality in crop improvement. *Planta* 1–22. doi:10.1007/s00425-013-2019-5
- Seal, S.E., vandenBosch, F., 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. doi:10.1080/07352680500365257
- Settlage, S.B., Miller, A.B., Hanley-Bowdoin, L., 1996. Interactions between geminivirus replication proteins. *J. Virol.* 70, 6790–6795.
- Sharma, V.K., Basu, S., Chakraborty, S., 2015. RNAi mediated broad-spectrum transgenic resistance in *Nicotiana benthamiana* to chilli-infecting begomoviruses. *Plant Cell Rep.* doi:10.1007/s00299-015-1795-8
- Silva, F.N., Lima, A.T.M., Rocha, C.S., Castillo-Urquiza, G.P., Alves-Júnior, M., Zerbini, F.M., 2014. Recombination and pseudorecombination driving the evolution of the begomoviruses Tomato severe rugose virus (ToSRV) and Tomato rugose mosaic virus (ToRMV): two recombinant DNA-A

components sharing the same DNA-B. *Viol. J.* 11, 66. doi:10.1186/1743-422X-11-66

Simon, J.N., Coe, D.M., 1958. Transmission of pseudo-curly top virus in Florida by a treehopper. *Virology.* 6, 43-48. doi: 10.1016/0042-6822(58)90058-8

Sinisterra, X.H., McKenzie, C.L., Hunter, W.B., Powell, C.A., Shatters, R.G., 2005. Differential transcriptional activity of plant-pathogenic begomoviruses in their whitefly vector (*Bemisia tabaci*, Gennadius: Hemiptera Aleyrodidae). *J. Gen. Virol.* 86, 1525–1532. doi:10.1099/vir.0.80665-0

Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G., Waterhouse, P.M., 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407, 319–320. doi:10.1038/35030305

Sobrinho, R.R., Xavier, C.A.D., Pereira, H.M. de B., Lima, G.S. de A., Assunção, I.P., Mizubuti, E.S.G., Duffy, S., Zerbini, F.M., 2014. Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous hosts. *J. Gen. Virol.* 95 , 2540–2552. doi:10.1099/vir.0.067009-0

Soleimani, R., Matic, S., Taheri, H., Behjatnia, S.A.A., Vecchiati, M., Izadpanah, K., Accotto, G.P., 2013. The unconventional geminivirus Beet curly top Iran virus: Satisfying Koch's postulates and determining vector and host range. *Ann. Appl. Biol.* 162, 174–181. doi:10.1111/aab.12009

Stewart, C., Kon, T., Rojas, M., Graham, A., Martin, D., Gilbertson, R., Roye, M., 2014. Mixed infection of *Sida jamaicensis* in Jamaica reveals the presence of three recombinant begomovirus DNA A components. *Arch. Virol.* doi:10.1007/s00705-014-2063-x

- Sunter, G., Bisaro, D.M., 1992. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell* 4, 1321–1331. doi:10.1105/tpc.4.10.1321
- Sunter, G., Hartitz, M.D., Hormuzdi, S.G., Brough, C.L., 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. doi:10.1016/0042-6822(90)90275-V
- Sunter, G., Sunter, J.L., 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. doi:10.1006/viro.2001.0950
- Tenllado, F., Llave, C., Díaz-Ruíz, J.R., 2004. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Res.* doi:10.1016/j.virusres.2004.01.019
- Thakur, N., Upadhyay, S.K., Verma, P.C., Chandrashekar, K., Tuli, R., Singh, P.K., 2014. Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of v-ATPase a gene. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0087235
- Tinoco, M.L.P., Dias, B.B.A., Dall'Astta, R.C., Pamphile, J.A., Aragão, F.J.L., 2010. In vivo trans-specific gene silencing in fungal cells by in planta expression of a double-stranded RNA. *BMC Biol.* 8, 27. doi:10.1186/1741-7007-8-27
- Unsel, S., Frischmuth, T., Jeske, H., 2004. Short deletions in nuclear targeting sequences of African cassava mosaic virus coat protein prevent geminivirus twinned particle formation. *Virology* 318, 90–101. doi:10.1016/j.virol.2003.09.003

- Upadhyay, S.K., Chandrashekar, K., Thakur, N., Verma, P.C., Borgio, J.F., Singh, P.K., Tuli, R., 2011. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. *J. Biosci.* 36, 153–161. doi:10.1007/s12038-011-9009-1
- Vanderschuren, H., Alder, A., Zhang, P., Grissem, W., 2009. Dose-dependent RNAi-mediated geminivirus resistance in the tropical root crop cassava. *Plant Mol. Biol.* 70, 265–272. doi:10.1007/s11103-009-9472-3
- Vanderschuren, H., Stupak, M., Fütterer, J., Grissem, W., Zhang, P., 2007. Engineering resistance to geminiviruses-review and perspectives. *Plant Biotechnol. J.* 5, 207–220. doi:10.1111/j.1467-7652.2006.00217.x
- Varma, A., Malathi, V.G., 2003. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Ann. Appl. Biol.* 142, 145–164. doi:10.1111/j.1744-7348.2003.tb00240.x
- Varsani, A., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Brown, J.K., Murilo Zerbini, F., Martin, D.P., 2014. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. *Arch. Virol.* 159, 2193–2203. doi:10.1007/s00705-014-2050-2
- Varsani, A., Shepherd, D.N., Dent, K., Monjane, A.L., Rybicki, E.P., Martin, D.P., 2009. A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. *Virol. J.* 6, 36. doi:10.1186/1743-422X-6-36
- Vert, J.-P., Foveau, N., Lajaunie, C., Vandenbrouck, Y., 2006. An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. *BMC Bioinformatics* 7, 520. doi:10.1186/1471-2105-7-520

- Voinnet, O., 2005. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet.* 6, 206–220. doi:10.1038/nrg1555
- Wang, X., Jiang, D., Yang, D., 2015. Fast-tracking determination of homozygous transgenic lines and transgene stacking using a reliable quantitative real-time PCR assay. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 996–1006. doi:10.1007/s12010-014-1322-3
- Wesley, S. V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., Waterhouse, P.M., 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27, 581–590.
- Yang, S.-J., Carter, S.A., Cole, A.B., Cheng, N.-H., Nelson, R.S., 2004. A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6297–6302. doi:10.1073/pnas.0304346101
- Yazdi, H.R.B., Heydarnejad, J., Massumi, H., 2008. Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: A geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus Genes* 36, 539–545. doi:10.1007/s11262-008-0224-2
- Yong Chung, H., Lacatus, G., Sunter, G., 2014. Geminivirus AL2 protein induces expression of, and interacts with, a calmodulin-like gene, an endogenous regulator of gene silencing. *Virology* 460-461, 108–118. doi:10.1016/j.virol.2014.04.034
- Zeidan, M., Czosnek, H., 1991. Acquisition of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci*. *J. Gen. Virol.* 72, 2607–2614.

- Zhang, P., Vanderschuren, H., Fütterer, J., Gruissem, W., 2005. Resistance to cassava mosaic disease in transgenic cassava expressing antisense RNAs targeting virus replication genes. *Plant Biotechnol. J.* 3, 385–397. doi:10.1111/j.1467-7652.2005.00132.x
- Zhou, X., 2013. Advances in understanding begomovirus satellites. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 357–81. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102234
- Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406–3415. doi:10.1093/nar/gkg595

6 Anexo 1



Contents lists available at ScienceDirect

Virus Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/virusres

Short communication

Reduction of viral load in whitefly (*Bemisia tabaci* Gen.) feeding on RNAi-mediated bean golden mosaic virus resistant transgenic bean plantsNayhanne T. de Paula^{a,b}, Josias C. de Faria^c, Francisco J.L. Aragão^{a,*}^a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte, 70770-900 Brasília, DF, Brazil^b Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, Campus Universitário, 70910-900 Brasília, DF, Brazil^c Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO-462, km 12 Zona Rural C.P. 179, 75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 June 2015

Received in revised form 16 July 2015

Accepted 11 August 2015

Available online 18 August 2015

Keywords:

Bean golden mosaic virus

GM plants

Viral load

Virus resistance

Whitefly

ABSTRACT

The RNAi concept was explored to silence the *rep* gene from the bean golden mosaic virus (BGMV) and a genetically modified (GM) bean immune to the virus was previously generated. We investigated if BGMV-viruliferous whiteflies would reduce viral amount after feeding on GM plants. BGMV DNA amount was significantly reduced in whiteflies feeding in GM-plants (compared with insects feeding on non-GM plants) for a period of 4 and 8 days in 52% and 84% respectively.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Bean golden mosaic virus (Family Geminiviridae) is transmitted by whitefly (*Bemisia tabaci*) in a persistent, circulative manner, causing the golden mosaic of common bean (*Phaseolus vulgaris*). It is a *Begomovirus* that has a bipartite genome with the DNA-A coding for proteins responsible for viral replication (Rep and REp), regulation of gene expression (TrAP), and particle encapsidation, whereas the DNA-B encode proteins involved in cell-to-cell and long-distance movement and symptom modulation (Hanley-Bowdoin et al., 1999; Vanitharani et al., 2005; Fondong, 2013).

Golden mosaic causes severe yield losses in Latin America and its control is based on controlling whiteflies by high-toxicity insecticides, with the development of pesticide-resistant genotypes, low cost-benefit ratio and environmental concerns. *Begomoviruses* have a complex interaction with the whitefly vectors and several aspects remain controversial (Czosnek et al., 2001; Hogenhout et al., 2008; Czosnek and Ghanim, 2012). Sinisterra et al. (2005) have shown that tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) seems to replicate in *B. tabaci* biotype B, while tomato mottle virus (ToMoV) does not appear to replicate. Viral transcripts of TYLCV (genes V1, V2, and C3) and ToMoV (genes AV1, BC1, and BV1) were detected in whitefly.

After feeding on virus-infected tomato plants, insects were transferred to cotton, which is immune to both ToMoV and TYLCV. The ToMoV gene transcripts rapidly became undetectable in whiteflies while the TYLCV transcripts increased after 4 and 7 days, indicating active transcription. Although data have suggested that TYLCV is able to replicate in whitefly it is still controversial and should be better investigated (Zeidan and Czosnek, 1991; Czosnek et al., 2001; Sinisterra et al., 2005).

We have used the RNAi strategy to generate a genetically modified bean immune to the bean golden mosaic virus by silencing the viral *rep* gene (Bonfim et al., 2007; Aragão and Faria, 2009). The transgenic bean line (named as 5.1, Embrapa 5.1 or EMB-PV051-1) was transformed with the vector pBGMVRNAiAHAS (Bonfim et al., 2007), using the biolistic method according to (Aragão et al., 1996). The pBGMVRNAiAHAS contains the cassettes $\Delta AC1hpRNA$ and *AtAhas*. Briefly, the $\Delta AC1hpRNA$ was constructed to express a siRNA corresponding to a fragment of the BGMV *rep* gene and the *AtAhas* gene encodes the acetolactate synthase from *Arabidopsis thaliana* (Aragão et al., 2000). The event Embrapa 5.1 was completely molecular characterized (Aragão et al., 2013). The siRNA were detected in transgenic plants according to Bonfim et al. (2007) (Fig. 1).

In 2011, this event was approved for commercial release in Brazil. We hypothesized that viruliferous whitefly, harboring the bean golden mosaic virus, would reduce the viral load after feeding on immune genetically modified plants.

* Corresponding author. Fax: +55 61 34484777.

E-mail addresses: francisco.aragao@embrapa.br, fjaragao@gmail.com (F.J.L. Aragão).

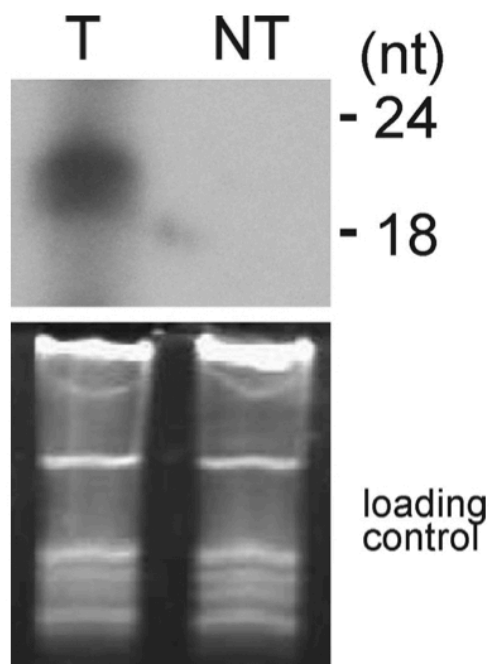


Fig. 1. Detection of the small interfering RNA (siRNA) isolated from leaves of transgenic (T) and non-transgenic (NT) bean plants. RNA blot was hybridized with a DNA probe corresponding to a fragment within the *rep* gene, from positions 1838 to 2232 in the bean golden mosaic virus genome. Ethidium bromide stained RNA serves as the loading control.

Groups of approximately 100 mixed-sex whiteflies were collected from a colony feeding on bean golden mosaic virus infected bean and transferred to transgenic (Embrapa 5.1) and non-transgenic plants. Plants were maintained in contact with viruliferous whiteflies during a period of 4 and 8 days. Then, whiteflies were collected and analyzed for presence of BGMV DNA. Three groups of two plants were used for each treatment. Experiments were repeated three times. Total DNA was isolated from whiteflies according to (Calderón-Cortés et al., 2010). Semi-quantitative PCR was carried out according to Bonfim et al., (2007)

using the primer pair AC3F (5'-TGTTGCCAAACGTACAGCTCTG-3')/AC3R (5'-CACAAACGACCAGAGTATACCAC-3') to amplify a 223 bp sequence from the replication enhancer (REn) gene of BGMV. As an internal control, primer pair MOSCA44F (5'-GAGGTATTTGGAAGGTTGGGA-3')/MOSCA579R (5'-TAATCTGAATATCGGCGAGGCA-3') was used to amplify a 536 bp fragment of the cytochrome oxidase subunit I gene from *B. tabaci* (BtCOI) (GenBank accession number EU760723.1). The number of amplification cycles was optimized to stop the reaction at the exponential stage, ensuring that amplification was semi-quantitative. The relative intensity of the bands was determined by scanning the PCR gel and analyzing the band intensity, using the Quantity One program v4.6.3. Relative quantification was done by comparing intensities of the REn and BtCOI bands. Experiments were performed in triplicate and repeated three times. Data are expressed as mean \pm SE. Statistical differences were analyzed by *t* test using Prism v. 6.02 (GraphPad Software Inc.). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Semi-quantitative PCR analyses have shown that bean golden mosaic virus load decreases in whiteflies transferred to GM-beans when compared to insects that were transferred to non-GM bean plants. Results revealed that after a period of feeding on GM-plants for 4 and 8 days, the reduction of BGMV DNA was of 52% and 84% respectively (comparing whiteflies on non-GM and GM plants) (Fig. 2).

Contrary to what was observed for the tomato yellow leaf curl virus (Sinisterra et al., 2005) our results suggest that bean golden mosaic virus might not be able to replicate with high efficiency in whitefly. The reduction in viral load observed in whitefly exposed to GM bean could be attributed to fact that the insects would not acquire de novo synthesized viral particle, since bean golden mosaic virus is not able to replicate in the transgenic plants as previously demonstrated (Bonfim et al., 2007). In addition, increase of viral load observed in whiteflies transferred to non-GM beans could be due to increase of bean golden mosaic virus particle over the period of 8 days. Nevertheless, we could not exclude the possibility of that siRNA being expressed in transgenic plants for silencing the viral *rep* gene, would interfere in the insect-virus interaction. It was recently demonstrated that siRNAs are able to silencing genes in *B. tabaci* (Upadhyay et al., 2011; Thakur et al., 2014 Thakur et al.,

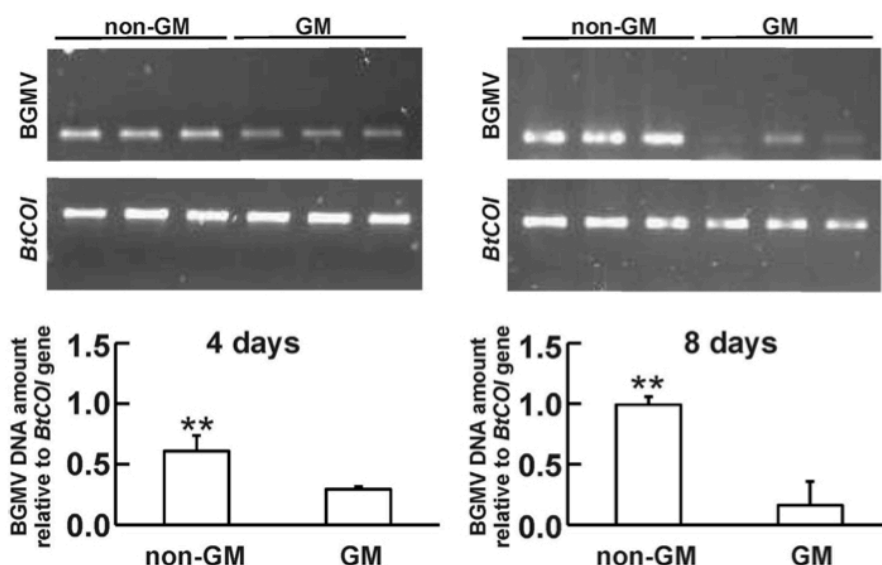


Fig. 2. Quantification of bean golden mosaic virus DNA in whitefly (*Bemisia tabaci*) interacting with genetically modified (GM) and non-genetically modified (non-GM) bean plants for 4 and 8 days. For semi-quantitative analyses, PCR reactions were subjected to an initial treatment at 95 °C (5 min) and 25 cycles of amplification (95 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min), with a final elongation cycle of 5 min at 72 °C. The cytochrome oxidase subunit I gene from *B. tabaci* (BtCOI) was used as internal control. Data represent mean \pm SEM of three biological replicates. ** $P < 0.05$.

2014). Although viral transcripts of *Begomovirus* species, such as tomato yellow leaf curl virus and tomato mottle virus, have been observed in whitefly (Mehta et al., 1994; Sinisterra et al., 2005), it is still not established whether or not the bean golden mosaic virus genome would be transcribed by whitefly cells.

The reduction of BGMV load in *B. tabaci* with the use of the immune GM bean varieties would help the control of golden mosaic in both transgenic and non-transgenic fields by reducing the virus inoculum and the probability of emergence of novel viruses associated with the co-existence of distinct viruses in the same field. This possibility will be further evaluated under field conditions.

Acknowledgement

N. T. de Paula was supported by a fellowship from CNPq (Brazil).

References

- Aragão, F.J.L., Barros, L.M.G., Brasileiro, A.C.M., Ribeiro, S.G., Smith, F.D., Sanford, J.C., Faria, J.C., Rech, E.L., 1996. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theor. Appl. Genet.* 93, 142–150.
- Aragão, F.J.L., Faria, J.C., 2009. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. *Nat. Biotechnol.* 27, 1086–1088.
- Aragão, F.J.L., Nogueira, E.O.P.L., Tinoco, M.L.P., Faria, J.C., 2013. Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the bean golden mosaic virus. *J. Biotechnol.* 166, 42–50.
- Aragão, F.J.L., Sarokin, L., Vianna, G.R., Rech, E.L., 2000. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. *Theor. Appl. Genet.* 101, 1–6.
- Bonfim, K., Faria, J.C., Nogueira, E.O.P.L., Mendes, E.A., Aragão, F.J.L., 2007. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 717–726.
- Calderón-Cortés, N., Quesada, M., Cano-Camacho, H., Zavala-Páramo, G., 2010. A simple and rapid method for DNA isolation from xylophagous insects. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 5056–5064.
- Czosnek, H., Ghanim, M., 2012. Back to basics: are begomoviruses whitefly pathogens? *J. Integr. Agric.* 11, 225–234.
- Czosnek, H., Ghanim, M., Shai, M., Rubinstein, G., Vivian, F., Zeidan, M., 2001. Whiteflies: vectors, and victims (?), of geminiviruses. *Adv. Virus Res.* 57, 291–322.
- Fondong, V.N., 2013. Geminivirus protein structure and function. *Mol. Plant Pathol.* 14, 635–649.
- Hanley-Bowdoin, L., Settledge, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S., Robertson, D., 1999. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 18, 71–106.
- Hogenhout, S.A., Ammar, E.-D., Whitfield, A.E., Redinbaugh, M.G., 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 327–359.
- Mehta, P., Wyman, J.A., Nakhla, M.K., Maxwell, D.P., 1994. Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol.* 87, 1291–1297.
- Sinisterra, X.H., McKenzie, C.L., Hunter, W.B., Powell, C.A., Shatters, R.G., 2005. Differential transcriptional activity of plant-pathogenic begomoviruses in their whitefly vector (*Bemisia tabaci*, Gennadius: Hemiptera Aleyrodidae). *J. Gen. Virol.* 86, 1525–1532.
- Thakur, N., Upadhyay, S.K., Verma, P.C., Chandrashekar, K., Tuli, R., Singh, P.K., 2014. Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of v-ATPase a gene. *PLoS One* 9 (3), e87235.
- Upadhyay, S.K., Chandrashekar, K., Thakur, N., Verma, P.C., Borgio, J.F., Singh, P.K., Tuli, R., 2011. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. *J. Biosci.* 36, 153–161.
- Vanitharani, R., Chellappan, P., Fauquet, C.M., 2005. Geminiviruses and RNA silencing. *Trends Plant Sci.* 10, 144–151.
- Zeidan, M., Czosnek, H., 1991. Acquisition of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci*. *J. Gen. Virol.* 72, 2607–2614.

7 Anexo 2

Sequência de DNA (1286 pb) utilizada na construção do cassete de interferência do gene *rep*:

>ToSRV(326) >TMoLCV (321) >TGVV (319) >ToLDV(320)

FourGemeni

```
GGGCCCTCTAGAAATATCCTATCTAAATTACTATTTAGATTGTGAACTGAAATAAGAACTTTT
CAGGCAGCTTCTCACGGATTATCTGCAAGGCGACGTCTTTGGAAGGTGCGTTCAAGGCTTCTGC
GGCAGCGTCGTTAGCTGTCTGGCAACCGCCTCTAGCACTTCTTCCGTCGATTTGGAATACCCCC
CACTCGATAGTATCTCCGTCCTTATCGACATAGGATTTGACGTCGGACGATGACTTAGCTCTCT
GAATGTTCCGGATGGAAATGTGTTGACCTTGTGGGGAGACCAGGTCGAAGAATCGTTGATTTTG
GCAGCAGTAGTTGCCCTCAATATATTGAGGGCCTCCATGATGGATCCTGAATTGAGGACCTTGG
CATACGTGTCATTTGCAGATTGCTGACCTCCTCTAGCTGATCTGCCGTCGATTTGGAAACTCC
ATGATCAATGAAGTCTCCGCTTTTCTCCACGTAGGTTTTGACATCTGAAGAGCTCTTAGCTCCC
TGAATGTTCCGGATGGAAATGTGCTGATCGGGTTGGGGATACGAGGTCGAAGAATCGGTTGTTCT
TGCAGTTGTATTTACCCTCGAATTGGATGAGCACATGGAGATGAGGTTGCCCATCTTCGTGTAG
TTCTCTTGAGACACGAATGTTCCAAAATCAATGAAGTCTCCGCTTTTTTCCATGTAGGTCTTGA
CGTCGGACGAGCTTTTAGCTCCCTGAATGTTGGATGGAAATGTGCTGATCTTGTTGGGGATAC
CAAGTCGAAGAACCGTTGATTTCTGGCATTGAATTTGCCCTTCGAATTGAATAAGCACATGGAGA
TGAGGTTCCCCATCTTCGTGAAATTCTCTGGTTACACGAATAAATTTCTTGTTTTGTTGGTGTTT
TAAGTGTCTGTAATTGGGAAAGTGTTCCTCTTTGGTTAATGAACAATGAGGGTATGTAAGGAA
GAAATTTTTTGCATTTACTAGGACTTGACGTCGGACGATGATTTAGCTCCCTGAATGTTCCGGAT
GGAAATGTGCTGACCTGGATGGGGATACCAAGTCGAAGAATCTGTTATTTGTGCACTGGTATTT
CCCTTCGAACTGTATAAGCACGTGTAGATGAGGTTCCCCATTCTCATGCAGTTCTCTGCAGATT
TTGATATACTTCTTGTTGGTTGGGGTGTAAAGGAGTTTAAGTTGGGCAAGTGCTTCTTCTTTGG
TCAGAGAACAATGAGGGTATGTGACAAAAATAGTTTTTTTGAAGATATTTTAAACCGCTTTGGGGG
TGGCATATTTGTAATATGGTACCCTAGT
```

XbaI TCTAGA
 SpeI ACTAGT
 KpnI GGTACC
 ApaI GGGCCC