

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OLERICULTURA

DIVERSIDADE GENÉTICA E EVOLUÇÃO DE  
BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIRO

Autora: Thayssa Monize Rosa de Oliveira  
Orientador: Dr. Leonardo Cunha de Albuquerque

MORRINHOS - GO  
2017

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OLERICULTURA

DIVERSIDADE GENÉTICA E EVOLUÇÃO DE  
BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIRO

Autora: Thayssa Monize Rosa de Oliveira  
Orientador: Dr. Leonardo Cunha de Albuquerque

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM OLERICULTURA, no Programa de Pós-Graduação em Olericultura do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Morrinhos – Área de Concentração: Olericultura.

MORRINHOS - GO  
2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/IF Goiano Campus Morrinhos**

O48d Oliveira, Thayssa Monize Rosa de.

Diversidade genética e evolução de begomovírus em  
tomateiro. / Thayssa Monize Rosa de Oliveira. – Morrinhos,  
GO: IF Goiano, 2017.

60 f. : il. color.

Orientador: Dr. Leonardo Cunha de Albuquerque.

Trabalho de conclusão de curso (mestrado) – Instituto  
Federal Goiano Campus Morrinhos, Programa de Pós-  
Graduação Mestrado Profissional em Olericultura, 2017.

1. *Solanum lycopersicum*. 2. *Tomato severe rugose  
virus*. 3. Variabilidade genética. I. Albuquerque, Leonardo  
Cunha de. II. Instituto Federal Goiano. Mestrado Profissional  
em Olericultura. III. Título

CDU 635.64

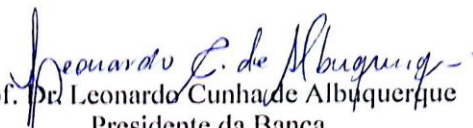
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OLERICULTURA


DIVERSIDADE GENÉTICA E EVOLUÇÃO DE  
BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIRO


Autora: Thayssa Monize Rosa de Oliveira  
Orientador: Dr. Leonardo Cunha de Albuquerque

TITULAÇÃO: Mestre em Olericultura - Área de Concentração: Manejo  
Fitossanitário em Olerícolas.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2017.

  
Prof. Dr. Leonardo Cunha de Albuquerque  
Presidente da Banca  
IF Goiano – Campus Morrinhos

  
Dr<sup>a</sup> Alice Kazuko Inoue-Nagata  
Avaliadora Externa  
Embrapa Hortaliças

  
Prof. Dr. Érico de Campos Dianese  
Avaliador Externo  
Universidade Federal de Goiás - UFG

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre abençoar e iluminar o meu caminho.

Ao meu orientador, Leonardo Cunha de Albuquerque, pela oportunidade, por todo conhecimento transmitido, competência, compreensão, prontidão e até empolgação em ensinar. A você que acrescentou não só no meu crescimento acadêmico como pessoal, meu eterno agradecimento e reconhecimento.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás pela concessão de auxílio financeiro.

Ao Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos, professores, funcionários e colegas, por durante quase 10 anos terem moldado minha educação, em várias etapas de meus estudos, desde o ensino médio e técnico até a Pós-graduação.

A equipe do laboratório de Fitopatologia: Tânia Mara e Ariela Rizo, por todo suporte, apoio, eficiência, participação e disposição em todas as atividades relacionadas ao meu trabalho e ao professor Dr. Nadson de Carvalho Pontes, sempre disponível e solícito em sanar minhas dúvidas.

A Embrapa Hortaliças representada pelo Laboratório de Biologia Molecular e Virologia. Meus agradecimentos a toda a equipe do laboratório, especialmente a Alice Nagata, Mônica Macêdo, Camila Rêgo, Erich Nakasu e Tadeu Araujo pela disponibilização de tempo, espaço, sugestões, equipamentos, acompanhamento e principalmente pela atenção em momento de necessidade e tamanha correria.

Ao professor Dr. Alison Lima extremamente disposto e prestativo, por toda paciência e atenção a mim dedicadas, uma inestimável colaboração.

A minhas queridas amigas de sempre Cristiane Mendes, Jessica Peixoto, Tainã Dias e Nikelly Dantas, por sempre se fazerem presentes.

As novas amigas, Lorena Lopes, Laysla Coelho, Heloísa Nascimento e Thammi Queuri, pelo incentivo, convívio e companheirismo. Em especial, a Mylla

Crysthyan, uma das melhores pessoas que tive a honra de conhecer, por sempre somar, pelo apoio, pelo carinho, e pela amizade que pretendo sempre manter.

Aos membros da banca, Dra. Alice Nagata e Dr. Érico Dianese, por concordarem em fazer parte desse momento tão especial.

A minha família, tios, primos, sogros, cunhados, ao meu avôzinho Jales, a minha avózinha Marly, minha avó Benedita e minha madrinha Lúcia.

Aos meus pais, Míria e Weliton, por sempre terem incetivado os meus estudos, acreditando no meu potencial e confiando e se orgulhando de minhas atitudes.

A minhas irmãs Larissa e Lara, por todos os momentos felizes e tranquilos, e também pelos agitados, pela admiração, amor e paciência. E a minha amada cadelinha Princesa por ser sempre minha companheira.

Ao meu namorado Breno, por todo amor, cuidado, companheirismo e compreensão, em todas as etapas da minha vida.

Muito obrigada!

## BIOGRAFIA DO AUTOR

THAYSSA MONIZE ROSA DE OLIVEIRA, filha de Weliton Eterno de Oliveira e Míria Rosa da Silva Oliveira, nascida em Morrinhos, Goiás, em 28 de fevereiro de 1993.

No ano de 2008, ingressou no Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos cursando ensino médio e curso técnico de Manutenção e Redes de Computadores. Em fevereiro de 2010, iniciou o Curso Bacharelado em Agronomia na mesma universidade. Durante a graduação participou de diversos projetos de pesquisa na área de Fitopatologia, trabalhando com nematoides sob a orientação do professor Rodrigo Vieira, e com fungos e bactérias sob orientação do professor Nadson Pontes. Graduou-se em Agronomia em 6 de março de 2015.

Em março de 2015, ingressou no curso de Pós-graduação em Olericultura em nível de Mestrado profissional, área de concentração em Ciências Agrárias, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Morrinhos. Trabalhou com vírus sob a orientação do professor Dr. Leonardo Albuquerque e defendeu a dissertação em 23 de fevereiro de 2017.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 CULTURA DO TOMATE .....	2
2.2 OS GEMINIVÍRUS .....	3
2.3 BEGOMOVÍRUS NO BRASIL .....	5
2.4 MECANISMOS DE VARIABILIDADE .....	6
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	8
3. CAPÍTULO I .....	11
Ocorrência de begomovirose em tomateiro em três estados brasileiros .....	11
3.1 INTRODUÇÃO .....	13
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	14
3.3 RESULTADOS.....	15
3.4 DISCUSSÃO .....	18
3.5 REFERÊNCIAS.....	19
4. CAPÍTULO II.....	22



Estrutura genética e variabilidade molecular de populações do <i>Tomato severe rugose virus</i> amostradas em municípios do estado de Goiás .....	22
4.1 INTRODUÇÃO .....	24
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	25
4.3 RESULTADOS.....	27
4.4 DISCUSSÃO .....	31
4.5 REFERÊNCIAS.....	34
5. CONCLUSÃO GERAL.....	39
APÊNDICES .....	40

## LISTA DE TABELAS

	Página
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
<b>Tabela 1.</b> Estados produtores de tomate e sua produção e área colhida no Brasil em 2016.....	2
3. CAPÍTULO I.....	11
Ocorrência de begomoviroses em tomateiro em três estados brasileiros .....	11
<b>Tabela 1.</b> Espécies de begomovírus encontradas em amostras de tomateiro coletadas em Goiás (GO) e Rio de Janeiro (RJ) em 2015. ....	17
4. CAPÍTULO II.....	22
Estrutura genética e variabilidade molecular de populações do <i>Tomato severe rugose virus</i> amostradas em municípios do estado de Goiás .....	22
<b>Tabela 1.</b> Número de isolados de <i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV) obtidos das amostras de tomateiro coletadas nas cidades no estado de Goiás nos anos 2003, 2008 e 2015.....	27
<b>Tabela 2.</b> Variabilidade genética de subpopulações de <i>Tomato severe rugose virus</i> (DNA-A) obtidas de amostras de tomateiro coletadas ao longo de três anos no estado de Goiás, Brasil.....	29
<b>Tabela 3.</b> Variabilidade genética de subpopulações do <i>Tomato severe rugose virus</i> (DNA-A) obtidas de plantas de tomateiro em três municípios do estado de Goiás, Brasil.....	29

<b>Tabela 4.</b> Diferenciação genética entre subpopulações do <i>Tomato severe rugose virus</i> (DNA-A) obtidas de plantas de tomateiro coletadas em diferentes épocas e localidades do estado de Goiás, Brasil.....	30
<b>Tabela 5.</b> Testes de neutralidade para as ORFs presentes no DNA-A de isolados do <i>Tomato severe rugose virus</i> coletados em três municípios do estado de Goiás, Brasil	31
<b>Tabela 6.</b> Número de códons em seleção negativa ou positiva nas populações de <i>Tomato severe rugose virus</i> de amostras foliares de tomateiro coletadas em Goiás. ..	31
APÊNDICES .....	40
<b>Tabela S1.</b> Posição dos códons em seleção negativa ou positiva nas populações de <i>Tomato severe rugose virus</i> de amostras coletadas no Brasil.....	41
<b>Tabela S2.</b> Isolados de <i>Tomato severe rugose virus</i> (DNA-A) obtidos de amostras de tomateiro em Goiás, Brasil .....	42
<b>Tabela S3.</b> Sequências do GenBank de isolados de <i>Tomato severe rugose virus</i> (DNA-A) obtidos em diferentes hospedeiros no Brasil.....	43
<b>Tabela S4.</b> Valores médios das razões entre as taxas de substituições não-sinônimas e substituições sinônimas (dN/dS) nas sequências de <i>Tomato severe rugose virus</i> de amostras coletadas no Brasil.....	45

## LISTA DE FIGURAS

	Página
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
<b>Figura 1.</b> Esquema ilustrativo da organização genômica dos geminivírus. LIR, região intergênica longa; SIR, região intergênica curta; CR, região comum; rep, proteína associada à replicação; ren, proteína potencializadora de replicação; trap, proteína de transcrição; ss, supressor de silenciamento gênico; tgs, silenciamento do gene transcricional; sd, determinante de sintomas; cp, proteína capsidial; mp, proteína de movimento; reg, gene regulador; nsp, proteína de movimento nuclear (Varsani et al., 2014). .....	3
3. CAPÍTULO I .....	11
Ocorrência de begomovirose em tomateiro em três estados brasileiros .....	11
<b>Figura 1.</b> Genoma <i>in silico</i> simulando os padrões de clivagem das principais espécies de begomovírus que infectam tomateiro usando a enzima de restrição <i>Msp</i> I para comparação com os padrões obtidos pelos isolados estudados. MM, marcador molecular 1kb Plus DNA; A: ToSRV, <i>Tomato severe rugose virus</i> ; B: TGMV, <i>Tomato golden mosaic virus</i> ; C: ToRMV, <i>Tomato rugose mosaic virus</i> ; D: ToCMoV, <i>Tomato chlorotic mottle virus</i> ; E: ToYSV, <i>Tomato yellow spot virus</i> ; F: ToCmMV, <i>Tomato common mosaic virus</i> ; G: ToMIMV, <i>Tomato mild mosaic virus</i> ; H: ToYVSV, <i>Tomato yellow vein streak virus</i> ; I: ToICV, <i>Tomato interveinal chlorosis virus</i> ; J: TMoLCV, <i>Tomato mottle leaf curl virus</i> e K: TGVV, <i>Tomato golden vein virus</i> . .....	15
<b>Figura 2.</b> Exemplos de 7 dos 16 diferentes padrões (A a G) de ToSRV obtidos a partir de produto de RCA digerido com <i>Msp</i> I do DNA total das amostras coletadas de	

tomateiro em Goiás. MM, Marcador 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen). Padrões iguais são identificados pela mesma letra. .... 16

**Figura 3.** Árvore filogenética ML baseada nas sequências nucleotídicas parciais obtidas a partir do sequenciamento direto de produtos de RCA utilizando o primer PAR1c496 com as sequências obtidas neste estudo (em negrito) e as sequências parciais correspondentes às espécies relacionadas. O acrônimo de cada isolado e o número de acesso (GenBank) estão incluídos na árvore de acordo com Brown et al., 2015. MSV foi utilizado como um outgroup. Somente valores bootstrap maiores que 50% são exibidos. A barra de escala abaixo indica 0,2 substituições nucleotídicas por sítio..... 17

4. CAPÍTULO II ..... 22  
Estrutura genética e variabilidade molecular de populações do *Tomato severe rugose virus* amostradas em municípios do estado de Goiás ..... 22

**Figura 1.** Mapa dos locais de coleta de amostras de tomateiro obtidas nos anos de 2003, 2008 e 2015 no estado de Goiás, Brasil..... 28

## RESUMO

OLIVEIRA, THAYSSA MONIZE ROSA DE. Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos, fevereiro de 2017. **Diversidade genética e evolução de begomovírus em tomateiro.** Orientador: Dr. Leonardo Cunha de Albuquerque.

Vírus pertencentes à família *Geminiviridae* são transmitidos na natureza por insetos vetores a uma ampla gama de hospedeiras mono e dicotiledôneas. A família possui genoma monopartido ou bipartido de DNA circular fita simples, encapsidado em duas partículas geminadas com formato icosaédrico incompleto. Dependendo do inseto vetor, hospedeiros, organização genômica e relação filogenética, a família é dividida em sete gêneros: *Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, *Becurtovirus*, *Turncurtovirus* e *Eragrovirus*. O gênero *Begomovirus* apresenta o maior número de espécies e, no Brasil, as begomoviroses estão entre as principais doenças do tomateiro. As espécies desse gênero são transmitidas naturalmente pela mosca-branca *Bemisia tabaci* MEAM 1 (Middle East Asia Minor 1) e, atualmente, dezesseis espécies são reconhecidas infectando o tomateiro no País, sendo *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) a espécie prevalente. Estudos sobre a diversidade genética foram então conduzidos, sendo identificada a presença de três espécies, ToSRV, *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) e *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV), em infecção simples ou mista nos estados de Goiás e Rio de Janeiro. Os resultados demonstram que ToSRV é prevalente em infecções simples podendo ocorrer também em infecções mistas com ToMoLCV e ToCmMV em Goiás e Rio de Janeiro, respectivamente. Atualmente, ToSRV é a espécie mais importante para o tomateiro, considerando sua incidência no estado de Goiás, maior região produtora do País. Para entender a sua estrutura genética populacional, 61 isolados de ToSRV (componente DNA-A) obtidos

de diferentes municípios do estado de Goiás nos anos 2003, 2008 e 2015 foram analisados. Especialmente para begomovírus, a variabilidade genética tem se mostrado importante para a adaptação viral. Interessantemente, os resultados apresentados aqui demonstram valores baixos de diferenciação genética entre os isolados de diferentes localidades e/ou épocas de coleta, sugerindo a existência de uma única população viral e geneticamente estável. A recombinação genética parece não ser importante para a espécie, e a mutação parece ser o principal mecanismo responsável pela variabilidade genética, ainda que baixa.

PALAVRAS-CHAVE: *Solanum lycopersicum*, *Tomato severe rugose virus*, Variabilidade genética

## ABSTRACT

OLIVEIRA, THAYSSA MONIZE ROSA DE. Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos, February of 2017. **Genetic diversity and evolution of begomovirus in tomato.** Advisor: Leonardo Cunha de Albuquerque.

Viruses belonging to the family *Geminiviridae* are transmitted in nature by vector insects to a wide range of mono and dicotyledonous hosts. The family has a monopartite or bipartite genome of single-stranded circular DNA, encapsidated into two twinned particles with incomplete icosahedral format. Depending on the insect vector, hosts, genomic organization and phylogenetic relationship, the family is divided into seven genera: *Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, *Becurtovirus*, *Turncurtovirus* and *Eragrovirus*. The genus *Begomovirus* has the highest number of species and, in Brazil, begomoviruses are among the main diseases of tomato. The species of this genus are transmitted naturally by the whitefly *Bemisia tabaci* MEAM 1 (Middle East Asia Minor 1), and currently sixteen species are recognized infecting tomato in Brazil, being *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) the prevalent species. Studies on genetic diversity were then conducted, with the presence of three species, ToSRV, *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) and *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) in single or mixed infection in the states of Goiás and Rio de Janeiro. The results demonstrate that ToSRV is prevalent in single infections and may also occur in mixed infections with ToMoLCV and ToCmMV in Goiás and Rio de Janeiro, respectively. ToSRV is the most important species for tomato, considering its incidence in the state of Goiás. In order to understand its population genetic structure, 61 ToSRV isolates (component DNA-A) obtained from different municipalities of the state of Goiás, Brazil, in the years 2003, 2008 and 2015 were analyzed. Especially for



begomoviruses, genetic variability has been shown to be important for viral adaptation. Interestingly, the results presented here demonstrate low values of genetic differentiation between isolates from different locations and/or collection years, suggesting the existence of a single viral and genetically stable population. Genetic recombination does not seem to be important for the species, and mutation seems to be the main mechanism responsible for genetic variability, even in low values.

**KEYWORDS:** *Solanum lycopersicum*, *Tomato severe rugose virus*, Genetic variability

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é uma das hortaliças mais consumidas no mundo. No entanto, seu cultivo é complexo e diversos fatores bióticos e abióticos podem prejudicar sua produção. Entre os fatores bióticos, as begomoviroses têm se tornado um dos principais fatores limitantes (Navas-Castillo *et al.*, 2011).

O gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) é o maior da família em número de espécies infectando o tomateiro e o Brasil é um dos países com a maior diversidade de espécies infectando a cultura (Inoue-Nagata *et al.*, 2016), sendo que a espécie mais encontrada, principalmente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do País, é *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (Fernandes *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2010). Sua transmissão natural ocorre por meio do vetor mosca-branca, *Bemisia tabaci* MEAM 1 (Middle East Asia Minor 1), a partir de fontes de inóculo (ervas daninhas, outras culturas hospedeiras ou resíduos de cultura abandonada). Os principais sintomas causados na planta são: amarelecimento internerval, clorose, mosaico, deformação foliar, epinastia e nanismo, que resultam na redução da produtividade (Inoue-Nagata *et al.*, 2016).

Considerando a grande importância socioeconômica da cultura do tomateiro no Brasil, especialmente para o estado de Goiás (maior produtor), e o impacto que as begomoviroses causam à cultura, estudos sobre a diversidade genética e a estrutura populacional, especialmente da principal espécie, ToSRV, são o primeiro passo para elaboração de estratégias adequadas para o manejo da doença. Além disso, os resultados deste tipo de estudo são uma importante fonte de informação para o entendimento da dinâmica dos processos que levam ao surgimento de novas espécies, estirpes ou isolados e, conseqüentemente, da evolução dessas espécies nativas do Brasil.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CULTURA DO TOMATE

O tomate (*Solanum lycopersicum*) pertence à família das solanáceas sendo a segunda hortaliça mais produzida no Brasil, atrás apenas da cultura da batata. O estado de Goiás é o principal estado produtor do País, com produção de aproximadamente 978 mil toneladas em uma área de 12 mil hectares, correspondente a 26,17% da produção nacional (Tabela 1). O Estado também se destaca com a maior produtividade, de 81,5 t/ha (IBGE, 2016).

**Tabela 1.** Estados produtores de tomate e sua produção e área colhida no Brasil em 2016

Unidade territorial	Produção	Área colhida			
			Paraíba	8955	287
Goiás	978258	11997	Alagoas	7568	105
São Paulo	753283	11259	Pará	6580	254
Minas Gerais	702510	10303	Mato Grosso	6037	243
Paraná	249760	4387	Rio Grande do Norte	4696	148
Rio de Janeiro	189611	2573	Roraima	4689	264
Bahia	175170	4055	Maranhão	3671	289
Santa Catarina	171699	2769	Rondônia	2542	154
Espírito Santo	154074	2511	Piauí	2498	132
Ceará	122846	2532	Mato Grosso do Sul	2465	69
Rio Grande do Sul	112563	2317	Amazonas	249	20
Pernambuco	53331	1617	Sergipe	110	7
Distrito Federal	24760	356	Total	3737925	58548

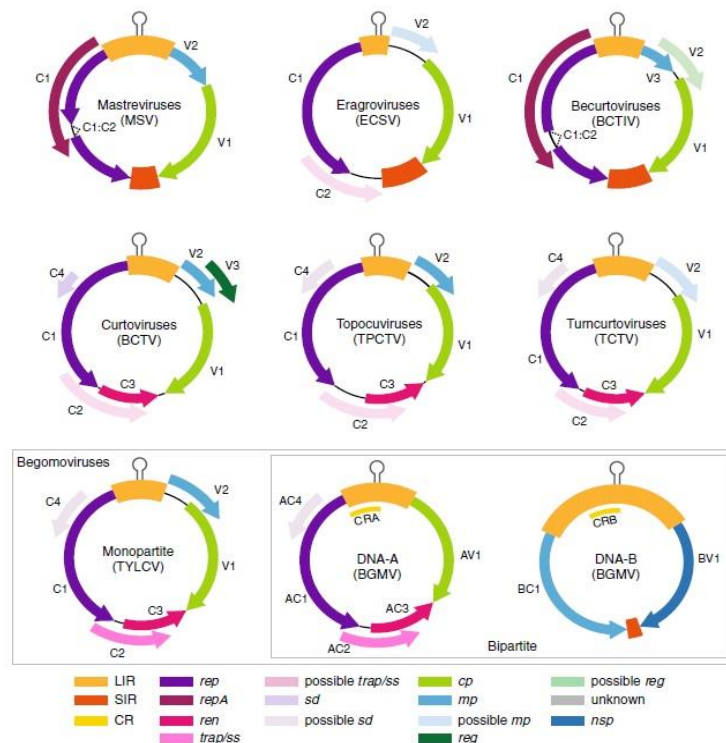
Fonte: IBGE, 2016

A produção de tomate exige conhecimento técnico, uma vez que a cultura é extremamente sensível a diversos fatores, especialmente pragas e doenças. Entre as doenças, as geminiviroses estão entre as mais importantes no cultivo do tomateiro. No

Brasil, a doença é causada por espécies de vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) que dependendo da época da infecção e da variedade utilizada podem inviabilizar tanto a produção de tomate para processamento industrial quanto para consumo *in natura* (Inoue-Nagata *et al.*, 2016).

## 2.2 OS GEMINIVÍRUS

Vírus pertencentes à família *Geminiviridae* são transmitidos na natureza por insetos vetores a uma ampla gama de hospedeiras mono e dicotiledôneas. Podem possuir um (monopartido) ou dois (bipartido) componentes genômicos de DNA circular fita simples, encapsidados em uma partícula geminada com formato icosaédrico incompleto. A família é dividida em sete gêneros: *Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, *Becurtovirus*, *Turncurtovirus* e *Eragrovirus*, (Figura 1) com base no inseto vetor, hospedeiros, organização genômica e relação filogenética (Varsani *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Esquema ilustrativo da organização genômica dos geminivírus. LIR, região intergênica longa; SIR, região intergênica curta; CR, região comum; rep, proteína associada à replicação; ren, proteína potencializadora de replicação; trap, proteína de transcrição; ss, supressor de silenciamento gênico; tgs, silenciamento do gene transcricional; sd, determinante de sintomas; cp, proteína capsidial; mp, proteína de movimento; reg, gene regulador; nsp, proteína de movimento nuclear (Varsani *et al.*, 2014).

O gênero *Begomovirus* (espécie-tipo: *Bean golden yellow mosaic virus* - BGYMV) é o maior em número de espécies, possuindo atualmente 322 espécies descritas (Brown *et al.*, 2015; ICTV, 2017). Esses vírus são transmitidos pelo vetor mosca-branca (*B. tabaci*) a plantas dicotiledôneas e possuem genoma monopartido ou bipartido, sendo que espécies com o genoma monopartido (apenas DNA-A) são encontradas no Velho Mundo (África, Ásia, Austrália e Europa), com exceções como o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), que foi introduzido na República Dominicana a partir de mudas infectadas oriundas de Israel (Nakhla *et al.*, 1994). As espécies com genoma bipartido possuem dois componentes genômicos, conhecidos como DNA-A e DNA-B. O DNA-A é responsável por codificar proteínas para encapsidação e replicação, enquanto as proteínas de movimento são codificadas pelo DNA-B (Brown *et al.*, 2015).

O gênero *Mastrevirus* (espécie-tipo *Maize streak virus*) possui 32 espécies reconhecidas (ICTV, 2017). É caracterizado por apresentar um genoma monopartido, transmitido por cigarrinhas de maneira circulativa, em sua maioria a plantas monocotiledôneas. Mais recentemente, espécies têm sido descritas infectando também plantas dicotiledôneas (Hadfield *et al.*, 2012), como o *Chickpea chlorotic dwarf Pakistan virus* na infecção do grão-de-bico (Thomas *et al.*, 2010). É encontrado no Velho Mundo e um diferencial é sua capacidade de codificar duas proteínas de replicação, a Rep e Rep-A (Figura 1) (Rojas *et al.*, 2005).

*Curtovirus* (espécie-tipo *Beet curly top virus*) é um gênero com vírus de genoma monopartido transmitido de maneira circulativa por cigarrinhas da espécie *Circulifer tenellus*, encontrado no Novo Mundo e Velho Mundo infectando uma ampla gama de hospedeiras dicotiledôneas (Rojas *et al.*, 2005). O gênero possui 3 espécies (*Beet curly top virus*, *Horseradish curly top virus* e *Spinach severe curly top virus*) (ICTV, 2017) com genoma capaz de codificar até sete genes, sendo o seu diferencial, o gene regulador *reg* no sentido viral (V3) e o gene determinante de sintomas *sd* no sentido complementar (C4) (Varsani *et al.*, 2014).

O gênero *Topocuvirus* (espécie-tipo *Tomato pseudo-curly top virus*) é formado apenas pela espécie-tipo, com espécies de genoma monopartido e transmitidas por membracídeos a hospedeiras dicotiledôneas. Análises revelam que o seu genoma pode ser um recombinante natural, com características dos vírus dos gêneros *Mastrevirus*

(arranjo semelhante na CP e AV2) e *Begomovirus* (arranjo semelhante nos genes de senso complementar) (Bridson *et al.*, 1996).

*Becurtovirus* (espécie-tipo *Beet curly top Iran virus*) é um gênero com espécies de genoma monopartido, caracterizadas por não possuir o usual nonanucleotídeo (TAATATT↓AC) em sua origem de replicação, mas sim “TAAGATTCC”. É transmitido por cigarrinhas para hospedeiras dicotiledôneas (Varsani *et al.*, 2014). Duas espécies são descritas para o gênero *Beet curly top Iran virus* e *Spinach curly top Arizona virus* (ICTV, 2017).

Os vírus do gênero *Eragrovirus* (espécie-tipo *Eragrostis curvula streak virus*) infectam plantas monocotiledôneas, possuem apenas a espécie-tipo como reconhecida e vetor desconhecido. Assim como os becurtovírus, possui o diferente nonanucleotídeo “TAAGATTCC”.

*Turncurtovirus* (espécie-tipo *Turnip curly top virus*) também possui apenas a espécie-tipo reconhecida, é transmitido por cigarrinhas para plantas dicotiledôneas e possui o genoma monopartido (Varsani *et al.*, 2014).

## 2.3 BEGOMOVÍRUS NO BRASIL

O gênero *Begomovirus* é o único com espécies descritas no Brasil. Essas espécies possuem genoma bipartido (DNA-A e DNA-B). O DNA-A contém uma ORF no sentido viral (AV1; CP, proteína multifuncional associada à formação do capsídeo, acumulação de DNA viral e transmissão pelo inseto vetor) e quatro ORFs no sentido complementar: AC1 (Rep, proteína associada à replicação), AC2 (TrAP, proteína ativadora da transcrição), AC3 (REn, potencializadora da replicação e da expressão de sintomas) e AC4 (fator de virulência) no sentido complementar. O DNA-B apresenta uma ORF no sentido viral, BV1 (NSP, proteína de transporte nuclear) e uma no sentido complementar, BC1 (MP, proteína de movimento) (Gutierrez, 2000). Apesar de terem tamanhos parecidos, os componentes genômicos não compartilham identidade de sequência, a não ser pela região comum (RC), região de aproximadamente 200 nucleotídeos altamente conservada (Lazarowitz, 1992). Nela se localiza a origem de replicação (*ori*) contendo o nonanucleotídeo 5'-TAATATT↓AC-3' necessário para clivagem do DNA viral (Laufs *et al.*, 1995).

No Brasil, os begomovírus são transmitidos pela mosca-branca, *Bemisia tabaci* MEAM1 (Middle East Asia Minor 1), de maneira persistente e circulativa (Rosen *et al.*, 2015). A mosca-branca é um inseto sugador que, ao se alimentar em hospedeiras infectadas, sugam a seiva contaminada a partir do floema da planta, adquirindo as partículas virais. O vírus circula em todo o corpo do inseto, passando do intestino para a hemolinfa, onde é encaminhado, com o auxílio de proteínas denominadas Groel, até a glândula salivar. Ao se alimentar em uma planta saudável, a mosca deposita a saliva contaminada, transmitindo as partículas virais. O inseto é polífago, com ampla gama de hospedeiros, capaz de se alimentar em mais de 1000 espécies de plantas tornando-se um eficiente vetor na transmissão desses vírus (Chen *et al.*, 2016).

Até o início da década de 1990, o biótipo A de *Bemisia tabaci* era predominante no Brasil (França *et al.*, 1996), foi então que a disseminação do biótipo polífago da mosca-branca, o biótipo B (atual MEAM1) trouxe um aumento considerável no surgimento de novas espécies de begomovírus capazes de infectar tomateiro (Ribeiro *et al.*, 2003). A principal diferença entre os biótipos se encontra nas espécies hospedeiras, o biótipo B apresenta uma gama mais ampla de hospedeiros, incluindo o tomateiro, além de se mostrar mais adaptado (Bedford *et al.*, 1994).

Atualmente, dezesseis espécies de begomovírus são reconhecidas infectando tomateiro no País: *Tomato bright yellow mosaic virus* (ToBYMV), *Tomato bright yellow mottle virus* (ToBYMoV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV), *Tomato golden leaf distortion virus* (ToGLDV), *Tomato golden leaf spot virus* (ToGLSV), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato golden vein virus* (TGVV), *Tomato interveinal chlorosis virus* (ToICV), *Tomato leaf distortion virus* (ToLDV), *Tomato mild mosaic virus* (ToMMV), *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (Brown *et al.*, 2015).

## 2.4 MECANISMOS DE VARIABILIDADE

Mutação, recombinação e pseudo-recombinação são os mecanismos de variabilidade genética responsáveis pela evolução e adaptação viral (Roossinck, 1997).

Esses mecanismos ocorrem nos begomovírus, causando uma alta variabilidade genética, resultando no surgimento de novas espécies, estirpes e isolados (Rocha *et al.*, 2013).

Vírus de RNA possuem maiores taxas de substituição quando comparados a vírus de DNA, devido a RNA polimerase não apresentar o mecanismo de “proof-reading” (Domingo & Holland, 1997), entretanto, nos geminivírus verificou-se que as taxas de substituição eram superiores a outros vírus de DNA e muito semelhantes a vírus de RNA, contrariando assim a teoria de que apenas a fidelidade da DNA polimerase seja determinante às taxas de substituição (Duffy & Holmes, 2008), atribuindo possivelmente a outros fatores como a interação com hospedeiro. Sendo assim, apesar da recombinação ser considerada um mecanismo poderoso na emergência de novas espécies, estirpes e isolados de begomovírus (Zhou *et al.*, 1997), a mutação também apresenta grande relevância na variabilidade genética, podendo gerar variabilidade antes da troca de fragmentos genômicos durante a recombinação (García-Arenal *et al.*, 2001; García-Arenal *et al.*, 2003), corroborado pelas altas taxas de mutações das geminiviruses, similares as taxas de vírus de RNA (Duffy & Holmes, 2008).

Quanto à recombinação, esse mecanismo é caracterizado pelas trocas de segmentos genômicos entre duas fitas de DNA (García-Arenal *et al.*, 2003; Sanz *et al.*, 1999). Nos begomovírus, a pseudo-recombinação também é capaz de atuar na variabilidade, por meio da troca de componentes genômicos intactos entre vírus de espécies diferentes (Gilbertson *et al.*, 1993).

A presença de várias espécies de begomovírus, frequentemente infectando uma mesma planta (infecção mista), contribui para que eventos de recombinação ou a pseudo-recombinação ocorram. A disseminação do Biótipo B (atual MEAM1) da mosca-branca, que coloniza o tomateiro e outras solanáceas com alta eficiência, também pode colaborar com esses eventos, devido a sua capacidade de infectar uma maior gama de hospedeiros, aumentando assim, a possibilidade de infecções mistas (Ribeiro *et al.*, 2003).



## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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.
- Brown, J. K., Zerbini, F. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J. C., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R. W., Hernández-Zepeda, C. & Idris, A. (2015).** Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch Virol* **160**, 1593-1619.
- Chen, W., Hasegawa, D. K., Kaur, N., Kliot, A., Pinheiro, P. V., Luan, J., Stensmyr, M. C., Zheng, Y., Liu, W., Sun, H., Xu, Y., Luo, Y., Kruse, A., Yang, X., Kontsedalov, S., Lebedev, G., Fisher, T. W., Nelson, D. R., Hunter, W. B., Brown, J. K., Jander, G., Cilia, M., Douglas, A. E., Ghanim, M., Simmons, A. M., Wintermantel, W. M., Ling, K.-S. & Fei, Z. (2016).** The draft genome of whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1, a global crop pest, provides novel insights into virus transmission, host adaptation, and insecticide resistance. *BMC Biology* **14**, 110.
- Domingo, E. & Holland, J. (1997).** RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Reviews in Microbiology* **51**, 151-178.
- Duffy, S. & Holmes, E. C. (2008).** Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus tomato yellow leaf curl virus. *J Virol* **82**, 957-965.
- Fernandes, F. R., de Albuquerque, L. C., de Britto Giordano, L., Boiteux, L. S., de Avila, A. C. & Inoue-Nagata, A. K. (2008).** Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* **36**, 251-258.
- França, F. H., Vilas-Boas, G. L. & Castelo-Branco, M. (1996).** Occurrence of *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (*Homoptera: Aleyrodidae*) in the Federal District. *An Soc Entomol Brasil* **25**, 369-372.

- Garcia-Arenal, F., Fraile, A. & Malpica, J. M. (2001).** Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annu Rev Phytopathol* **39**, 157-186.
- García-Arenal, F., Fraile, A. & Malpica, J. M. (2003).** Variation and evolution of plant virus populations. *Int Microbiol* **6**, 225-232.
- Gilbertson, R. L., Hidayat, S. H., Paplomatas, E. J., Rojas, M. R., Hou, Y. M. & Maxwell, D. P. (1993).** Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. *J Gen Virol* **74**, 23-31.
- Gutierrez, C. (2000).** Geminiviruses and the plant cell cycle. *Plant Molecular Biology [print] August, 2000*; **43**, 763-772.
- Hadfield, J., Thomas, J. E., Schwinghamer, M. W., Kraberger, S., Stainton, D., Dayaram, A., Parry, J. N., Pande, D., Martin, D. P. & Varsani, A. (2012).** Molecular characterisation of dicot-infecting mastreviruses from Australia. *Virus Res* **166**, 13-22.
- IBGE (2016).** Levantamento sistemático da produção agrícola.
- ICTV (2017).** Virus Taxonomy.
- Inoue-Nagata, A. K., Lima, M. F. & Gilbertson, R. L. (2016).** A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Horticultura Brasileira* **34**, 8-18.
- Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F., Matzeit, V., Rogers, S. G., Schell, J. & Gronenborn, B. (1995).** *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of *Tomato yellow leaf curl virus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3879-3883.
- Lazarowitz, S. G. (1992).** Geminiviruses: genome structure and gene function. *Crit Rev Plant Sci* **11**, 327-349.
- Nakhla, M. K., Maxwell, D. P., Martinez, R. T., Carvalho, M. G. & Gilbertson, R. L. (1994).** Widespread occurrence of the eastern Mediterranean strain of tomato yellow leaf curl geminivirus in tomatoes in the Dominican Republic. *Plant Dis* **78**, 926.
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olive, E. & Sanchez-Campos, S. (2011).** Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annu Rev Phytopathol* **49**, 219-248.
- Ribeiro, S. G., Ambrozevícius, L. P., De Avila, A. C., Bezerra, I. C., Calegario, R. F., Fernandes, J. J., Lima, M. F., Mello, R. N., Rocha, H. & Zerbini, F. M.**

- (2003). Distribution and genetic diversity of tomato-infecting geminiviruses in Brazil. *Arch Virol* **148**, 281-295.
- Rocha, C. S., Castillo-Urquiza, G. P., Lima, A. T., Silva, F. N., Xavier, C. A., Hora-Junior, B. T., Beserra-Junior, J. E., Malta, A. W., Martin, D. P., Varsani, A., Alfenas-Zerbini, P., Mizubuti, E. S. & Zerbini, F. M. (2013).** Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. *J Virol* **87**, 5784-5799.
- Rocha, K. C. G., Marubayashi, J. M., Navas-Castillo, J., Pavan, M. A. & Krause-Sakate, R. (2010).** Ocorrência e variabilidade genética do Tomato severe rugose virus em tomateiro e pimentão no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathol* **36**, 222-227.
- 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.
- Roossinck, M. J. (1997).** Mechanisms of plant virus evolution. *Annu Rev Phytopathol* **35**, 191-209.
- Rosen, R., Kanakala, S., Kliot, A., Cathrin Pakkianathan, B., Farich, B. A., Santana-Magal, N., Elimelech, M., Kontsedalov, S., Lebedev, G., Cilia, M. & Ghanim, M. (2015).** Persistent, circulative transmission of begomoviruses by whitefly vectors. *Current Opinion in Virology* **15**, 1-8.
- Sanz, A. I., Fraile, A., Gallego, J. M., Malpica, J. M. & Garcia Arenal, F. (1999).** Genetic variability of natural populations of cotton leaf curl geminivirus, a single-stranded DNA virus. *Journal of Molecular Evolution* **1999**; **49**, 672-681.
- Thomas, J. E., Parry, J. N., Schwinghamer, M. W. & Dann, E. K. (2010).** Two novel mastreviruses from chickpea (*Cicer arietinum*) in Australia. *Arch Virol*.
- 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.
- Zhou, X., Liu, Y., Calvert, L., Munoz, C., Otim Nape, G. W., Robinson David, J. & Harrison Bryan, D. (1997).** Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *J Gen Virol* **78**, 2101-2111.

### 3. CAPÍTULO I

#### **Ocorrência de begomoviroses em tomateiro em três estados brasileiros**

(Normas de acordo com a revista Journal of General Virology)

RESUMO: Begomovírus (gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*) são os vírus mais importantes infectando tomateiro no Brasil. Muitas espécies têm sido relatadas, com a prevalência de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). Para comprovar essa informação, foram coletadas 313 amostras de tomateiro com sintomas de infecção por begomovírus em Goiás (GO), Paraná (PR) e Rio de Janeiro (RJ) em 2015. O DNA total foi extraído e a presença de begomovírus confirmada por PCR em 137 amostras (27/57 de RJ e 110/216 de GO). Interessantemente, nenhuma amostra do PR foi positiva, mas infectadas por *Tomato chlorosis virus* (ToCV, gênero *Crinivirus*, família *Closteroviridae*). As amostras positivas foram analisadas usando RCA-RFLP com enzima *Msp* I e o padrão de fragmentos obtidos foi comparado com os conhecidos para as principais espécies de begomovírus infectando tomateiro no Brasil. Os produtos de RCA foram escolhidos e diretamente sequenciados. Confirmou-se a presença de três espécies em infecção simples ou mista: *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) e ToSRV. No RJ 15% das plantas estavam infectadas com ToCmMV e ToSRV e 41% infectadas somente com ToSRV, no entanto, o begomovírus presente em 44% das amostras ainda não foi determinado. Em GO, 4,5% apresentaram infecção mista com ToMoLCV e ToSRV, enquanto 95,5% apresentaram infecção simples com ToSRV. A presença de ToSRV nestas amostras foi confirmada

com primers específicos para cada espécie. Este resultado indica que ToSRV continua sendo a espécie mais importante, embora a incidência de outras espécies como ToCmMV e ToMoLCV também esteja aumentando nos últimos anos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Diversidade genética, *Geminiviridae*, RCA-RFLP

**ABSTRACT:** Begomoviruses (genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*) are the most important viruses infecting tomatoes in Brazil. Many species are reported, with the prevalence of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). To verify this information, 313 samples of tomato plants exhibiting symptoms of begomovirus infection were collected in Goiás (GO), Paraná (PR) and Rio de Janeiro (RJ) in 2015. Total DNA was isolated and the presence of begomovirus was confirmed by PCR in 137 samples (27/57 from RJ and 110/216 from GO). Interestingly, no sample from PR was PCR positive for begomovirus, but infection by *Tomato chlorosis virus* was observed (ToCV, genus *Crinivirus*, family *Closteroviridae*). The positive samples were analyzed using RCA-RFLP with *Msp* I enzyme digestion and the pattern of fragments was compared with those known for the main species of begomovirus infecting tomato in Brazil. RCA products were chosen and directly sequenced. It confirmed the presence of three species in single or mixed infection: *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) and ToSRV. In RJ samples, 15% of the plants were infected by ToCmMV and ToSRV, 41% in single infection with ToSRV, but the begomovirus present in 44% of the samples is still not determined. In GO, 4.5% were mixed infected with ToMoLCV and ToSRV, while 95.5% had single infection with ToSRV. The presence of ToSRV in these samples was confirmed with species-specific primers. This result indicates that ToSRV remains the most important species, although the incidence of other species as ToCmMV and ToMoLCV are also increasing in the last years.

**KEYWORDS:** Genetic diversity, *Geminiviridae*, RCA-RFLP

### 3.1 INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum*) ocupa uma posição de destaque entre as hortaliças mais consumidas, tanto *in natura* como para processamento industrial. No Brasil, o estado de Goiás é a principal região produtora com 978.258 toneladas, correspondente a 26,17% da produção nacional (IBGE, 2016). Entretanto, a cada ano, seu cultivo é comprometido devido a doenças, especialmente as begomoviroses.

Os begomovírus (gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*) são vírus que possuem um ou dois componentes genômicos (monopartidos ou bipartidos), infectam plantas dicotiledôneas e são transmitidos pela mosca-branca, *Bemisia tabaci* MEAM1 (Middle East Asia Minor 1) (Brown *et al.*, 2015; Navas-Castillo *et al.*, 2011). No Brasil, os begomovírus descritos possuem genoma bipartido (DNA-A e DNA-B) com cada componente possuindo aproximadamente 2600 pares de base. O componente DNA-A codifica as proteínas necessárias para a transcrição, replicação e encapsidação de ambos os componentes, enquanto o DNA-B codifica as proteínas envolvidas no movimento viral, tanto do núcleo para citoplasma, quanto célula-a-célula via plasmodesmos (Rojas *et al.*, 2005).

Os begomovirus são considerados emergentes (Aranha *et al.*, 2011) com continua descrição de novas espécies, sendo considerado o maior gênero da família em número de espécies. O Brasil é um dos países com maior número de espécies infectando o tomateiro (Inoue-Nagata *et al.*, 2016) e, atualmente, 16 espécies foram detectadas no país: *Tomato bright yellow mosaic virus* (ToBYMV), *Tomato bright yellow mottle virus* (ToBYMoV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV), *Tomato golden leaf distortion virus* (ToGLDV), *Tomato golden leaf spot virus* (ToGLSV), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato golden vein virus* (TGVV), *Tomato interveinal chlorosis virus* (ToICV), *Tomato leaf distortion virus* (ToLDV), *Tomato mild mosaic virus* (ToMMV), *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (Brown *et al.*, 2015), com a prevalência de ToSRV (Fernandes *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2010).

Considerando a grande importância da cultura e os impactos causados na produção de tomate, estudos sobre a diversidade genética dos begomovírus são

essenciais. Os resultados deste tipo de estudo visam contribuir para a compreensão desses patógenos, ao mesmo tempo, são importantes no direcionamento de programas de melhoramento visando à obtenção de genótipos com resistência duradoura, uma vez que a resistência genética tem se mostrado a melhor opção para o controle sustentável da doença. Considerando que o último estudo sobre diversidade genética de begomovírus infectando tomateiro no Brasil foi realizado há quase 10 anos (Fernandes *et al.*, 2008), o objetivo desse trabalho foi realizar um estudo com amostras coletadas em três diferentes estados brasileiros, sendo um deles o maior produtor do País.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

**Amostras foliares de tomateiro.** Em 2015, foram coletadas 313 amostras foliares de plantas de tomateiro com sintomas típicos de infecção por begomovírus (como clorose internerval, mosaico, distorção foliar e nanismo) nos estados de Goiás (GO), Paraná (PR) e Rio de Janeiro (RJ).

**Testes de detecção viral.** O DNA total foi extraído pelo método CTAB (Doyle & Doyle, 1987) e a presença de begomovírus foi confirmada por PCR utilizando os primers universais PAL1v1978/PAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993). O DNA total das amostras positivas para infecção por begomovírus foi submetido à RCA-RFLP (*Rolling Circle Amplification - Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Haible *et al.*, 2006; Inoue-Nagata *et al.*, 2004). O produto desta amplificação foi digerido com uma enzima de restrição de corte frequente *Msp* I (New England Biolabs) e o padrão dos fragmentos obtidos (*in vitro*) foi comparado com os conhecidos (*in silico*) para as principais espécies infectando tomateiro no Brasil.

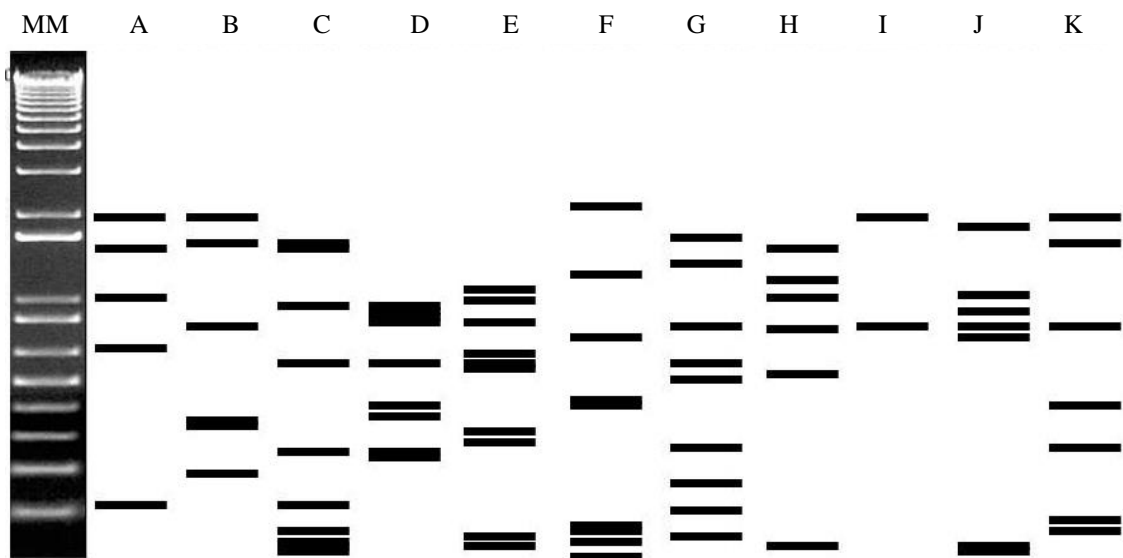
**Sequenciamento de isolados virais.** Os produtos de RCA foram selecionados e diretamente sequenciados pela Macrogen utilizando o primer PAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993). As sequências nucleotídicas foram inicialmente submetidas a uma análise usando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) comparando com outras sequências disponíveis no banco de dados (GenBank).

**Análise Filogenética.** A árvore filogenética foi construída pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) com 1000 bootstrap usando o programa MEGA 7

(Kumar *et al.*, 2016). Para isso, foram utilizadas as sequências dos fragmentos do DNA-A (aproximadamente 1000 nucleotídeos) obtidos neste estudo juntamente com a sequência da região correspondente dos isolados mais representativos.

### 3.3 RESULTADOS

Um total de 137 amostras foi PCR positiva (27/57 de RJ e 110/216 de GO). Interessantemente, nenhuma amostra do PR foi positiva, mas infectadas por *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (gênero *Crinivirus*, família *Closteroviridae*) (dados não apresentados). Provavelmente, essas amostras foram oriundas de tomateiros apresentando algum grau de resistência à geminivírus. Estas 137 plantas infectadas foram analisadas utilizando RCA-RFLP e o padrão de fragmentos obtidos foi comparado com os conhecidos para as principais espécies de begomovírus infectando tomateiro no Brasil utilizando a enzima de restrição *Msp* I (Figura 1).

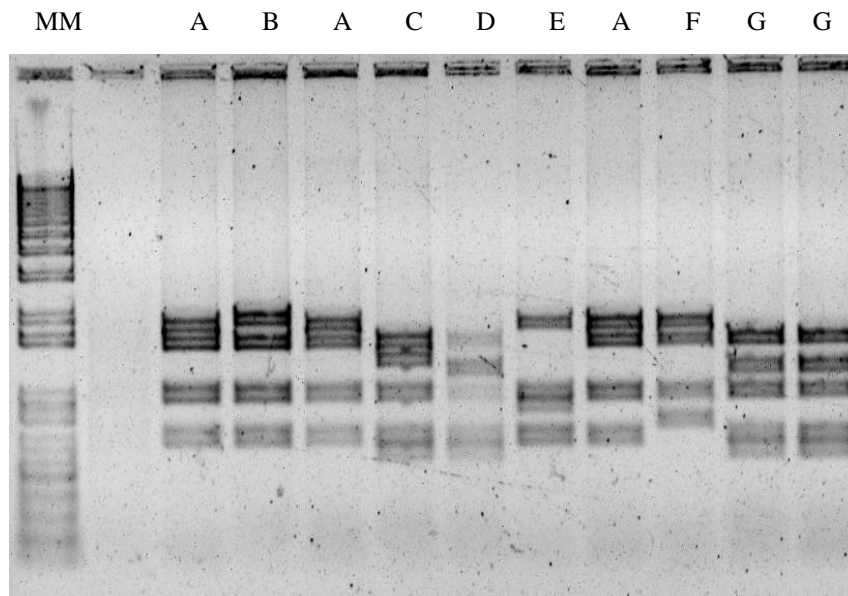


**Figura 1.** Genoma *in silico* simulando os padrões de clivagem das principais espécies de begomovírus que infectam tomateiro usando a enzima de restrição *Msp* I para comparação com os padrões obtidos pelos isolados estudados. MM, marcador molecular 1kb Plus DNA; A: ToSRV, *Tomato severe rugose virus*; B: TGMV, *Tomato golden mosaic virus*; C: ToRMV, *Tomato rugose mosaic virus*; D: ToCMoV, *Tomato chlorotic mottle virus*; E: ToYSV, *Tomato yellow spot virus*; F: ToCmMV, *Tomato common mosaic virus*; G: ToMIMV, *Tomato mild mosaic virus*; H: ToYVSV, *Tomato yellow vein streak virus*; I: ToICV, *Tomato interveinal chlorosis virus*; J: TMoLCV, *Tomato mottle leaf curl virus* e K: TGVV, *Tomato golden vein virus*.



Com base nos padrões dos fragmentos obtidos, 14 isolados foram selecionados e parcialmente sequenciados utilizando o primer PAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993). O resultado do sequenciamento confirmou a presença de três espécies em infecção simples ou mista: *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) e ToSRV.

Os resultados do sequenciamento indicam ainda que dezesseis padrões diferentes (Figura 2) estão relacionados à infecção simples com ToSRV, sugerindo que essa espécie pode apresentar diferentes padrões de clivagem usando a mesma enzima de restrição, fato também observado em outros trabalhos (Rocha *et al.*, 2010), talvez inutilizando o método do genoma *in silico* como forma de identificação, que poderia então ser utilizado apenas para uma análise preliminar.



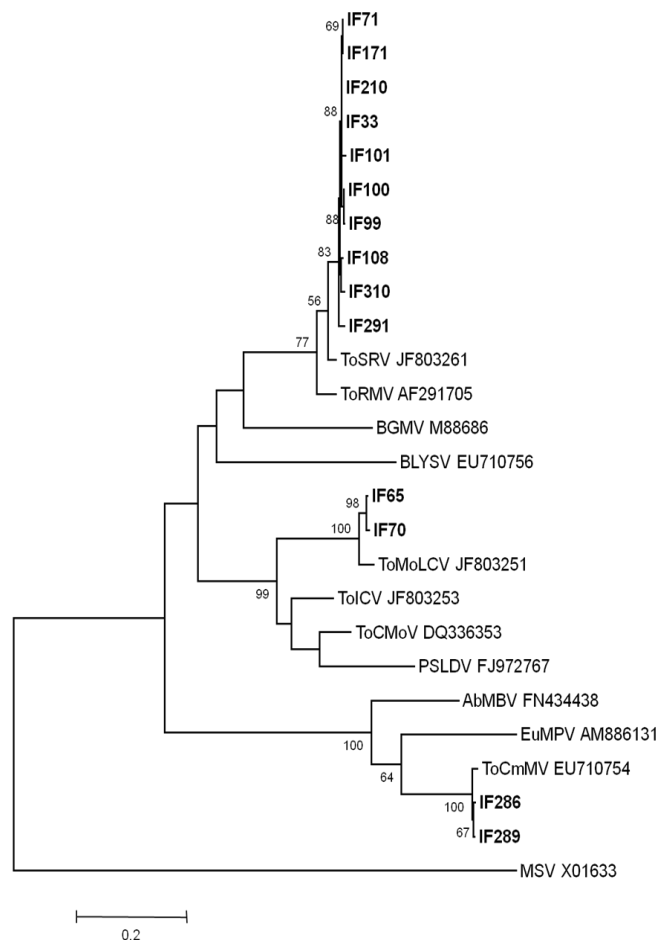
**Figura 2.** Exemplos de 7 dos 16 diferentes padrões (A a G) de ToSRV obtidos a partir de produto de RCA digerido com *Msp* I do DNA total das amostras coletadas de tomateiro em Goiás. MM, Marcador 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen). Padrões iguais são identificados pela mesma letra.

No Rio de Janeiro, 15% (4/27) das amostras coletadas apresentaram infecção mista com ToCmMV e ToSRV e 41% (11/27) apresentaram infecção simples com ToSRV. O restante, 44% (12/27), ainda não foi determinado. Em Goiás, 4,5% (5/110) das amostras apresentaram infecção mista com ToMoLCV e ToSRV, enquanto os 95,5% (105/110) restantes mostraram infecção simples por ToSRV (Tabela 1).

**Tabela 1.** Espécies de begomovírus encontradas em amostras de tomateiro coletadas em Goiás (GO) e Rio de Janeiro (RJ) em 2015.

	GO	RJ
ToSRV	105	11
ToCmMV e ToSRV	0	4
ToMoLCVe ToSRV	5	0
Não identificados	0	12
Total	110	27

A presença de ToSRV em todas estas amostras foi confirmada por PCR com primers espécie-específicos (Fernandes *et al.*, 2010). Na análise filogenética das 14 sequências parciais obtidas de GO (IF33, IF65, IF70, IF71, IF99, IF100, IF101, IF108, IF171 e IF210) e RJ (IF286, IF289, IF291 e IF310), 10 isolados (8 de GO e 2 do RJ) apresentaram relação próxima a espécie ToSRV, 2 isolados (GO) próximos a ToMoLCV e 2 isolados (RJ) a ToCmMV (Figura 3).



**Figura 3.** Árvore filogenética ML baseada nas sequências nucleotídicas parciais obtidas a partir do sequenciamento direto de produtos de RCA utilizando o primer PAR1c496 com as sequências obtidas neste estudo (em negrito) e as sequências parciais correspondentes às espécies relacionadas. O acrônimo de cada isolado e o número de acesso (GenBank) estão incluídos na árvore de acordo com Brown et al., 2015. MSV foi utilizado como um outgroup. Somente valores bootstrap maiores que 50% são exibidos. A barra de escala abaixo indica 0,2 substituições nucleotídicas por sítio.

### 3.4 DISCUSSÃO

A incidência de begomovírus tem aumentado nos últimos anos e, atualmente, estão entre os patógenos mais limitantes à produção de tomate no mundo (Navas-Castillo *et al.*, 2011). No Brasil, ToSRV tem sido descrito como a espécie predominante infectando tomateiro no Sudeste (Rocha *et al.*, 2010) e Centro-oeste, seguido de TGVV, ToMoLCV e ToYVSV (Fernandes *et al.*, 2008).

A prevalência de ToSRV pode ser devido a sua melhor capacidade de adaptação. Alguns fatores que poderiam explicar essa adaptação seriam, o cultivo contínuo da cultura, que colabora para a manutenção da espécie no campo (Barbosa *et al.*, 2016), a capacidade de ToSRV de infectar plantas daninhas (Barbosa *et al.*, 2009), servindo como hospedeiras durante um período em que o tomateiro não esteja no campo (durante o vazio sanitário), e a uma melhor transmissão pelo vetor, demonstrado por estudos onde ToSRV foi transmitido mais eficientemente que TGVV por mosca-branca, provavelmente por uma maior eficiência de inoculação (Macedo *et al.*, 2015).

Os resultados apresentados nesse estudo indicam que após quase 10 anos do último estudo sistemático sobre a diversidade genética e a prevalência de espécies de begomovírus no País (Fernandes *et al.*, 2008), ToSRV continua sendo a espécie mais importante e ToMoLCV segue ocorrendo mesmo que em baixa incidência. A ocorrência de ToCmMV em amostras do RJ pode indicar uma contínua disseminação da espécie para diferentes regiões produtoras do País. ToCmMV foi primeiramente descrito em plantas de tomateiro coletadas em 2007 no estado de Minas Gerais, sendo considerada uma linhagem distinta dos begomovírus já descritos no Brasil (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). Em 2016, um estudo, conduzido ao longo de 5 anos (2007/2011) no estado do Espírito Santo, demonstrou que ToCmMV foi à única espécie identificada nessa região (Barbosa *et al.*, 2016). Além disso, análises do genoma de ToCmMV demonstram que ele é um recombinante e que também participa na evolução de outras espécies (Barbosa *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2013). Neste estudo, ToCmMV foi identificado em infecção mista (pré-requisito para recombinação) e, portanto, é possível que novas espécies ou estirpes possam estar presentes no campo. Esses resultados em conjunto indicam que ToCmMV é uma espécie em processo de disseminação e evolução, especialmente na

região sudeste. Para saber a real incidência dessas espécies (ToSRV, ToMoLCV e ToCmMV), um estudo mais sistemático deve ser conduzido e a obtenção de clones para sequenciamento completo do genoma para a confirmação das espécies já identificadas e também para aquelas ainda não identificadas são essenciais.

### 3.5 REFERÊNCIAS

- Aranha, S. d. A., Albuquerque, L. C. d., Boiteux, L. S. & Inoue-Nagata, A. K. (2011).** Detection and complete genome characterization of a begomovirus infecting okra (*Abelmoschus esculentus*) in Brazil. *Tropical Plant Pathology* **36**, 14-20.
- Barbosa, J. C., Barreto, S. S., Inoue-Nagata, A. K., Reis, M. S., Firmino, A. C., Bergamin, A. & Rezende, J. A. M. (2009).** Natural infection of *Nicotiana glauca* by Tomato severe rugose virus in Brazil. *J Gen Plant Pathol* **75**, 440-443.
- Barbosa, J. C., Rezende, J. A. & Amorim, L. (2016).** Temporal dynamics of Tomato severe rugose virus and *Bemisia tabaci* in tomato fields in São Paulo, Brazil. *Journal of Phytopathology* **164**, 1-10.
- Brown, J. K., Zerbini, F. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J. C., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R. W., Hernández-Zepeda, C. & Idris, A. (2015).** Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch Virol* **160**, 1593-1619.
- Castillo-Urquiza, G. P., Beserra, J. E., Jr., Bruckner, F. P., Lima, A. T., 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.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987).** A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**, 11-15.
- Fernandes, F. R., de Albuquerque, L. C., de Britto Giordano, L., Boiteux, L. S., de Avila, A. C. & Inoue-Nagata, A. K. (2008).** Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* **36**, 251-258.

- Fernandes, F. R., de Albuquerque, L. C. & Inoue-Nagata, A. K. (2010).** Development of a species-specific detection method for three Brazilian tomato begomoviruses. *Tropical Plant Pathology* **35**, 43-47.
- Haible, D., Kober, S. & Jeske, H. (2006).** Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *J Virol Methods* **135**, 9-16.
- IBGE (2016).** Levantamento sistemático da produção agrícola.
- 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.
- Inoue-Nagata, A. K., Lima, M. F. & Gilbertson, R. L. (2016).** A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Horticultura Brasileira* **34**, 8-18.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016).** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* **33**, 1870-1874.
- Macedo, M. A., Michereff Filho, M., Navas-Castillo, J. & Inoue-Nagata, A. K. (2015).** Host range and whitefly transmission efficiency of Tomato severe rugose virus and Tomato golden vein virus in tomato plants. *Tropical Plant Pathology* **40**, 405-409.
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olive, E. & Sanchez-Campos, S. (2011).** Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annu Rev Phytopathol* **49**, 219-248.
- Rocha, C. S., Castillo-Urquiza, G. P., Lima, A. T., Silva, F. N., Xavier, C. A., Hora-Junior, B. T., Beserra-Junior, J. E., Malta, A. W., Martin, D. P., Varsani, A., Alfenas-Zerbini, P., Mizubuti, E. S. & Zerbini, F. M. (2013).** Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. *J Virol* **87**, 5784-5799.
- Rocha, K. C. G., Marubayashi, J. M., Navas-Castillo, J., Pavan, M. A. & Krause-Sakate, R. (2010).** Ocorrência e variabilidade genética do Tomato severe rugose virus em tomateiro e pimentão no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathol* **36**, 222-227.
- Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R. & Maxwell, D. P. (1993).** Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis* **77**, 340-347.

**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.

## 4. CAPÍTULO II

### **Estrutura genética e variabilidade molecular de populações do *Tomato severe rugose virus* amostradas em municípios do estado de Goiás**

(Normas de acordo com a revista Journal of General Virology)

RESUMO: Os begomovírus são uma das maiores restrições à produção de tomate no Brasil, principalmente devido a grande variedade de espécies virais, geradas por mecanismos de variabilidade como a mutação, recombinação e pseudo-recombinação. Dentre essas espécies, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) merece destaque por sua prevalência, principalmente no estado de Goiás (maior produtor do país). Para se verificar a variabilidade genética das populações de ToSRV em Goiás, foram analisados 61 isolados de tomateiro de diferentes cidades do estado ao longo de três anos (2003, 2008 e 2015). Os baixos valores dos índices de diferenciação  $G_{ST}$  estimados entre isolados amostrados de diferentes localidades e/ou épocas de coleta sugerem a existência de uma única população viral. Enquanto isolados coletados nos anos de 2003 e 2008 apresentaram graus similares de variabilidade genética, isolados coletados em 2015 foram notavelmente mais variáveis. Nos testes de neutralidade foram observados valores negativos, possivelmente resultado de um evento demográfico recente (expansão ou contração de população). Análises de seleção códon-a-códon sugerem que a seleção purificadora atua predominantemente ao longo dos genes virais com ocorrências esporádicas de sítios sob seleção positiva. Apenas um evento de

recombinação foi detectado, sugerindo que mutação é o principal mecanismo responsável pela geração de variabilidade na população viral.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Tomato severe rugose virus*, Variabilidade genética, Evolução

**ABSTRACT:** Begomoviruses are one of the biggest restrictions on tomato production in Brazil, mainly due to its wide variety of viral species, generated by mechanisms of variability such as mutation, recombination and pseudo-recombination. Among these species, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) its particularly important due to its prevalence, mainly in the state of Goiás (largest producer in the country). A full genome sequence of 61 ToSRV (DNA-A) isolates collected from tomato plants in different cities of the state of Goiás were analyzed in three years (2003, 2008 and 2015) to determine the structure and genetic variability of the populations. The low values of estimated  $G_{ST}$  differentiation index among isolates sampled from different locations and/or years suggest the existence of a single viral population. While isolates collected in 2003 and 2008 presented similar degrees of genetic variability, isolates collected in 2015 were notably more variable. In the neutrality tests, negative values were observed, possibly as a result of a recent demographic event (population expansion or contraction). Codon-to-codon selection analysis suggest that purification selection predominates over viral genes with sporadic occurrences of sites under positive selection. Only one recombination event was detected, suggesting that mutation is the main mechanism responsible to generate variability in this viral population.

**KEYWORDS:** *Tomato severe rugose virus*, Genetic variability, Evolution



## 4.1 INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* é caracterizada por possuir genoma de DNA circular, fita simples, encapsidado em uma partícula geminada formada por dois icosaédros incompletos. Baseado na organização genômica, inseto vetor, círculo de hospedeiros e relações filogenéticas, a família é dividida em sete gêneros: *Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, *Becurtovirus*, *Turncurtovirus* e *Eragrovirus* (Varsani et al., 2014). Espécies do gênero *Begomovirus* possuem um (monopartido) ou dois (bipartido) componentes genômicos, as quais infectam plantas dicotiledôneas e são transmitidas por mosca-branca, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) (Rojas et al., 2005). Begomovirose são um dos principais fatores limitantes à produção de diversas culturas. Particularmente, em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma das principais doenças, causando sérios prejuízos em várias regiões do mundo (Chowda Reddy et al., 2005; Hanssen et al., 2010; Lefeuvre et al., 2010).

No Brasil, os begomovírus são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* MEAM1 (Middle East Asia Minor 1) e possuem genoma bipartido (DNA-A e DNA-B) (Navas-Castillo et al., 2011). O DNA-A codifica as proteínas envolvidas na replicação, transcrição e encapsidação, enquanto o DNA-B codifica proteínas relacionadas ao movimento do vírus na planta (Rojas et al., 2005). Devido à incidência e severidade crescentes é um gênero considerado emergente (Aranha et al., 2011), apresentando uma grande variedade de espécies virais e sendo uma das maiores restrições à produção de tomate, sendo que sob elevada pressão da mosca branca pode causar 100% de perda (Inoue-Nagata et al., 2016).

Desde meados de 1990, com a disseminação do biótipo B (atual MEAM1) da mosca-branca, houve um aumento considerável no número, incidência e severidade de doenças causadas por espécies de begomovírus capazes de infectar tomateiro (Ribeiro et al., 2003). Atualmente, dezesseis espécies são reconhecidas (Brown et al., 2015). No entanto, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) é a espécie prevalente no Brasil, especialmente na região central do País (Fernandes et al., 2008; González-Aguilera et al., 2012; Inoue-Nagata et al., 2016; Rocha et al., 2010).

A presença de duas ou mais espécies/estirpes de begomovírus em uma mesma planta hospedeira (infecção mista) possibilita a ocorrência de eventos de recombinação (troca de fragmentos genômicos), ou mesmo, pseudo-recombinação (troca de

componentes genômicos intactos), o que aumenta a variabilidade entre indivíduos intra- e interespecífica, possibilitando que sejam gerados novos isolados mais adaptados (Ribeiro *et al.*, 2003). Apesar de a recombinação ser considerada um importante mecanismo atuando na emergência de novas espécies, estirpes e isolados de begomovírus (Zhou *et al.*, 1997), geminivírus apresentam maiores taxas de substituição comparados a outros vírus de DNA (Domingo & Holland, 1997) reforçando o papel da mutação como fonte primária de variabilidade (García-Arenal *et al.*, 2003), principalmente, entre isolados de uma mesma espécie (van der Walt *et al.*, 2008).

A região central do Brasil, especificamente o estado de Goiás, é a principal região produtora de tomate do país e onde predomina a espécie ToSRV. Apesar disso, não existem estudos demonstrando a estrutura genética de populações dessa espécie na região. Portanto, esse trabalho apresenta informações sobre os mecanismos de variabilidade genética envolvidos na evolução da espécie considerando aspectos geográficos e temporais no estado de Goiás

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

**Coleta de amostras.** Nos anos de 2003, 2008 e 2015, foram coletadas amostras foliares de tomateiro com sintomas típicos de infecção por begomovírus (como clorose internerval, mosaico, distorções foliares e nanismo) em áreas de produção localizadas em cidades do estado de Goiás (GO): Abadia de Goiás, Anápolis, Goianápolis, Itaberaí (Unilever e Córrego Frio), Paraúna, Piracanjuba, Silvânia, Vicentinópolis, Luziânia e Morrinhos.

**Deteção e clonagem viral.** O DNA total das amostras foliares foi extraído (Doyle & Doyle, 1987) e a presença do begomovírus foi confirmada por PCR usando os primers universais PAL1v1978/PAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993). O DNA total das amostras positivas foi analisado usando o método RCA-RFLP (Haible *et al.*, 2006; Inoue-Nagata *et al.*, 2004) com a enzima de restrição de corte frequente *Msp* I (New England Biolabs) e o padrão de fragmentos obtidos foi comparado com aqueles obtidos a partir das análises *in silico*. A presença de ToSRV em todas estas amostras foi confirmada por PCR com primers espécie-específicos (Fernandes *et al.*, 2010). Para a clonagem do componente DNA-A, os produtos de RCA foram digeridos com *Hind* III

(Invitrogen life technologies), *Pst* I (New England Biolabs), *Bam*H I, *Eco*R I (NEB) ou *Xba* I (Fermentas life sciences) e ligados ao vetor plasmidial pBluescript SK+ (Stratagene), previamente digeridos com a mesma enzima e introduzido em *Escherichia coli* XL-1 Blue por transformação. Os insertos foram sequenciados (Macrogen Inc., Seoul, South Korea) e todas as sequências organizadas para iniciarem no nucleotídeo número 1 dentro da sequência nonanucleotídica (5'-TAATATT↓AC-3') na origem de replicação dos begomovírus.

**Montagem de sequências.** As sequências foram montadas utilizando o programa SeqMan (DNASTAR Inc., Madison, WI, EUA). Além das sequências determinadas neste estudo, foram utilizadas sequências de ToSRV recuperadas do banco de dados em janeiro de 2017 (Tabela S3).

**Análise de recombinação** As sequências (Tabela S2 e S3) foram alinhadas usando o software Muscle (Edgar, 2004) implementado no MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Os métodos RDP, Chimaera, Bootscan, 3Seq, GENECONV, Maximum Chi Square and SisterScan incluídos no programa RDP v.4 (Martin *et al.*, 2015) foram utilizados para detecção das sequências recombinantes, identificação dos prováveis parentais e breakpoints. A significância estatística das análises foi considerada por um *P*-valor menor que 0,05 (Bonferroni-corrected cutoff). Foram considerados confiáveis apenas eventos detectados por pelo menos quatro desses métodos.

**Análise de variabilidade.** Usando DnaSP v.5.10 (Rozas *et al.*, 2003), os principais descritores de variabilidade como número de haplótipos (*h*), diversidade haplotípica (*H<sub>d</sub>*), número de sítios segregantes (*s*), número total de mutações (*Êta*), número médio de diferenças nucleotídicas entre as sequências (*k*), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), estimativa de Watterson para taxa de mutação escalonada para população baseada em *s* ( $\theta$ -*s*) e em *Êta* ( $\theta$ -*Êta*) foram estimados para cada população do conjunto de dados (considerando as populações com tamanho de amostra maior que quatro indivíduos). O índice *G<sub>ST</sub>* (Nei, 1973) foi utilizado para estimar o grau de diferenciação genética entre subpopulações.

**Análise de neutralidade.** Ainda no DnaSP, os conjuntos de dados foram organizados em subpopulações considerando sua localização geográfica e ano de coleta. A parametrização dos mecanismos evolutivos baseou-se nos testes Tajima's *D* (Tajima, 1989) e Fu & Li's *D\** (Fu & Li, 1993), e *F\** para verificar a hipótese de seleção ocorrendo nas subpopulações.

**Análise de seleção códon-a-códon.** Para detecção de códons sob seleção positiva ao longo de todas as ORFs do DNA-A do ToSRV, foram empregados três métodos distintos implementados no Datamonkey (<http://www.datamonkey.org>): Single Likelihood Ancestor Counting (SLAC), Fixed Effects Likelihood (FEL), e Random Effects Likelihood (REL) (Pond & Frost, 2005; Scheffler *et al.*, 2006).

### 4.3 RESULTADOS

**Detecção de ToSRV.** Nos anos de 2003, 2008 e 2015 foram coletadas amostras foliares de tomateiro de várias cidades do estado de Goiás, Brasil. O DNA total das amostras PCR positivas para begomovírus foi submetido à RCA-RFLP usando *Msp* I para observação dos padrões de restrição. Um total de 61 isolados com padrão de restrição correspondente àquele esperado para o ToSRV foram selecionados para clonagem e sequenciamento do componente genômico DNA-A (Tabela 1 e Figura 1).

**Tabela 1.** Número de isolados de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) obtidos das amostras de tomateiro coletadas nas cidades no estado de Goiás nos anos 2003, 2008 e 2015.

Cidades	Número de isolados de ToSRV (DNA-A)			Total
	2003	2008	2015	
Abadia de Goiás	1			1
Anápolis	1			1
Goianápolis	2			2
Itaberaí	7			7
Luziânia	3	10	12	25
Morrinhos		10	9	19
Paraúna	1			1
Piracanjuba	2			2
Silvânia	1			1
Vicentinópolis	2			2
Total	20	20	21	61



**Figura 1.** Mapa dos locais de coleta de amostras de tomateiro obtidas nos anos de 2003, 2008 e 2015 no estado de Goiás, Brasil

**Análises de recombinação.** Para as análises de recombinação foram alinhadas todas as sequências dos isolados de ToSRV coletados no estado de Goiás (Tabela S2) juntamente com sequências de ToSRV depositadas no GenBank (Tabela S3). Apenas um evento de recombinação foi detectado no isolado VicTo10 (número de acesso: JX865633), sendo que o isolado VicSi10 (número de acesso: KC004090) foi o maior parental e o menor parental desconhecido ( $p$ -valor:  $3,5 \times 10^{-9}$ ). Os pontos de recombinação iniciam no nucleotídeo 517 (CP) e terminam no nucleotídeo 933 (REn), região conhecida como um hotspot de recombinação dos begomovírus (Lefeuvre *et al.*, 2007).

**Variabilidade genética das populações.** Isolados de ToSRV coletados no ano de 2015, comparados aos coletados em 2003 e 2008, apresentaram um grau de

variabilidade mais elevado (Tabela 2), com valores mais altos para todos os índices analisados. Por exemplo, considerando-se a subpopulação coletada no ano de 2015, a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) foi de 0,01402 ( $\sigma = 0,00064$ ) e para os isolados coletados em 2003 e 2008 de 0,00610 ( $\sigma = 0,00040$ ) e 0,00897 ( $\sigma = 0,00080$ ), respectivamente. Os números médios de diferenças nucleotídicas entre as sequências (k) calculados para os isolados coletados em 2015 foram de 36,286, aproximadamente 2,3 e 1,5 vezes maior que os valores obtidos para isolados coletados em 2003 e 2008, respectivamente.

**Tabela 2.** Variabilidade genética de subpopulações de *Tomato severe rugose virus* (DNA-A) obtidas de amostras de tomateiro coletadas ao longo de três anos no estado de Goiás, Brasil

População	Nt	N	h	Hd	s	Eta	k	$\pi$ ( $\sigma$ )	$\theta$ -s	$\theta$ -Eta
Total	2601	61	61	1,00	317	337	29,197	0,01131 (0,00056)	0,02623	0,02789
2003	2601	20	20	1,00	107	111	15,800	0,00610 (0,00040)	0,01164	0,01208
2008	2601	20	20	1,00	114	116	23,211	0,00897 (0,00080)	0,01242	0,01263
2015	2601	21	21	1,00	179	184	36,286	0,01402 (0,00064)	0,01922	0,01976

Nt, tamanho do genoma em nucleotídeos; N, número de sequências; h, número de haplótipos; Hd, diversidade haplotípica; s, número de sítios segregantes; Eta, número total de mutações; k, número médio de diferenças nucleotídicas entre as sequências;  $\pi$ , diversidade nucleotídica;  $\sigma$ , desvio padrão de  $\pi$ ;  $\theta$ -s, estimativa de Watterson para taxa de mutação escalonada para população baseado em s;  $\theta$ -Eta, estimativa de Watterson para taxa de mutação escalonada para população baseado em Eta.

A variabilidade genética entre isolados coletados de diferentes localidades do estado de Goiás foi estimada somente quando um tamanho de amostra mínimo de quatro isolados foi obtido (subpopulações coletadas nas cidades de Itaberaí, Luziânia e Morrinhos). A subpopulação viral amostrada no município de Itaberaí apresentou a menor variabilidade dentre as subpopulações analisadas, com valores inferiores para todos os descritores. As subpopulações de Morrinhos e Luziânia apresentaram valores semelhantes para a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e as diferenças nucleotídicas entre as sequências (k) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Variabilidade genética de subpopulações do *Tomato severe rugose virus* (DNA-A) obtidas de plantas de tomateiro em três municípios do estado de Goiás, Brasil

População	Nt	N	h	Hd	s	Eta	k	$\pi$ ( $\sigma$ )	$\theta$ -s	$\theta$ -Eta
Total	2601	61	61	1,00	317	337	29,197	0,01131 (0,00056)	0,02623	0,02789
Luziânia	2601	25	25	1,00	181	187	29,610	0,01146 (0,00061)	0,01856	0,01917
Morrinhos	2601	19	19	1,00	122	124	29,374	0,01133 (0,00109)	0,01347	0,01369
Itaberaí	2601	7	7	1,00	45	45	14,381	0,00555 (0,00072)	0,00709	0,00709

Nt, tamanho do genoma em nucleotídeos; N, número de sequências; h, número de haplótipos; Hd, diversidade haplotípica; s, número de sítios segregantes; Eta, número total de mutações; k, número médio de diferenças nucleotídicas entre as sequências;  $\pi$ , diversidade nucleotídica;  $\sigma$ , desvio padrão de  $\pi$ ;  $\theta$ -s, estimativa de Watterson para taxa de mutação escalonada para população baseado em s;  $\theta$ -Eta, estimativa de Watterson para taxa de mutação escalonada para população baseado em Eta.

Para estimar o grau de diferenciação genética entre subpopulações obtidas de diferentes localidades ou épocas de coleta foi utilizado o  $G_{ST}$  (Nei, 1973). Quando comparadas as populações tanto por região quanto por época de coleta, os resultados indicam uma baixa diferenciação genética ( $<0,05$ ). Quando comparadas as populações entre os anos, essa diferenciação é ainda menor (Tabela 4).

**Tabela 4.** Diferenciação genética entre subpopulações do *Tomato severe rugose virus* (DNA-A) obtidas de plantas de tomateiro coletadas em diferentes épocas e localidades do estado de Goiás, Brasil

População	$G_{ST}$
Morrinhos/Luziânia	0,00043
Luziânia/Itaberaí	0,01426
Itaberaí/Morrinhos	0,01030
2003/2008	0,00000
2008/2015	0,00001
2015/2003	0,00001

Valores de 0 a 0,05 indicam baixa diferenciação genética, valores de 0,05 a 0,15 indicam diferenciação genética moderada, valores de 0,15 a 0,25 indicam diferenciação genética ótima e valores  $> 0,25$  indicam alta diferenciação genética.

**Testes de neutralidade e seleção.** Para se determinar o tipo de seleção atuando ao longo de cada gene viral foram utilizados os testes Tajima's  $D$ , Fu & Li's  $D^*$  e  $F$ . Os valores foram negativos para todas as ORFs e subpopulações, sendo que os únicos desvios estatisticamente significativos da neutralidade foram observados para a Rep dos isolados coletados no município de Itaberaí pelos três testes e de Luziânia pelo teste Tajima's  $D$  sugerindo uma seleção purificadora (Tabela 5).

Nas análises de seleção códon-a-códon foram observadas ocorrências esporádicas de seleção positiva. Usando o método SLAC, apenas códons sob seleção negativa foram detectados para todas as ORFS. Com o método FEL, entre 0 e 3 códons em seleção positiva foram detectado nas ORFS, indicando que a grande maioria dos códons detectados está sob seleção negativa. O mesmo aconteceu com o método REL, com exceção da Rep, onde foram detectados 10 códons sob seleção positiva. Esses resultados indicam que poucos códons estão sob seleção positiva por qualquer método, predominando massivamente a seleção purificadora (Tabela 6 e S1).

**Tabela 5.** Testes de neutralidade para as ORFs presentes no DNA-A de isolados do *Tomato severe rugose virus* coletados em três municípios do estado de Goiás, Brasil

População	ORF	Tajima's <i>D</i>	Fu and Li's <i>D</i> *	Fu and Li's <i>F</i> *
Itaberaí	CP	-1,44633	-1,48499	-1,62233
	Rep	-1,67042§	-1,77133†	-1,92566§
	TrAP	-1,12898	-1,09691	-1,20302
	REn	-0,03984	-0,06863	-0,06739
	AC4	-1,48614	-1,56696	-1,68344
Luziânia	CP	-1,64796	-1,00341	-1,41788
	Rep	-1,91203 §	-1,81111	-2,16452
	TrAP	-1,70886	-1,58417	-1,90243
	REn	-1,41186	-1,02324	-1,34084
	AC4	-1,76028	-1,81068	-2,09959
Morrinhos	CP	-0,40036	-0,87961	-0,85873
	Rep	-0,37167	-1,07598	-1,00919
	TrAP	-1,06936	-0,61774	-0,86887
	REn	-0,85911	-0,25067	-0,49621
	AC4	-1,04808	-1,76337	-1,80448
Total	CP	-2,03751 §	-3,22805 §	-3,31454 †
	Rep	-2,22159 ‡	-3,70380 †	-3,74421 †
	TrAP	-2,17597 ‡	-4,04143 †	-3,98958 †
	REn	-1,94107 §	-3,12176 §	-3,20039 §
	AC4	-2,26741 ‡	-3,82711 †	-3,87933 †

§ valor significativo para rejeição da hipótese de neutralidade ( $P < 0.05$ )

† valor significativo para rejeição da hipótese de neutralidade ( $P < 0.02$ )

‡ valor significativo para rejeição da hipótese de neutralidade ( $P < 0,01$ )

**Tabela 6.** Número de códons em seleção negativa ou positiva nas populações de *Tomato severe rugose virus* de amostras foliares de tomateiro coletadas em Goiás.

Dados	Slac		Fel		Rel	
	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva
AC4	1	0	0	0	0	1
CP	6	0	22	1	56	1
REn	3	0	7	1	3	1
Rep	6	0	35	3	1	10
TrAP	2	0	8	0	1	0

#### 4.4 DISCUSSÃO

**Recombinação.** A recombinação é considerada um dos principais mecanismos atuando na variabilidade genética (Zhou *et al.*, 1997), entretanto, em nossas análises apenas um evento de recombinação foi identificado, no isolado VicTo10 (número de acesso: JX865633). Estudos apresentaram resultados similares, sugerindo uma baixa



frequência de recombinação em populações do ToSRV (Lima *et al.*, 2013), diferente de outros vírus, principalmente os que infectam hospedeiros não cultivados, como *Macropodium yellow spot virus* (MaYSV), onde ocorreram 6 a 7 eventos únicos de recombinação (Lima *et al.*, 2013; Sobrinho *et al.*, 2014).

**Variabilidade e estrutura genética de populações do ToSRV.** Uma elevada variabilidade genética é geralmente encontrada entre begomovírus que infectam hospedeiros não cultivados (Lima *et al.*, 2013), provavelmente por sua capacidade de servirem como reservatórios de begomovirose que infectam hospedeiros não cultivados e cultivados, diferentemente do observado em hospedeiros cultivados, os quais frequentemente apresentam menor variabilidade (Rocha *et al.*, 2013). Todos os isolados apresentados nesse estudo são oriundos de amostras foliares de tomateiro e, portanto, valores baixos são esperados para o conjunto de dados.

Isolados coletados nos anos de 2008 e 2015 foram amostrados em apenas dois municípios, diferentemente dos isolados coletados no ano de 2003, que foram amostrados em nove municípios. Contrariando nossas expectativas, uma menor variabilidade genética foi observada entre isolados coletados em 2003 (Tabela 2), mesmo sendo provenientes de um maior número de locais. Isso provavelmente se deve à distância geográfica entre os nove locais de coleta de 2003 (Figura 1), estando eles localizados mais próximos uns aos outros (até 120 km de distância) e em alguns casos sendo até mesmo vizinhos (30 km), facilitando a migração entre eles. Entre Luziânia e Morrinhos (locais de coleta de 2008 e 2015), a maior distância geográfica (206 km) pode explicar a maior variabilidade genética. Os isolados de 2015 mostraram uma maior variabilidade do que isolados de 2008, mostrando que a variabilidade teve aumento no decorrer dos anos, mesmo que em valores baixos.

Ao se comparar as populações de ToSRV amostradas de diferentes localidades do estado de Goiás (Tabela 3) com populações do mesmo vírus amostradas em outros estados (apesar de os conjuntos de isolados apresentarem tamanhos de amostra diferentes) (González-Aguilera *et al.*, 2012), uma maior variabilidade genética foi encontrada, com os maiores valores para o número médio de diferenças nucleotídicas entre sequências de isolados amostrados em Morrinhos e Luziânia ( $k = 29,374$  e  $29,610$ ) e diversidade nucleotídica ( $0,01133$  e  $0,01146$ ) quando comparadas as outras populações de ToSRV. O aumento da variabilidade ao longo dos anos pode explicar a maior variabilidade nos isolados dos municípios de Morrinhos, onde as coletas foram realizadas em 2008 e 2015 e Luziânia (2003, 2008 e 2015) em comparação com

isolados de Itaberaí, onde as amostras foram coletadas apenas em 2003, inferindo que os isolados se encontram em contínua evolução com o passar dos anos.

Os valores obtidos para a diferenciação genética pelo índice  $G_{ST}$  (Tabela 4) entre isolados coletados de diferentes localidades também foram muito baixos, semelhante ao encontrado em outras populações de ToSRV (González-Aguilera *et al.*, 2012). Para subpopulações compostas por isolados coletados em épocas distintas foram obtidos valores ainda menores, sugerindo ausência de estruturação das subpopulações, possivelmente devido à ocorrência de migração entre os isolados de diferentes localidades (Sobrinho *et al.*, 2014).

**Seleção purificadora ao longo dos genes do DNA-A do ToSRV.** Os mecanismos de variabilidade são processos que potencializam a evolução pela geração de variabilidade genética. Entretanto, são as forças evolutivas, como a seleção, que afetam a composição genética de uma população de vírus (Moreno *et al.*, 2004).

Os valores médios das razões entre taxas de substituições não-sinônimas e sinônimas (dN/dS) (Tabela S4) apresentaram valores predominantemente menores que 1, exceto para a ORF AC4, o que indica seleção negativa, semelhante aos resultados encontrados em testes para CP e Rep de *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e *Macrotidium yellow spot virus* (MaYSV) (Sobrinho *et al.*, 2014). Esses resultados estão de acordo com os obtidos nos testes de neutralidade Tajima's D e Fu&Li's D\* e F\*, (Tabela 5), onde resultados negativos foram obtidos para todos os dados, atestando que as populações estão sob seleção negativa/purificadora, principalmente na Rep dos isolados coletados nos municípios de Itaberaí e Luziânia que apresentaram significância em alguns testes ( $P < 0,05$  e  $P < 0,02$ ). Devido à alta variabilidade gerada por eventos de recombinação na ORF Rep de begomovírus, a mesma precisa de uma força seletiva (purificação) para preservar sua sequência e conseqüentemente, sua integridade e capacidade de se replicar (Ferro *et al.*, 2017), explicando assim, os eventos de recombinação identificados nessa ORF.

Esses valores negativos poderiam ser resultado de muitos fatores, entre eles, um possível evento demográfico recente (expansão) (Ferro *et al.*, 2017) que poderia ser confundido com uma seleção negativa. Entretanto, a seleção purificadora foi predominante em todas as análises, e isso poderia ser explicado por uma necessidade de ToSRV de conservar suas características que já se mostram mais adaptadas (Barbosa *et al.*, 2016; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008), fato que é comprovado pela maior prevalência dessa espécie em várias regiões do Brasil (Fernandes *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2010) e

pela interação dos vírus com fatores do hospedeiro (Garcia-Arenal *et al.*, 2001) como demonstrado em uma comparação entre ToSRV e TGVV, em que ToSRV apresentou melhor transmissão pela mosca-branca (Macedo *et al.*, 2015), atribuído a co-evolução de ToSRV com seu vetor *B. tabaci*, apresentando uma relação vírus-vetor muito mais íntima do que com outros vírus transmitidos pela mosca-branca, como por exemplo, o *Tomato chlorosis virus* (ToCV) e otimizando a sua transmissão (Fereres *et al.*, 2016).

Entre os isolados de ToSRV foi encontrada pouca evidência de recombinação, e mutação parece então ser o principal fator de variabilidade nas populações, sendo necessárias outras análises para comprovação dessa hipótese. Os isolados coletados em 2015 apresentaram uma maior variabilidade, sugerindo que a variabilidade dos isolados apresenta tendência de aumentar com o decorrer dos anos, entretanto, esses valores de variabilidade ainda são considerados baixos. Através de análises de seleção e neutralidade, observamos que a maioria dos códons dos genes virais se encontram sob seleção purificadora, sugerindo preservação das sequências a nível de aminoácidos e consequente manutenção da adaptabilidade viral.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

- Aranha, S. d. A., Albuquerque, L. C. d., Boiteux, L. S. & Inoue-Nagata, A. K. (2011).** Detection and complete genome characterization of a begomovirus infecting okra (*Abelmoschus esculentus*) in Brazil. *Tropical Plant Pathology* **36**, 14-20.
- Barbosa, J. C., Rezende, J. A. & Amorim, L. (2016).** Temporal dynamics of Tomato severe rugose virus and *Bemisia tabaci* in tomato fields in São Paulo, Brazil. *Journal of Phytopathology* **164**, 1-10.
- Brown, J. K., Zerbini, F. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J. C., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R. W., Hernández-Zepeda, C. & Idris, A. (2015).** Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch Virol* **160**, 1593-1619.
- Castillo-Urquiza, G. P., Beserra, J. E., Jr., Bruckner, F. P., Lima, A. T., 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.
- Chowda Reddy, R. V., Colvin, J., Muniyappa, V. & Seal, S. (2005).** Diversity and distribution of begomoviruses infecting tomato in India. *Arch Virol* **150**, 845-867.
- Domingo, E. & Holland, J. (1997).** RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Reviews in Microbiology* **51**, 151-178.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987).** A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**, 11-15.
- Edgar, R. C. (2004).** MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* **5**, 113.
- Fereres, A., Peñafior, M. F. G., Favaro, C. F., Azevedo, K. E., Landi, C. H., Maluta, N. K., Bento, J. M. S. & Lopes, J. R. (2016).** Tomato Infection by Whitefly-Transmitted Circulative and Non-Circulative Viruses Induce Contrasting Changes in Plant Volatiles and Vector Behaviour. *Viruses* **8**, 225.
- Fernandes, F. R., de Albuquerque, L. C., de Britto Giordano, L., Boiteux, L. S., de Avila, A. C. & Inoue-Nagata, A. K. (2008).** Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* **36**, 251-258.
- Fernandes, F. R., de Albuquerque, L. C. & Inoue-Nagata, A. K. (2010).** Development of a species-specific detection method for three Brazilian tomato begomoviruses. *Tropical Plant Pathology* **35**, 43-47.
- Ferro, M. M. M., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J. T., Assunção, I. P. & Lima, G. S. A. (2017).** Genetic structure of populations of the begomoviruses Tomato mottle leaf curl virus and Sida mottle Alagoas virus infecting tomato (*Solanum lycopersicum*) and Sida spp., respectively. *Tropical Plant Pathology* **42**, 39-45.
- Fu, Y. X. & Li, W. H. (1993).** Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* **133**, 693-709.
- Garcia-Arenal, F., Fraile, A. & Malpica, J. M. (2001).** Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annu Rev Phytopathol* **39**, 157-186.
- García-Arenal, F., Fraile, A. & Malpica, J. M. (2003).** Variation and evolution of plant virus populations. *Int Microbiol* **6**, 225-232.
- González-Aguilera, J., Tavares, S. S., Sobrinho, R. R., Xavier, C. A. D., Dueñas-Hurtado, F., Lara-Rodrigues, R. M., Silva, D. J. H. d. & Zerbini, F. M.**

- (2012). Genetic structure of a Brazilian population of the begomovirus Tomato severe rugose virus (ToSRV). *Tropical Plant Pathology* **37**, 346-353.
- Haible, D., Kober, S. & Jeske, H. (2006).** Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *J Virol Methods* **135**, 9-16.
- Hanssen, I. M., Lapidot, M. & Thomma, B. P. (2010).** Emerging viral diseases of tomato crops. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 539-548.
- IBGE (2016).** Levantamento sistemático da produção agrícola.
- 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.
- Inoue-Nagata, A. K., Lima, M. F. & Gilbertson, R. L. (2016).** A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Horticultura Brasileira* **34**, 8-18.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016).** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* **33**, 1870-1874.
- Lefevre, P., Martin, D. P., Harkins, G., Lemey, P., Gray, A. J., Meredith, S., Lakay, F., Monjane, A., Lett, J.-M. & Varsani, A. (2010).** The spread of tomato yellow leaf curl virus from the Middle East to the world. *PLoS Pathog* **6**, e1001164.
- Lefevre, P., Martin, D. P., Hoareau, M., Naze, F., Delatte, H., Thierry, M., Varsani, A., Becker, N., Reynaud, B. & Lett, J.-M. (2007).** Begomovirus ‘melting pot’ in the south-west Indian Ocean islands: molecular diversity and evolution through recombination. *J Gen Virol* **88**, 3458-3468.
- 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.
- Macedo, M. A., Michereff Filho, M., Navas-Castillo, J. & Inoue-Nagata, A. K. (2015).** Host range and whitefly transmission efficiency of Tomato severe rugose virus and Tomato golden vein virus in tomato plants. *Tropical Plant Pathology* **40**, 405-409.

- Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A. & Muhire, B. (2015).** RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* **1**, vev003-vev003.
- Moreno, I., Malpica, J., Diaz-Pendón, J., Moriones, E., Fraile, A. & Garcia-Arenal, F. (2004).** Variability and genetic structure of the population of watermelon mosaic virus infecting melon in Spain. *Virology* **318**, 451-460.
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olive, E. & Sanchez-Campos, S. (2011).** Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annu Rev Phytopathol* **49**, 219-248.
- Nei, M. (1973).** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 3321-3323.
- Pond, S. L. K. & Frost, S. D. (2005).** Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol Biol Evol* **22**, 1208-1222.
- Ribeiro, S. G., Ambrozevícius, L. P., De Avila, A. C., Bezerra, I. C., Calegario, R. F., Fernandes, J. J., Lima, M. F., Mello, R. N., Rocha, H. & Zerbini, F. M. (2003).** Distribution and genetic diversity of tomato-infecting geminiviruses in Brazil. *Arch Virol* **148**, 281-295.
- Rocha, C. S., Castillo-Urquiza, G. P., Lima, A. T., Silva, F. N., Xavier, C. A., Hora-Junior, B. T., Beserra-Junior, J. E., Malta, A. W., Martin, D. P., Varsani, A., Alfenas-Zerbini, P., Mizubuti, E. S. & Zerbini, F. M. (2013).** Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. *J Virol* **87**, 5784-5799.
- Rocha, K. C. G., Marubayashi, J. M., Navas-Castillo, J., Pavan, M. A. & Krause-Sakate, R. (2010).** Ocorrência e variabilidade genética do Tomato severe rugose virus em tomateiro e pimentão no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathol* **36**, 222-227.
- Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R. & Maxwell, D. P. (1993).** Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis* **77**, 340-347.
- 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.

- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. & Rozas, R. (2003).** DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**, 2496-2497.
- Scheffler, K., Martin, D. P. & Seoighe, C. (2006).** Robust inference of positive selection from recombining coding sequences. *Bioinformatics* **22**, 2493-2499.
- Sobrinho, R. R., Xavier, C. A., Pereira, H. M., Lima, G. S., Assuncao, I. P., Mizubuti, E. S., Duffy, S. & Zerbini, F. M. (2014).** Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous hosts. *J Gen Virol* **95**, 2540-2552.
- Tajima, F. (1989).** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 585-595.
- van der Walt, E., Martin, D. P., Varsani, A., Polston, J. E. & Rybicki, E. P. (2008).** Experimental observations of rapid Maize streak virus evolution reveal a strand-specific nucleotide substitution bias. *Virol J* **5**, 104.
- 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.
- Zhou, X., Liu, Y., Calvert, L., Munoz, C., Otim Nape, G. W., Robinson David, J. & Harrison Bryan, D. (1997).** Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *J Gen Virol* **78**, 2101-2111.

## 5. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados apresentados nesse estudo indicam que após quase 10 anos do último estudo sistemático sobre a diversidade genética e a prevalência de espécies de begomovírus no País, ToSRV continua sendo a espécie mais importante, apesar de outras espécies seguirem ocorrendo mesmo que em baixa incidência.

Foram então analisados isolados de ToSRV quanto a sua estruturação temporal e geográfica. Baixos valores de diferenciação foram obtidos, sugerindo ausência de estruturação das subpopulações amostradas. Uma maior variabilidade foi observada nos isolados coletados no ano de 2015, inferindo que a tendência do aumento da variabilidade acompanharia o decorrer dos anos. Quanto às análises de seleção e neutralidade, resultados negativos foram predominantes, nos levando a induzir que a seleção purificadora é a força evolutiva presente nos isolados, sugerindo preservação das sequências em nível de aminoácidos e consequente manutenção da adaptabilidade viral.



## APÊNDICES

**Tabela S1.** Posição dos códons em seleção negativa ou positiva nas populações de *Tomato severe rugose virus* de amostras coletadas no Brasil

Dados	Slac		Fel		Rel	
	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva
AC4	0.	0.	0.	0.	0.	87.
CP	137, 152, 156, 159, 190, 206.	0.	6, 11, 13, 28, 42, 56, 65, 70, 96, 137, 146, 150, 152, 156, 159, 164, 180, 189, 190, 195, 206, 235.	30.	4, 6, 11, 13, 15, 18, 24, 25, 28, 31, 41, 42, 45, 56, 59, 65, 70, 71, 74, 78, 91, 96, 98, 105, 118, 137, 146, 148, 150, 151, 152, 155, 156, 159, 164, 167, 180, 189, 190, 193, 195, 196, 200, 201, 202, 204, 206, 220, 221, 223, 224, 235, 238, 239, 244, 250.	30.
REn	56, 92, 122.	0.	22, 44, 46, 56, 92, 122, 124.	84.	56, 92, 122.	84.
Rep	46, 108, 138, 139, 148, 151.	0.	12, 13, 16, 20, 31, 32, 42, 46, 56, 57, 64, 65, 66, 71, 80, 88, 96, 104, 108, 138, 139, 148, 151, 159, 172, 193, 202, 229, 230, 239, 259, 283, 288, 303, 321.	199, 279, 347.	148.	47, 63, 176, 186, 195, 199, 204, 256, 279, 347.
TrAP	13, 42.	0.	13, 42, 43, 48, 64, 78, 99, 109.	0.	13.	0.
AC4*	0.	0.	35.	0.	0.	32, 51, 52, 62, 87.
CP*	137, 151, 156, 190, 202, 205, 206, 238, 244.	0.	6, 11, 13, 18, 25, 28, 31, 53, 56, 65, 70, 76, 91, 96, 137, 148, 151, 156, 164, 172, 180, 184, 189, 190, 193, 195, 202, 204, 205, 206, 210, 219, 223, 238, 244.	0	**	**
REn*	18, 44, 92, 111, 122.	84.	18, 22, 33, 44, 46, 52, 92, 93, 98, 101, 111, 122, 124, 125.	84	**	**
Rep*	12, 31, 42, 46, 65, 66, 80, 103, 104, 107, 108, 139, 147, 148, 151, 188, 268, 288, 303, 351.	0.	8, 12, 13, 14, 16, 20, 31, 32, 39, 40, 42, 43, 46, 55, 56, 57, 64, 65, 66, 71, 76, 77, 80, 83, 88, 96, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 117, 126, 132, 137, 138, 139, 147, 148, 151, 153, 154, 159, 165, 172, 188, 202, 213, 227, 229, 230, 239, 246, 259, 268, 269, 271, 274, 278, 283, 284, 288, 303, 321, 351.	192, 199, 256, 279, 347.	18, 44, 92, 98, 101, 111, 122.	84.
TrAP*	13, 25, 42.	0.	13, 25, 26, 42, 43, 48, 57, 64, 85, 99, 109.	90.	13.	77, 86, 90.

\*Sequências de ToSRV de Goiás, Brasil juntamente com sequências referenciais retiradas do GenBank.

\*\*Conjunto de dados maior que o suportado pelo método.

**Tabela S2.** Isolados de *Tomato severe rugose virus* (DNA-A) obtidos de amostras de tomateiro em Goiás, Brasil

Isolado	Acesso	Ano de coleta	Local de Coleta
LuzTo671		2003	Luziânia
LuzTo672		2003	Luziânia
LuzTo749		2003	Luziânia
CofTo949		2003	Itaberaí
CofTo957		2003	Itaberaí
UniTo1153		2003	Itaberaí
UniTo1160		2003	Itaberaí
UniTo1176		2003	Itaberaí
UniTo1186		2003	Itaberaí
ItaTo1230		2003	Itaberaí
SilTo1246		2003	Silvânia
ParTo1248		2003	Paraúna
PirTo1264		2003	Piracanjuba
PirTo1265		2003	Piracanjuba
AbaTo1326		2003	Abadia de Goiás
VicTo1387		2003	Vicentinópolis
VicTo1388		2003	Vicentinópolis
GoiTo1412		2003	Goianápolis
GoiTo1418		2003	Goianápolis
AnaTo1651		2003	Anápolis
LuzTo6891		2008	Luziânia
LuzTo6892		2008	Luziânia
LuzTo6898		2008	Luziânia
LuzTo6901		2008	Luziânia
LuzTo6902		2008	Luziânia
LuzTo6905		2008	Luziânia
LuzTo6907		2008	Luziânia
LuzTo6909		2008	Luziânia
LuzTo6910		2008	Luziânia
LuzTo6916		2008	Luziânia
MorTo6937		2008	Morrinhos
MorTo6953		2008	Morrinhos
MorTo6956		2008	Morrinhos
MorTo7012		2008	Morrinhos
MorTo7015		2008	Morrinhos
MorTo7016		2008	Morrinhos
MorTo7017		2008	Morrinhos
MorTo7018		2008	Morrinhos
MorTo7023		2008	Morrinhos
MorTo7025		2008	Morrinhos
LuzTo1		2015	Luziânia
LuzTo2		2015	Luziânia
LuzTo3		2015	Luziânia
LuzTo4		2015	Luziânia
LuzTo5		2015	Luziânia
LuzTo7		2015	Luziânia
LuzTo8		2015	Luziânia
LuzTo9		2015	Luziânia
LuzTo10		2015	Luziânia
LuzTo11		2015	Luziânia
LuzTo12		2015	Luziânia
LuzTo13		2015	Luziânia

MorTo39	2015	Morrinhos
MorTo40	2015	Morrinhos
MorTo47	2015	Morrinhos
MorTo58	2015	Morrinhos
MorTo94	2015	Morrinhos
MorTo95	2015	Morrinhos
MorTo97	2015	Morrinhos
MorTo104	2015	Morrinhos
MorTo139	2015	Morrinhos

**Tabela S3.** Sequências do GenBank de isolados de *Tomato severe rugose virus* (DNA-A) obtidos em diferentes hospedeiros no Brasil

Nomenclatura sugerida	Acesso	Ano de coleta	Local de coleta		Hospedeiro
VicTo09	JX865615	2009	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo09	JX865616	2009	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo09	JX865617	2009	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo09	JX865618	2009	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo09	JX865619	2009	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865620	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865621	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865622	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865623	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865624	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865625	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo09	JX865626	2009	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo09	JX865627	2009	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo09	JX865628	2009	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo09	JX865629	2009	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865630	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865631	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865632	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865633	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo09	JX865634	2009	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo09	JX865635	2009	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865636	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865637	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865638	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo09	JX865639	2009	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo09	JX865640	2009	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo09	JX865641	2009	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865642	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865643	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865644	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865645	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865646	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865647	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865648	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865649	2010	Viçosa	MG	Tomateiro
VicTo10	JX865650	2010	Viçosa	MG	Tomateiro

PetCp03	NC009607	2003	Petrolina	PE	Pimenta
PetCp03	DQ207749	2003	Petrolina	PE	Pimenta
GoiNp03	JX415188	2003	Goianápolis	GO	<i>Nicandra physaloides</i>
LuzCj08	JX415190	2008	Luziânia	GO	<i>Crotalaria juncea</i>
LuzTo08	JX415193	2008	Luziânia	GO	Tomateiro
LuzTo08	JX415196	2008	Luziânia	GO	Tomateiro
GoiNp08	JX415197	2008	Goianápolis	GO	<i>Nicandra physaloides</i>
GoiTo08	JX415198	2008	Goianápolis	GO	Tomateiro
GoiTo08	JX415199	2008	Goianápolis	GO	Tomateiro
AcrTo09	JX415201	2009	Acreúna	GO	Tomateiro
AcrTo09	JX415202	2009	Acreúna	GO	Tomateiro
CarTo08	KC706617	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
CarTo08	KC706618	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
CarTo08	KC706619	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
CarTo08	KC706620	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
JaiTo08	KC004068	2008	Jaíba	MG	Tomateiro
JaiTo08	KC004069	2008	Jaíba	MG	Tomateiro
FloTo08	KC004070	2008	Florestal	MG	Tomateiro
FloTo08	KC004071	2008	Florestal	MG	Tomateiro
FloTo08	KC004072	2008	Florestal	MG	Tomateiro
FloTo08	KC004073	2008	Florestal	MG	Tomateiro
FloTo08	KC004074	2008	Florestal	MG	Tomateiro
CarTo08	KC004075	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
CarTo08	KC004076	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
CarTo08	KC004077	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
CarTo08	KC004078	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
CarTo08	KC004079	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
CarTo08	KC004080	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
CarTo08	KC004081	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
CarSi08	KC004082	2008	Carandaí	MG	Sida
CarTo08	KC004083	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
CarTo08	KC004084	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
CarTo08	KC004085	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
CarTo08	KC004086	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
CarTo08	KC004087	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
CarTo08	KC004088	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
CarTo08	KC004089	2008	Carandaí	MG	Tomateiro
VicSi10	KC004090	2010	Viçosa	MG	Sida
PipTo03	JF803260	2003	Pipiripau	DF	Tomateiro
PipTo03	JF803261	2003	Pipiripau	DF	Tomateiro
IndTo04	JF803262	2004	Indiana	GO	Tomateiro
PalTo04	JF803263	2004	Ponte Alta	DF	Tomateiro
PetCp00	AY029750	2000	Petrolina	PE	Pimenta
SumNp07	EU086591	2007	Sumaré	SP	<i>Nicandra physaloides</i>
PjuPi05	FJ824808	2005	Pirajú	SP	Pimentão
BraTo07	HQ606467	2007	Desconhecido		Tomateiro
BraPv14	KX458238	2014	Desconhecido		<i>Phaseolus vulgaris</i>

**Tabela S4.** Valores médios das razões entre as taxas de substituições não-sinônimas e substituições sinônimas (dN/dS) nas sequências de *Tomato severe rugose virus* de amostras coletadas no Brasil

Dados	dN/dS	dN/dS*
AC4	2,67182	3,29403
CP	0,12916	0,24807
Ren	0,48894	0,48659
Rep	0,30306	0,28353
TrAP	0,40378	0,42352

\*Sequências de ToSRV apresentadas neste estudo juntamente com sequências retiradas do GenBank utilizadas nas análises.