

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

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
Tomato chlorosis virus EM TOMATEIRO BASEADA NO
GENE DA PROTEÍNA P22

Autora: Laysla Morais Coêlho
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 DE POPULAÇÕES DE *Tomato
chlorosis virus* EM TOMATEIRO BASEADA NO GENE DA
PROTEÍNA P22

Autora: Laysla Morais Coêlho
Orientador: Dr. Leonardo Cunha de Albuquerque

Dissertação apresentada, como parte das exigências para a
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 Ciências Agrárias.

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 DE POPULAÇÕES DE *Tomato
chlorosis virus* EM TOMATEIRO BASEADA NO GENE DA
PROTEÍNA P22

Autora: Laysla Morais Coêlho
Orientador: Dr. Leonardo Cunha de Albuquerque

Dissertação apresentada, como parte das exigências para a 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 Ciências Agrárias.

MORRINHOS - GO
2017

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

C672d Coêlho, Laysla Morais.

Diversidade genética de populações de *Tomato chlorosis virus* em tomateiro baseado no gene da proteína p22. / Laysla Morais Coêlho. – Morrinhos, GO: IF Goiano, 2017.
55 f. : il. color.

Orientador: Dr. Leonardo Cunha de Albuquerque.

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

1. *Solanum lycopersicum*. 2. Variedade genética. 3. ToCV. 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 E PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OLERICULTURA


DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Tomato
chlorosis virus* EM TOMATEIRO BASEADO NO GENE DA
PROTEÍNA P22


Autora: Laysla Morais Coêlho
Orientador: Leonardo Cunha de Albuquerque

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

APROVADA em 29 de setembro de 2017.


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


Dr.^a Alice Kazuko Inoue-Nagata
Avaliadora Externa
Embrapa Hortaliças - CNPH


Dr. Júlio César Barbosa
Avaliador Externo
Bayer S.A. - Crop Science Division

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fé que me mantém viva, pelos dias de aprendizados, pela vida de trabalho e estudos.

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr^o Leonardo Albuquerque, pelos ensinamentos, por seu exemplo de dedicação à profissão e pelo seu amor pela pesquisa que me inspiram. Por acreditar e incentivar seus alunos, por confiar na minha capacidade, pelas palavras de consolo, apoio e determinação. Obrigada, sobretudo, pela sua paciência, atenção e disposição.

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

Ao Instituto Federal Goiano-Campus Morrinhos, ambiente que me proporcionou tanto crescimento. A todos os professores do PPGOL e funcionários que, de alguma forma, contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Aos colegas de pesquisa do Laboratório de Biologia Molecular, Tânia, Thayssa, Ariela, Danilo, Helena, Ana Carolina e Denise, que estiveram presentes nos dias de luta e se tornaram grandes companheiros.

A toda a equipe do Laboratório de Virologia da Embrapa Hortaliças, por ter me recebido de braços abertos em um momento de grandes desafios a serem superados. À Dr.^a Alice Nagata, por disponibilizar todo o auxílio presencial e a distância. Ao Erick e Tadeu, por me ensinarem com toda atenção os processos laboratoriais na prática e na teoria. E a todos os demais estudantes e funcionários que se fizeram presentes no meu aprendizado, especialmente a Mônica, Camila, Cristiano, Thaís, Vivian e Pedro.

Ao Carlos Roberto, Marly, Débora e Délcio, pela agradável acolhida em um lar cheio de amor. Ao Luidi Coelho, por disponibilizar seu apartamento em nome da pesquisa para parte da equipe do laboratório.

Aos membros da banca, Dr^a Alice Kazuko Inoue Nagata e Dr^o Júlio Cesar Barbosa, por aceitarem fazer parte desse momento especial.

À minha família, que sempre me apoiou nas minhas escolhas, pelas palavras de incentivo e pelo amor incondicional. Mãe Maria Helena, pai Mário Coêlho e irmãos Synara e Mikeyas, vocês são a minha maior inspiração para seguir em frente!

Ao meu namorado Lucas, pelos sonhos compartilhados, pelo incentivo diário, pelo carinho e compreensão.

As colegas de pós-graduação, que dividiram as cargas pesadas, as alegrias e as conquistas. Passamos por momentos marcantes e hoje levo-os como amigos para a vida.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA DA AUTORA

LAYSLA MORAIS COÊLHO, filha de Mário Manoel Coêlho e Maria Helena Vieira de Moraes, nascida em Morrinhos, em 15 de abril de 1992.

No ano de 2010, ingressou na Universidade Federal de Goiás-Campus Samambaia, cursando Bacharelado em Agronomia. Durante a graduação, participou, como membro, da Empresa Júnior CIPPAL, do grupo de pesquisa NUCLIRH (Núcleo de Pesquisa em Climatologia e Recursos Hídricos do Cerrado), atuando efetivamente em trabalhos na área da Climatologia Agrícola, sob orientação do Professor Dr. Derblai Casaroli, tendo participado de pesquisas ligadas à área de mecanização agrícola. Durante o estágio curricular, no ano de 2014, estagiou na estação de pesquisa da empresa Iharabrás S/A Indústrias Químicas em Sorocaba-SP, com atuação a campo na área de fitossanidade, tendo desenvolvido pesquisas com agroquímicos, sob orientação da Professora Dr^a Abadia dos Reis Nascimento e supervisão do Agrônomo Sílvio Aparecido Marcussi.

Em setembro de 2015, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Olericultura, nível Mestrado Profissional, área de concentração em Ciências Agrárias, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Morrinhos. Trabalhou com virologia vegetal sob a orientação do Professor Dr. Leonardo Cunha de Albuquerque e defendeu a dissertação em 29 de setembro de 2017.

ÍNDICE

	Páginas
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Culturado tomate.....	2
2.2 Família <i>Closteroviridae</i>	3
2.3 Gênero <i>Crinivirus</i>	4
2.4 <i>Tomato chlorosis virus</i> (ToCV)	5
2.5 Diversidade genética de membros da Família <i>Closteroviridae</i>	8
2.6 Referências Bibliográficas	10
3. CAPÍTULO I.....	17
3.1. INTRODUÇÃO	18
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.3. RESULTADOS	22
3.4. DISCUSSÃO.....	24
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
4. CONCLUSÃO GERAL	41

LISTA DE TABELAS

Páginas

3. CAPÍTULO I.....	17
Diversidade genética de populações de <i>Tomato chlorosis virus</i> em tomateiro baseada no gene da proteína p22.....	17
Tabela 1. Clones correspondentes à sequência nucleotídica completa da proteína p22 de <i>Tomato chlorosis virus</i> obtidos de amostras de tomateiro coletadas nos estados do Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ) e Goiás (GO), Brasil.....	38
Tabela 2. Tabela 2. Sequências nucleotídicas da proteína p22 de <i>Tomato chlorosis virus</i> em tomateiro obtidas do GenBank.....	39
Tabela 3. Estrutura genética da população de <i>Tomato chlorosis virus</i> baseada na sequência nucleotídica do gene da proteína p22.....	40
Tabela 4. Diferenciação genética entre as subpopulações de <i>Tomato chlorosis virus</i>	40
Tabela 5. Valores médios da relação de substituições sinônimas e não sinônimas (d_{NS}/d_S) para as sequências nucleotídicas do gene da p22 nas populações de <i>Tomato chlorosis virus</i>	40

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
Figura 1. Representação esquemática do genoma de <i>Tomato chlorosis virus</i> (ToCV)-RNA1 e RNA2. As linhas representam o RNA genômico; as caixas representam as ORFs com os nomes das proteínas indicadas..	6
3. CAPÍTULO I.....	17
Diversidade genética de populações de <i>Tomato chlorosis virus</i> em tomateiro baseada no gene da proteína p22.....	17
Figura 1. Plantas de tomateiros infectadas por <i>Tomato chlorosis virus</i> (ToCV), apresentando sintomas de clorose internerval nas folhas baixas e medianas. A- Vassouras, Rio de Janeiro. B- Faxinal, Paraná. C- Morrinhos, Goiás.....	33
Figura 2. Mapa geográfico do Brasil, destacando, em vermelho, os estados de Goiás (GO), Rio de Janeiro (RJ) e Paraná (PR), onde as amostras foram coletadas para este estudo. Os pontos representam os municípios de Morrinhos, Vassouras, Paty do Alferes e Faxinal. As linhas que formam o triângulo indicam a distância entre os locais de coleta.....	33
Figura 3. Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína p22 de isolados de <i>Tomato chlorosis virus</i> usados neste estudo. Um consenso secundário da sequência de aminoácidos é mostrado no topo. As sequências para p22 de isolados da Coreia do Sul, Espanha, Estados Unidos, Grécia, China e Brasil disponíveis em bancos de dados também foram incluídas (Tabela 2). Os aminoácidos idênticos ao consenso são indicados por pontos. Os números na parte inferior dos alinhamentos indicam as	

posições dos aminoácidos. As setas indicam as principais mudanças dos aminoácidos que determinam as distâncias filogenéticas. Os aminoácidos em destaque preto indicam as diferenças para os isolados brasileiros, e as caixas indicam as principais mudanças nos aminoácidos que caracterizam os isolados do Tipo I e do Tipo II.....34

Figura 4. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da proteína p22 de isolados de *Tomato chlorosis virus* usados neste estudo. As seqüências para p22 de isolados da Coreia do Sul, Espanha, Estados Unidos, Grécia, China e Brasil disponíveis em bancos de dados também foram incluídas (Tabela 2). A primeira e a segunda linha correspondem às posições dos aminoácidos e dos nucleotídeos, respectivamente. Um consenso secundário da seqüência de nucleotídeos é mostrado na terceira linha. Os nucleotídeos destacados no consenso indicam as posições onde ocorrem as principais mudanças que determinam mutações significativas. Os nucleotídeos idênticos ao consenso são indicados por pontos.....36

Figura 5. Árvore filogenética construída por inferência bayesiana, baseada nas seqüências nucleotídicas do gene da proteína p22 de isolados de *Tomato chlorosis virus* (ToCV) das subpopulações GO, PR e RJ (destacados em negrito), no Brasil, em comparação com outros isolados representativos de ToCV obtidos do GenBank. O nome do isolado e o número de acesso no GenBank são indicados nas Tabelas 1 e 2. A barra de escala abaixo representa o número de substituições nucleotídicas por sítio.....37

RESUMO

COELHO, LAYSLA MORAIS. Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos, setembro de 2017. **Diversidade genética de populações de *Tomato chlorosis virus* em tomateiro baseado no gene da proteína p22.** Orientador: Dr. Leonardo Cunha de Albuquerque.

Tomato chlorosis virus (ToCV), gênero *Crinivirus*, família *Closteroviridae*, é um patógeno importante para a tomaticultura e tem sido relatado em vários países, incluindo o Brasil. ToCV tem genoma bipartido, constituído por duas moléculas de RNA fita simples, sentido positivo, encapsidadas separadamente em uma partícula alongada e flexuosa. Sua transmissão ocorre naturalmente por algumas espécies de mosca-branca. Plantas de tomate infectadas exibem sintomas característicos de clorose internerval, redução do vigor e, conseqüentemente, diminuição da produtividade. No entanto, pouco se sabe sobre a estrutura populacional desse vírus no país. Considerando a importância da espécie como um problema para a cadeia produtiva de tomate, objetivou-se estudar a estrutura genética de populações de ToCV, baseada na sequência completa da ORF2, que codifica a proteína p22, descrita como um supressor de silenciamento gênico. O estudo teve por base as sequências de isolados obtidos de amostras de *Solanum lycopersicum* (tomate), coletadas nos anos de 2015 e 2016 nos estados de Goiás (GO), Paraná (PR) e Rio de Janeiro (RJ). Foram obtidos 28 clones, e as sequências nucleotídicas analisadas juntamente com outras sequências foram obtidas do GenBank. As sequências dos isolados do Brasil foram comparadas com sequências de isolados da Coreia do Sul (KOR) e da Espanha (ESP). Os resultados confirmam a

subdivisão das populações de ToCV em dois grupos, com base na sequência da p22, denominados Tipo I (apenas isolados da Espanha) e Tipo II (isolados da Espanha e demais países). Os principais indicadores de variabilidade genética apresentaram valores relativamente baixos, mas com diferenciação genética entre as populações, com os isolados do Brasil sendo mais próximos geneticamente aos isolados da Coreia do Sul do que aos isolados da Espanha. A análise filogenética mostra que os isolados do Brasil formam um grupo monofilético com uma evidência de estruturação genética das subpopulações baseada na origem geográfica. A mutação parece ser o principal mecanismo de variabilidade genética entre os isolados analisados e uma seleção negativa ou purificadora pode estar atuando na manutenção da sequência de aminoácidos da p22.

PALAVRAS- CHAVE: Variabilidade genética, ToCV, *Solanum lycopersicum*

ABSTRACT

COELHO, LAYSLA MORAIS. Instituto Federal Goiano (Goiano Federal Institute) Morrinhos Campus, September 2017. **Genetic diversity of *Tomato chlorosis virus* population in tomato plant on the basis of p22 protein gene.** Advisor: Dr. Leonardo Cunha de Albuquerque.

Tomato chlorosis virus (ToCV) (*Crinivirus* genus, *Closteroviridae* family) is considered an important pathogen for tomato production and has been reported in many countries, including Brazil. ToCV has a bipartite genome, consisting of two simple tapes RNA molecules of positive-sense, separately encapsidated in an elongated and flexuous particle. ToCV is naturally transmitted by some whitefly species. Infected tomato plants display characteristic symptoms of internerval chlorosis, vigor reduction, and consequently productivity decrease. However, little is known about the population structure of this virus in the country. Considering the species' importance as a problem to tomato production chain, this study aimed to investigate the genetic structure of ToCV population on the basis of the complete ORF2 sequence, which encodes the p22 protein, described as a gene silencing suppressor. The study was based on the sequences of isolates obtained from *Solanum lycopersicum* (tomato) samples collected in 2015 and 2016 in the states of Goiás (GO), Paraná (PR), and Rio de Janeiro (RJ), Brazil. Twenty-eight clones were obtained and their nucleotide sequences were analyzed together with other sequences obtained from GenBank. The nucleotide sequences of isolates from Brazil were compared to South Korean (KOR) and Spanish (ESP) isolates. Results confirm the subdivision of ToCV population into two groups on the basis of nucleotide sequence of p22 gene, denominated Type I (only Spanish isolates), and Type II (isolates from Spain and other countries). The main indicators of genetic variability presented

relatively low values, but with genetic differentiation among the populations, in relation to Brazilian isolates, and they are genetically closest to South Korean than to Spanish isolates. Phylogenetic analysis shows that the Brazilian isolates form a monophyletic group with evident genetic structure of subpopulations on the basis of geographic origin. Mutation seems to be the main mechanism of genetic variability among the analyzed isolates, and a negative or purifying selection may be acting to maintain the amino acid sequence of p22.

KEYWORDS: Genetic variability, ToCV, *Solanum lycopersicum*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma das hortaliças mais plantadas no mundo, assumindo uma grande importância na alimentação humana. No entanto, muitos problemas ainda surgem durante o seu ciclo de desenvolvimento, entre eles, os fitossanitários, com destaque para as doenças de etiologia viral, um dos fatores limitantes para a cultura. Entre os vírus que infectam o tomateiro, os crinivírus têm se tornado um problema, especialmente pela eficiência de transmissão e ampla disseminação do inseto vetor (Wintermantel & Wisler, 2006).

Os crinivírus, gênero *Crinivirus*, família *Closteroviridae*, são transmitidos na natureza por algumas espécies de mosca-branca dos gêneros *Bemisia* e *Trialeurodes*. (Orfanidou *et al.*, 2014; Tzanetakis *et al.*, 2013). Na década de 1990, nos Estados Unidos, foram relatadas duas espécies de crinivírus infectando o tomateiro: *Tomato infectious chlorosis virus*(TICV) e *Tomato chlorosis virus*(ToCV) (Wisler *et al.*, 1998). O TICV ainda não foi relatado no Brasil (Zhao *et al.*, 2014a), estando o ToCV amplamente disseminado em áreas produtoras de tomate, tendo seu primeiro relato ocorrido em 2006, no estado de São Paulo (Barbosa *et al.*, 2008). Os sintomas incluem clorose internerval, especialmente nas folhas baixas, que se tornam frágeis e podem apresentar manchas necróticas, redução do vigor das plantas e, conseqüentemente, diminuição da produtividade (Barbosa *et al.*, 2011).

Considerando a importância de ToCV para a cultura do tomateiro e o limitado conhecimento sobre a estrutura genética desse patógeno no Brasil, estudos de variabilidade genética e estrutura populacional de ToCV são importantes para o entendimento dos mecanismos de variabilidade que atuam na evolução da espécie e para o direcionamento de pesquisas na área de melhoramento genético.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Culturado tomate

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) tem como seu centro de origem a região andina, compartilhada pela Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Chile. Há fortes indícios de que sua domesticação tenha ocorrido no México, mas existem algumas hipóteses que indicam o Peru (Nuez, 1999). Sua disseminação pelo mundo ocorreu por meio das colônias espanholas e portuguesas (Alvarenga, 2013).

A planta do tomateiro pode apresentar dois hábitos de crescimento distintos – indeterminado e determinado - que estabelecem a condução da planta. No hábito indeterminado, ocorre dominância da gema apical sobre as gemas laterais, o crescimento da planta é vigoroso e contínuo, ocorrendo concomitantemente com a produção de flores e frutos. As plantas que apresentam este hábito são destinadas à produção de tomate de mesa e precisam ser tutoradas e podadas. No hábito determinado, o crescimento vegetativo é menos vigoroso, o crescimento das hastes é mais uniforme, a planta assume a forma de uma moita e as hastes apresentam um cacho de flores na extremidade. As plantas de hábito determinado são cultivadas com finalidade agroindustrial (Filgueira, 2008).

O tomate é a segunda hortaliça mais plantada do mundo, ficando atrás apenas da batata. Em 2016, de acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (FAO), o Brasil aparece como o nono produtor mundial de tomate, sendo a China e os Estados Unidos os maiores produtores. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2016, o Brasil produziu cerca de 3.667.121 toneladas, e os maiores produtores foram os estados de Goiás (maior produtor desde 1999), São Paulo e Minas Gerais. Atualmente, esses três estados representam

65% da produção brasileira de tomate, sendo que Goiás produziu 934.658 toneladas ou 25% da produção nacional (IBGE, 2016).

Diante da grande importância econômica da cultura e do número de doenças e pragas que afetam a tomaticultura, esse setor agrícola está entre os que mais consomem produtos fitossanitários, com um gasto médio de R\$ 3.961,67 ha.ano (AGRIANUAL, 2015). Entre as diversas pragas que atacam a cultura, a mosca-branca tem destaque por causar danos diretos e indiretos à cultura.

Os danos diretos estão relacionados com a sucção da seiva e injeção de toxinas, que causam desordens fisiológicas nas plantas. Os danos indiretos estão relacionados ao crescimento de fungos do gênero *Capnodium* sob a superfície de frutos e folhas, atraídos pela excreção de uma substância açucarada (*honeydew*) liberada pelo inseto, transmitindo viroses, destacando-se vírus dos gêneros *Begomovirus* e *Crinivirus*, com espécies que infectam o tomateiro (Jones, 2003; Villas Boas *et al.*, 2002).

Entre os crinivírus no Brasil, a espécie *Tomato chlorosis virus* (ToCV), gênero *Crinivirus*, família *Closteroviridae*, tem apresentado alta incidência em lavouras de tomateiros, cujo sintoma característico é a clorose internerval, que resulta na diminuição da produtividade. O ToCV é transmitido na natureza de forma semipersistente pelas espécies da mosca-branca *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum* e *T. abutilonea* (Wisler *et al.*, 1998).

A diversidade genética do ToCV é tema deste trabalho, sendo descrita nos tópicos a seguir.

2.2 Família *Closteroviridae*

Os closterovírus têm partícula longa e flexuosa, genoma de RNA fita simples senso positivo (ssRNA+), podendo ser monopartido, bipartido ou tripartido, com tamanho entre 13000 a 19500 bases. Atualmente, a família está subdividida em quatro gêneros de acordo com o genoma e o vetor de transmissão: *Ampelovirus*, *Closterovirus*, *Crinivirus* e *Velarivirus* (Al Rwahnih *et al.*, 2012; Martelli *et al.*, 2012).

Os vírus pertencentes ao Gênero *Ampelovirus* têm genoma monopartido e são transmitidos por cochonilhas. Atualmente, há nove espécies aceitas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV): *Blackberry vein banding-associated virus* (BVBaV), *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3), *Grapevine leafroll-associated virus 4* (GLRaV-4), *Little cherry virus 2* (LChV-2), *Pineapple mealybug wilt-associated virus*

1 (PMWaVs-1), *Pineapple mealybug wilt-associated virus 2* (PMWaVs-2), *Pineapple mealybug wilt-associated virus 3* (PMWaVs-3) e *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus* (PBNSPaV).

O Gênero *Closterovirus* é composto por espécies que têm genoma monopartido e são transmitidos por afídeos. Atualmente, há treze espécies aceitas pelo ICTV: *Beet yellow stunt virus* (BYSV), *Beet yellows virus* (BYV), *Burdock yellows virus* (BdYV), *Carnation necrotic fleck virus* (CNFV), *Carrot yellow leaf virus* (CYLV), *Citrus tristeza virus* (CTV), *Grape vine leaf roll-associated virus 2* (GLRaV-2), *Mintvirus 1* (MV1), *Raspberry leaf mottle virus* (RLMV), *Rose leaf rosette-associated virus* (RLRaV), *Strawberry chlorotic fleck-associated virus* (SCFV), *Tobacco virus 1* (TV1) e *Wheat yellow leaf virus* (WYLV).

Velarivirus é um gênero da família *Closteroviridae* criado recentemente. O genoma é monopartido e o vetor ainda é desconhecido. Esse gênero é composto por sete espécies (ICTV): *Areca palmvela virus 1* (ArPV1), *Cordyline virus 1* (CoV-1), *Cordyline virus 2* (CoV-2), *Cordyline virus 3* (CoV-3), *Cordyline virus 4* (CoV-4), *Grapevine leafroll-associated virus 7* (GLRaV-7) e *Little cherry virus 1* (LChV-1) (ICTV; Martelli et al., 2012).

Há ainda seis espécies de vírus que não estão classificadas em nenhum gênero: *Alligatorweed stunting virus* (AWSV00), *Blueberry virus A* (BVA), *Megakepasma mosaic virus* (MEGMV0), *Mint vein banding-associated virus* (MVBaV), *Olive leaf yellowing-associated virus* (OLYAV0) e *Persimmon virus B* (PvB) (ICTV).

2.3 Gênero *Crinivirus*

Os crinivírus têm genoma composto de duas moléculas de ssRNA+ encapsuladas separadamente, com exceção da espécie *Potato yellow vein virus* (PYVD), que tem genoma tripartido (Livieratos et al., 2004).

Atualmente, há 14 espécies aceitas pelo ICTV: *Abutilon yellows virus* (AbYV), *Bean yellow disorder virus* (BnYDV), *Blackberry yellow vein-associated virus* (BYVaV), *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), *Diodia vein chlorosis virus* (DVCV), *Lettuce chlorosis virus* (LCV), *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV), *Potato yellow vein virus* (PYVV), *Strawberry pallidosis-associated virus* (SPaV), *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), *Tetterwort vein chlorosis virus* (TVCV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV), *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV).

A transmissão natural ocorre de maneira semipersistente por algumas espécies de mosca-branca dos gêneros *Bemisia* e *Trialeurodes* (Tzanetakis *et al.*, 2013). TICV e ToCV são as duas espécies descritas infectando tomateiro. As populações desses dois vírus apresentam baixa divergência molecular e os sintomas causados pela infecção são similares (Orfanidou *et al.*, 2014). O TICV foi descrito na América do Norte, Europa e Ásia, sendo transmitido exclusivamente por *Trialeurodes vaporariorum*. No Brasil, TICV ainda não foi relatado (Zhao *et al.*, 2014a). O ToCV é transmitido pelas espécies *Bemisia tabaci*, *T. abutilonea* e *T. Vaporariorum* (Wintermantel & Wisler, 2006) e encontra-se disseminado nas Américas (Martinez-Zubiaur *et al.*, 2008), Europa (Bese *et al.*, 2011), Ásia (Sundaraj *et al.*, 2011) e África (Fiallo-Olive *et al.*, 2011). No Brasil, o primeiro relato do ToCV ocorreu em 2008 em Sumaré, São Paulo (Barbosa *et al.*, 2008), posteriormente foi relatado nos estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Barbosa *et al.*, 2011). Já existem relatos da presença do vírus nas principais regiões produtoras de todo o país e da infecção simples de ToCV em plantio de cultivares tolerantes a begomovírus (Macedo *et al.*, 2014). Esses fatos reforçam a necessidade de mais pesquisas relacionadas ao ToCV, já que não há cultivares comerciais resistente a este vírus.

2.4 *Tomato chlorosis virus* (ToCV)

Tomato chlorosis virus (ToCV) tem o genoma bipartido de ssRNA⁺, denominado RNA1 e RNA2. Tendo por base o isolado brasileiro ToCV-BR, o RNA1 consiste de 8.594 nucleotídeos (nt) e o RNA2, de 8.242 nt (Albuquerque *et al.*, 2013).

O RNA1 tem quatro ORFs que codificam as proteínas envolvidas principalmente na replicação do genoma e na supressão de silenciamento gênico (Figura 1) (Canizares *et al.*, 2008). A ORF 1a codifica uma proteína multifuncional (protease, helicase e metiltransferase) comum entre os membros da família *Closteroviridae*, de 221 kDa. A ORF 1b codifica uma RNA dependente de RNA polimerase (RdRp) de 58 kDa, sendo essa proteína altamente conservada entre os membros do gênero *Crinivirus* (Wintermantel *et al.*, 2005). A ORF 2 é traduzida em uma proteína de 22 kDa, denominada de p22, que atua como supressora de silenciamento gênico (Canizares *et al.*, 2008). A ORF 3 fica localizada na extremidade 3' do RNA1, com 155 nucleotídeos, codifica a proteína p5, com função ainda desconhecida (Figura 1) (Wintermantel *et al.*, 2005).

O RNA2 codifica nove ORFs responsáveis principalmente pelas funções de encapsidação viral, transmissão pelo vetor e movimento na planta. A ORF 1 codifica uma pequena proteína de 4 kDa (p4), que possivelmente, tem um domínio transmembrana. A ORF 2 codifica a “heat shock protein 70” (HSP70h), envolvida na montagem das partículas virais e movimento célula a célula, sendo essa proteína altamente conservada. A ORF 3 codifica uma proteína de 8 kDa com função desconhecida. A ORF 4 codifica uma proteína de 59 kDa (P59), envolvida no movimento célula a célula. A ORF 5 codifica uma proteína de 9 kDa ainda com função desconhecida (Wintermantel *et al.*, 2005). A ORF 6 codifica a capa proteica (CP), que tem a função de encapsidar a maior parte da partícula viral, e a ORF 7 codifica uma capa proteica menor (CPm), que está associada com a encapsidação da extremidade 5’ (Alzhanova *et al.*, 2001) e pode estar envolvida na determinação da transmissibilidade pelo vetor (Wintermantel & Wisler, 2006). A ORF 8 codifica uma proteína de 27 kDa (P27), exclusiva dos crinivírus. A ORF 9 codifica uma proteína exclusiva de ToCV, também com domínio transmembrana (Figura 1) (Wintermantel *et al.*, 2005).

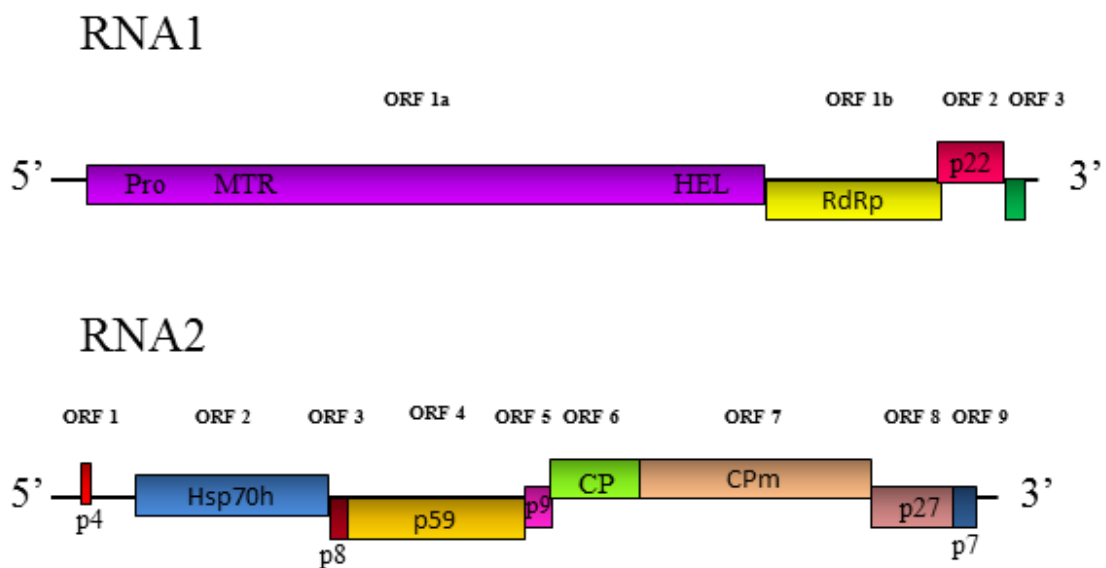


Figura 1. Representação esquemática do genoma de *Tomato chlorosis virus* (ToCV)- RNA1 e RNA2. As linhas representam o RNA genômico; as caixas representam as ORFs com os nomes das proteínas indicadas.

Tomateiros infectados com ToCV exibem sintomas de clorose internerval, especialmente nas folhas baixas. As folhas mais velhas podem ficar enroladas, tornando-se grossas e quebradiças. A gravidade dos sintomas e as perdas de rendimento variam dependendo da cultivar e da época de infecção (Barbosa *et al.*, 2008).

O ToCV é restrito ao floema da planta, sendo transmitido na natureza de maneira semipersistente pelas espécies de mosca-branca *Bemisia tabaci*, *T. abutilonea* e *Trialeurodes vaporariorum* (Wintermantel & Wisler, 2006; Wisler *et al.*, 1998). No entanto, *T. vaporariorum* é a que apresenta menor eficiência na transmissão de ToCV. Wintermantel & Wisler (2006) obtiveram uma eficiência de transmissão após 24h de aquisição do vírus com alta infestação (40 moscas-brancas/planta) próximo de 100% para *B. tabaci* biótipo B e *T. abutilonea*. Para *B. tabaci* biótipo A e *T. vaporariorum*, esses valores foram de 74% e 34%, respectivamente.

O ToCV foi relatado também em outras culturas. No Brasil, a infecção natural de ToCV foi confirmada nas culturas da batata (*Solanum tuberosum* cv. Ágata), berinjela (*Solanum melongena*) e jiló (*Solanum aethiopicum*) (Fonseca *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2012). Experimentalmente, Wintermantel & Wisler(2006) mostraram a transmissão do ToCV para 22 espécies de plantas daninhas nos Estados Unidos. Recentemente, em estufas da Coreia do Sul, a infecção natural do ToCV foi relatada em 17 espécies de plantas daninhas, pertencentes a dez famílias, sendo uma espécie de ciclo perene (Kil *et al.*, 2015).

O ToCV foi identificado pela primeira vez em 1996 na Flórida, EUA (Wisler *et al.*, 1998). Na Grécia, em 1997, já eram observados os sintomas causados pelo vírus e até 2001 a doença disseminou-se, apresentando incidência de até 100% em plantações de tomate. A detecção do ToCV, associado a plantas sintomáticas, só ocorreu em 2002, utilizando os primers específicos TOC-5 e TOC-6 (Dovas *et al.*, 2002). Em 2005, a sequência nucleotídica completa do ToCV foi determinada e comparada a outras espécies de crinivírus (Wintermantel *et al.*, 2005).

O ToCV foi relatado também em Portugal (Louro *et al.*, 2000), Espanha (Navas-Castillo *et al.*, 2000), Porto Rico (Wintermantel *et al.*, 2001), Itália (Accotto *et al.*, 2001), Taiwan (Tsai *et al.*, 2004), Israel (Segev *et al.*, 2004), Líbano (Abou-Jawdah *et al.*, 2006), Turquia (Cevik & Erkis, 2008), Cuba (Martinez-Zubiaur *et al.*, 2008), Ilhas Mayotte(Masse *et al.*, 2008), Ilhas Maurício (Lett *et al.*, 2009), Hungria (Bese *et al.*, 2011), Georgia (Sundaraj *et al.*, 2011) e Sudão (Fiallo-Olive *et al.*, 2011).

Atualmente, apenas cinco sequências completas do genoma do ToCV estão disponíveis no banco de dados. Os isolados com genoma caracterizado têm origem nos Estados Unidos (Wintermantel *et al.*, 2005), Espanha (Lozano *et al.*, 2006; 2007), Grécia(Kataya *et al.*, 2008), Brasil (Albuquerque *et al.*, 2013) e China (Zhao *et al.*, 2014a).

2.5 Diversidade genética de membros da Família *Closteroviridae*

Os vírus da família *Closteroviridae* são transmitidos por diferentes insetos vetores capazes de colonizar uma mesma planta hospedeira e causar infecções mistas que resultam em eventos de recombinação e/ou pseudorrecombinação entre diferentes isolados/espécies. Além disso, uma população viral pode gerar variáveis de uma mesma espécie (quasispecies) que podem melhorar a capacidade de reprodução e de adaptação desses vírus (Rubio *et al.*, 2013). Sendo assim, estudos de diversidade genética dos vírus são de extrema importância para a compreensão da evolução viral e como ocorrem essas relações.

Entre os vírus da família, o *Citrus tristeza virus* (CTV) é o mais bem estudado com >600 sequências nucleotídicas da CP de isolados de todo o mundo (Rubio *et al.*, 2013). Em relação à diversidade nucleotídica (π), valores relativamente baixos ($\pi=0,073$) foram encontrados para região da CP de isolados do CTV. No entanto, esse vírus apresenta uma alta variação genética entre isolados de todo o mundo, sendo já relatados oito grupos de sequências diferentes. Essa variação genética no CTV pode ser causada por fatores relacionados a plantas hospedeiras e/ou modo de transmissão. O CTV infecta plantas hospedeiras perenes, como os citrus, que podem ser infectados por muitos anos, além de ser também disseminado por propagação vegetativa (Xiao *et al.*, 2017). A propagação vegetativa de tecidos infectados e a introdução de novos genótipos de um vírus pelo vetor permitem que as populações virais aumentem sua complexidade. A infecção persistente de múltiplos genótipos virais dentro de uma mesma hospedeira estimula o surgimento de variantes de uma espécie, que podem evoluir para novas espécies (Weng *et al.*, 2007).

Estudos indicam que a maioria dos vírus da família *Closteroviridae* têm genomas conservados com baixa diversidade genética e forte pressão de seleção negativa (Garcia-Arenal *et al.*, 2001). Entre os ampelovírus, foram relatadas diversidades genéticas para região CP de *Pineapple mealy bug wilt-associated virus 1* (PMWaVs-1), *Grapevine leafroll-associated virus 5* (GLRaV-5) e *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) de 0,008, 0,058 e 0,0058, respectivamente (Rubio *et al.*, 2013). Para *Blackberry yellow vein-associated virus* (BYVaV), foi encontrada uma diversidade nucleotídica entre 0,007 e 0,12 para as regiões HSP70h, CP e CPM, todos sob pressão de seleção negativa (Poudel *et al.*, 2012).

Dentro da família *Closteroviridae*, as espécies do gênero *Crinivirus* têm os genomas mais conservados. Para *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), foi identificada uma baixa variabilidade nucleotídica ($\pi=0,00250$) entre isolados com separação temporal e geográfica, quando as regiões da CP e HSP70h foram analisadas (Rubio *et al.*, 2001). Posteriormente, essa baixa variabilidade ($\pi=0,001888$) do CYSDV também foi encontrada em populações infectando diferentes plantas hospedeiras para as regiões genômicas que codificam a CP, HSP70h, RdRp, p25 e p22 (Marco & Aranda, 2005). Estudos mostraram baixa diversidade para região da CPM de isolados de *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) obtidos da Itália, Espanha, França, Japão e Estados Unidos (Rubio *et al.*, 2013). Para *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), foi encontrada diversidade nucleotídica de 0,022, 0,043 e 0,0071 para os genes RNase3, p7 e p22, respectivamente. No entanto, interessantemente, apesar da baixa diversidade nucleotídica, foram encontradas altas diferenciações genéticas para a região 3' proximal entre isolados de diferentes regiões geográficas, sendo que para uma área foram identificados isolados que não codificavam a proteína p22. Nesse caso, as plantas hospedeiras apresentaram sintomas mais severos. Esses dados evidenciam a importância do estudo da variabilidade genética da p22 com isolados de diferentes regiões geográficas (Tugume *et al.*, 2013). O ToCV também apresenta baixos valores de diversidade nucleotídica, mas os estudos tiveram por base regiões que codificam a polimerase (*RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp), Hsp70h (heat shock protein) e CP (Barbosa *et al.*, 2013; Gharsallah *et al.*, 2015; Lozano *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2013). Sobre a variabilidade genética da p22 do ToCV, as informações ainda são escassas, resumidas basicamente a um estudo conduzido com isolados obtidos da Espanha (Landeo-Rios *et al.*, 2015). Além de a p22 ser descrita como uma proteína supressora do silenciamento gênico, ela está envolvida no processo da infecção sistêmica do vírus (Landeo-Rios *et al.*, 2016). Destarte, os estudos da variabilidade da p22 do ToCV são de extrema importância para a compreensão da evolução desse vírus e como informação para pesquisas de melhoramento genético.

2.6 Referências Bibliográficas

- Abou-Jawdah, Y., El Mohtar, C., Atamian, H. & Sobh, H. (2006).** First report of Tomato chlorosis virus in Lebanon. *Plant Disease***90**, 378-378.
- Accotto, G. P., Vaira, A. M., Vecchiati, M., Sialer, M. M. F., Gallitelli, D. & Davino, M. (2001).** First Report of Tomato chlorosis virus in Italy. *Plant Disease***85**.
- AGRIANUAL (2015).** Anuário da agricultura brasileira, p. 472. Edited by F. Consultoria. São Paulo.
- Al Rwahnih, M., Dolja, V. V., Daubert, S., Koonin, E. V. & Rowhani, A. (2012).** Genomic and biological analysis of Grapevine leafroll-associated virus 7 reveals a possible new genus within the family Closteroviridae. *Virus Research***163**, 302-309.
- Albuquerque, L. C., Villanueva, F., Resende, R. O., Navas-Castillo, J., Barbosa, J. C. & Inoue-Nagata, A. K. (2013).** Molecular characterization reveals Brazilian Tomato chlorosis virus to be closely related to a Greek isolate. *Tropical Plant Pathology***38**, 332-336.
- Alvarenga, A. R. (2013).** Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia, p. 455. Edited by Lavras.
- Alzhanova, D. V., Napuli, A. J., Creamer, R. & Dolja, V. V. (2001).** Cell-to-cell movement and assembly of a plant closterovirus: roles for the capsid proteins and Hsp70 homolog. *Embo Journal***20**, 6997-7007.
- Barbosa, J. C., Costa, H., Gioria, R. & Rezende, J. A. M. (2011).** Occurrence of Tomato chlorosis virus in tomato crops in five Brazilian states. *Tropical Plant Pathology***36**, 256-258.
- Barbosa, J. C., Rezende, J. A. M. & Filho, A. B. (2013).** Low Genetic Diversity Suggests a Single Introduction and Recent Spread of Tomato chlorosis virus in Brazil. *Journal of Phytopathology***161**, 884-886.
- Barbosa, J. C., Teixeira, A. P. M., Moreira, A. G., Camargo, L. E. A., Bergamin, A., Kitajima, E. W. & Rezende, J. A. M. (2008).** First Report of Tomato chlorosis virus Infecting Tomato Crops in Brazil. *Plant Disease***92**, 1709-1709.
- Bedford, I. D., Briddon, R. W., Brown, J. K., Rosell, R. C. & Markham, P. G. (1994).** *Geminivirus*- Transmission and biological characterization of *Bemisia*

- tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Annals of Applied Biology* **125**, 311-325.
- Bese, G., Boka, K., Krizbai, L. & Takacs, A. (2011).** First Report of Tomato chlorosis virus in Tomato from Hungary. *Plant Disease* **95**, 363-363.
- Canizares, M. C., Navas-Castillo, J. & Moriones, E. (2008).** Multiple suppressors of RNA silencing encoded by both genomic RNAs of the crinivirus, Tomato chlorosis virus. *Virology* **379**, 168-174.
- Cevik, B. & Erkis, G. (2008).** First report of Tomato chlorosis virus in Turkey. *Plant Pathology* **57**, 767-767.
- Dolja, V. V., Kreuze, J. F. & Valkonen, J. P. T. (2006).** Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Research* **117**, 38-51.
- Domingo, E., Sheldon, J. & Perales, C. (2012).** Viral Quasispecies Evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**, 159-216.
- Dovas, C. I., Katis, N. I. & Avgelis, A. D. (2002).** Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. *Plant Disease* **86**, 1345-1349.
- Edgar, R. C. (2004).** MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *Bmc Bioinformatics* **5**, 1-19.
- Fiallo-Olive, E., Hamed, A. A., Moriones, E. & Navas-Castillo, J. (2011).** First Report of Tomato chlorosis virus Infecting Tomato in Sudan. *Plant Disease* **95**, 1592-1592.
- Filgueira, F. A. R. (2008).** Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. , 3 edn, p. 421. Edited by UFV. Viçosa.
- Fonseca, M. E. N., Boiteux, L. S., Abreu, H., Nogueira, I. & Pereira-Carvalho, R. C. (2013).** *Physalis angulata*: A New Natural Host of Tomato chlorosis virus in Brazil. *Plant Disease* **97**, 692-692.
- Fonseca, M. E. N., Boiteux, L. S., Lima, M. F., Mendonca, J. L., Costa, A. F., Fontes, M. G., Costa, H. & Gonzalez-Arcos, M. (2016).** First Report of Tomato chlorosis virus Infecting Eggplant and Scarlet Eggplant in Brazil. *Plant Disease* **100**, 867-868.
- Freitas, D. M. S., Nardin, I., Shimoyama, N., Souza-Dias, J. A. C. & Rezende, J. A. M. (2012).** First Report of Tomato chlorosis virus in Potato in Brazil. *Plant Disease* **96**, 593-594.

- Garcia-Arenal, F., Fraile, A. & Malpica, J. M. (2001).**Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology***39**, 157-186.
- Gharsallah, C., Ben Halima, A., Fakhfakh, H. & Gorsane, F. (2015).** Insights into the genetic diversity and the phylogenetic analysis of Tunisian isolates of Tomato chlorosis virus. *Phytoparasitica***43**, 87-96.
- IBGE (2016).** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. In *Levantamento Sistemático da produção agrícola Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil* pp. 78-79. Edited by IBGE. Rio de Janeiro.
- ICTV.***International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) [Online]. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Consultado em 12 mai. 2017.
- Jones, D. R. (2003)** Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* 109, 195–219.
- Kataya, A. R. A., Stavridou, E., Farhan, K. & Livieratos, I. C. (2008).**Nucleotide sequence analysis and detection of a Greek isolate of Tomato chlorosis virus. *Plant Pathology***57**, 819-824.
- Kil, E. J., Lee, Y. J., Cho, S., Auh, C. K., Kim, D., Lee, K. Y., Kim, M. K., Choi, H. S., Kim, C. S. & Lee, S. (2015).** Identification of natural weed hosts of Tomato chlorosis virus in Korea by RT-PCR with root tissues. *European Journal of Plant Pathology***142**, 419-426.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016).** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution***33**, 1870-1874.
- Landeo-Rios, Y., Navas-Castillo, J., Moriones, E. & Canizares, M. C. (2016).** The p22 RNA silencing suppressor of the crinivirus Tomato chlorosis virus preferentially binds long dsRNAs preventing them from cleavage. *Virology***488**, 129-136.
- Landeo-Rios, Y. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E. & Canizares, M. C. (2015).**Genetic diversity and silencing suppression activity of the p22 protein of Tomato chlorosis virus isolates from tomato and sweet pepper. *Virus Genes***51**, 283-289.
- Lauring, A. S., Frydman, J. & Andino, R. (2013).** The role of mutational robustness in RNA virus evolution. *Nature Reviews Microbiology***11**, 327-336.

- Lett, J. M., Hoareau, M., Reynaud, B., Saison, A., Hostachy, B., Lobin, K. & Benimadhu, S. P. (2009).** First Report of Tomato chlorosis virus in Tomato on Mauritius Island. *Plant Disease***93**, 111-111.
- Livieratos, I. C., Eliasco, E., Muller, G., Olsthoorn, R. C., Salazar, L. F., Pleij, C. W. & Coutts, R. H. (2004).** Analysis of the RNA of Potato yellow vein virus: evidence for a tripartite genome. *Journal of General Virology***85** (7).
- Louro, D., Accotto, G. P. & Vaira, A. M. (2000).** Occurrence and diagnosis of Tomato chlorosis virus in Portugal. *European Journal of Plant Pathology***106**, 589-592.
- Lozano, G., Grande-Perez, A. & Navas-Castillo, J. (2009).** Populations of Genomic RNAs Devoted to the Replication or Spread of a Bipartite Plant Virus Differ in Genetic Structure. *Journal of Virology***83**, 12973-12983.
- Lozano, G., Moriones, E. & Navas-Castillo, J. (2006).** Complete nucleotide sequence of the RNA2 of the crinivirus tomato chlorosis virus. *Archives of Virology***151**, 581-587.
- Lozano, G., Moriones, E. & Navas-Castillo, J. (2007).** Complete sequence of the RNA1 of a European isolate of tomato chlorosis virus. *Archives of Virology***152**, 839-841.
- Macedo, M. A., Barreto, S. S., Hallwass, M. & Inoue-Nagata, A. K. (2014).** High incidence of Tomato chlorosis virus alone and in mixed infection with begomoviruses in two tomato fields in the Federal District and Goias state, Brazil. *Tropical Plant Pathology***39**, 449-452.
- Marco, C. F. & Aranda, M. A. (2005).** Genetic diversity of a natural population of Cucurbit yellow stunting disorder virus. *Journal of General Virology* **86**, 815-822.
- Martelli, G. P., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Agranovsky, A. A., Al Rwahnih, M., Dolja, V. V., Dovas, C. I., Fuchs, M., Gugerli, P., Hu, J. S., Jelkmann, W., Katis, N. I., Maliogka, V. I., Melzer, M. J., Menzel, W., Minafra, A., Rott, M. E., Rowhani, A., Sabanadzovic, S. & Saldarelli, P. (2012).** Taxonomic revision of the family *Closteroviridae* with special reference to the *Grapevine leafroll-associated* members of the genus *Ampelovirus* and the putative species unassigned to the family. *Journal of Plant Pathology* **94**, 7-19.
- Martinez-Zubiaur, Y., Fiallo-Olive, E., Carrillo-Tripp, J. & Rivera-Bustamante, R. (2008).** First report of Tomato chlorosis virus infecting tomato in single and

- mixed infections with Tomato yellow leaf curl virus in Cuba. *Plant Disease* **92**, 836-836.
- Masse, D., Lefevre, P., Delatte, H., Karime, A. L. A., Hostachy, B., Reynaud, B. & Lett, J. M. (2008).** Tomato chlorosis virus: first report in Mayotte Island. *Plant Pathology* **57**, 388-388.
- Navas-Castillo, J., Camero, R., Bueno, M. & Moriones, E. (2000).** Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain associated with infections of Tomato chlorosis virus. *Plant Disease* **84**, 835-837.
- Nuez, F. (1999).** Desarrollo de nuevos cultivares. In *El cultivo del tomate*, Madrid: Mundi-Prensa edn, pp. 625-669. Edited by F. Nuez. Madrid, España.
- Orfanidou, C. G., Dimitriou, C., Papayiannis, L. C., Maliogka, V. I. & Katis, N. I. (2014).** Epidemiology and genetic diversity of criniviruses associated with tomato yellows disease in Greece. *Virus Research* **186**, 120-129.
- Pond, S. L. K. & Frost, S. D. W. (2005).** Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics* **21**, 2531-2533.
- Poudel, B., Sabanadzovic, S., Bujarski, J. & Tzanetakis, I. E. (2012).** Population structure of Blackberry yellow vein associated virus, an emerging crinivirus. *Virus Research* **169**, 272-275.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. & Rozas, R. (2003).** DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**, 2496-2497.
- Rubio, L., Abou-Jawdah, Y., Lin, H. X. & Falk, B. W. (2001).** Geographically distant isolates of the crinivirus Cucurbit yellow stunting disorder virus show very low genetic diversity in the coat protein gene. *Journal of General Virology* **82**, 929-933.
- Rubio, L., Guerri, J. & Moreno, P. (2013).** Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family Closteroviridae. *Frontiers in Microbiology* **4**.
- Sanjuan, R. & Domingo-Calap, P. (2016).** Mechanisms of viral mutation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **73**, 4433-4448.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllon, M. A., Albiach-Marti, M. R., Rabindran, S. & Dawson, W. O. (2002).** The p23 protein of citrus tristeza virus controls asymmetrical RNA accumulation. *Journal of Virology* **76**, 473-483.
- Scheffler, K., Martin, D. P. & Seoighe, C. (2006).** Robust inference of positive selection from recombining coding sequences. *Bioinformatics* **22**, 2493-2499.

- Segev, L., Polston, J. E. & Lapidot, M. (2004).** First report of Tomato chlorosis virus in Israel. *Plant Disease* **88**, 1160-1160.
- Sundaraj, S., Srinivasan, R., Webster, C. G., Adkins, S., Perry, K. & Riley, D. (2011).** First Report of Tomato chlorosis virus Infecting Tomato in Georgia. *Plant Disease* **95**, 881-881.
- Tsai, W. S., Shih, S. L., Green, S. K., Hanson, P. & Liu, H. Y. (2004).** First report of the occurrence of Tomato chlorosis virus and Tomato infectious chlorosis virus in Taiwan. *Plant Disease* **88**, 311-311.
- Tugume, A. K., Amayo, R., Weinheimer, I., Mukasa, S. B., Rubaihayo, P. R. & Valkonen, J. P. T. (2013).** Genetic Variability and Evolutionary Implications of RNA Silencing Suppressor Genes in RNA1 of Sweet Potato Chlorotic Stunt Virus Isolates Infecting Sweetpotato and Related Wild Species. *PLoS One* **8**.
- Tzanetakis, I. E., Martin, R. R. & Wintermantel, W. M. (2013).** Epidemiology of criniviruses: an emerging problem in world agriculture. *Frontiers in Microbiology* **4**.
- Villas Bôas, G. L., França, F. H., Macedo, N. (2002).** Potencial biótico da mosca-branca *Bemisia argentifolii* a diferentes plantas hospedeiras. *Horticultura Brasileira* **20**, 71–79.
- Weng, Z. M., Barthelson, R., Gowda, S., Hilf, M. E., Dawson, W. O., Galbraith, D. W. & Xiong, Z. G. (2007).** Persistent Infection and Promiscuous Recombination of Multiple Genotypes of an RNA Virus within a Single Host Generate Extensive Diversity. *PLoS One* **2**.
- Wintermantel, W., Polston, J., Escudero, J. & Paoli, E. (2001).** First report of Tomato chlorosis virus in Puerto Rico. *Plant Disease* **85**, 228-228.
- Wintermantel, W. M. & Hladky, L. L. (2010).** Methods for detection and differentiation of existing and new crinivirus species through multiplex and degenerate primer RT-PCR. *Journal of Virological Methods* **170**, 106-114.
- Wintermantel, W. M. & Wisler, G. C. (2006).** Vector specificity, host range, and genetic diversity of Tomato chlorosis virus. *Plant Disease* **90**, 814-819.
- Wintermantel, W. M., Wisler, G. C., Anchieta, A. G., Liu, H. Y., Karasev, A. V. & Tzanetakis, I. E. (2005).** The complete nucleotide sequence and genome organization of tomato chlorosis virus. *Archives of Virology* **150**, 2287-2298.

- Wisler, G. C., Li, R. H., Liu, H. Y., Lowry, D. S. & Duffus, J. E. (1998).** Tomato chlorosis virus: A new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology* **88**, 402-409.
- Xiao, C., Yao, R. X., Li, F., Dai, S. M., Licciardello, G., Catara, A., Gentile, A. & Deng, Z. N. (2017).** Population structure and diversity of citrus tristeza virus (CTV) isolates in Hunan province, China. *Archives of Virology* **162**, 409-423.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. & Madden, T. L. (2012).** Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *Bmc Bioinformatics* **13**.
- Zhao, L. M., Li, G., Gao, Y., Liu, Y. J., Sun, G. Z. & Zhu, X. P. (2014a).** Molecular Detection and Complete Genome Sequences of Tomato chlorosis virus Isolates from Infectious Outbreaks in China. *Journal of Phytopathology* **162**, 627-634.
- Zhao, R., Wang, N., Wang, R., Chen, H., Shi, Y., Fan, Z. & Zhou, T. (2014b).** Characterization and full genome sequence analysis of a Chinese isolate of tomato chlorosis virus. *Acta Virologica* **58**, 92-94.

3. CAPÍTULO I

Diversidade genética de populações de *Tomato chlorosis virus* em tomateiro, baseada no gene da proteína p22

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

RESUMO: *Tomato chlorosis virus* (ToCV), gênero *Crinivirus*, família *Closteroviridae*, é transmitido por algumas espécies de mosca-branca e tem genoma bipartido de RNA fita simples de sentido positivo (RNA1 e RNA2). Assim como outros crinivírus com genoma bipartido, o ToCV codifica uma proteína envolvida na supressão de silenciamento gênico (p22), localizada na região 3' proximal do RNA1. Neste estudo, um total de 28 clones do gene da p22 foi obtido de amostras de tomateiro coletadas nos estados de Goiás (GO), Paraná (PR) e Rio de Janeiro (RJ). As sequências nucleotídicas dos clones foram analisadas juntamente com outras sequências obtidas do banco de dados para determinar a estrutura genética das populações de ToCV. A análise filogenética desse conjunto de dados mostrou que os isolados do Brasil formam um grupo monofilético, com uma evidência de estruturação baseada na origem geográfica. Entretanto, os principais indicadores de variabilidade genética mostram que a variabilidade na população e entre subpopulações de ToCV do Brasil é menor, se comparada à variabilidade de outros países. Há evidências de pressão de seleção positiva para a subpopulação do PR, no entanto, a seleção negativa parece ser predominante, indicando que uma seleção purificadora pode estar atuando na

manutenção da sequência de aminoácidos da p22, conservando sua integridade e, conseqüentemente, sua atividade de supressora de silenciamento gênico.

PALAVRAS-CHAVE: *Crinivirus*; *Closteroviridae*; p22; *Solanum lycopersicum*; ToCV; Supressor de silenciamento gênico.

ABSTRACT: *Tomato chlorosis virus* (ToCV) *Crinivirus* genus, *Closteroviridae* family, is transmitted by some whitefly species and has bipartite genome of single tapes RNA of positive-sense (RNA1 e RNA2). As well as other criniviruses with bipartite genome, ToCV encodes a protein involved in gene silencing suppression (p22) located at the proximal 3' genomic region of RNA1. In this study, a total of 28 clones of the p22 gene were obtained from tomato plant samples collected in the states of Goiás (GO), Paraná (PR), and Rio de Janeiro (RJ), Brazil. The nucleotide sequences of the clones were analyzed with other sequences obtained from GenBank to determine the genetic structure of the ToCV populations. The phylogenetic analysis of this data set showed that Brazilian isolates form a monophyletic group with evident structure on the basis of geographic origin. However, the main indicators of genetic variability showed that the variability in the population and among ToCV subpopulations of Brazil is smaller, when compared to other countries. There are evidences of positive selection pressure for the PR subpopulation; however, negative selection seems to be predominant, indicating that a purifying selection may be acting to maintain the amino acid sequence of p22, preserving its integrity and, consequently, its gene silencing suppressor activity.

KEYWORDS: *Crinivirus*; *Closteroviridae*; Gene silencing supressor; p22; *Solanum lycopersicum*; ToCV.

3.1. INTRODUÇÃO

Tomato chlorosis virus (ToCV), gênero *Crinivirus*, família *Closteroviridae*, causa sintoma característico na planta de clorose internerval, especialmente nas folhas baixas, resultando na diminuição da produtividade (Wintermantel *et al.*, 2005). O ToCV foi descrito pela primeira vez em 1998 na Flórida, EUA (Wisler *et al.*, 1998) e, atualmente, está disseminado nas Américas (Martinez-Zubiaur *et al.*, 2008) Europa (Bese *et al.*, 2011), Ásia (Sundaraj *et al.*, 2011) e África (Fiallo-Olive *et al.*, 2011). No Brasil, o ToCV foi detectado em 2006 em Sumaré, São Paulo (Barbosa *et al.*, 2008).

Posteriormente, ele foi relatado na Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Barbosa *et al.*, 2011). Em decorrência da alta eficiência na transmissão (Wintermantel & Wisler, 2006) e disseminação da mosca-branca, o ToCV está presente em grande parte das áreas de produção de tomate no país. Além do tomateiro, o ToCV também foi relatado infectando, naturalmente, no Brasil, batata (*Solanum tuberosum*) (Freitas *et al.*, 2012), berinjela (*Solanum melongena*) e jiló (*Solanum aethiopicum*) (Fonseca *et al.*, 2016).

O ToCV é transmitido na natureza pelas espécies de mosca-branca *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum* e *T. Abutilonea*, de maneira semipersistente (Wisler *et al.*, 1998). O genoma do ToCV é constituído por RNA bipartido de fita simples, senso positivo, RNA1 (8595 nucleotídeos, nt) e RNA2 (8247 nt), encapsidados separadamente em partículas alongadas e flexuosas (Wintermantel *et al.*, 2005). O RNA1 codifica proteínas envolvidas na replicação do RNA e na supressão do silenciamento gênico, enquanto o RNA2 codifica proteínas envolvidas no movimento, encapsidação e transmissão do vírus pelo inseto vetor (Canizares *et al.*, 2008; Dolja *et al.*, 2006).

Assim como outras espécies da família *Closteroviridae*, como *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) e *Citrus tristeza virus* (CTV) (Satyanarayana *et al.*, 2002; Tugume *et al.*, 2013), o ToCV codifica múltiplos supressores de silenciamento de RNA: a proteína p22, localizada na região 3' proximal no RNA1, a capa proteica (CP) e a capa proteica menor (CPm) no RNA2. Entre essas, a proteína p22 é uma eficiente supressora de silenciamento gênico local, quando expressada em *Nicotiana benthamiana*, (Canizares *et al.*, 2008), e a região 3' proximal do RNA1, onde está localizada a p22, é descrita como uma região com alta variabilidade genética para membros da família *Closteroviridae* (Dolja *et al.*, 2006; Tugume *et al.*, 2013). Para o ToCV, estudos de variabilidade genética têm tido por base as regiões que codificam a polimerase (*RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp), Hsp70h (*heat shock protein*) e CP (Barbosa *et al.*, 2013; Gharsallah *et al.*, 2015; Lozano *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2013). No entanto, informações sobre a variabilidade genética da p22 do ToCV são escassas, resumidas basicamente a um estudo conduzido com isolados obtidos da Espanha (Landeo-Rios *et al.*, 2015). Neste estudo, isolados de ToCV obtidos de amostras de tomateiro coletadas no Brasil foram analisados e comparados a isolados de outros países para determinar sua estrutura populacional com base na sequência nucleotídica completa do gene da p22.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta das amostras. Em 2015 e 2016, foram coletadas 66 amostras foliares de tomateiro apresentando sintoma de clorose internerval, característico da infecção causada por ToCV, em áreas produtoras nos estados de Goiás (município de Morrinhos, n=14), Rio de Janeiro (municípios de Paty do Alfares e Vassouras, n=24) e Paraná (município de Faxinal, n=28).

Deteção viral. A extração do RNA total das amostras foi feita de 100 mg de tecido foliar, utilizando o reagente Trizol (Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). O RNA obtido foi ressuspendido em 30 µl de H₂O Milli-Q, tratado com DEPC (*Diethyl pyrocarbonate*) e armazenado a -20°C. A deteção de ToCV foi feita por RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*), usando o par de primers específico ToC-5 e ToC6 (Dovas *et al.*, 2002).

Seleção dos isolados e amplificação da região de interesse. Foram selecionados 28 isolados de ToCV (RJ, n=10; GO, n=10; e PR, n=8) para amplificação da sequência completa do gene que codifica a proteína p22. Primers foram desenhados nas regiões 3' da ORF1b e 5' da ORF3. Para isso, as sequências completas do componente genômico RNA1 dos isolados do Brasil (Albuquerque *et al.*, 2013), Estados Unidos (Wintermantel *et al.*, 2005), Espanha (Lozano *et al.*, 2007), Grécia (Kataya *et al.*, 2008) e China (Zhao *et al.*, 2014b) foram alinhadas, e as sequências dos primers específicos foram obtidas usando o programa Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012). Os primers foram sintetizados pela empresa Macrogen Inc. (Seoul, Coreia do Sul) e denominados IFP22F [(+)5'-ATGCAGCGTTGTGTTATATTCAT-3'] e IFP22R [(-)5'-ATCGCAAGCAAACGATCACC-3'], alinhando nas posições 7566 e 8286, respectivamente, para amplificar um fragmento de 720 nucleotídeos. O gene da p22 foi escolhido para análise por estar envolvido no processo de supressão dos mecanismos de defesa do hospedeiro e, portanto, provavelmente submetido a uma forte pressão de seleção. Adicionalmente, o gene da p22 está localizado próximo à região 3' do RNA1, descrita para outros membros da família como uma região com alta variabilidade genética (Dolja *et al.*, 2006).

Amplificação da sequência alvo. A síntese do cDNA de cada isolado foi feita por meio da reação contendo 1 µl do RNA total, 0,5 µl de dNTP (10 mM), 0,5 µl do primer IFP22R (10 µM) e 4,5 µl de H₂O Milli-Q DEPC. A reação foi mantida a 65°C por 5 minutos para o anelamento do primer e mantida em gelo pelo mesmo tempo. Em seguida, foram adicionados à reação 2µl de tampão 5X, 0,5 µl DTT (0,1 mM), 0,5 µl de M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/µl, Invitrogen), 0,5 µl de RNAase inibidor (40 U/µl, Invitrogen) e misturados gentilmente. Imediatamente, a reação foi mantida a 37°C por 50 minutos, seguida por uma incubação a 70°C por 15 minutos. Dois microlitros do cDNA foram usados para a PCR com volume final de 50 µl com 5 µl de tampão 10X, 1 µl de dNTP (10 mM), 1,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl do primer IFP22R (10 µM), 1 µl do primer IFP22F (10µM) e 0,2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As condições da PCR foram as seguintes: uma desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida por 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 1,5 minutos, finalizando com uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, e os fragmentos de tamanho esperado (720 pb) foram visualizados usando brometo de etídio. Os fragmentos foram purificados utilizando Kit Intron Biotechnology (Seongnam, Coreia do Sul) e eluídos em 33 µl.

Clonagem. Os produtos da PCR foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega), introduzidos em células competentes de *Escherichia coli* XL1- Blue por transformação e os insertos foram sequenciados pela empresa Macrogen Inc. (Seoul, Coreia do Sul).

Análises das sequências. As sequências nucleotídicas obtidas foram alinhadas usando o software Muscle (Edgar, 2004) e as sequências das extremidades correspondentes a ORF1b e ORF3 foram eliminadas. As sequências nucleotídicas resultantes foram submetidas à análise usando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool-<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para confirmação da identidade com a p22 de ToCV, e MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016), para as comparações par a par de sequências nucleotídicas. As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos da p22 do ToCV foram alinhadas usando o mesmo programa e avaliadas visualmente.

Análise da variabilidade genética e pressão de seleção. A variabilidade genética e as inferências sobre a estrutura populacional foram calculadas usando o programa DnaSP

v.5.10 (Rozas *et al.*, 2003). As subpopulações foram analisadas de acordo com a origem geográfica, e os principais indicadores de variabilidade genética foram quantificados: número total de mutações (Eta), número médio de diferenças nucleotídicas entre as sequências (K), diversidade nucleotídica (π), número de haplótipos (h) e diversidade haplotípica (Hd). O índice Nst foi utilizado para estimar o grau de diferenciação genética entre as subpopulações. Para estimar os números de substituições não sinônimas por substituições sinônimas (d_N/d_S), foi empregado o método Single Likelihood Ancestor Counting (SLAC) (Pond & Frost, 2005; Scheffler *et al.*, 2006), disponível no Data Monkey (<http://www.datamonkey.org>).

Análise Filogenética. A árvore filogenética foi construída por inferência Bayesiana, utilizando o programa MrBayes 3.0 com os modelos selecionados por mrmodeltest2 no Akaike Information Criterion (AIC). A análise foi conduzida executando pelo menos 20.000.000 gerações. A árvore filogenética foi visualizada e editada, usando FigTree 1.3(<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

3.3. RESULTADOS

Deteção de ToCV em plantas de tomateiro e clonagem. Um total de 66 amostras foliares de plantas apresentando sintomas típicos de infecção por ToCV, Figura 1, foram coletadas, nos anos de 2015 e 2016, em municípios de três estados do Brasil - Goiás (GO), Rio de Janeiro (RJ) e Paraná (PR) - com distâncias aproximadas entre 735km e 804km (Figura 2). Dessas 66 amostras, 60 foram positivas (14/14 de GO, 18/24 do RJ e 28/28 do PR) para ToCV, com a amplificação de um fragmento de DNA do tamanho esperado de 463 pares de bases (pb). Tendo como referência essas amostras, 28 clones contendo a sequência nucleotídica completa da proteína p22 foram obtidos e sequenciados, sendo 10 de GO, 10 do RJ e 8 do PR (Tabela 1). As sequências nucleotídicas completas da p22 dos 28 isolados foram depositadas no banco de dados público (GenBank) com os números de acesso apresentados na Tabela 1. Tendo como base as análises feitas no BLAST e de comparação par a par, os isolados obtidos nesse estudo apresentaram identidade nucleotídica >99,1% entre eles e >96,5% com as sequências obtidas do GenBank e de aminoácidos >98,4% e >94,6%, respectivamente. As sequências desse estudo, Tabela 1, foram combinadas com outras sequências nucleotídicas da p22, obtidas do GenBank, Tabela 2, para as análises subsequentes.

Variabilidade Genética das populações. Três subpopulações brasileiras foram analisadas: GO, PR e RJ. Adicionalmente, três conjuntos de dados, representando as populações do Brasil (BRA), Coreia do Sul (KOR) e Espanha (ESP), também foram analisados. As populações da KOR e da ESP foram escolhidas por apresentarem um número significativo de sequências ($n > 8$) disponíveis no GenBank. A análise do conjunto de dados descrita como total inclui as sequências de isolados do Brasil, Coreia do Sul, Espanha, Estados Unidos, Grécia e China. Quando a variabilidade genética foi estimada para as subpopulações do Brasil, GO apresentou valores significativamente inferiores para todos os indicadores, incluindo a diversidade nucleotídica ($\pi = 0,00069$), com valores aproximadamente 5 e 3 vezes menores que os observados para as subpopulações do PR e RJ, respectivamente, entretanto, com o número de haplótipos ($h = 3$) menor se comparado às duas outras subpopulações. Interessantemente, mesmo com o menor número de sequências analisadas ($n = 8$), a subpopulação do PR apresentou a maior diversidade genética ($\pi = 0,00350$) e número de haplótipos ($h = 7$), seguida pelo RJ ($\pi = 0,00206$ e $h = 6$). Com exceção dos isolados de GO, a variabilidade genética dessas subpopulações foi próxima à variabilidade calculada para todos os isolados do Brasil (BRA, $\pi = 0,00279$). Quando comparada aos outros países, a população do BRA foi menos variável do que as populações da ESP ($\pi = 0,01591$) e da KOR ($\pi = 0,00506$) (Tabela 3).

O alinhamento das sequências dos aminoácidos da p22 do ToCV indica a existência de dois tipos de sequências (Tipo I e Tipo II) com base nas posições 58, 63, 125, 133, 167 e 180. Assim, as sequências do tipo I apresentam a composição L-V-G-V-L-Y e são exclusivas de alguns isolados da Espanha (Figura 3). O tipo II, que envolve os demais isolados, é composto por M-A-S-I-S-H, com exceção dos isolados NJ, PRIF240, ToCV-BJ, HS e JJ. Para os isolados espanhóis, que fazem parte do tipo II, é evidenciada uma alteração no aminoácido 144 (L→F). O alinhamento indica ainda uma alteração no aminoácido 154 (I→T) para todos os isolados do Brasil, alguns da Coreia do Sul (YG, HP, JN1, IS17 e IS29) e um isolado chinês (SDSG). Três isolados do Paraná (PRIF247, PRIF 247b e PRIF256) apresentaram uma diferenciação na posição do aminoácido 115 (M→L) (Figura 3).

O alinhamento das sequências dos nucleotídeos indica algumas mutações sinônimas significativas. Todos os isolados brasileiros apresentam uma mutação sinônima no nucleotídeo 264 (A→G) em diferenciação aos isolados de outros países.

Dentro dos isolados do Brasil, todos os isolados do RJ apresentaram uma mutação sinônima na posição do nucleotídeo 177 (A→G) (Figura 4).

Relações filogenéticas dos isolados de ToCV. A árvore filogenética construída por inferência bayesiana, baseada na sequência de nucleotídeos que codifica a proteína p22 do ToCV, mostra que os isolados são divididos claramente em dois grupos (Figura 5). Em um grupo, estão apenas os isolados da Espanha (Tipo I), e no outro, estão os isolados com origem em vários países, incluindo o Brasil (Tipo II). Os isolados do Brasil formam um grupo monofilético com uma evidência de estruturação baseada na origem geográfica. A análise filogenética não indica nenhuma evidência de estruturação baseada na localização entre isolados da subpopulação GO e a subpopulação PR, exceto pela existência de três isolados do PR (PRIF247, PRIF247b e PRIF256), que aparecem separados dos demais. Esse resultado foi confirmado pelo teste Nst ($Nst=0,08033$), que indica que as subpopulações GO e PR apresentam uma baixa diferenciação genética (Tabela 4). Em contrapartida, para a subpopulação RJ, a árvore filogenética apresenta uma forte evidência de estruturação baseada na origem geográfica com todos os isolados RJ sendo agrupados separadamente. Com base nas análises Nst, a subpopulação RJ apresenta uma forte diferenciação genética em relação às subpopulações GO ($Nst= 0,55579$) e PR ($Nst=0,40684$). A população BR apresenta uma diferenciação genética moderada da população KOR ($Nst= 0,09711$) e alta da população ESP ($Nst=0,46979$).

Testes da Pressão de seleção. O número de substituições não sinônimas (d_{NS}) por sinônimas (d_S) foi usado para indicar a pressão de seleção no gene da proteína p22. Regiões codantes estão sob pressão de seleção positiva quando $d_{NS}/d_S > 1$, neutralidade $d_{NS}/d_S = 1$ e sob pressão de seleção negativa quando $d_{NS}/d_S < 1$. Valores de d_{NS}/d_S inferiores a 1 foram encontrados para quase todas as subpopulações, com exceção da subpopulação PR, que apresentou seleção positiva. Mesmo com evidências de seleção positiva na subpopulação PR, a seleção negativa foi predominante (Tabela 5).

3.4. DISCUSSÃO

O aumento das criniviroses em plantas de importância econômica durante as últimas décadas está intimamente relacionado à expansão e ao aumento das populações

de mosca-branca em áreas cultivadas em todo o mundo. A expansão rápida da mosca-branca e o impacto das viroses por ela transmitida na produção vegetal levaram a uma necessidade de estudos sobre a epidemiologia das doenças e à busca por estratégias de manejo adequadas e efetivas (Wintermantel & Hladky, 2010). No Brasil, o ToCV é a única espécie do gênero *Crinivirus* descrita até o momento, infectando o tomateiro. Após seu primeiro relato em 2006, o ToCV foi relatado em várias regiões do país (Barbosa *et al.*, 2011) e acredita-se que, atualmente, ele esteja disseminado por todas as áreas de produção de tomate.

O sucesso da infecção de ToCV em tomateiro pode estar relacionado à presença da proteína p22. Essa proteína de 22 kDa, codificada pelo RNA1, tem sido descrita como uma supressora de silenciamento gênico (Canizares *et al.*, 2008) e ainda parece ser importante para o sucesso da infecção sistêmica do vírus na planta (Landeo-Rios *et al.*, 2016). Portanto, essa é uma das proteínas que provavelmente estejam sob a ação de mecanismos, especialmente da mutação, que resultam na variabilidade genética em populações de ToCV. Com exceção de Landeo-Rios *et al.* (2015), que analisaram a variabilidade genética da sequência do gene da p22 de isolados obtidos apenas na Espanha, não há informação sobre a variabilidade genética e a estrutura populacional de ToCV em tomateiro, com base na sequência da p22. Neste estudo, com base na sequência nucleotídica e de aminoácidos da p22 do ToCV em tomateiro, foram analisados os principais indicadores de variabilidade genética em três subpopulações geograficamente distantes do Brasil (Goiás, Paraná e Rio de Janeiro) e, adicionalmente, a população de ToCV do Brasil foi comparada com outras duas populações, Espanha e Coreia do Sul.

Os vírus de RNA têm um alto potencial de gerar variabilidade genética em suas populações em decorrência de alguns fatores como ausência de um sistema de correção (proofreading) na polimerase e velocidade na replicação do genoma (Sanjuan & Domingo-Calap, 2016). Esse potencial é tão alto que isolados de uma mesma espécie não são representados por uma única sequência, mas por uma população de sequências mutantes, denominadas de quasispecies, que apresentam diferenças ao longo de uma sequência consenso (Domingo *et al.*, 2012). No entanto, a alta mutabilidade dos vírus de RNA não necessariamente resulta em uma alta variabilidade genética, isso porque fatores como a seleção natural e o efeito gargalo podem reduzir a variabilidade genética das populações (Lauring *et al.*, 2013). Esse fato foi observado nesse estudo, em que a população total de ToCV apresentou uma alta diversidade haplotípica ($Hd=0,933$) e, no

entanto, uma baixa diversidade de nucleotídeos ($\pi= 0,01046$) para a região da p22. Valores de baixas taxas de diversidades ($\pi= 0,011$ e $0,0123$) também foram observados quando a CP de isolados de ToCV obtidos de vários países foi analisada (Gharsallah *et al.*, 2015; Rubio *et al.*, 2013), indicando que tanto a p22 quanto a CP de ToCV apresentam uma diversidade genética muito próxima. Entre as subpopulações do Brasil, Goiás apresentou uma diversidade genética consideravelmente menor quando comparada às demais ($\pi= 0,00069$). Em outro estudo, com base na sequência da p22, conduzido com isolados obtidos de tomateiros de uma região de cultivo intensivo em Goiás, o valor da diversidade nucleotídica foi comparativamente mais alto ($\pi= 0,00272$) (dados não publicados). Assim, essa baixa diversidade nucleotídica encontrada para os isolados de Goiás pode ser atribuída à área de coleta, uma vez que nessa área não há histórico de vários ciclos de cultivo, reduzindo a manutenção da população viral, o número de ciclo de replicação e, conseqüentemente, o acúmulo de mutações ao longo do genoma.

A baixa variabilidade genética também foi relatada para outras espécies da família *Closteroviridae*. Dentro do gênero *Ampelovirus*, foram relatadas diversidades nucleotídicas para região CP de 0,008, 0,058 e 0,0058 para *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* (PMWaVs-1), *Grapevine leafroll-associated virus 5* (GLRaV-5) e *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3), respectivamente (Rubio *et al.*, 2001). Para o crinivírus *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), foi identificada uma baixa variabilidade nucleotídica, de 0,00250 e 0,00285 para as regiões CP e HSP70h, respectivamente, mesmo quando as populações foram analisadas com uma distância temporal e geográfica (Rubio *et al.*, 2001). Posteriormente, foram encontrados valores de diversidade genética entre 0,000321 e 0,001728 para isolados de diversas populações de CYSDV infectando diferentes plantas hospedeiras em um período de oito anos, e as regiões analisadas foram a CP, HSP70h, RdRp, p25 e p22 (Marco & Aranda, 2005). Para *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), foi encontrada diversidade nucleotídica de 0,022, 0,043 e 0,0071 para os genes RNase3, p7 e p22, respectivamente. Apesar da baixa diversidade nucleotídica, foram encontradas altas diferenciações genéticas para a região 3' proximal, com isolados que não codificam proteína p22. Nesse caso, as plantas hospedeiras apresentaram sintomas mais severos, evidenciando a importância do estudo da variabilidade genética dos vírus e da p22 (Tugume *et al.*, 2013). Entre os vírus da família, *Citrus tristeza virus* (CTV) é o mais bem estudado. Rubio *et al.* (2013) encontraram uma baixa variabilidade genética ($\pi=0,073$) para a CP

desse vírus, no entanto, foram identificados oito grupos de sequências em isolados de todo o mundo. Essa variabilidade genética encontrada em populações de CTV pode ser explicada por dois fatores: planta hospedeira e modo de transmissão. CTV tem plantas hospedeiras perenes que podem ser infectadas por muitos anos e também pode ser transmitido por propagação vegetativa, o que pode eliminar restrições seletivas relacionadas à transmissão pelo inseto vetor (Xiao *et al.*, 2017). A propagação vegetativa de tecidos infectados e a introdução de novos genótipos da espécie viral pelo vetor permitem que as populações virais aumentem sua complexidade ao longo do tempo, impulsionando o surgimento de novas variantes, que podem evoluir para novas espécies (Weng *et al.*, 2007).

A árvore filogenética mostra dois clados principais que sustentam a existência de subpopulações diferentes, denominadas Tipo I e Tipo II (Lozano *et al.*, 2009). Alguns isolados da Espanha formam o Tipo I e os demais isolados do mundo, incluindo os outros isolados da Espanha, formam o Tipo II. A mesma separação foi identificada para análises anteriores de sequências da p22 (Landeo-Rios *et al.*, 2015) e para análises da RdRp, também localizado no RNA1, de isolados de ToCV da Espanha (Lozano *et al.*, 2009). Com base no alinhamento dos aminoácidos da p22, Landeo-Rios *et al.* (2015) apresentaram uma composição de aminoácidos baseada nas posições 58, 63, 125, 133, 167 e 180: L-V-G-V-L-Y (Tipo I) e M-A-S-I-S-H (Tipo II). No entanto, os resultados apresentados aqui indicam uma composição mais complexa para os isolados pertencentes ao Tipo II. Diferentemente dos demais países, Brasil e Espanha apresentam populações de ToCV filogeneticamente bem estruturadas, baseadas nas posições 58, 63, 125, 133, 154, 167 e 180 (Brasil) e 58, 63, 125, 133, 144, 167 e 180 (Espanha). Assim, essas duas populações podem ser caracterizadas pela composição de aminoácidos M-A-S-I-T-S-H (Brasil) e M-A-S-I-F-S-H (Espanha). Alguns isolados da Coreia do Sul (YG, HP, JN1, IS17 e IS29) e um isolado da China (SDSG) também apresentaram alteração do aminoácido 154 (I→T), em relação aos demais isolados analisados, o que pode explicar uma menor diferenciação genética entre os isolados do Brasil e Coreia do Sul (Nst= 0,09711) do que entre Brasil e Espanha (Nst=0,46979). Análises no alinhamento das sequências nucleotídicas mostraram que os isolados do Brasil apresentam uma mutação sinônima na posição 264 (A→G), o que explica o grupo monofilético. Dentro desse grupo, há uma evidência de estruturação baseada na origem geográfica. Todos os isolados obtidos de amostras coletadas no Rio de Janeiro formam um grupo separado dos outros isolados do Brasil. Nesses isolados, foi identificada uma mutação sinônima

na posição 177 (A→G). Para a subpopulação do Paraná, três isolados (PRIF247, PRIF 247b e PRIF256) apresentaram uma alteração no aminoácido 115 (M→L) e aparecem em um ramo separado dos demais isolados do estado na árvore filogenética. Essa alteração pode explicar também a maior diversidade genética para essa subpopulação ($\pi= 0,00350$) em relação à população de Goiás ($\pi=0,00069$) e Rio de Janeiro ($\pi=0,00206$).

Os resultados de pressão de seleção indicam que uma seleção negativa ou purificadora ($d_{NS}/d_{SBras\grave{a}l}= 0,646$; $d_{NS}/d_{STotal}= 0,476$) pode estar atuando na manutenção da sequência de aminoácidos da p22 em populações de ToCV. Valores próximos de d_{NS}/d_S (0,324) também foram observados por Landeo-Rios *et al.*(2015) e confirmados nesse estudo. A pressão de seleção negativa na mesma ordem de grandeza também foi identificada para diferentes regiões do genoma de ToCV, RdRp e CP, com valores médios de d_{NS}/d_S de 0,110 e 0,115, respectivamente (Lozano *et al.*, 2009). Os resultados de baixa variabilidade nucleotídica e de pressão de seleção negativa indicam que o genoma do ToCV é muito estável, a exemplo do observado para *Blackberry yellow vein associated virus* (BYVaV), outro membro do gênero *Crinivirus* (Poudel *et al.*, 2012), e SPCSV (Tugume *et al.*, 2013).

O estudo da variabilidade genética do ToCV no Brasil é importante pelas condições próprias do país - clima, extensão geográfica, variedades utilizadas, sistema de cultivo -, que podem alterar a estrutura genética da população viral. O entendimento sobre a evolução do patógeno auxilia no direcionamento das pesquisas na área de melhoramento genético para obtenção de genótipos resistentes e, assim, no manejo da doença. Os trabalhos têm mostrado baixa diversidade genética para as populações de ToCV. Os resultados aqui apresentados, embora confirmem os baixos índices de diversidade genética, apontam para uma estruturação genética baseada na região geográfica. Destarte, é possível que, ao longo dos anos, populações de ToCV apresentem subpopulações com características genéticas específicas, que reflitam as condições do nicho ecológico onde estão inseridas. Atualmente, a pressão de seleção negativa (ou purificadora) parece ser a predominante nas populações de ToCV, atuando na manutenção da sequência de aminoácidos da p22, conservando sua integridade e, conseqüentemente, sua função como supressora de silenciamento gênico.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque, L. C., Villanueva, F., Resende, R. O., Navas-Castillo, J., Barbosa, J. C. & Inoue-Nagata, A. K. (2013).** Molecular characterization reveals Brazilian Tomato chlorosis virus to be closely related to a Greek isolate. *Tropical Plant Pathology* **38**, 332-336.
- Barbosa, J. C., Costa, H., Gioria, R. & Rezende, J. A. M. (2011).** Occurrence of Tomato chlorosis virus in tomato crops in five Brazilian states. *Tropical Plant Pathology* **36**, 256-258.
- Barbosa, J. C., Rezende, J. A. M. & Filho, A. B. (2013).** Low Genetic Diversity Suggests a Single Introduction and Recent Spread of Tomato chlorosis virus in Brazil. *Journal of Phytopathology* **161**, 884-886.
- Barbosa, J. C., Teixeira, A. P. M., Moreira, A. G., Camargo, L. E. A., Bergamin, A., Kitajima, E. W. & Rezende, J. A. M. (2008).** First Report of Tomato chlorosis virus Infecting Tomato Crops in Brazil. *Plant Disease* **92**, 1709-1709.
- Bese, G., Boka, K., Krizbai, L. & Takacs, A. (2011).** First Report of Tomato chlorosis virus in Tomato from Hungary. *Plant Disease* **95**, 363-363.
- Canizares, M. C., Navas-Castillo, J. & Moriones, E. (2008).** Multiple suppressors of RNA silencing encoded by both genomic RNAs of the crinivirus, Tomato chlorosis virus. *Virology* **379**, 168-174.
- Dolja, V. V., Kreuze, J. F. & Valkonen, J. P. T. (2006).** Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Research* **117**, 38-51.
- Domingo, E., Sheldon, J. & Perales, C. (2012).** Viral Quasispecies Evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**, 159-216.
- Dovas, C. I., Katis, N. I. & Avgelis, A. D. (2002).** Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. *Plant Disease* **86**, 1345-1349.
- Edgar, R. C. (2004).** MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *Bmc Bioinformatics* **5**, 1-19.
- Fiallo-Olive, E., Hamed, A. A., Moriones, E. & Navas-Castillo, J. (2011).** First Report of Tomato chlorosis virus Infecting Tomato in Sudan. *Plant Disease* **95**, 1592-1592.
- Fonseca, M. E. N., Boiteux, L. S., Lima, M. F., Mendonca, J. L., Costa, A. F., Fontes, M. G., Costa, H. & Gonzalez-Arcos, M. (2016).** First Report of

- Tomato chlorosis virus Infecting Eggplant and Scarlet Eggplant in Brazil. *Plant Disease* **100**, 867-868.
- Freitas, D. M. S., Nardin, I., Shimoyama, N., Souza-Dias, J. A. C. & Rezende, J. A. M. (2012).** First Report of Tomato chlorosis virus in Potato in Brazil. *Plant Disease* **96**, 593-594.
- Gharsallah, C., Ben Halima, A., Fakhfakh, H. & Gorsane, F. (2015).** Insights into the genetic diversity and the phylogenetic analysis of Tunisian isolates of Tomato chlorosis virus. *Phytoparasitica* **43**, 87-96.
- Karwitha M., Feng Z., Yao M., Chen X., Zhang W., Liu X., Tao X. (2014).** The complete nucleotide sequence of the RNA 1 of a Chinese isolate of Tomato chlorosis virus. *Journal of phytopathology* **162**, 411-415.
- Kataya, A. R. A., Stavridou, E., Farhan, K. & Livieratos, I. C. (2008).** Nucleotide sequence analysis and detection of a Greek isolate of Tomato chlorosis virus. *Plant Pathology* **57**, 819-824.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016).** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**, 1870-1874.
- Landeo-Rios, Y., Navas-Castillo, J., Moriones, E. & Canizares, M. C. (2016).** The p22 RNA silencing suppressor of the crinivirus Tomato chlorosis virus preferentially binds long dsRNAs preventing them from cleavage. *Virology* **488**, 129-136.
- Landeo-Rios, Y. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E. & Canizares, M. C. (2015).** Genetic diversity and silencing suppression activity of the p22 protein of Tomato chlorosis virus isolates from tomato and sweet pepper. *Virus Genes* **51**, 283-289.
- Lauring, A. S., Frydman, J. & Andino, R. (2013).** The role of mutational robustness in RNA virus evolution. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 327-336.
- Lozano, G., Grande-Perez, A. & Navas-Castillo, J. (2009).** Populations of Genomic RNAs Devoted to the Replication or Spread of a Bipartite Plant Virus Differ in Genetic Structure. *Journal of Virology* **83**, 12973-12983.
- Lozano, G., Moriones, E. & Navas-Castillo, J. (2007).** Complete sequence of the RNA1 of a European isolate of tomato chlorosis virus. *Archives of Virology* **152**, 839-841.

- Marco, C. F. & Aranda, M. A. (2005).** Genetic diversity of a natural population of Cucurbit yellow stunting disorder virus. *Journal of General Virology* **86**, 815-822.
- Martinez-Zubiaur, Y., Fiallo-Olive, E., Carrillo-Tripp, J. & Rivera-Bustamante, R. (2008).** First report of Tomato chlorosis virus infecting tomato in single and mixed infections with Tomato yellow leaf curl virus in Cuba. *Plant Disease* **92**, 836-836.
- Pond, S. L. K. & Frost, S. D. W. (2005).** Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics* **21**, 2531-2533.
- Poudel, B., Sabanadzovic, S., Bujarski, J. & Tzanetakis, I. E. (2012).** Population structure of Blackberry yellow vein associated virus, an emerging crinivirus. *Virus Research* **169**, 272-275.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. & Rozas, R. (2003).** DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**, 2496-2497.
- Rubio, L., Abou-Jawdah, Y., Lin, H. X. & Falk, B. W. (2001).** Geographically distant isolates of the crinivirus Cucurbit yellow stunting disorder virus show very low genetic diversity in the coat protein gene. *Journal of General Virology* **82**, 929-933.
- Rubio, L., Guerri, J. & Moreno, P. (2013).** Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family Closteroviridae. *Frontiers in Microbiology* **4**.
- Sanjuan, R. & Domingo-Calap, P. (2016).** Mechanisms of viral mutation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **73**, 4433-4448.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllon, M. A., Albiach-Marti, M. R., Rabindran, S. & Dawson, W. O. (2002).** The p23 protein of citrus tristeza virus controls asymmetrical RNA accumulation. *Journal of Virology* **76**, 473-483.
- Scheffler, K., Martin, D. P. & Seoighe, C. (2006).** Robust inference of positive selection from recombining coding sequences. *Bioinformatics* **22**, 2493-2499.
- Sundaraj, S., Srinivasan, R., Webster, C. G., Adkins, S., Perry, K. & Riley, D. (2011).** First Report of Tomato chlorosis virus Infecting Tomato in Georgia. *Plant Disease* **95**, 881-881.
- Tugume, A. K., Amayo, R., Weinheimer, I., Mukasa, S. B., Rubaihayo, P. R. & Valkonen, J. P. T. (2013).** Genetic Variability and Evolutionary Implications of

- RNA Silencing Suppressor Genes in RNA1 of Sweet Potato Chlorotic Stunt Virus Isolates Infecting Sweetpotato and Related Wild Species. *PLoS One* **8**.
- Weng, Z. M., Barthelson, R., Gowda, S., Hilf, M. E., Dawson, W. O., Galbraith, D. W. & Xiong, Z. G. (2007).** Persistent Infection and Promiscuous Recombination of Multiple Genotypes of an RNA Virus within a Single Host Generate Extensive Diversity. *PLoS One* **2**.
- Wintermantel, W. M. & Hladky, L. L. (2010).** Methods for detection and differentiation of existing and new crinivirus species through multiplex and degenerate primer RT-PCR. *Journal of Virological Methods* **170**, 106-114.
- Wintermantel, W. M., Wisler, G. C., Anchieta, A. G., Liu, H. Y., Karasev, A. V. & Tzanetakis, I. E. (2005).** The complete nucleotide sequence and genome organization of tomato chlorosis virus. *Archives of Virology* **150**, 2287-2298.
- Wisler, G. C., Li, R. H., Liu, H. Y., Lowry, D. S. & Duffus, J. E. (1998).** Tomato chlorosis virus: A new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology* **88**, 402-409.
- Xiao, C., Yao, R. X., Li, F., Dai, S. M., Licciardello, G., Catara, A., Gentile, A. & Deng, Z. N. (2017).** Population structure and diversity of citrus tristeza virus (CTV) isolates in Hunan province, China. *Archives of Virology* **162**, 409-423.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. & Madden, T. L. (2012).** Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *Bmc Bioinformatics* **13**.
- Zhao, R., Wang, N., Wang, R., Chen, H., Shi, Y., Fan, Z. & Zhou, T. (2014).** Characterization and full genome sequence analysis of a Chinese isolate of tomato chlorosis virus. *Acta Virologica* **58**, 92-94.
- Zhao L., Li G, Gao Y., Zhu Y.R., Liu J., Zhu X. (2015).** Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detecting tomato chlorosis virus. *Journal of virological methods* **213**, 93-97.

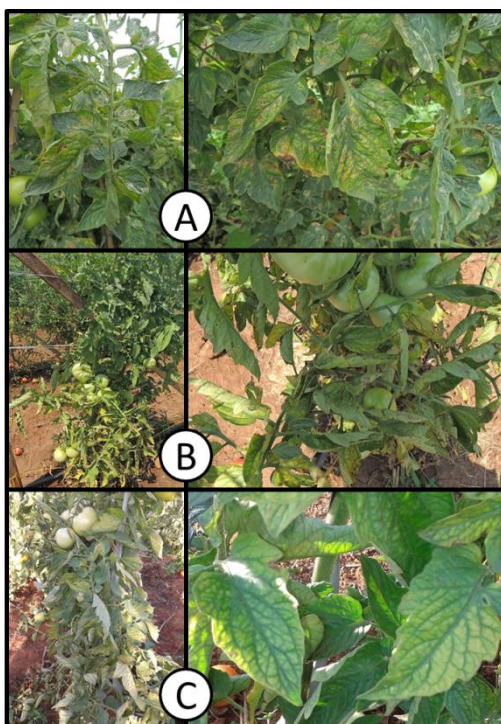


Figura 1. Plantas de tomateiros infectadas por *Tomato chlorosis virus* (ToCV), apresentando sintomas de clorose internerval nas folhas baixas e medianas. A- Vassouras, Rio de Janeiro. B- Faxinal, Paraná. C- Morrinhos, Goiás.



Figura 2. Mapa geográfico do Brasil, destacando, em vermelho, os estados de Goiás (GO), Rio de Janeiro (RJ) e Paraná (PR), onde as amostras foram coletadas para este estudo. Os pontos representam os municípios de Morrinhos, Vassouras, Paty do Alferes e Faxinal. As linhas que formam o triângulo indicam a distância entre os locais de coleta.

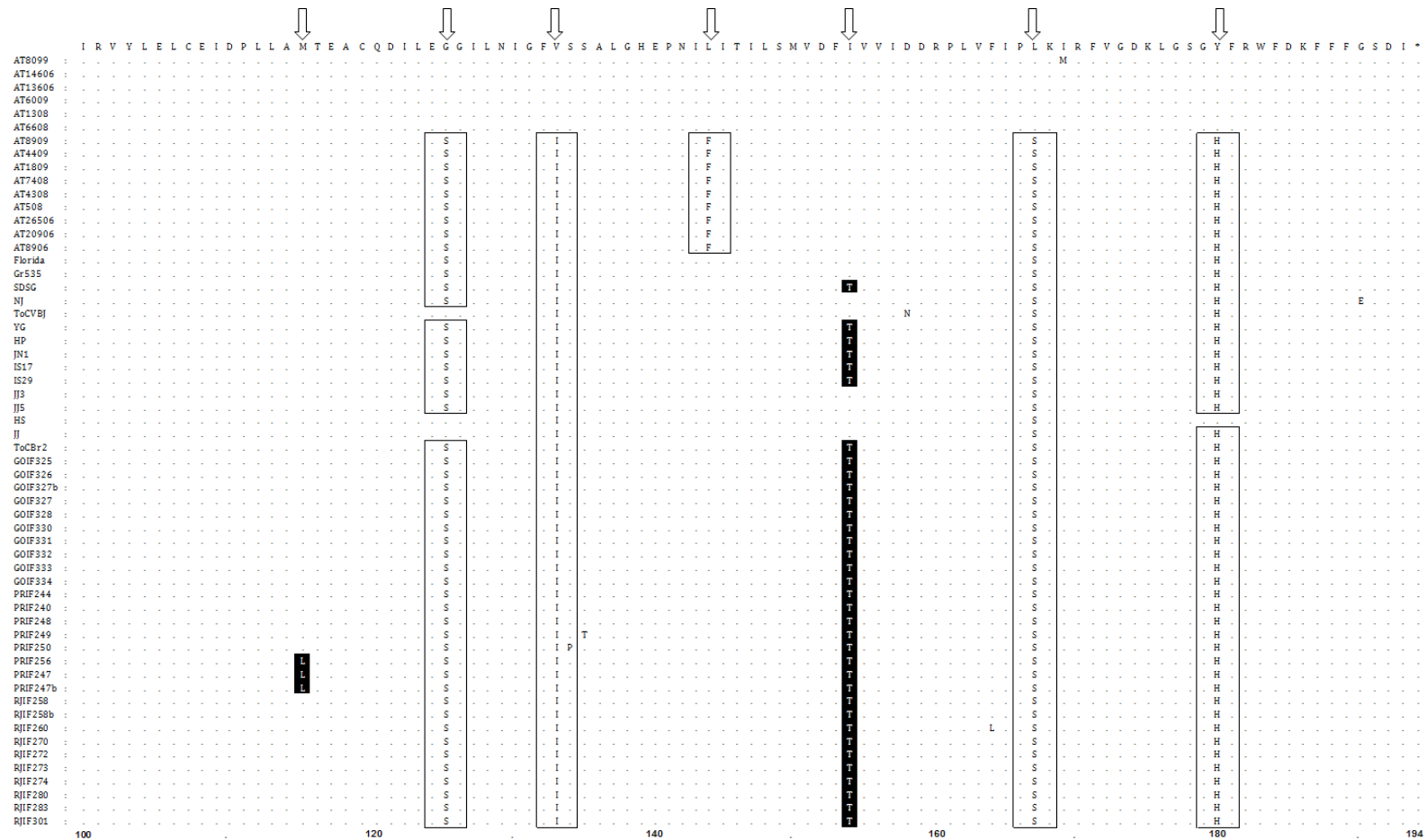


Figura 3. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína p22 de isolados de *Tomato chlorosis virus* usados neste estudo. Um consenso secundário da seqüência de aminoácidos é mostrado no topo. As seqüências para p22 de isolados da Coreia do Sul, Espanha, Estados Unidos, Grécia, China e Brasil disponíveis em bancos de dados também foram incluídas (Tabela 2). Os aminoácidos idênticos ao consenso são indicados por pontos. Os números na parte inferior dos alinhamentos indicam as posições dos aminoácidos. As setas indicam as principais mudanças dos aminoácidos que determinam as distâncias filogenéticas. Os aminoácidos em destaque preto indicam as diferenças para os isolados brasileiros, e as caixas indicam as principais mudanças nos aminoácidos que caracterizam os isolados do Tipo I e do Tipo II.

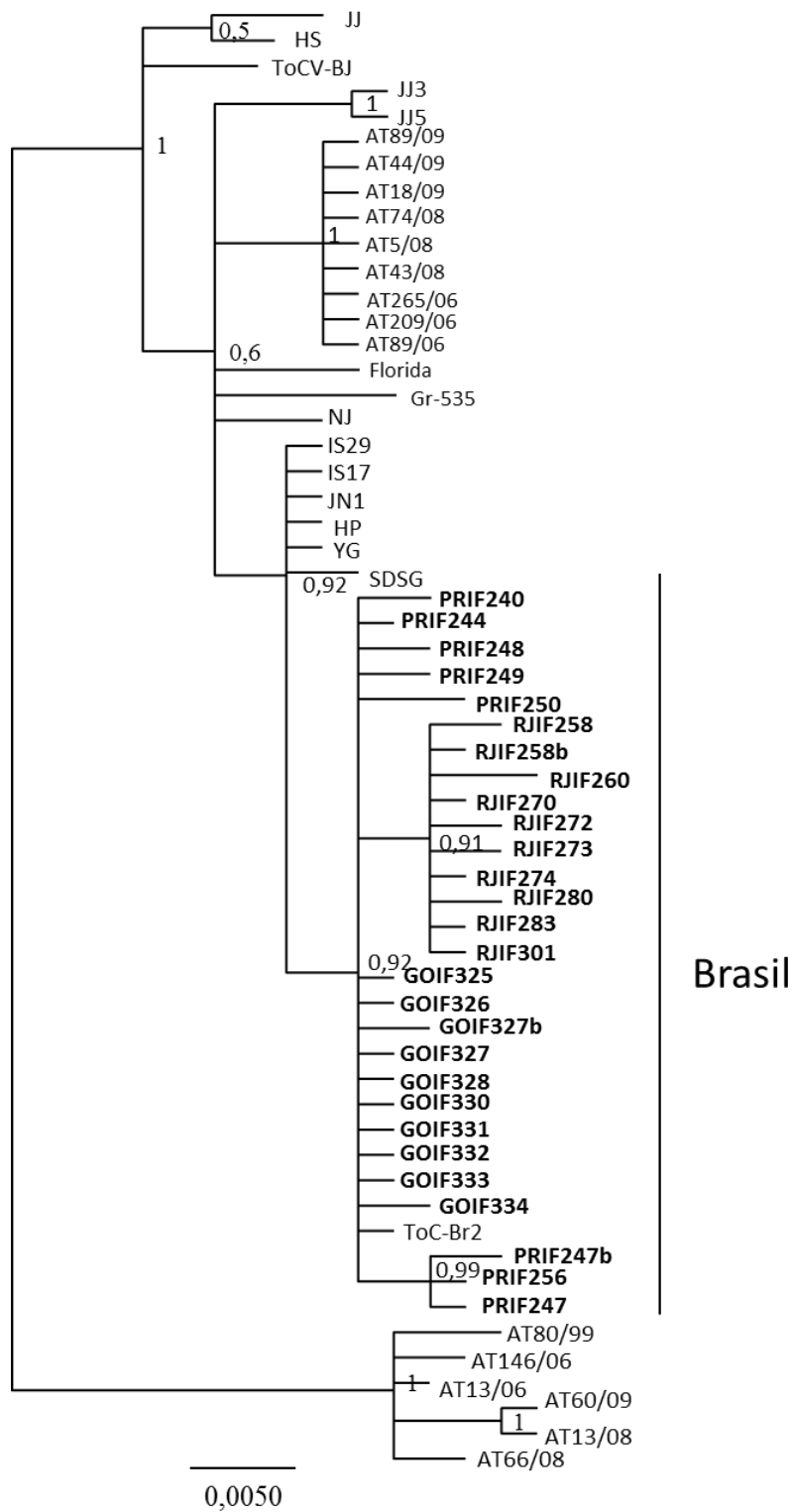


Figura 5. Árvore filogenética construída por inferência bayesiana, baseada nas seqüências nucleotídicas do gene da proteína p22 de isolados de *Tomato chlorosis virus* (ToCV) das subpopulações GO, PR e RJ (destacados em negrito), no Brasil, em comparação com outros isolados representativos de ToCV obtidos do GenBank. O nome do isolado e o número de acesso no GenBank são indicados nas Tabelas 1 e 2. A barra de escala abaixo representa o número de substituições nucleotídicas por sítio.

Tabela 6. Clones correspondentes à sequência nucleotídica completa da proteína p22 de *Tomato chlorosis virus* obtidos de amostras de tomateiro coletadas nos estados do Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ) e Goiás (GO), Brasil.

Número de Acesso (GenBank)	Clone	Localização
MF415495	IF240	Paraná
MF415496	IF244	Paraná
MF415497	IF247-1	Paraná
MF415498	IF247-2	Paraná
MF415499	IF248	Paraná
MF415500	IF249	Paraná
MF415501	IF250	Paraná
MF415502	IF256	Paraná
MF415503	IF258-1	Rio de Janeiro
MF415504	IF258-2	Rio de Janeiro
MF415505	IF260-1	Rio de Janeiro
MF415506	IF270-1	Rio de Janeiro
MF415507	IF272-2	Rio de Janeiro
MF415508	IF273-2	Rio de Janeiro
MF415509	IF274-2	Rio de Janeiro
MF415510	IF280-1	Rio de Janeiro
MF415511	IF283-2	Rio de Janeiro
MF415512	IF301	Rio de Janeiro
MF415513	IF325	Goiás
MF415514	IF326	Goiás
MF415515	IF327-1	Goiás
MF415516	IF327-2	Goiás
MF415517	IF328-1	Goiás
MF415518	IF330	Goiás
MF415519	IF331-1	Goiás
MF415520	IF332	Goiás
MF415521	IF333-2	Goiás
MF415522	IF334-1	Goiás

Tabela 7. Sequências nucleotídicas da proteína p22 de *Tomato chlorosis virus* em tomateiro obtidas do GenBank.

Número de acesso	Isolado	País	Referência
JQ952600	ToC- Br2	Brasil	Albuquerque <i>et al.</i> (2013)
KP137100	JJ	Coreia do Sul	Não publicado
KP137098	HS	Coreia do Sul	Não publicado
KP114532	JJ3	Coreia do Sul	Não publicado
KP114538	IS29	Coreia do Sul	Não publicado
KP114535	IS17	Coreia do Sul	Não publicado
KP114531	JN1	Coreia do Sul	Não publicado
KP114530	HP	Coreia do Sul	Não publicado
KP114527	JJ5	Coreia do Sul	Não publicado
KP114526	YG	Coreia do Sul	Não publicado
DQ983480	AT80/99	Espanha	Lozano <i>et al.</i> (2007)
KP668838	AT13/08	Espanha	Landeo-Rios <i>et al.</i> (2015)
KP668839	AT66/08	Espanha	Landeo-Rios <i>et al.</i> (2015)
KP668840	AT60/09	Espanha	Landeo-Rios <i>et al.</i> (2015)
KP668841	AT 136/06	Espanha	Landeo-Rios <i>et al.</i> (2015)
KP668842	AT146/06	Espanha	Landeo-Rios <i>et al.</i> (2015)
KP668843	AT89/06	Espanha	Landeo-Rios <i>et al.</i> (2015)
KP668844	AT209/06	Espanha	Landeo-Rios <i>et al.</i> (2015)
KP668845	AT265/06	Espanha	Landeo-Rios <i>et al.</i> ,2015
KP668846	AT5/08	Espanha	Landeo-Rios <i>et al.</i> (2015)
KP668847	AT43/08	Espanha	Landeo-Rios <i>et al.</i> (2015)
KP668848	AT74/08	Espanha	Landeo-Rios <i>et al.</i> (2015)
KP668849	AT18/09	Espanha	Landeo-Rios <i>et al.</i> (2015)
KP668850	AT44/09	Espanha	Landeo-Rios <i>et al.</i> (2015)
KP668851	AT89/09	Espanha	Landeo-Rios <i>et al.</i> (2015)
KC709509	SDSG	China	Zhao <i>et al.</i> (2015)
KC887998	ToCV-BJ	China	Zhao <i>et al.</i> (2014)
KF018280	NJ	China	Karwitha <i>et al.</i> (2014)
EU284745	Gr-535	Grécia	Kataya <i>et al.</i> (2008)
NC_007340	Florida	Estados Unidos	Wintermantel <i>et al.</i> (2005)

Tabela 8. Estrutura genética da população de *Tomato chlorosis virus* baseada na sequência nucleotídica do gene da proteína p22.

População	N	S	Eta	K	π	h	Hd
GO	10	2	2	0,400	0,00069	3	0,378
PR	8	7	7	2,036	0,00350	7	0,964
RJ	10	6	6	1,200	0,00206	6	0,778
BRA	29	16	16	1,626	0,00279	15	0,862
ESP	15	22	22	9,257	0,01591	6	0,648
KOR	9	8	8	2,944	0,00506	4	0,694
Total	58	57	57	6,089	0,01046	30	0,933

N, número de sequências; S, número de sítios segregantes; Eta, número total de mutações; K, número médio de diferenças nucleotídicas entre as sequências; π , diversidade nucleotídica; h, número de haplótipos; Hd, diversidade de haplotípica.

Tabela 9. Diferenciação genética entre as subpopulações de *Tomato chlorosis virus*.

População 1	População 2	N_{st}
PR	RJ	0,40684
PR	GO	0,08033
RJ	GO	0,55579
BRA	ESP	0,46979
BRA	KOR	0,09711
ESP	KOR	0,19002

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 diferenciação genética alta.

Tabela 10. Valores médios da relação de substituições sinônimas e não sinônimas (d_{NS}/d_S) para as sequências nucleotídicas do gene da p22 nas populações de *Tomato chlorosis virus*.

Conjunto de dados	d_{NS}/d_S
GO	0,17264
PR	2,0837
RJ	0,51314
BR	0,64646
ESP	0,31962
KOR	0,76576
Total	0,47663

4. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados apresentados nesse estudo indicam que, apesar da baixa variabilidade genética encontrada em isolados de *Tomato chlorosis virus* (ToCV), há evidência de estruturação baseada na localização geográfica, indicando influência dos fatores do ambiente na conformação genética do genoma do vírus. Esses resultados podem auxiliar no direcionamento das pesquisas na área de melhoramento genético para obtenção de genótipos resistentes e, conseqüentemente, no manejo da doença.

Os resultados apresentados indicam formação de dois grupos de sequências obtidos de isolados de diferentes países: Tipo I (apenas isolados da Espanha) e Tipo II (demais isolados do mundo, incluindo alguns da Espanha). Embora a população do Brasil seja indicada no Tipo II, seus isolados formam um grupo monofilético separado dos demais países, com uma diferenciação genética menor entre os isolados da Coreia do Sul do que entre os isolados da Espanha. Entre as subpopulações do Brasil, a subpopulação do Rio de Janeiro apresenta uma evidência clara de estruturação. As populações de Goiás e Paraná parecem ser mais próximas, com uma pequena diferenciação genética, embora a população do Paraná tenha uma alta diversidade genética quando comparada com as outras subpopulações. Quanto às análises de pressão de seleção, com exceção da população do Paraná, os resultados indicam que a seleção purificadora é a força evolutiva presente nos isolados, sugerindo a preservação das sequências em nível de aminoácidos e, conseqüentemente, a conservação do desempenho da p22 como supressora do silenciamento gênico e na infecção sistêmica do vírus.