



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

**LEVANTAMENTO DE NOVAS ESPÉCIES DE BEGOMOVÍRUS NO DISTRITO  
FEDERAL E EM GOIÁS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA NOVA  
ESPÉCIE ASSOCIADA A TOMATEIRO CONTENDO *Ty-1***

IKARO ALVES DE ANDRADE

BRASÍLIA - DF  
MARÇO / 2020



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

**LEVANTAMENTO DE NOVAS ESPÉCIES DE BEGOMOVÍRUS NO DISTRITO  
FEDERAL E EM GOIÁS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA NOVA  
ESPÉCIE ASSOCIADA A TOMATEIRO CONTENDO *Ty-1***

IKARO ALVES DE ANDRADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rita de Cássia Pereira Carvalho.

BRASÍLIA - DF  
MARÇO / 2020

Ikaró Alves de Andrade

**LEVANTAMENTO DE NOVAS ESPÉCIES DE BEGOMOVÍRUS NO DISTRITO  
FEDERAL E EM GOIÁS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA NOVA  
ESPÉCIE ASSOCIADA A TOMATEIRO CONTENDO *Ty-1***

Banca Examinadora:

---

Dr.<sup>a</sup> Mirtes Freitas Lima  
Embrapa Hortaliças  
Membro Externo

---

Dr. Helson Mário Martins do Vale.  
Departamento de Fitopatologia - Universidade de Brasília – UnB  
Membro Interno

---

Dr.<sup>a</sup> Eliane Ferreira Noronha  
Departamento de Biologia Celular – Universidade de Brasília – UnB  
Suplente

---

Dr.<sup>a</sup> Rita de Cássia Pereira Carvalho  
Departamento de Fitopatologia – Universidade de Brasília – UnB  
Orientadora

BRASÍLIA - DF  
MARÇO / 2020

Al

Alves de Andrade, Ikaro  
**LEVANTAMENTO DE NOVAS ESPÉCIES DE  
BEGOMOVÍRUS NO DISTRITO FEDERAL E EM GOIÁS E  
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA NOVA  
ESPÉCIE ASSOCIADA A TOMATEIRO CONTENDO Ty-1**  
Ikaro Alves de Andrade; orientador Rita de Cássia Pereira Carvalho.  
-- Brasília, 2020.  
98 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Biologia Microbiana)  
- Universidade de Brasília, 2020.

1. Vírus. 2. Tomate. 3. Begomovírus. 4. Geminiviridae. I. Pereira  
Carvalho, Rita de Cássia, orient. II. Título.

Dedico a minha família que sempre me incentivou a lutar pelos meus objetivos, e em memória de minha tia avó Francisca que me ensinou sobre a verdadeira humildade, perseverança e mansidão.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por todas as graças recebidas, discernimento e proteção ao longo de toda a minha caminhada.

A minha família pelo suporte, paciência e incentivo durante toda a minha vida, e em especial, durante os dois últimos anos. Obrigado pelo carinho, amor e por ser representar meu ponto seguro.

À orientadora, Dr.<sup>a</sup> Rita de Cássia Pereira Carvalho, pela orientação.

Ao Dr. Maurício Rossato, pela amizade, paciência, otimismo e ensinamentos que auxiliaram na construção do conhecimento científico. Todos os seus conselhos foram extremamente importantes ao longo desta fase.

Ao Dr. Fernando Lucas Melo, pela paciência, disponibilidade e pelos ensinamentos no campo da bioinformática.

Ao Dr. Tatsuya Nagata, agradeço a disponibilidade, paciência e pelos conselhos e esclarecimentos de diversas dúvidas sobre Virologia e Biologia Molecular.

Aos membros do laboratório de virologia vegetal (Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília): Luciane, Josiane, Macária, Felipe, Vinícius, Maria Luiza, Amanda, por todo o suporte e conhecimento prático da rotina laboratorial. De maneira mais que especial, agradeço a Luciane, Josiane e Macária pela amizade, amparo em momentos difíceis, companhia e por alegrarem os meus dias de trabalho, obrigado por ressignificarem o sentido da palavra amizade.

Aos meus queridos amigos e vizinhos de laboratório: Vitória, Catherine, Lucas e João Lucas pela amizade, companhia e pelas conversas e risadas durante a hora do “cafézinho”. Também agradeço pelos conselhos e carinho a mim ofertado. Agradeço também aos técnicos do departamento de fitopatologia Viviane, César e Marivaldo pelo trabalho executado e disponibilidade.

À minha querida amiga Jamile, de maneira especial, pelo suporte, carinho, pelas risadas, pelo companheirismo (em especial nas aulas de Yoga), pelos conselhos e por me ouvir em diversos momentos em que eu não sabia para onde ir e como dar continuidade em minha caminhada. Você é uma das peças-chave que me ajudaram a chegar onde estou.

À minha amiga Aline Belmok, pelo carinho, companhia, auxílio e por me guiar em diversos momentos no começo da caminhada acadêmica. A Débora por toda paciência e suporte em diversos momentos. Agradeço também a Dr<sup>a</sup> Cynthia Kyaw por proporcionar o meu

primeiro contato com o mundo acadêmico, pelos ensinamentos, e por auxiliar na construção da minha formação enquanto Microbiologista.

Aos meus amados amigos Karine e Igor pela amizade e carinho. Eu sei que a distância é um fator que dificulta nossos encontros, mas saibam que o carinho de vocês me ajuda a ser uma pessoa melhor. Vocês sempre estão no meu coração. Agradeço por sempre me ouvirem, me aconselharem e me acolherem.

De maneira particular, a todos os meus amigos que me acompanharam e que eu fortaleci o laço de amizade nesses dois últimos anos: Sandrinha, Turriceli, Jonathan, Luc, Cassiano, Manoel, Cássio, Matheus Ramos, Mélodi, Lucas, Lucas José, Hezequiel, Jeferson, Felipe Martins, Frankie, Eduardo, Fernando, André, Lucas Jorge, Brenom, Gabriel, Márcio, Bruno, Yasmin, Ester, Karen, Maria, Adriano, Fernando Fonseca, Bianca, Laysa, Wellen, Samirah, Emilla. Enfim, a todos que estiveram comigo e que caso eu não tenha mencionado, devido a minha ótima memória, sintam-se acolhidos, pois vocês também fazem parte da minha história.

“Depois de uma longa tempestade, aguarde por um dia de sol. É na noite mais escura e sombria que somos capazes de enxergar as estrelas.”

Samantha Raub

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE ACRÔNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xiii
RESUMO .....	xv
ABSTRACT .....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 A cultura do tomateiro .....	19
2.2 Produção de tomate no Mundo e Brasil.....	20
2.2.1 Doenças virais em tomateiro no Brasil.....	25
2.3 Família Geminiviridae.....	26
2.3.1 Gêneros.....	30
2.4 Mecanismos geradores de variabilidade genética em vírus.....	38
2.4.1 Mutação .....	39
2.4.2 Recombinação .....	39
2.4.3 Pseudo-recombinação.....	40
2.5 Estratégias de controle viral .....	41
3. JUSTIFICATIVA .....	43
4. OBJETIVOS.....	43
4.1 OBJETIVO GERAL.....	43
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	44
5.1 Coleta e manutenção de isolados virais.....	44
5.2 Seleção de isolados correspondendo a prováveis espécies novas com base em sequências parciais e obtenção de sequências completas.....	45
5.3 Obtenção de inserto de aproximadamente 2.6 kb para DF-640 .....	49
5.4 Transformação por choque térmico .....	50
5.5 Confirmação da infectividade de monômeros para os componentes A e B de DF-640 ..	51
5.6 Desenvolvimento de clone multimérico para componentes A e B da nova espécie viral .....	51
5.7 Identificação da presença do gene Ty-1 nos acessos selecionados no estudo .....	56
5.8 Alinhamento de sequências e análise filogenética.....	57
5.9 Análise de recombinação dos componentes A e B de Tomato mosaic severe dwarf virus .....	60
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	63
6.1 Caracterização molecular dos componentes A e B de Tomato mosaic severe dwarf virus .....	63
6.2 Confirmação da infectividade dos monômeros dos componentes A e B de DF-640 .....	65
6.3 Construção dos clones infecciosos .....	65
6.4 Verificação da presença do gene de resistência Ty-1 nos isolados de begomovírus .....	70
6.5 Análise filogenética e de recombinação .....	71
7. CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	80
ANEXOS.....	94
ANEXO A – TABELAS REFERENTES À PRODUÇÃO, ÁREA PLANTADA E COLHIDA DE TOMATE NO BRASIL E NO MUNDO.....	94

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Produção (toneladas) dos principais países produtores de tomate em 2017.....	21
<b>Figura 2.</b> Dados referentes a área plantada, colhida (hectares) e produção (toneladas) no Brasil de 2010 a 2018 .....	22
<b>Figura 3.</b> Dados referentes a área plantada, colhida (hectares) e produção (toneladas) nas regiões brasileiras em 2018. ....	23
<b>Figura 4.</b> Produção (toneladas) de tomate em estados da região Centro-Oeste (2018) e nos principais municípios de Goiás (2017).....	24
<b>Figura 5.</b> Estruturas genômicas representativas de espécies classificadas nos gêneros <i>Becurtovirus</i> , <i>Capulavirus</i> , <i>Curtovirus</i> , <i>Eragrovirus</i> , <i>Grablovirus</i> , <i>Mastrevirus</i> , <i>Topocuvirus</i> e <i>Turncurtovirus</i> .....	27
<b>Figura 6.</b> Organização genômica de espécies de begomovírus monopartidas e bipartidas.....	32
<b>Figura 7.</b> Mapa demonstrativo com primers universais .....	47
<b>Figura 8.</b> Mapa do vetor pSL1180.....	49
<b>Figura 9.</b> Primeira etapa para produção de clone multimérico: obtenção de <b>pSL1180A–DF-640FRAG</b> (fragmento).....	52
<b>Figura 10.</b> Primeira etapa para produção de clone multimérico: obtenção de <b>pSL1180B–DF-640FRAG</b> (fragmento).....	52
<b>Figura 11.</b> Segunda etapa para produção de clone multimérico: obtenção de <b>pSL1180A–DF-640MULT</b> (multimérico) .....	53
<b>Figura 12.</b> Segunda etapa para produção de clone multimérico: obtenção de <b>pSL1180B–DF-640MULT</b> (multimérico) .....	53
<b>Figura 13.</b> Mapa do vetor pCAMBIA1180 .....	54
<b>Figura 14.</b> Etapa final para produção de clone multimérico em pCAMBIA1180: obtenção de <b>pCAMBIA1180–A–DF-640</b> .....	55
<b>Figura 15.</b> Etapa final para produção de clone multimérico em pCAMBIA1180: obtenção de <b>pCAMBIA1180–B–DF-640</b> .....	55
<b>Figura 16.</b> Organização genômica da espécie DF-640 nomeada como Tomato mosaic severe dwarf virus (ToMSDV), com organização típica de isolados bipartidos do novo mundo e alinhamento da região comum de ambos os componentes.....	64
<b>Figura 17.</b> Eletroforese em gel (1%) das etapas iniciais de clonagem.....	66
<b>Figura 18.</b> Eletroforese em gel de agarose (1%) da digestão dos clones recombinantes com as construções multiméricas pSL1180ADF640MULT e pSL1180BDF640MULT .....	68

<b>Figura 19.</b> Eletroforese em gel de agarose (1%) da digestão dos clones recombinantes com a construção multimérica pSL1180ADF640MULT .....	69
<b>Figura 20.</b> Eletroforese em gel de agarose (1%) das amostras purificadas para a nova construção pSL1180BDF640FRAG .....	70
<b>Figura 21.</b> Verificação da presença do gene <i>Ty-1</i> nos acessos utilizados neste trabalho.....	71
<b>Figura 22.</b> Árvore filogenética com modelo baesiano do componente A da espécie ToMSDV complementada com SDT .....	76
<b>Figura 23.</b> Árvore filogenética com modelo baesiano do componente B da espécie ToMSDV complementada com SDT .....	77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Informações de genoma, hospedeiras, número de espécies, vetor e espécie-tipo de gêneros classificados na família <i>Geminiviridae</i> .....	28
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos primers utilizados para detecção de begomovírus .....	45
<b>Tabela 3.</b> Isolados virais selecionados para este trabalho de acordo com ano/local de coleta e identificação com base em sequência parcial e completa do componente A de begomovírus.	48
<b>Tabela 4.</b> Espécies de vírus empregadas para análise filogenética do componente A de Tomato mosaic severe dwarf virus .....	58
<b>Tabela 5.</b> Espécies de vírus empregadas para análise filogenética do componente B de Tomato mosaic severe dwarf virus .....	59
<b>Tabela 6.</b> Amostras empregadas para análise de recombinação do componente A de Tomato mosaic severe dwarf virus .....	60
<b>Tabela 7.</b> Amostras empregadas para análise de recombinação do componente B de Tomato mosaic severe dwarf virus .....	61
<b>Tabela 8.</b> Eventos de recombinação identificados no componente A de Tomato mosaic severe dwarf virus.....	73
<b>Tabela 9.</b> Eventos de recombinação identificados no componente B de Tomato mosaic severe dwarf virus.....	75
<b>Tabela 10.</b> Produção de tomate no mundo e nos principais países produtores (produção em toneladas) de 2010 a 2017 .....	94
<b>Tabela 11.</b> Área plantada (hectares) de tomate no Brasil de 2010 a 2018 .....	94
<b>Tabela 12.</b> Área colhida (hectares) de tomate no Brasil de 2010 – 2018 .....	94
<b>Tabela 13.</b> Quantidade produzida (toneladas) de tomate no Brasil de 2010 a 2018.....	95
<b>Tabela 14.</b> Área colhida (hectares) de tomate nas regiões e estados brasileiros de 2010 – 2018 .....	95
<b>Tabela 15.</b> Produção (toneladas) de tomate nas regiões e estados brasileiros de 2010 – 2018	97
<b>Tabela 16.</b> Produção (toneladas) de tomate nas principais cidades de Goiás de 2010 – 2017	98

## LISTA DE ACRÔNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<	Menor que
Φ	<i>Phi</i>
ALCV	<i>Alfalfa leaf curl virus</i>
BCTV	<i>Beet curly top virus</i>
BCTIRV	<i>Beet curly top Iran virus</i>
BGMV	<i>Bean golden mosaic virus</i>
BMCTV	<i>Beet mild curly top virus</i>
BSCTV	<i>Beet severe curly top virus</i>
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
CaLCuV	<i>Cabbage leaf curl virus</i>
CCDaV	<i>Citrus chlorotic dwarf associated virus</i>
CdTV	<i>Chino del tomate virus</i>
CILCrV	<i>Cleome leaf crumple virus</i>
CLCuV	<i>Cotton leaf curl virus</i>
CSNV	<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i>
CP	Proteína capsidial
dsDNA	DNA de fita dupla
EcmLV	<i>Euphorbia caput medusae latent virus</i>
ECSV	<i>Eragrostis curvula streak virus</i>
EuMV	<i>Euphorbia mosaic virus</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FbSLCV	<i>French bean severe leaf curl virus</i>
FR	Forma replicativa
GRBV	<i>Grapevine red blotch virus</i>
ha	Hectares
HrCTV	<i>Horseradish curly top virus</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IRD	<i>Iteron-related domain</i>
LB	Luria-Bertani
LIR	<i>Long intergenic region</i>
MeCMV	<i>Melon chlorotic mosaic virus</i>
MMDaV	<i>Mulberry mosaic dwarf associated virus</i>
MP	Miniprep
MSV	<i>Maize streak virus</i>
NIG	<i>NSP-interacting GTPase</i>
nm	Nanômetro
NSP	<i>Nuclear shuttle protein</i>
nts	Nucleotídeos
ORF	<i>Open reading frames</i>
ori	Origem de replicação
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PepCTV	<i>Pepper curly top virus</i>
PepYMV	<i>Pepper yellow mosaic virus</i>
PILV	<i>Plantago lanceolata latent virus</i>
PVY	<i>Potyvirus, a Potato virus Y</i>
RC	Região comum

RCA	Amplificação por círculo rolante
RCR	Replicação por círculo rolante
RDR	Replicação dependente de recombinação
REN	Proteína potencializadora da replicação viral
REP	Proteína relacionada com a replicação
SCAV	<i>Spinach curly top Arizona virus</i>
SCE	<i>Structurally-conserved element</i>
SCTV	<i>Spinach curly top virus</i>
SIDRA	Sistema IBGE de Recuperação Automática
SIR	<i>Short intergenic region</i>
TCSV	<i>Tomato chlorotic spot virus</i>
TCTV	<i>Turnip curly top virus</i>
TGMV	<i>Tomato golden mosaic virus</i>
TMoLCV	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>
ToCMoV	<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>
ToCmMV	<i>Tomato common mosaic virus</i>
ToCV	<i>Tomato chlorosis virus</i>
ToLDV	<i>Tomato leaf distortion virus</i>
ToLDeV	<i>Tomato leaf deformation virus</i>
ToMIMV	<i>Tomato mild mosaic virus</i>
ToRMV	<i>Tomato rugose mosaic virus</i>
ToSRV	<i>Tomato severe rugose virus</i>
ToYSV	<i>Tomato yellow spot virus</i>
ToYVSV	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>
ToMV	<i>Tomato mosaic virus</i>
TrAP	Proteína ativadora da transcrição
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
TYLCAxV	<i>Tomato yellow leaf curl Axarquia virus</i>
TYLCCNV	<i>Tomato yellow leaf curl China virus</i>
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
TYLCMaIV	<i>Tomato yellow leaf curl Malaga virus</i>
ton	Toneladas
WDV	<i>Wheat dwarf virus</i>

## RESUMO

ALVES-ANDRADE, IKARO. Universidade de Brasília, março de 2020. **Levantamento de novas espécies de begomovírus no Distrito federal e em Goiás e caracterização molecular de uma nova espécie associada a tomateiro contendo Ty-1.** Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Rita de Cássia Pereira Carvalho.

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é cultivado em todas as principais regiões tropicais e subtropicais do Brasil e do mundo. O Estado de Goiás é um dos principais produtores de tomate para consumo *in natura* e para processamento no Brasil. O tomateiro apresenta uma grande vulnerabilidade à ação de pragas e agentes patogênicos. Dentre os agentes virais, isolados de espécies do gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) são responsáveis por perdas significativas de produção. Tais vírus podem apresentar um (espécies monopartidas) ou dois (espécies bipartidas) componentes genômicos de DNA circular fita simples, entre 2.600 a 2.800 nucleotídeos. No país, o elevado número de espécies classificadas no gênero *Begomovirus* ocorre por uma combinação de fatores incluindo a atividade polífaga do vetor mosca-branca (*Bemisia tabaci* *Middle East Asian Minor* – MEAM 1) e a grande capacidade de eventos geradores de variabilidade no gênero *Begomovirus*. Devido a importância das doenças causadas por espécies de begomovírus no país, o constante monitoramento da diversidade viral e produção de clones infecciosos são ações de pesquisa de suma importância para programas de melhoramento visando o desenvolvimento de cultivares resistentes. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar prováveis novas espécies *Begomovirus* ocorrendo em cultivos de tomate em Goiás e no Distrito Federal. DNA foi extraído de 450 amostras foliares de tomate exibindo sintomas típicos de vírus de plantas, coletadas na região do Distrito Federal e Goiás e usado como molde em ensaios de PCR com os *primers* universais PAL1v1978/PAR1c496. Os amplicons obtidos tiveram suas sequências obtidas e um total de 23 isolados foram selecionados com base em sequências parciais com identidade inferior a 91% com o componente DNA-A de qualquer outra espécie de *Begomovirus* previamente descrita. Um conjunto adicional de primers universais foi utilizado visando recuperar o genoma das espécies virais nas 23 amostras. Sequências completas de três isolados foram recuperadas correspondendo a três prováveis espécies novas. Os demais isolados se encontram-se em fase final de caracterização. Um dos isolados (DF-640) foi caracterizado uma cultivar identificada como sendo portadora do gene *Ty-1*. O monômero referente ao componente DNA-A do isolado DF-640 apresentou 2.605 nucleotídeos e foi obtido com a enzima *Nde*I. O DNA-B apresentou de 2.625 nucleotídeos e foi obtido com *Bgl*II. O isolado DF-640 apresenta uma organização genômica típica de espécies bipartidas do Novo Mundo, com seis fases de leitura aberta (ORFs) presentes no DNA-A e duas ORFs no DNA-B. Análises de RDP4 evidenciaram eventos de recombinação nos dois componentes genômicos. Clones monoméricos para os componentes DNA-A e DNA-B do isolado DF-640 foram capazes de infectar tomate quando inoculados via bombardeamento. Clone multimérico foi obtido para o componente DNA-A. Estudos serão conduzidos futuramente para produção de clone multimérico para componente DNA-B e testes de inoculação serão realizados. Devido aos sintomas observados inicialmente em condições de campo, a espécie foi nomeada como *Tomato mosaic severe dwarf virus* (ToMSDV).

PALAVRAS-CHAVE: *Geminiviridae*, *Begomovirus*, *Tomate*.

## ABSTRACT

ALVES-ANDRADE, IKARO. Universidade de Brasília, março de 2019. **Survey of new begomovirus species in the Federal District and Goiás and molecular characterization of a new species associated with tomato plants containing Ty-1.** Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Pereira Carvalho.

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) crop is grown across all major tropical and subtropical regions of Brazil and of the world. The State of Goiás is one of the major producing regions of tomatoes for fresh market and for processing in Brazil. Tomatoes are highly vulnerable to the action of pests and pathogens. Among the viral agents, species of the genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*) are responsible for significant yield losses. *Begomovirus* species can have one (monopartite species) or two (bipartite species) genomic components of single-stranded circular DNA, ranging from 2,600 to 2,800 nucleotides. In Brazil, the high number of species classified in the genus *Begomovirus* occurs due to a combination of factors including the polyphagous activity of the whitefly vector (*Bemisia tabaci* Middle East Asian Minor - MEAM 1) and by the ability that these viral species have to generate genetic variability. Due to the importance of diseases caused by *Begomovirus* species in the country, constant monitoring of viral diversity and the production of infectious clones are extremely important research actions for breeding programs aimed at the development of resistant cultivars. In this context, the objective of the present work was to characterize putative new *Begomovirus* species occurring in tomato crops in Goiás and in the Federal District. Genomic DNA was extracted from 450 tomato leaf samples collected in the Federal District and Goiás region showing typical begomovirus-like symptoms. The purified DNA was used as a template in PCR assays with the universal primers PAL1v1978 / PAR1c496. The amplicons were sequenced and a total of 23 isolates were selected based on partial sequences with identity less than 91% with the DNA-A component of any other species of *Begomovirus* previously described. An additional set of universal primers was used to recover the genome of the viral species in the 23 tomato samples. Complete sequences of three isolates were recovered corresponding to three putative new species. The remaining isolates are in the final stage of characterization. One of the isolates (DF-640) was characterized in a cultivar that was identified as having the tolerance *Ty-1* gene. The DF-640 monomer of the DNA-A component displayed 2,605 nucleotides and it was obtained with the enzyme *Nde*I. The DNA-B component displayed 2,625 nucleotides and it was obtained with *Bg*II. The DF-640 isolate displayed a genomic organization typical of New World bipartite species, with six open reading frames (ORFs) present in the DNA-A component and two ORFs in the DNA-B component. RDP4 analysis indicated recombination events in both genomic components. Monomeric clones for the DNA-A and DNA-B components of the DF-640 isolate were able to infect tomatoes when inoculated via bombardment. A multimeric clone was obtained for the DNA-A component. Studies will be conducted in the future for the production of a multimeric clone for the DNA-B component and inoculation tests will be carried out. Due to the symptoms initially observed in field conditions, the species was tentatively named as *Tomato mosaic severe dwarf virus* (ToMSDV).

**KEY-WORDS:** *Geminiviridae*, *Begomovirus*, *Tomato*.

## 1. INTRODUÇÃO

O tomateiro, natural da região dos Andes na América do Sul, é uma solanácea de importante interesse econômico. No Brasil, o seu cultivo foi iniciado através das atividades de imigrantes europeus no século XIX. O fruto apresenta propriedades antioxidantes e anticancerígenas, fato este que reforça sua importância na dieta humana (CARVALHO; PAGLIUCA, 2007; INOUE–NAGATA; ÁVILLA; BÔAS, 2009).

Uma das características deste cultivo é a considerável suscetibilidade a doenças. O tomateiro normalmente é afetado por diversos agentes patogênicos, dentre estes, *Alternaria* sp., (SCHIRO et al., 2018); *Ralstonia solanacearum*, (YULIAR; TOYOTA, 2015); e *Meloidogyne* sp. (PINHEIRO; PERREIRA; SUINAGA, 2014). Além disto, isolados de espécies virais, classificadas nos gêneros *Begomovirus*, *Crinivirus*, *Cucumovirus*, *Potyvirus*, *Tospovirus* e *Tobamovirus* (AMORIM et al., 2016) também acometem o tomateiro e podem causar prejuízos econômicos para a cultura (ANDRADE; SOUZA; ASSIS, 2009).

Os begomovírus, classificados na família *Geminiviridae*, apresentam DNA fita simples circular, encapsidados por dois icosaedros incompletos, formados por apenas um tipo de proteína estrutural. Espécies deste gênero podem apresentar um ou dois componentes genômicos, infectam plantas dicotiledôneas, e são transmitidos pelo vetor mosca-branca (*Bemisia tabaci*) biótipo *Middle EastAsia Minor 1* (MEAM1) (ISLAM et al., 2018; ROJAS et al., 2018), onde o tipo de relação estabelecida entre vírus e vetor caracteriza-se como circulativa não propagativa (DE BARRO et al., 2011).

As espécies de begomovírus presentes na Europa, Ásia e África, (Velho Mundo) por apresentarem um componente genômico, são descritas como monopartidas e frequentemente associadas à DNA satélites (ZHOU, 2013). Por outro lado, as espécies presentes nas Américas (Novo Mundo), em sua maioria, dispõem de dois componentes virais, denominados DNA-A e DNA-B. O primeiro apresenta genes que codificam proteínas relacionadas à replicação viral, encapsidação e patogenicidade e o segundo está relacionado ao movimento intercelular e intracelular na planta (ROJAS et al., 2018).

No Brasil, a primeira identificação de begomovírus em tomateiro ocorreu em 1960 (FLORES; SILBERSCHMIDT; KRAMER, 1960), e até a década de 1980, os relatos de begomovírus nesta cultura eram esporádicos e sem importância econômica. No entanto, a partir da década de 1990, com a identificação de *Bemisia tabaci* MEAM1 (ESASHIKA et al., 2016), percebeu-se o aumento da incidência de begomovirose, com consequente surgimento de novas

espécies virais (FERNANDES et al., 2008). Além disso, pode-se identificar no território nacional *Bemisia tabaci Mediterranean* (MED), anteriormente conhecido como biótipo Q (BARBOSA, 2014)

Novas espécies de begomovírus comumente emergem por processos de mutação, recombinação ou pseudo-recombinação (SILVA et al., 2014). Tal fato proporciona constantes oportunidades para que estes possam se adaptar à diferentes hospedeiros e alterações nas condições ambientais (MONCI et al., 2002).

Em meio à emergência de espécies virais e da atividade *B. tabaci*, certas estratégias têm sido empregadas para reduzir os prejuízos acarretados por begomovirose em tomateiro. Uma vez que o controle químico do vetor é pouco eficiente, adota-se o emprego de variedades resistentes. Em tomateiro, foram relatados os seguintes genes de resistência: *Ty-1* (ZAMIR et al., 1994), *Ty-2* (HANSON et al., 2000), *Ty-3* (JI; SCHUSTER; SCOTT, 2007), *Ty-4* (YAN et al., 2018), *ty-5* (ANBINDER et al., 2009), *Ty-6* (HUTTON; SCOTT; SCHUSTER, 2012; GILL et al., 2019), e *tgr-1* (BIAN et al., 2007).

A descrição molecular e biológica de isolados de espécies de *Begomovirus* que afetam tomateiro no país, através da construção de clones infecciosos, por exemplo, é fundamental para compreender tal diversidade genética destes fitopatógenos, identificar outras plantas hospedeiras e contribuir para o andamento de programas de melhoramento. Além de possibilitar de maneira mais eficiente estudos de diferentes agentes isoladamente ou em casos de infecção mista (INOUE-NAGATA et al., 2006; EINI; SAHRAEI; BEHJATNIA, 2016).

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho identificar possíveis novas espécies de begomovírus ocorrendo em Goiás e no Distrito Federal em tomateiro no período compreendido entre 2001 a 2016 e caracterizar molecularmente uma espécie nova de begomovírus neste local. Os objetivos específicos, por sua vez, foram obter a sequência completa de isolados virais do Distrito Federal e Goiás, tidos como prováveis espécies novas e associar com a presença do gene de resistência *Ty-1*; gerar clones dos componentes virais DNA-A e DNA-B de pelo menos um dos isolados virais; e obter clone infeccioso da espécie nova (monomérico e/ou multiméricos) para pelo menos um isolado dos isolados virais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A cultura do tomateiro

O tomate é uma hortaliça amplamente cultivada em áreas subtropicais e tropicais do mundo. A relevante propagação da cultura, especialmente a partir do século XIX, ocorreu devido à importância nutricional e à tolerância climática (WALIA et al., 2013). A produção de tomate é comumente direcionada ao processamento industrial, como na produção de molhos, e para a utilização *in natura* (REIS-FILHO; MARIN; FERNANDES, 2009).

Ao longo do tempo, ocorreram algumas mudanças na descrição taxonômica desta hortaliça. Primeiramente, a mesma foi classificada como pertencente ao gênero *Lycopersicon* por Tournefort (1694), no entanto, em 1753 Carl Van Linnaeus classificou a espécie no gênero *Solanum*. Em 1.754, Miller redefiniu novamente a espécie no gênero *Lycopersicon* e em 1768 a classificou como *L. esculentum* (PERALTA; KNAPP; SPOONER, 2006). Posteriormente, descobriu-se alta similaridade gênica entre espécies descritas pertencentes ao gênero *Solanum* e *Lycopersicon esculentum*. Por intermédio de resultados oriundos de análises de sequências de DNA, então, o tomate foi novamente classificado como *Solanum lycopersicum*, a qual é empregada atualmente (SPOONER; PERALTA; KNAPP, 2005).

*Solanum lycopersicum*, família *Solanaceae* é uma espécie natural da região dos Andes (abrangendo partes do Equador, Peru e Chile) e Ilhas Galápagos e posteriormente domesticada no México (Puebla e Vera Cruz) visto que este foi incorporado na rotina alimentar da população que vivia na região (CHETELAT et al., 2009). Acredita-se que a planta foi levada para a Europa no século XVI, durante a colonização espanhola na América do Sul. O tomate, era praticamente utilizado na ornamentação de ambientes devido a aparência de seus frutos. O consumo do mesmo intensificou-se a partir do plantio, na Itália, de tomateiros que detinham frutos de coloração amarelada (*Pomi d'oro*), conhecidos popularmente como maçãs douradas (PERALTA; KNAPP; SPOONER, 2006).

No Brasil, destaca-se que a cultura foi introduzida no século XIX na região Sudeste, em decorrência da imigração de europeus. A espécie encontra-se distribuída em várias regiões da América do Sul, e apresenta considerável relevância econômica e agrícola, uma vez que este é um dos vegetais mais produzidos no mundo (FILHO; MARIN; FERNANDES, 2009).

## 2.2 Produção de tomate no Mundo e Brasil

O cultivo do tomateiro é recorrente em diversas partes do mundo. A produção mundial desta cultura tem aumentado consideravelmente e, tal fato pode ser explicado pelo o consumo elevado do fruto e o desenvolvimento de melhores técnicas de produção (CARVALHO; PAGLIUCA, 2007). Este consumo decorre do aumento na procura de alimentos saudáveis, o que reforça a maior comercialização do fruto fresco, uma vez que o tomate apresenta considerável teor de vitaminas A e C e licopeno. Dietas alimentares que apresentam altas quantidades de licopeno auxiliam na prevenção de cânceres, em particular, os voltados ao sistema digestório (SHAMI; MOREIRA, 2004; BERNI et al., 2019). Salienta-se também o emprego da hortaliça na forma processada, por intermédio de alimentos industrializados, como molhos pré-preparados ou àqueles prontos para uso (CARVALHO; PAGLIUCA, 2007).

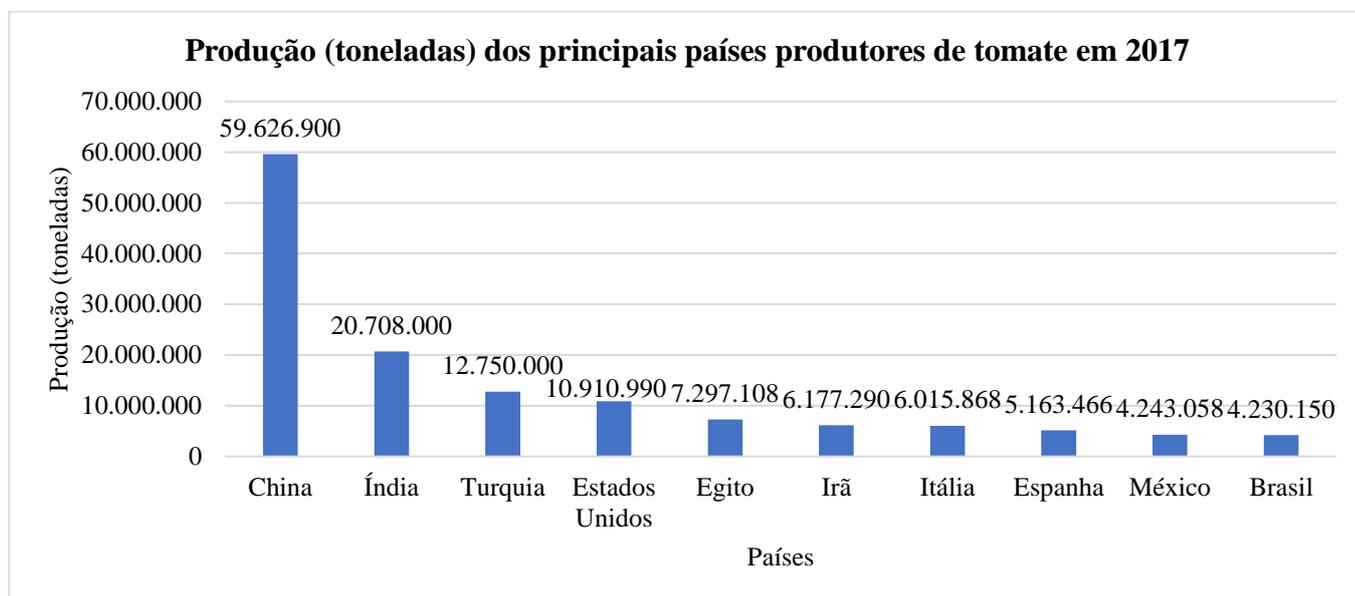
Mediante os dados atualizados (2017) da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), a China é o maior produtor mundial de tomate, com 59.626.900 toneladas (ton); seguida pela Índia, com 20.708.000 ton; e Turquia, com 12.750.000 ton. O Brasil ocupa o décimo lugar no *ranking* de produção mundial, com 4.230.150 ton (**ANEXO A - Tabela 10 e Figura 1**) (FAO, 2019). As tabelas referentes à produção, área colhida e produzida de tomate no Brasil e no mundo estão dispostas no **ANEXO A**.

No Brasil, a cultura de tomate adaptou-se, em especial, ao clima temperado da região Centro-Sul e, pelo fato de dispor de boa aceitação no mercado e preços razoáveis, o tomate é uma das principais hortaliças cultivadas pelos produtores (RODRIGUES et al., 2010). De acordo com dados provenientes do Levantamento Sistemático de Produção Agrícola, provenientes do Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA), coordenado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2018, nota-se que a área plantada e colhida (em hectares) foi respectivamente de 59.738 ha (**ANEXO A -Tabela 11**) e 59.726 ha (**ANEXO A -Tabela 12**), enquanto que a produção (em toneladas) foi de 4.084.910 ton (**ANEXO A -Tabela 13**) (**Figura 2**) (IBGE, 2019b).

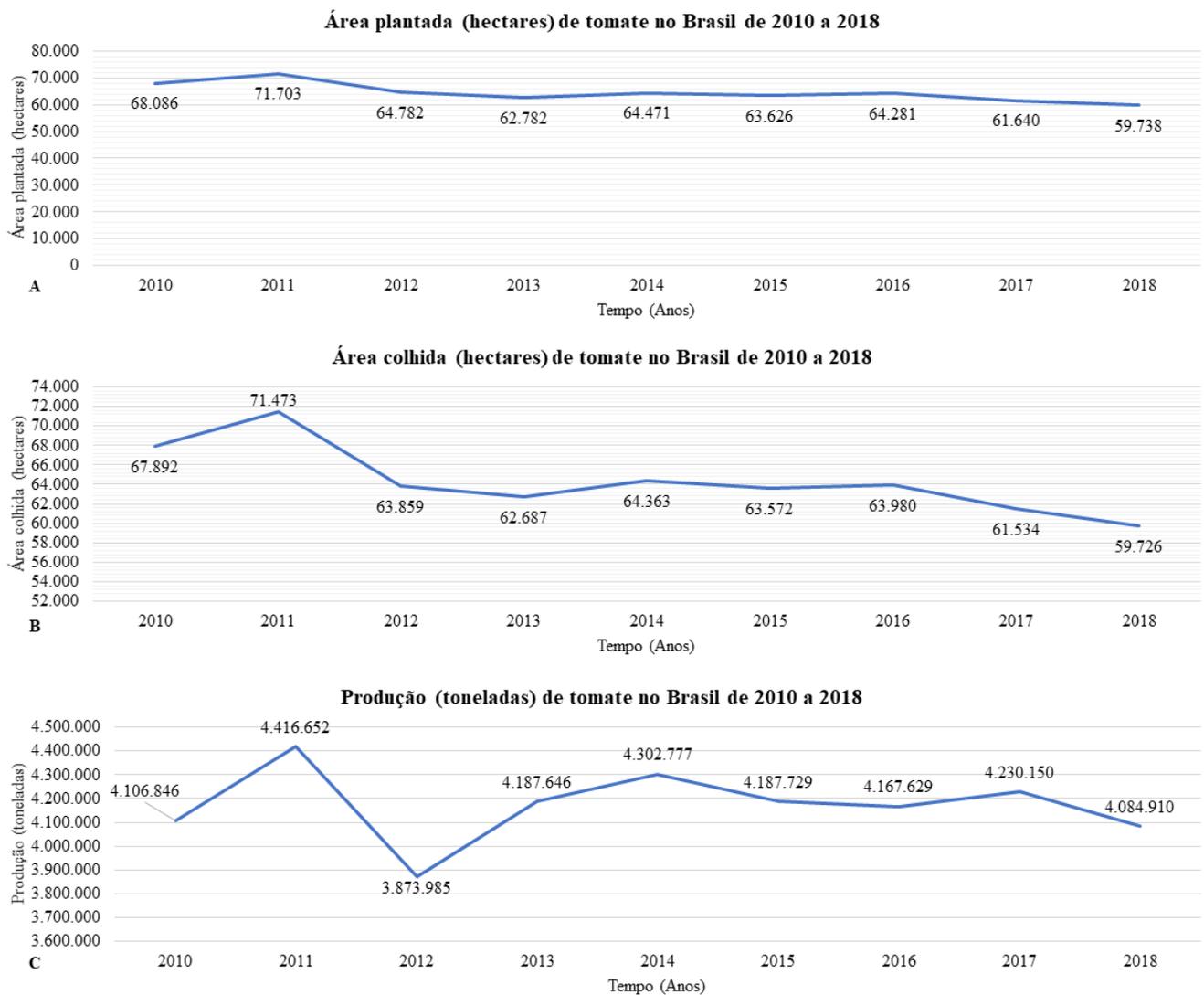
A região Sudeste, no período de 2010 a 2018 liderou no tocante à área plantada, colhida e produção, valores estes que, em 2018, corresponderam a: 23.505 ha, 23.505 ha (**ANEXO A - Tabela 14**) e 1.689.558 ton (**ANEXO A -Tabela 15**) (**Figura 3**). No entanto, Goiás é o maior estado produtor do Brasil, com o registro de 1.334.500 ton no mesmo ano (**Figura 4**).

Os três maiores municípios, no referido estado, que contribuíram para tal valor de produção, em 2018 foram respectivamente Cristalina (288.000 ton), Morrinhos (269.000 ton) e

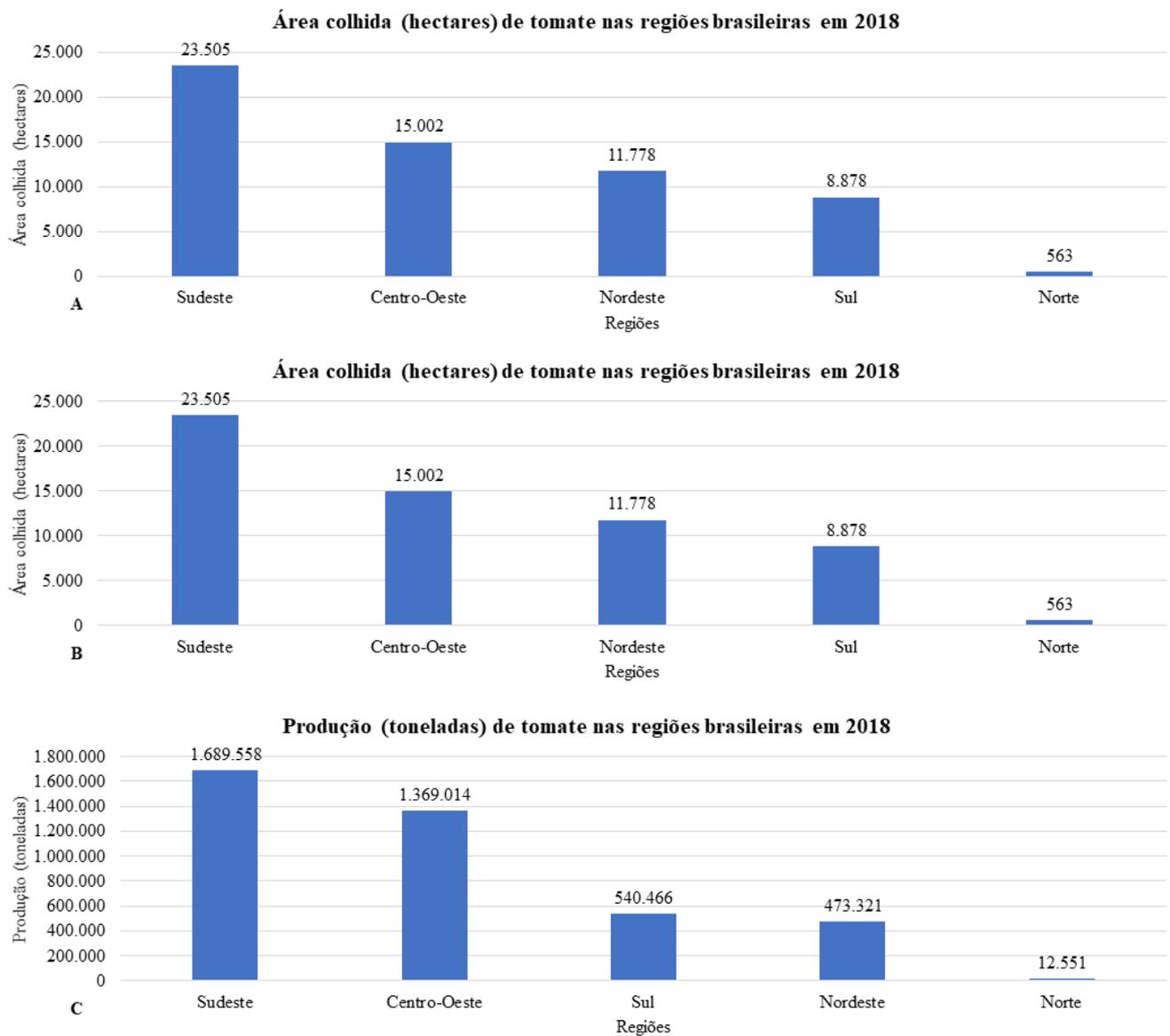
Itaberai (257.785 ton) (**ANEXO A -Tabela 16**) (IBGE, 2019a). As tabelas com os referidos dados encontram-se como anexos a este trabalho.



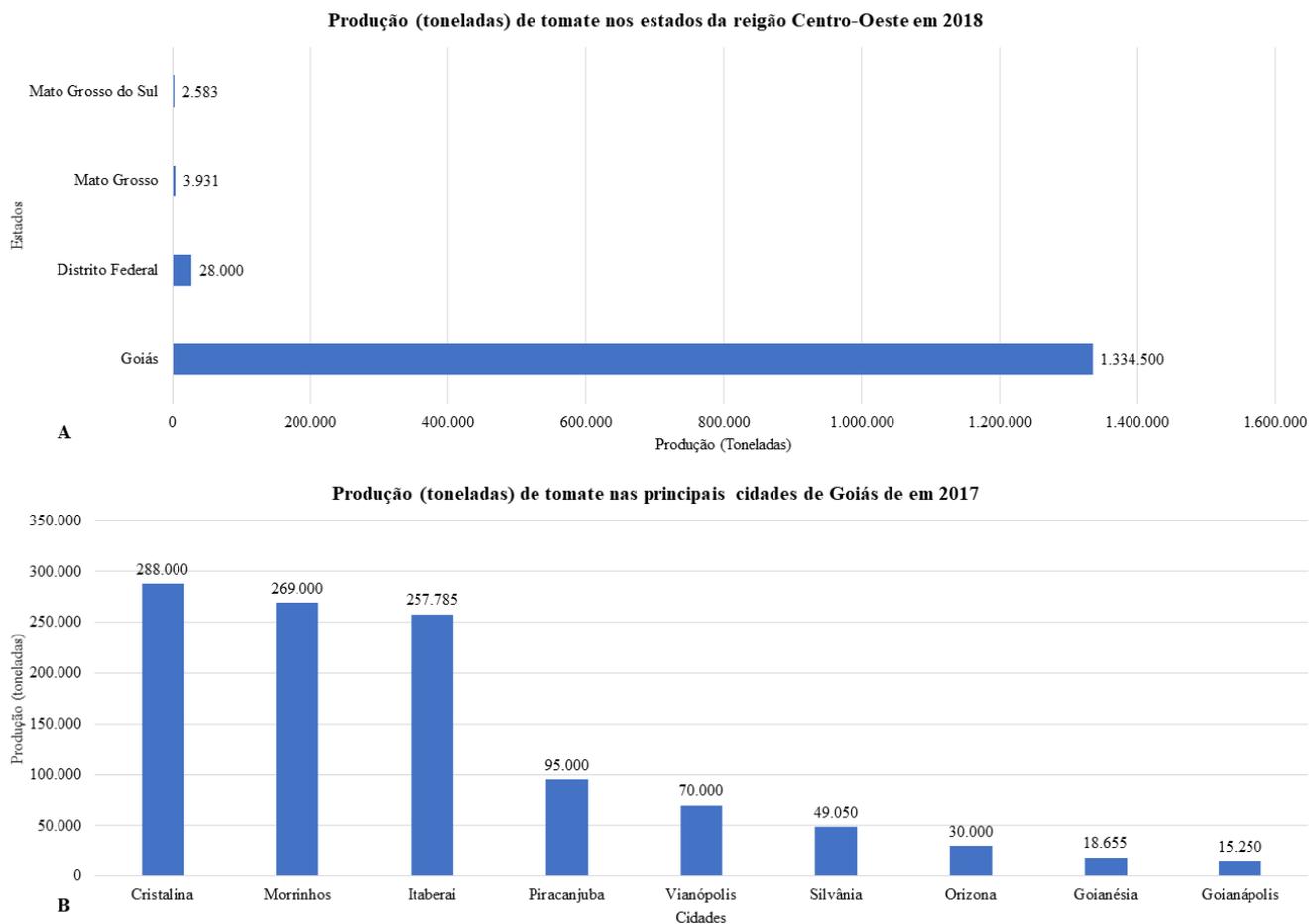
**Figura 1.** Produção (toneladas) dos principais países produtores de tomate em 2017..A China destacou-se como o principal produtor, seguida pela Índia e Turquia. O Brasil ocupou o décimo lugar no ranking de produção mundial de tomate. Fonte: FAO, 2019



**Figura 2.** Dados referentes a área plantada, colhida (hectares) e produção (toneladas) no Brasil de 2010 a 2018. Em **A** têm-se a distribuição da área plantada no país de 2010 a 2018, destacando-se maior área plantada no ano de 2011. Em **B**, observa-se a região colhida durante a mesma faixa temporal, com destaque ao pico de produção no ano de 2011, reforçando os dados de **A**. Em **C** nota-se a produção (toneladas) de tomate nos últimos anos, destacando-se a queda acentuada na produção de 2011 a 2012. Fonte: IBGE, 2019a.



**Figura 3.** Dados referentes a área plantada, colhida (hectares) e produção (toneladas) nas regiões brasileiras em 2018. Em **A** nota-se a área plantada (hectares). Em **B** evidencia-se a área colhida (hectares), e em **C** a produção (toneladas) de tomate. Nota-se que a maior região produtora corresponde a Sudeste. Fonte: IBGE, 2019a.



**Figura 4.** Produção (toneladas) de tomate em estados da região Centro-Oeste (2018) e nos principais municípios de Goiás (2017). Em **A** nota-se que Goiás foi o maior estado produtor de tomate em 2018, e em **B** têm-se as dez maiores cidades produtoras de tomate do estado de Goiás em 2017. Fonte: IBGE, 2019a; IBGE, 2019b.

### 2.2.1 Doenças virais em tomateiro no Brasil

O tomateiro é acometido por várias pragas e patógenos. Destaca-se que uma das pragas que promove maior prejuízo neste cultivo corresponde a mosca-branca (*Bemisia tabaci*), por atuar como vetor de isolados de espécies de *Begomovirus*, constante preocupação entre os produtores de tomate (ISLAM et al., 2018). O inseto é uma praga tanto para plantas ornamentais, quanto para culturas de interesse econômico (INOUE-NAGATA, LIMA e GILBERTSON, 2016). O biótipo MEAM1 dispõe de maior adaptação a diferentes hospedeiros. O biótipo MED, por sua vez, relatado inicialmente no Brasil em 2013 no Rio Grande do Sul (BARBOSA et al., 2015) apresenta maior resistência a inseticidas (piriproxifeno e neonicotinóides) (QUEIROZ et al., 2016).

As principais viroses que infectam o tomateiro no país são causadas por isolados de espécies classificadas nos gêneros *Begomovirus*, *Crinivirus*, *Cucumovirus*, *Potyvirus*, *Tospovirus* e *Tobamovirus* (AMORIM et al., 2016), entretanto a ocorrência de isolados de espécies classificadas em *Cucumovirus* e *Potyvirus* tem sido esporádica na região Centro-Oeste do país. As begomoviroses, causam severos prejuízos econômicos em tomateiro e diferentes culturas (ROJAS et al., 2018).

Isolados da espécie *Tomato chlorosis virus* – ToCV (gênero *Crinivirus*, família *Closteroviridae*), apresentam transmissão através de *Bemisia tabaci*, e no Brasil, o primeiro relato de ToCV ocorreu em 2008 no estado de São Paulo (BARBOSA et al., 2008). Isolados da espécie *Potato virus Y* – PVY (gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*), são transmitidos por afídeos e comumente afetam plantas solanáceas, amarantáceas, leguminosas e quenopodiáceas. A doença estimulada pela espécie, denominada risca do tomateiro, apresenta baixa incidência (LOURENÇÃO et al., 2005). Inicialmente relatado em pimenteiras, isolados da espécie *Pepper yellow mosaic virus* – PepYMV (gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*) também podem ser encontrados em tomateiro. A incidência deste vírus é mais associada ao cultivo do tomateiro próximo a lavouras de pimenteiras (AMORIM et al., 2016).

Isolados da espécie *Tomato mosaic virus* – ToMV (gênero *Tobamovirus*, família *Virgaviridae*) apresentam ampla distribuição e, podem ser transmitidos facilmente por contato (mecânico) e por sementes (MOREIRA et al., 2003). Os isolados de *Tomato chlorotic spot virus* – TCSV (gênero *Tospovirus*, família *Bunyaviridae*) são transmitidos por tripses (*Frankliniella schultzei*) e promovem a doença conhecida como “vira-cabeça” (AMORIM et al., 2016).

### 2.3 Família *Geminiviridae*

Espécies virais classificadas na família *Geminiviridae* apresentam o genoma de DNA circular de fita simples, com cerca de 2.500 a 3.000 nucleotídeos (nt) (ROJAS et al., 2018; REGO-MACHADO et al., 2019). Os geminivírus apresentam-se como monopartidos (quando o genoma possui uma única molécula de DNA) ou bipartidos (genoma formado por duas moléculas de DNA) (INOUE–NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). Uma única proteína capsidial (CP), é responsável pela encapsidação viral, de maneira que o capsídeo se organiza na forma de 22 capsômeros, resultando em dois icosaedros imperfeitos geminados. Tais entidades virais apresentam 18 a 30 nanômetros (nm) de comprimento (ZERBINI et al., 2017).

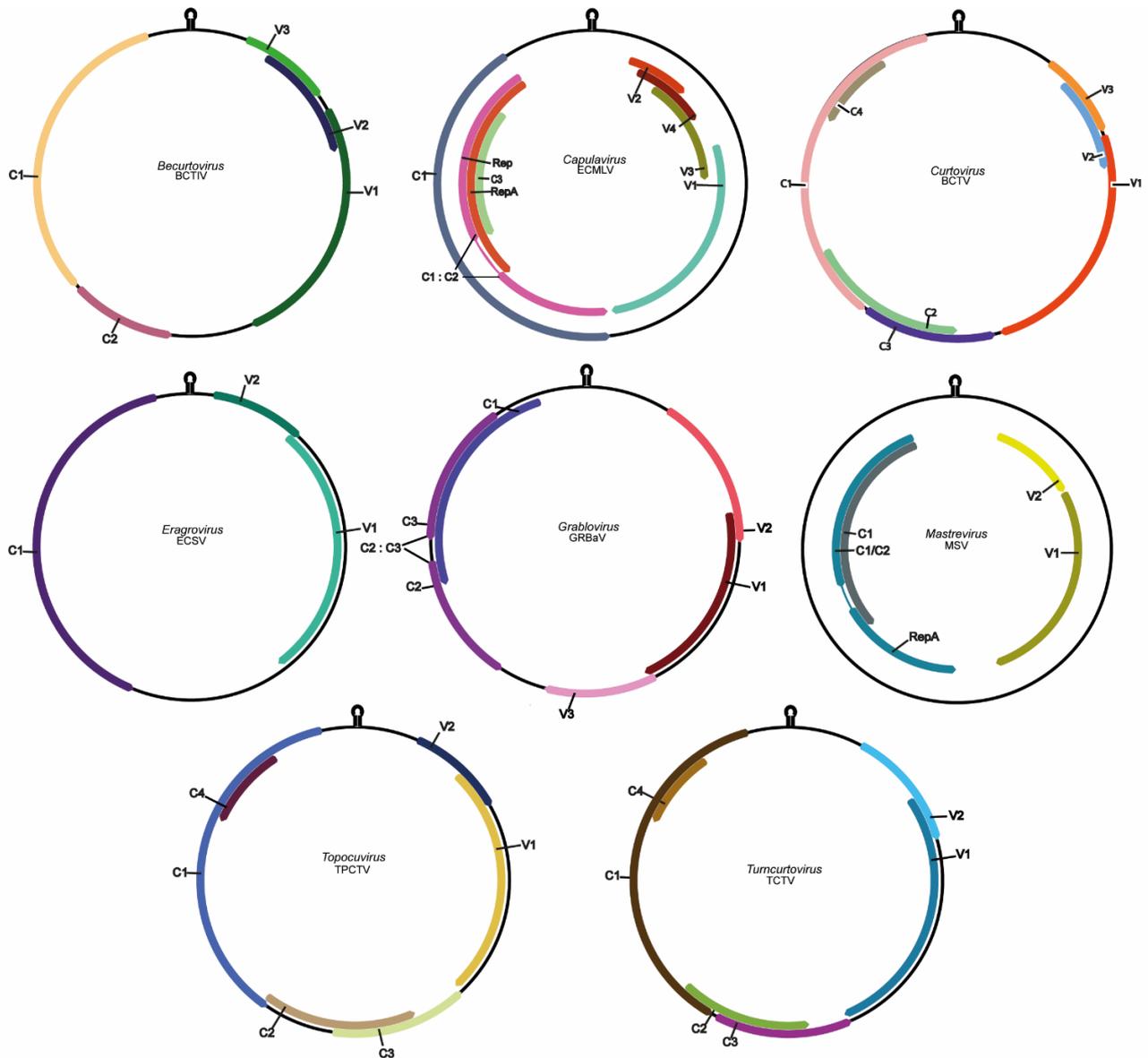
Acredita-se que os geminivírus se originaram de bacteriófagos como  $\phi$ X174, ou de plasmídeos bacterianos com genoma de DNA fita simples (KOONIN; ILYINA, 1992). Além disso, sugere-se, mediante estudos filogenéticos que a evolução dos geminivírus ocorreu em consonância com os nanovírus a partir de um ancestral comum. Os nanovírus são transmitidos por afídeos, e apresentam o genoma formado de ssDNA encapsidado em seis partículas isométricas (GRONENBORN, 2004; ROJAS et al., 2005).

Estes estudos fundamentam-se no fato de que, em nanovírus, a replicação do material genético também ocorre pelo método de círculo rolante, semelhante aos geminivírus e bacteriófagos (GRONENBORN, 2004). Destaca-se também que o DNA possui uma região conservada no formato de *hairpin* e a sequência TAGTATT↓AC (de forma que ↓ indica a região de clivagem), parecida com nonanucleotídeo TAATATT↓AC em geminivírus (TIMCHENKO et al., 2000).

De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus – ICTV) existem mais de 440 isolados virais identificados na família *Geminiviridae* (ICTV, 2019). Nos casos em que a identidade de nucleotídeos de um genoma completo em vírus monopartido e do componente DNA-A em espécies bipartidas, for menor que (<) 91% com o a sequência genômica total de qualquer begomovírus conhecido, trata-se de uma nova espécie. Em situações onde a sequência partilhar mais que 94% de identidade com o genoma completo de todos os isolados identificados para aquela espécie, têm-se, uma nova estirpe (BROWN et al., 2015).

A família *Geminiviridae* encontra-se representada por nove gêneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus* (**Figura 5** e **Tabela 1**). Para a separação dos gêneros, são utilizados como

critérios o inseto vetor, gama de hospedeiros, organização genômica e identidade de pares de sequência de todo o genoma (BROWN et al., 2015; ROJAS et al., 2018). No entanto, *Citrus chlorotic dwarf associated virus* (CCDaV) e *Mulberry mosaic dwarf associated virus* (MMDaV), espécies que não estão relacionadas à nenhum gênero também são classificadas como pertencentes à família *Geminiviridae* (VARSANI et al., 2017).



**Figura 5.** Estruturas genômicas representativas de espécies classificadas nos gêneros *Becurtovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*. As espécies representadas na imagem são respectivamente: *Beet curly top Iran virus* (BCTIV), *Beet curly top virus* (BCTV), *Eragrostis curvula streak virus* (ECSV), *Maize streak virus* (MSV), *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV) e *Turnip curly top virus* (TCTV). Na imagem, pode-se observar as ORFs (*open reading frame*) e as proteínas codificadas por elas V1 (proteína do capsídeo), V2 (proteína de movimento), V3 (regulação) codificadas no sentido viral. No sentido complementar pode-se indicar as ORFs C1 (replicação viral), C2 (ativação da transcrição), C3 (potencialização da replicação) e C4 (sintomas). Nota-se também que para os gêneros *Becurtovirus*, *Capulavirus*, *Grablovirus* e *Mastrevirus* a codificação da proteína relacionada a replicação acontece por meio do *splicing* do RNA mensageiro das ORFs C1 e C2.

**Tabela 1.** Informações de genoma, hospedeiras, número de espécies, vetor e espécie-tipo de gêneros classificados na família *Geminiviridae*.

<b>GENOMA</b>	<b>HOSPEDEIRAS</b>	<b>VETOR</b>	<b>GÊNERO</b>	<b>ESPÉCIES-TIPO</b>	<b>NÚMERO DE ESPÉCIES</b>	
Monopartido	Dicotiledôneas	Cigarrinha	<i>Becurtovirus</i>	<i>Beet curly top Iran virus</i>	03	
			<i>Curtovirus</i>	<i>Beet curly top virus</i>	03	
			<i>Turncurtovirus</i>	<i>Turnip curly top virus</i>	02	
	Membracídeo		<i>Grablovirus</i>	<i>Grapevine red blotch virus</i>	03	
			<i>Topocuvirus</i>	<i>Tomato pseudo-curly top virus</i>	01	
	Monocotiledôneas	Desconhecido	<i>Eragrovirus</i>	<i>Eragrostis curvula streak virus</i>	01	
	Monocotiledôneas e Dicotiledôneas		Pulgão	<i>Capulavirus</i>	<i>Euphorbia caput-medusae latent virus</i>	04
			Cigarrinha	<i>Mastrevirus</i>	<i>Maize streak virus</i>	40
Monopartido e Bipartido	Dicotiledôneas	Mosca-branca	<i>Begomovirus</i>	<i>Bean golden yellow mosaic virus</i>	409	

**Fonte:** *International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV (2019)*

Esta família é a maior dentre os vírus de planta, e isolados de espécies nela classificadas, provocam grandes prejuízos econômicos, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, por afetar culturas importantes economicamente, como tomate (*Solanum lycopersicum*) (TORRE et al., 2018); batata (*Solanum tuberosum*), batata-doce (*Ipomoea batatas*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), pimenta (*Capsicum* spp.), quiabo (*Abelmoschus esculentus*), soja (*Glycine max*) (INOUE–NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016); algodão; milho (*Zea mays*) (MARTIN; SHEPHERD, 2009); e mandioca (*Manihot esculenta*) (JACOBSON; DUFFY; SSERUWAGI, 2018).

Os sintomas induzidos por geminivírus corresponde à mosaico, enrolamento e deformidade foliar, nanismo e subsequente diminuição no quantitativo e tamanho de frutos. Tais sintomas refletem, na hospedeira, em muitos casos, as alterações na homeostasia celular e comprometimento dos microRNAs (miRNAs), relacionados à sinalização de hormônios e mudanças no desenvolvimento (HANLEY–BOWDOIN et al., 2013). Além disso, os sintomas podem ser influenciados pelo estágio do desenvolvimento da planta hospedeira e seu genótipo, fatores ambientais e infecções mistas (INOUE–NAGATA; ÁVILLA; BÔAS, 2009).

O estudo de geminivírus e seus aspectos biológicos de gama de hospedeiras necessitam que clones infecciosos sejam construídos pois proporcionam uma compreensão mais adequada da relação entre vírus e a hospedeira. A produção dos clones infecciosos auxilia na descrição biológica de várias espécies viral, tanto em infecções mistas, quanto de maneira individual; além de contribuir em trabalhos para avaliar culturas resistentes em situações de begomovirose (MELGAREJO; KON; GILBERTSON, 2015).

Para a confecção e inoculação de clones para begomovírus, emprega-se rotineiramente RCA (*Rolling Circle Amplification* – amplificação por círculo rolante) (INOUE–NAGATA et al., 2004). Para clones multiméricos, a origem de replicação deve estar presente duas vezes na construção e a inoculação pode ocorrer via agroinoculação, empregando-se *Agrobacterium tumefaciens* (MELGAREJO; KON; GILBERTSON, 2015). Outra ferramenta que auxilia na construção de clones infecciosos corresponde a montagem por *Gibson Assembly*. Este método não utiliza a digestão por enzimas de restrição, e possibilita a ligação de múltiplos fragmentos de DNA em um único segmento (CASINI et al., 2015).

### 2.3.1 Gêneros

O gênero *Becurtovirus* apresenta duas espécies, uma delas é *Beet curly top Iran virus* – BCTIV (espécie tipo), cujo isolado é transmitido pela cigarrinha *Circulifer haematoceps*; e a outra espécie é *Spinach curly top Arizona virus* (SCAV) sem vetor conhecido. Estas espécies apresentam o nonanucleotídeo TAAGATTCC diferente da sequência conservada 5'-TAATATTAC-3', comum a maioria dos geminivírus caracterizados. Até o momento, isolados de BCTIV foram relatados exclusivamente no Irã, em plantas dicotiledôneas, como *Solanum lycopersicum* (tomate), *Beta vulgaris* (beterraba), *Phaseolus vulgaris* (feijão-comum) e *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) (VARSANI et al., 2014).

O gênero *Curtovirus*, é representado atualmente por três espécies: *Horseradish curly top virus* – HrCTV, *Spinach curly top virus* – SCTV, e a espécie-tipo *Beet curly top virus* – BCTV. Isolados destas apresentam genoma monopartido de DNA circular de fita simples, com 2,8 a 3 Kb de comprimento, infectam dicotiledôneas e são transmitidas por cigarrinhas da família *Cicadellidae* em uma relação caracterizada como circulativa. O genoma normalmente codifica sete proteínas. Três estão dispostas no sentido viral, a capa proteica (CP, V1), uma proteína reguladora (REF, V2) e a proteína de movimento (MP, V3). O restante no sentido complementar, proteína relacionada à replicação (REP, C1), supressão de silenciamento (SS, C2), potenciador de replicação (REN, C3) e um gene associado aos sintomas (SD, C4) (ICTV, 2019)

O gênero *Eragrovirus* apresenta até o momento uma única espécie, a espécie-tipo *Eragrostis curvula streak virus* – ECSV. O genoma é monopartido de DNA circular de fita simples, infecta monocotiledôneas e o vetor é desconhecido. O genoma apresenta duas regiões intergênicas (IR-1 e IR-2) e normalmente codifica quatro proteínas. Duas são situadas no sentido viral, a capa proteica (CP, V1), proteína de movimento (MP, V2). No sentido complementar, têm-se a proteína relacionada à replicação (REP, C1) e a ativadora de transcrição (TrAP, C2) (VARSANI et al., 2014).

Espécies classificadas no gênero *Mastrevirus*, infectam em sua maioria espécies de plantas monocotiledôneas, exceto: *Tobacco yellow dwarf virus* – TYDV e *Chickpea chlorotic dwarf virus* – CpCDVV, que infectam dicotiledôneas. Este gênero apresenta até o momento 40 espécies, e *Maize streak virus* – MSV é a espécie-tipo. O genoma é monopartido de DNA circular de fita simples, com 2,6 a 2,8 Kb de comprimento e os isolados das espécies são transmitidos por cigarrinhas da família *Cicadellidae*, de forma circulativa e não propagativa

(ROJAS et al., 2018). O genoma de isolados de espécies neste gênero codifica quatro proteínas. A expressão no sentido viral inicia-se com a proteína de movimento (MP), situada na ORF V2. Após, tem-se a proteína capsidial (CP) localizada na ORF V1. Na direção complementar observa-se a expressão de proteínas relacionadas com a replicação: Rep, disposta na ORF C1:C2; e RepA, na ORF C1 (HANLEY–BOWDOIN et al., 2013).

O gênero *Capulavirus* é representado atualmente por quatro espécies: *French bean severe leafcurl virus* (FbSLCV), *Alfalfa leafcurl virus* (ALCV) e *Plantago lanceolata latent virus* (PILV), e a espécie-tipo *Euphorbia caput medusae latent virus* (EcmLV). Isolados destas espécies apresentam genoma monopartido de DNA circular, infectam monocotiledôneas e dicotiledôneas, e apenas ALCV apresenta vetor conhecido, o afídeo *Aphis craccivora* (SUSI et al., 2017; ICTV, 2019). O genoma codifica seis proteínas, quatro no sentido viral: a proteína de capa (CP, V1), V2, V4 e V3, estas três últimas possivelmente relacionadas com o movimento viral (MP). No sentido complementar: Rep, disposta na ORF C1:C2; RepA, na ORF C1 e C3 (ICTV, 2019).

*Grabovirus*, é representado atualmente por três espécies: *Prunus latent virus* – PLV, *Wild vitis latent virus* – WVLV, e a espécie-tipo *Grapevine red blotch virus* – GRBV. Isolados destas espécies apresentam genoma monopartido de DNA circular de fita simples, com 3,2 Kb de comprimento, infectam dicotiledôneas e são transmitidas por membracídeos da família *Membracidae*. O genoma codifica seis proteínas, três destas estão dispostas no sentido viral: proteína de capa (ORF V1) e ORFs V2 e V3. No sentido complementar, têm-se: a proteína RepA (C1), Rep (C1:C2) e C3 (VARSANI et al., 2017; ICTV, 2019).

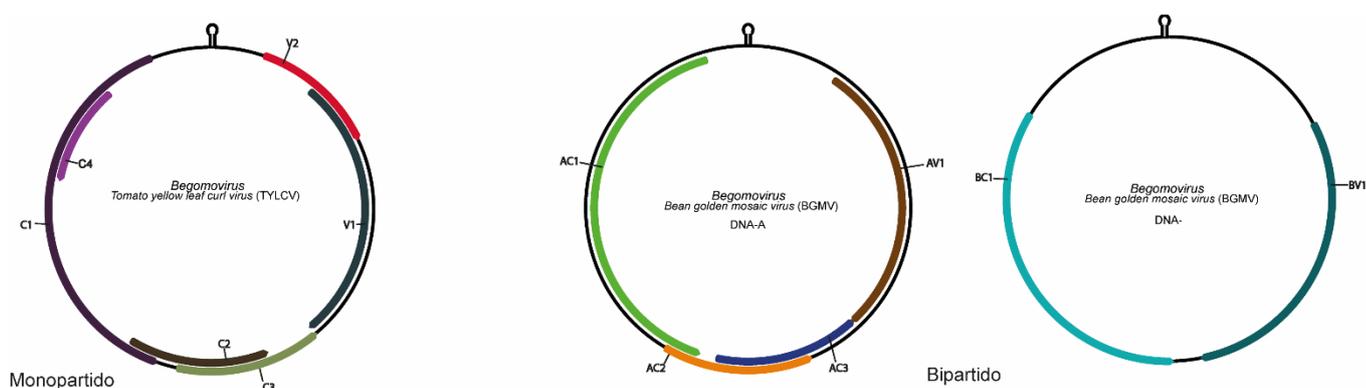
O gênero *Topocuvirus*, atualmente representado unicamente pela espécie-tipo *Tomato pseudo-curly top virus* – TPCTV, possui genoma monopartido de DNA circular de fita simples, com cerca de 2,8 Kb, infecta dicotiledôneas e é transmitido por cigarrinhas da família *Membracidae*. O genoma codifica seis proteínas. No sentido viral observa-se a proteína codificada na ORF V2 e a proteína de capa (V1). No sentido complementar: REP (C1), e as presentes nas ORFs C2, C3 e C4 (FAUQUET et al., 2008; ICTV, 2019).

O gênero *Turncurtovirus* apresenta até o presente momento apenas a espécie-tipo *Turnip curly top virus* – TCTV, transmitido pela cigarrinha *Circulifer haematoceps*, e infecta plantas dicotiledôneas. O genoma é monopartido formado por DNA circular de fita simples, codificando seis proteínas, duas no sentido viral: a proteína codificada pela ORF V2 e a proteína de capa (ORF V1) e quatro no sentido complementar: C1, C2, C3 e C4 (VARSANI et al., 2014).

### 2.3.1.1 *Begomovirus*

O gênero *Begomovirus*, espécie-tipo *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), é o que apresenta o maior número de espécies. Dentre estas, nota-se que existem espécies de considerável importância econômica, tendo em vista as perdas em diferentes culturas (BROWN et al., 2015). As espécies classificadas em *Begomovirus* apresentam um ou dois componentes genômicos e a transmissão para hospedeiras dicotiledôneas ocorre por intermédio da mosca-branca, *Bemisia tabaci* MEAM1, (Homoptera: Aleyrodidae) (LEKE et al., 2015).

Os isolados de espécies de *Begomovirus*, relatados na África, Ásia, Europa e Oceania, (Velho Mundo) possuem a particularidade de apresentarem os genes envolvidos no movimento viral, encapsidação do genoma e replicação em um único componente (**Figura 6**) (BROWN et al., 2015). Tanto espécies monopartidas quanto bipartidas apresentam disposição genômica ambissenso. Nas espécies monopartidas, as proteínas relacionadas com o capsídeo e o movimento viral na hospedeira são codificadas pelas ORFs V1 e V2, respectivamente. No sentido complementar, as proteínas são codificadas pelas ORFs C1, C2, C3 e C4, que estão relacionadas respectivamente à replicação viral (REP), ativação da transcrição (TrAP), potencialização da replicação viral (REN) e manifestação dos sintomas aliada ao movimento do vírus e silenciamento gênico após transcrição (VANITHARANI et al., 2004).



**Figura 6.** Organização genômica de espécies de begomovírus monopartidas e bipartidas. As espécies representadas na imagem correspondem a *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e *Bean golden mosaic virus* (BGMV). Na imagem também, pode-se observar as regiões comuns (CR, *common region*) do componente A (CRA) e B (CRB), seguida das ORFs, no componente A: AV1 (capsídeo), AC1 (replicação), AC2 (Transcrição), AC3 (Aumento de DNA viral) e AC4; no componente B: BV1 (movimento intracelular) e BC1 (movimento extracelular). Para os vírus monopartidos, pode-se indicar as ORFs C1 (replicação viral), C2 (ativação da transcrição), C3 (potencialização da replicação) e C4 (sintomas), V1 (capsídeo) e V2 (movimento).

Além disso, espécies com genoma monopartido são frequentemente relacionadas a outro componente molecular, o DNA satélite, como DNA-1 (alfasatélites) e DNA  $\beta$  (betassatélites).

Satélites são ácidos nucleicos infecciosos que precisam de um vírus auxiliar para encapsidação e replicação (BRIDDON et al., 2003).

Os alfassatélites apresentam aproximadamente 1.375 nt, assemelham-se ao componente genômico descrito como DNA-R de nanovírus, os quais apresentam uma *open reading frame* (ORF) que codifica a REP, seguida de uma região abundante em adenina e uma estrutura em *hairpin* que engloba a origem de replicação (IDRIS et al., 2005). Estes satélites conseguem se replicar de forma autônoma, entretanto, necessitam de um vírus auxiliar para infecção sistêmica da planta hospedeira e transmissão por inseto (SAUNDERS et al., 2000). Em 2010, alfassatélites começaram a ser descritos no Brasil e na Venezuela relacionados aos begomovírus bipartidos *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV), *Euphorbia mosaic virus 1* (EuMV) e *Melon chlorotic mosaic virus* (MeCMV) (PAPROTKA; METZLER; JESKE, 2010). Estes corresponderam aos primeiros relatos de alfassatélites envolvendo begomovírus nas Américas (Novo Mundo) (ROMAY et al., 2010).

Os betassatélites (DNA- $\beta$ ) apresentam cerca de 1.360 nt, são dependentes de um vírus auxiliar para a replicação e movimento sistêmico na hospedeira. O genoma apresenta uma ORF,  $\beta$ C1, que codifica uma proteína relacionada à indução de sintomas e na supressão do silenciamento gênico após a transcrição (CUI et al., 2005; BRIDDON; STANLEY, 2006). Destaca-se que o DNA  $\beta$  é fundamental para o aumento da severidade dos sintomas, e quadros infecciosos promovidos apenas pelo vírus auxiliar não conseguem reproduzir os sintomas da doença (ZHOU, 2013). A severidade está atrelada ao fato de que o DNA  $\beta$  codifica uma proteína relacionada à supressão de silenciamento, a  $\beta$ C1, que compromete a resposta de defesa da planta (CUI et al., 2005).

Os begomovírus presentes nas Américas, entretanto, são conhecidos como pertencentes ao Novo Mundo e apresentam dois componentes genômicos, caracterizados como DNA-A e DNA-B, exceção é feita para a espécie *Tomato leaf deformation virus* (ToLDeV), identificada no Equador e Peru (MELGAREJO et al., 2013). No Brasil, isolados de espécies monopartidas foram identificadas e correspondem a *Tomato leaf curl purple vein virus* (ToLCPVV) (MACEDO et al., 2018) e *Tomato mottle leaf curl virus* (CHAVES et al., 2017). Em uma mesma espécie, sabe-se que os componentes genômicos não apresentam uma identidade de sequência, com exceção de uma região altamente conservada (acima de 90% de identidade), com aproximadamente 200 nt, conhecida como região comum (RC). Neste trecho, está localizado a origem de replicação dos geminivírus (BROWN et al., 2015).

O DNA-A apresenta a informação genética necessária para a codificação de seis proteínas. Inicialmente, têm-se a proteína relacionada com a replicação (*Replication-associated protein* – REP) que reconhece e liga-se à origem de replicação e inicia a síntese de DNA pelo método do círculo rolante (OROZCO et al., 1997). Posteriormente, observa-se a proteína transativadora da transcrição dos genes *cp* e *nsp* (*Trans-activating protein* – TRAP), que também pode desempenhar o papel de supressora do silenciamento (VOINNET; PINTO; BAULCOMBE, 1999).

A terceira proteína, está envolvida com a replicação, de maneira a elevar a quantidade de DNA viral, entretanto, a mesma tem caráter acessório (*Replication-enhancer protein* – REN) (PEDERSEN; HANLEY-BOWDOIN, 1994). A proteína capsidial (CP) que está relacionada com a encapsidação do genoma do vírus, o que é fundamental para a transmissão pelo inseto vetor (HÖFER et al., 1997). Por fim, destaca-se também que certos begomovírus podem codificar a proteína AC4, participante no evento de supressão do silenciamento gênico (VANITHARANI et al., 2004).

Em algumas espécies monopartidas e bipartidas pode-se encontrar também a ORF AC5/C5. Esta é identificada adjacente a ORF AC3/C3 e sobreposta a um segmento da ORF AV1/V1. Acredita-se que a AC5 atue na supressão do silenciamento de RNA e reforce a patogenicidade viral, por intermédio de estudos com a espécie *Mungbean yellow mosaic India virus* (MYMIV) (LI et al., 2015). No Brasil, dentre as espécies relatadas, nota-se a presença da ORF na espécie *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (FERNANDES, 2009), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (ANDRADE et al., 2006).

O DNA-B, por outro lado, possibilita a codificação de duas proteínas. A primeira, responsável pelo movimento célula-a-célula (*Movement protein* – MP) enquanto a segunda, realiza o transporte do DNA do vírus através dos poros nucleares (*Nuclear shuttle protein* – NSP) (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013).

#### **2.3.1.1.1 Replicação viral**

Isolados de begomovírus são inoculados na planta pelo inseto vetor e o genoma viral (ssDNA) desassocia-se espontaneamente do capsídeo (PALMER e RYBICKI, 1998). No meio celular, o ssDNA viral é transportado para o núcleo, onde é transformado para a forma replicativa (FR), um estágio intermediário em que o genoma assume a conformação de fita

dupla (dsDNA) (STENGER et al., 1991). Acredita-se que a proteína CP participa deste processo ao interagir com a cadeia de transporte da hospedeira (GAFNI; EPEL, 2002).

A FR atua como molde para a formação de novos componentes genômicos e transcrição de genes virais. O genoma do vírus é replicado por meio do procedimento da replicação por círculo rolante utilizando a FR como base (STENGER et al., 1991; STANLEY, 1995; PRADHAN et al., 2017). A origem de replicação (*ori*) é situada na região intergênica comum entre ambos componentes genômicos do vírus. A sequência nucleotídica da *ori* é conservada entre componentes de um mesmo vírus, todavia, a mesma varia entre diferentes espécies. Apesar de que uma região de aproximadamente 30 nucleotídeos permanece conservada entre todas as espécies (OROZCO et al., 1997).

Na região existe uma sequência repetida e invertida composta majoritariamente por guanina e citosina, resultando em uma estrutura conservada na forma de grampo (*Structurally-conserved element* – SCE), com uma sequência invariável (5'–TAATATTAC–3') presente em todos os geminivírus, que corresponde ao domínio funcional da origem de replicação. A clivagem acontece na região AC do nonanucleotídeo (TAATATT↓AC), de forma que inicia-se o a replicação por círculo rolante (FONTES et al., 1994; LAUFS et al., 1995). O processo de corte decorre da ação da proteína Rep, que atua como endonuclease sítio-específica (PRADHAN et al., 2017).

Na RC região também estão dispostas regiões específicas para ligação da REP e sequências promotoras da RNA polimerase tipo II de plantas, a qual transcreve genes virais (FONTES et al., 1994; HANLEY–BOWDOIN et al., 1999). O sítio de ligação de Rep no DNA viral está situado entre a caixa TATA do gene *rep* e a SCE (OROZCO; HANLEY–BOWDOIN, 1998), de forma que é formado por duas sequências em repetição direta e ao menos uma repetição invertida descrita como iterons (ARGUELLO–ASTORGA; HERRERA–ESTRELLA; RIVERA–BUSTAMANTE, 1994). A ligação de REP aos iterons é fundamental para o começo da replicação. Após a ligação da proteína ao genoma do vírus e posterior estabilização do complexo constituído por REP, REN e fatores do hospedeiro, a REP cliva o nonanucleotídeo situado na SCE, iniciando à replicação pelo método de círculo rolante (PRADHAN et al., 2017).

A REP tem como característica ter o reconhecimento vírus-específico, assim, a proteína só realiza a replicação de genomas cognatos. A região funcional de Rep foi mapeada na sua porção N-terminal e abrange o domínio de ligação a DNA, constante em todas as proteínas Rep. Uma vez que o reconhecimento e ligação aos iterons por Rep é específico, estipulou-se

que este é dependente da sequência nucleotídica dos iterons e da sequência de aminoácidos de um motivo conservado na proteína Rep descrito como domínio relacionado aos iterons (*Iteron-related domain – IRD*) (ARGUELLO–ASTORGA; RUIZ–MEDRANO, 2001).

### **2.3.1.1.2 Movimento viral na planta**

A partir da síntese das proteínas MP e NSP, inicia-se o movimento do vírus na planta hospedeira. O movimento viral pode ser classificado em movimento célula-a-célula através dos plasmodesmas, e movimento a longa distância, em que a partícula viral consegue atingir o sistema vascular e é transportado de forma sistêmica para toda a planta. (PALMER; RYBICKI, 1998; PRADHAN et al., 2017).

Os begomovírus replicam-se no núcleo de células hospedeiras, assim, estes precisam ser transportados da região nuclear para o citoplasma, o que é desempenhado pela proteína NSP (PALMER; RYBICKI, 1998). A proteína MP por sua vez, consegue se associar à membrana plasmática e modificar o limite de exclusão dos plasmodesmas, o que possibilita o transporte do vírus. Ambas as proteínas atuam de maneira cooperativa no controle do movimento viral, tanto no meio intracelular, quanto intercelular, o que resulta em uma infecção sistêmica (NOUEIRY; LUCAS; GILBERTSON, 1994; SANDERFOOT; LAZAROWITZ, 1996).

A interação entre as proteínas MP e NSP em testes *in vitro* foi demonstrada para o TGMV (MARIANO et al., 2004), enquanto que *in vivo*, a relação entre estas foi exemplificada em *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) empregando-se o modelo duplo-híbrido de levedura (CARVALHO et al., 2008). Nestes trabalhos, identificou-se uma GTPase citoplasmática descrita como NIG (*NSP-interacting GTPase*), que apresenta interação com NSP viral tanto *in vitro* quanto *in vivo* e desencadeia o transporte da proteína do vírus do núcleo para o citoplasma, de maneira que esta é redirecionada para a periferia celular, para a interação com MP (CARVALHO et al., 2008; PRADHAN et al., 2017).

O movimento intracelular de begomovírus pode ser exemplificado pelos modelos de *couple-skating* e *relay-race* (LEVY; TZFIRA, 2010). No primeiro, a NSP transporta o genoma viral (ssDNA ou dsDNA) do núcleo para a região de periferia celular, e no citoplasma, a MP age nos plasmodesmas com o intuito de facilitar o movimento célula-a-célula do sistema NSP-DNA (FRISCHMUTH et al., 2007; KLEINOW et al., 2008). No segundo, descreve-se que a NSP transporta inicialmente o dsDNA do núcleo para o citoplasma da célula, e o genoma

associa-se com a MP, resultando em MP-dsDNA que consegue atravessar os plasmodesmas (NOUEIRY; LUCAS; GILBERTSON, 1994).

Quando o vírus consegue atingir os plasmodesmas relacionados ao tecido vascular, inicia-se o movimento a longa distância. Este movimento segue o fluxo do sistema vascular, e a maior parte dos vírus são transportados através do floema, em sua forma de partícula completa. A partir do ponto onde houve a penetração do vírus, este atinge inicialmente as raízes, em seguida as folhas mais novas, e por fim, toda a planta (PRADHAN et al., 2017).

Para os casos de begomovírus monopartidos e os gêneros *Mastrevirus* e *Curtovirus*, nota-se que a proteína CP atua tanto nos movimentos a longa distância, quanto célula-a-célula (ROJAS et al., 2001). Em begomovírus monopartidos, ressalta-se ainda que as proteínas V2 e C4 também são necessárias para o movimento. Na maioria dos casos de begomovírus bipartidos, a proteína CP não é necessária para que se estabeleça um quadro de infecção sistêmica. A MP e NSP conseguem reconhecer o DNA viral de forma específica em relação à forma e comprimento, isto diminui a necessidade da proteína capsidial ser empregada no movimento a longa distância (GILBERTSON et al., 2003).

### **2.3.1.1.3 Begomovirose em tomateiro Brasil**

Os relatos iniciais de begomovírus em tomateiro no país correspondem à década de 60 (FLORES; SILBERSCHMIDT; KRAMER, 1960). Os tomateiros apresentavam sintomas de deformação foliar, encrespamento e clorose internerval difusa. O agente viral foi transmitido por enxertia e por mosca-branca. Verificou-se neste caso que o provável agente causador da doença em tomateiro poderia ser um begomovírus. Em estudos posteriores, confirmou-se que o agente causador da doença em tomateiro era um begomovírus, especificamente, o *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (MAYTIS et al., 1975).

O TGMV foi a única espécie de begomovírus de tomateiro do Brasil caracterizada durante esta época e a sequência de nucleotídeos do genoma completo foi determinada e publicada em 1984 (HAMILTON et al., 1984). Até 1990, os relatos de begomovírus em tomateiro eram restritos a poucas publicações, sugerindo que eram eventos esporádicos. A partir de 1994, os relatos de begomovírus em tomateiros no Brasil começaram a ficar mais recorrentes, inicialmente na Bahia, Ceará, Distrito Federal e Minas Gerais. Sugere-se que o aumento na incidência de begomovirose em tomateiro foi desencadeado pela introdução do

biótipo B (MEAM1) de *B. tabaci*, no Brasil (FRANÇA; VILAS-BOAS; CASTELO-BRANCO, 1996).

A relação observada entre vírus-vetor é descrita como circulativa não propagativa, visto que o patógeno percorre o corpo do inseto sem apresentar atividade replicativa, e quando atinge as glândulas salivares pode ser transmitido para outra planta (DE BARRO et al., 2011; WHITFIELD; FALK; ROTENBERG, 2015).

Outra espécie de begomovírus em tomateiro no país foi proposta como *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) no ano de 1996 (FARIA et al., 1997). O vírus foi identificado em amostras provenientes da região de São Paulo e foi descrito como o agente causador da doença do mosaico deformante da batata (RIBEIRO et al., 2006; ALBUQUERQUE et al., 2010).

As espécies que infectam tomateiro no Brasil compõem um conjunto distante de outros begomovírus descritos nos demais países. Indica-se que possivelmente estes vírus conseguiram evoluir de forma independente e isolada no Brasil. A hipótese mais aceita é de que *B. tabaci* biótipo MEAM1, polífaga, serviu como vetor para a transmissão e posterior adaptação de begomovírus de plantas silvestres ou daninhas para o tomateiro. Destaca-se então que no Brasil existem cerca de 20 espécies de begomovírus que infectam tomateiro, sendo estas: *Chino del tomate Amazonas virus* (CdTAV); *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV), *Tomato leaf distortion virus* (ToLDV), *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV), *Tomato mild mosaic virus* (ToMIMV) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), *Tomato bright yellow mosaic virus* (ToBYMV), *Tomato bright yellow mottle virus* (ToBYMoV), *Tomato golden leaf distortion virus* (ToGLDV), *Tomato golden leaf spot virus* (ToGLSV), *Tomato golden vein virus* (ToGVV), *Tomato interveinal chlorosis virus* (ToICV), *Tomato rugose yellow leaf curl virus* (TRYLCV); *Tomato leaf curl purple vein virus* (ToLCPVV); *Tomato interveinal chlorosis virus-2* (ToICV2) ( HAMILTON et al., 1984; ALBUQUERQUE et al., 2010; MACEDO et al., 2018; REGO-MACHADO et al., 2019).

## **2.4 Mecanismos geradores de variabilidade genética em vírus**

Para os vírus, a variabilidade genética possibilita diferentes oportunidades para que estes possam se adaptar à vários hospedeiros e a alterações nas condições ambientais. A variabilidade e consequente evolução pode ser impulsionada por eventos de mutação, recombinação e

pseudo-recombinação. Em *Begomovirus*, tais mecanismos proporcionam uma considerável variabilidade genética, o que resulta no desenvolvimento de novos isolados, estirpes e espécies (SEAL; JEGER; VANDENBOSCH, 2006).

#### **2.4.1 Mutação**

A evolução dos geminivírus, semelhante a todos os vírus, é dependente de mutações. Tal evento corresponde na inserção errônea de nucleotídeos ao longo da replicação do material genético, o que pode resultar na mudança da fase de leitura (WATSON et al., 2015; MADIGAN et al., 2016). O mesmo possibilita a variabilidade antes da permuta dos fragmentos de material genético (SEAL; JEGER; VANDENBOSCH, 2006; DUFFY; HOLMES, 2008).

Além disso, a evolução rápida destes vírus é guiada em certa parte por mecanismos mutacionais, que atuam especificamente sobre o ssDNA (HARKINS et al., 2009). Estudos sobre a taxa de variabilidade gênica de *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV) (begomovírus), apontaram uma frequência média de mutação de  $3,5 \cdot 10^{-4}$  e  $5,3 \cdot 10^{-4}$  após 60 dias de infecção e *N. benthamiana* e tomateiro, respectivamente (GE et al., 2007). Estudos de bactérias e sistemas animais mostram que as taxas de substituição de vírus de dsDNA e ssDNA diferem significativamente (DUFFY; SHACKELTON; HOLMES, 2008).

#### **2.4.2 Recombinação**

A dinâmica recombinativa contribui fortemente para a diversidade das populações virais, mesmo que a mutação se configure como principal mecanismo de diversidade viral (GARCÍA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2003). Define-se como recombinação o mecanismo em que trechos de uma fita de DNA ou RNA incorporam-se na fita de um indivíduo diferente no processo de replicação. O evento de recombinação é corriqueiro em *Geminiviridae* (LEFEUVRE; VARSANI; MARTIN, 2009), e contribui para a diversificação genética, potencial evolucionário e adaptação local do gênero (MONCI et al., 2002; SILVA et al., 2014).

A alta recorrência de recombinações nestes vírus pode ser parcialmente explicada pela existência de uma estratégia de replicação dependente de recombinação (RDR) (PREISS; JESKE, 2003) em consonância à replicação por círculo rolante (RCR) (SAUNDERS; BEDFORD; STANLEY, 2001), além de infecções mistas (GARCÍA-ANDRÉS et al., 2006;

DAVINO et al., 2009) com a presença de infecção em uma mesma planta por mais de um vírus (MORILLA et al., 2004; SEAL; JEGER; VANDENBOSCH, 2006).

A recombinação é diretamente relacionada com a emergência de novas doenças em plantas cultivadas. Pode-se mencionar a doença do mosaico da mandioca (*Manihot esculenta*), promovida pelo recombinante EACMV na Uganda (PITA et al., 2001); as epidemias relacionadas ao complexo TYLCV no Mediterrâneo, com o surgimento de *Tomato yellow leaf curl Malaga virus* (TYLCMaV) e *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus* (TYLCAxV) em plantações de tomate na Espanha (MONCI et al., 2002; GARCÍA-ANDRÉS et al., 2007). Os mecanismos precisos que regulam a recombinação em begomovírus, por exemplo, são pouco elucidados, entretanto, sabe-se que os sítios recombinantes não são distribuídos de maneira uniforme ao longo do genoma, com a existência de sítios frequentes (*hot spots*) e não-frequentes (*cold spots*) (STANLEY, 1995; LEFEUVRE, VARSANI e MARTIN, 2009).

#### **2.4.3 Pseudo-recombinação**

A pseudo-recombinação mecanismo que acontece em boa parte dos begomovírus bipartidos, consiste na troca de segmentos do genoma entre vírus diferentes, sem a necessidade de recombinação intermolecular (ANDRADE et al., 2006; SILVA et al., 2014). O estudo de pseudo-recombinantes é útil para melhor caracterização de genes e verificação de relações filogenéticas, como na situação de mistura de componentes genômicos do BGYMV e do *Bean golden mosaic virus* (BGMV), que apresentam identidade inferior a 75% em suas sequências e não formam pseudo-recombinantes infecciosos (GILBERTSON et al., 1993).

O caráter específico da ligação da proteína Rep aos iterons é descrita como o principal fator para a formação de pseudo-recombinantes viáveis entre diferentes espécies de begomovírus (ANDRADE et al., 2006; BULL et al., 2007). Outra questão relevante é o estado de conservação da sequência de aminoácidos da proteína Rep, particularmente, os três aminoácidos do IRD que estariam relacionados especificamente na ligação aos iterons (ARGUELLO-ASTORGA; RUIZ-MEDRANO, 2001).

A viabilidade de pseudo-recombinantes demonstra que os fatores envolvidos na replicação e movimento podem ser trocados entre espécies altamente relacionadas, ou entre estirpes de uma mesma espécie. No entanto, a pseudo-recombinação entre begomovírus é complexa e envolve interações entre fatores do vírus e do hospedeiro (HILL et al., 1998; SILVA et al., 2014).

## 2.5 Estratégias de controle viral

Concomitantemente a emergência de novos begomovírus, existe a dificuldade em se adotar, de forma eficaz, medidas que visem controlar o vetor. O controle de geminivíroses normalmente abrange técnicas de controle do vetor viral e o uso de plantas com genes de resistência (TORRE et al., 2018). As técnicas voltadas ao vetor (*Bemisia tabaci*) podem ser mais caras e possuírem pouca eficiência, neste sentido, uma alternativa mais rentável e benéfica corresponde no desenvolvimento de culturas com algum gene de resistência (PEREIRA-CARVALHO et al., 2014).

Assim, o controle de doenças virais em tomateiro, a estratégia mais empregada corresponde na adoção de plantas com resistência genética, visto que o vetor (*B. tabaci*) pode adquirir resistência à inseticidas e poder migrar de plantios mais velhos para os mais novos (ROCHA et al., 2012). Destaca-se também que o emprego destes genes advém da busca de genes de resistência em espécies selvagens de tomateiro, como *Solanum pimpinellifolium* e *Solanum peruvianum* (PEREIRA-CARVALHO et al., 2014).

Tais genes/*loci* visam impedir de forma mais estável, o sucesso da infecção viral ao comprometer atividades envolvidas na replicação, expressão genômica ou no movimento viral. No tomateiro, relata-se a presença de nove genes que conferem resistência aos begomovírus, sendo estes: *Ty-1* (ZAMIR et al., 1994), *Ty-2* (HANSON et al., 2000), *Ty-3* (JI; SCHUSTER; SCOTT, 2007), *Ty-4* (YAN et al., 2018), *ty-5* (ANBINDER et al., 2009), *Ty-6* (HUTTON; SCOTT; SCHUSTER, 2012; GILL et al., 2019), *tcm-1* (GIORDANO et al., 2005) e *tgr-1* (BIAN et al., 2007).

Os genes previamente mencionados foram obtidos mediante a introgressão de variadas espécies selvagens pertencentes ao gênero *Solanum* com a espécie *S. lycopersicum*. Tais genes podem ser separados em dominantes e recessivos. O primeiro grupo compreende *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4* e *Ty-6* e proporciona resistência a espécie *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) begomovírus monopartido do Velho Mundo. *Ty-1*, em particular, presente no cromossomo 6 de tomate, apresenta maior acessibilidade ao produtor brasileiro, uma vez que o mesmo é empregado em tomateiros híbridos no país. Originalmente o gene foi introgridido a partir de *Solanum chilense* e a resistência conferida abarca adicionalmente isolados de espécies de genoma bipartido como *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (BOITEUX et al., 2007; TORRE et al., 2018).

Pode-se mencionar também que a ação do gene *Ty-1* provavelmente esteja relacionada a atividade da proteína de movimento intercelular (MP) (ZAMIR et al., 1994; VOORBURG et

al., 2019), e no silenciamento gênico transcricional - SGT (VERLAAN et al., 2013). De acordo com Verlaan et al. (2011) *Ty-1* codifica para uma RNA polimerase dependente de RNA (RDR), do tipo RDRy (VERLAAN et al., 2011). Segundo Butterbach et al. (2014) uma das funções desta RDR seria amplificação dos níveis de SGT (BUTTERBACH et al., 2014).

A resistência conferida pelo gene *Ty-2*, introgridido a partir de *S. habrachoites*, está relacionada a isolados de begomovírus provenientes da região asiática (PEREIRA-CARVALHO et al., 2014). Além disso, pode-se mencionar que o referido gene também pode atuar contra espécies bipartidas, e diferentes isolados de *Tomato leaf curly virus* (ToLCV) e *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (YANG et al., 2014). O gene *Ty-3* introgridido de *S. chilense*, é eficaz contra a *Tomato mottle virus* (ToMoV) (JI, SCHUSTER; SCOTT, 2007), enquanto *Ty-4* atua contra múltiplas espécies de begomovírus, como descrito por Nakhla e colaboradores (2005) (NAKHLA et al., 2005).

O segundo grupo, composto por *tcm-1*, *tgr-1* e *ty-5* proporcionam resistência à (TYLCV) e variantes de *Tomato leaf curl virus* (TLCV) (BOITEUX et al., 2012; HUTTON; SCOTT; SCHUSTER, 2012). Adicionalmente, pode-se destacar que *tcm-1* auxilia na resistência a begomovírus monopartidos e bipartidos, como *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (GIORDANO et al., 2005) *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (PEREIRA-CARVALHO et al., 2010) e também a monopartidos (GARCÍA-CANO et al., 2008; PEREIRA-CARVALHO et al., 2010).

### 3. JUSTIFICATIVA

No atual contexto de variabilidade genética entre membros da família *Geminiviridae*, em particular, *Begomovirus*, onde constantemente identificam-se isolados de novas espécies ocorrendo campo, alguns destes, com potencial para superar os genes de resistência usados em tomateiro, o monitoramento, a descrição molecular e a produção de clones infecciosos de isolados virais é de fundamental importância, para conhecimento da diversidade viral e para suporte a programas de melhoramento genético de tomate

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar novas espécies de begomovírus ocorrendo em Goiás e no Distrito Federal em tomateiro no período compreendido entre 2001 a 2016 e caracterizar molecularmente uma espécie nova de begomovírus neste local.

#### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter a sequência completa de isolados virais do Distrito Federal e Goiás, tidos como prováveis espécies novas e associar com a presença do gene de resistência *Ty-1*
- Gerar clones dos componentes virais DNA-A e DNA-B de pelo menos um dos isolados virais.
- Obter clone infeccioso da espécie nova (monomérico e/ou multiméricos) para pelo menos um isolado viral.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Coleta e manutenção de isolados virais

Mediante dados oriundos de uma coleção de trabalho com 1655 isolados de begomovírus do Laboratório de Melhoramento Vegetal da Embrapa Hortaliças, verificou-se que existem 166 amostras coletadas na região do Distrito Federal, e 284 do estado de Goiás. A partir destas amostras iniciais, foram selecionadas preliminarmente 92 amostras por apresentarem a identidade nucleotídica menor ou igual a 91%, dentre estas, 25 eram do Distrito Federal e 67 de Goiás. Após esta primeira seleção, procurou-se escolher amostras coletadas preferencialmente em locais diferentes e em momentos (mês/ano) diferentes, assim, foram escolhidas 23 amostras representativas por local/ano sendo sete provenientes de Goiás e 16 do Distrito Federal. No momento de recebimento das amostras foliares de plantas sintomáticas, estas foram submetidas à extração de DNA total utilizando o protocolo descrito por Boiteux e colaboradores (BOITEUX, FONSECA; SIMON, 1999) e armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para a extração de DNA total três discos foliares foram retirados da folha e macerados na presença de nitrogênio líquido. Posteriormente 600  $\mu\text{L}$  de tampão CTAB e 1% de sulfito de sódio foram adicionados. Adicionou-se também 2  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol. A amostra permaneceu em banho-maria por 10 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ . Após resfriar, 600  $\mu\text{L}$  de clorofil foram adicionados à mistura e agitada em vórtex e centrifugada a 13.000 rpm (aproximadamente 12000g) por cinco minutos. Retirou-se 450 $\mu\text{L}$  do sobrenadante, transferindo este volume para um novo tubo já contendo 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Após homogeneização lenta do material, as amostras permaneceram 10 minutos em gelo. A seguir o material foi centrifugado a 13.200 rpm por 13 minutos. Após descartar o sobrenadante, o precipitado foi lavado mediante a aplicação de 50  $\mu\text{L}$  de etanol (70%). Novamente, centrifugou-se a 13.200 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante e deixou-se a amostra secar por no mínimo 10 minutos (de maneira que todo o etanol evaporasse). Ao final, houve a ressuspensão do *pellet* em 100  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e armazenamento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 5.2 Seleção de isolados correspondendo a prováveis espécies novas com base em sequências parciais e obtenção de sequências completas

As amostras foram submetidas à RCA – *Rolling Circle Amplification* (INOUE-NAGATA et al., 2004) por meio da reação de 10 µL de volume final, contendo: 0,1 µL de *phi*-29 DNA polimerase (1.000 U/µL), 1 µL do tampão da enzima *Phi*-29 DNA polimerase (10x), 1 µL de BSA (20 mg/mL), 1 µL de dNTPs (2,5 mM), 1 µL de *primer* (50 µM–tioprotégido), 4,9 µL de água MilliQ e 1 µL de DNA extraído (20 ng/µL). A reação foi incubada a 30 °C por 18 horas no termociclador (Bio–Rad) e subsequente a 65 °C por 10 min para inativar a enzima. A RCA foi analisada em gel de agarose 1% usando tampão TBE (0,1 M Tris–HCl, 0,1 M ácido bórico e 0,02 mM EDTA pH 8,0) sob corrente de 80 V/cm.

O gel foi corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e as bandas visualizadas em transiluminador UV (Loccus Biotecnologia). A RCA foi empregada na reação de PCR usando *primers* degenerados para o componente A de begomovírus (PAL1v1978/PAR1c496) e para o componente B (PCRC1/PBL1v2040) (**Tabela 02**) (ROJAS et al., 1993). O mix foi composto por 1,25 µL de tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (10X), 0,25 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,38 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,25 µL de cada *primers* (PAL1v1978/PAR1c496) (10 µM), 0,1 µL da enzima *Taq* DNA polimerase (5U/µL), 9,02 µL de água MilliQ e 1,0 µL de RCA para um total de 12,5 µL.

**Tabela 2.** Sequência dos *primers* utilizados para detecção de begomovírus

Componente	Primers	Sequência
DNA-A	PAL1v1978	5' GCA–TCT–GCA–GGC–CCA–CAT–YGT–CTT–YCC–NGT 3'
DNA-A	PAR1c496	5' AAT–ACT–GCA–GGG–CTT–YCT–RTA–CAT–RGG 3'
DNA-B	PCRC1	5' CTA–GCT–GCA–GCA–TAT–TTA–CRA–RWA–TGC–CA 3'
DNA-B	PBL1v2040	5' GCC–TCT–GCA–GCA–RTG–RTC–KAT–CTT–CAT–ACA 3'

Fonte: ROJAS et al., 1993

As condições utilizadas na PCR foram: desnaturação inicial 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos, sendo cada um composto por: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, além da extensão final a 72°C por 7 minutos. Mediante observação dos fragmentos de DNA nos tamanhos esperados (aproximadamente 1.100/1.200 kb para o componente A e 450 pb para o componente B), os produtos da PCR das amostras positivas foram enviados para sequenciamento *Sanger*.

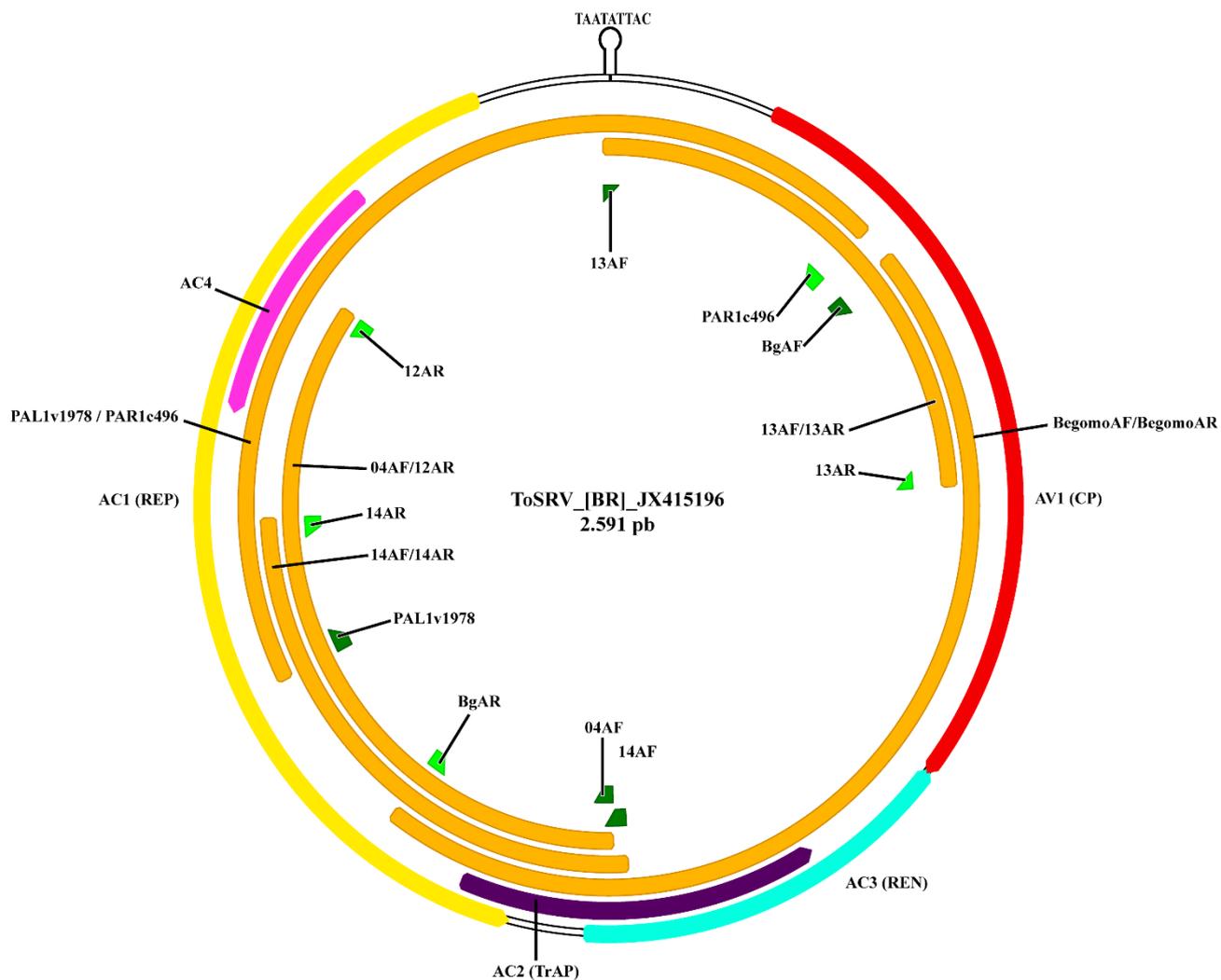
As sequências obtidas à PCR com os *primers* PAL1v1978/PAR1c496 foram analisadas por meio da ferramenta *Blast n* (ALSCHUL et al., 1997). Isolados considerados como prováveis

espécies novas tiveram o genoma completo sequenciado por *Sanger* usando quatro pares de *primers* desenvolvidos e validados por Fonseca e colaboradores (dados/*primers* mostrados aguardando publicação) que resulta em fragmentos do componente A com parcial sobreposição e que propiciaram a obtenção da sequência (**Figura 7**).

Os *primers* utilizados são a: ‘BegomoAFor1’ (5’ ATH-CCM-DCH-ATC-KTB-CTI-TGC-AAT-CC 3’) e ‘BegomoARev1’ (5’ TGY-GAR-GGI-CCI-TGY-AAR-GTY-CAR-TC 3’) (HA et al., 2006); ‘14AF’ (5’ CAT-TCT-CYG-CYT-GAK-GYRCAG-TGA-TGA-R 3’) e ‘14AR’ (5’ GCW-CCR-GAR-CSH-TGG-GYY-CCT-MCG-TT 3’); ‘4AF’ (5’ CAG-TGA-TGA-GTT-CCC-CTG-TGC-GTG-AA 3’) e ‘12AF’ (5’ ATTTCC-ATC-CGA-ACA-TTC-AGG-GAG-C 3’); 13AF’ (5’ TAA-TAT-TAC-CGG-ATG-GCC-GC 3’) e ‘13AR’ (5’ CTT-RAAMAC-CTG-DCC-RAA-RTC-C 3’). Para três isolados a sequência foi obtida mediante *primers walking* (DF-023, DF-480 e DF-640).

O mix preparado para estes *primers* foi em triplicata e correspondeu a: 2,5µL de tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (10X); 0,5 µL de dNTPs (2,5 mM); 1,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,5 µL de ambos os pares de *primers* (10 µM); 0,1 µL da enzima *Taq* polimerase (5U/µL), 18,9 µL de água MilliQ e 1,0 µL de DNA (20 ng/µL) para um total de 25,0 µL. A configuração do termociclador correspondeu a uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de desnaturação a 94°C por 30, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, em ciclo de 35 repetições, além da extensão final a 72°C por 7 minutos.

O gel foi corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e as bandas visualizadas em um transiluminador UV (Loccus Biotecnologia). A purificação das bandas esperadas foi efetuada com o *Gel DNA purification* (Ludwig Biotecnologia Ltda) e enviadas para sequenciamento *Sanger*. Estas sequências foram montadas por meio de *de novo assemble* empregando-se o programa *Geneious* (KEARSE et al., 2012) e as amostras selecionadas para o trabalho estão descritas na **Tabela 03**. O isolado DF-640 foi selecionado para caracterização molecular completa.



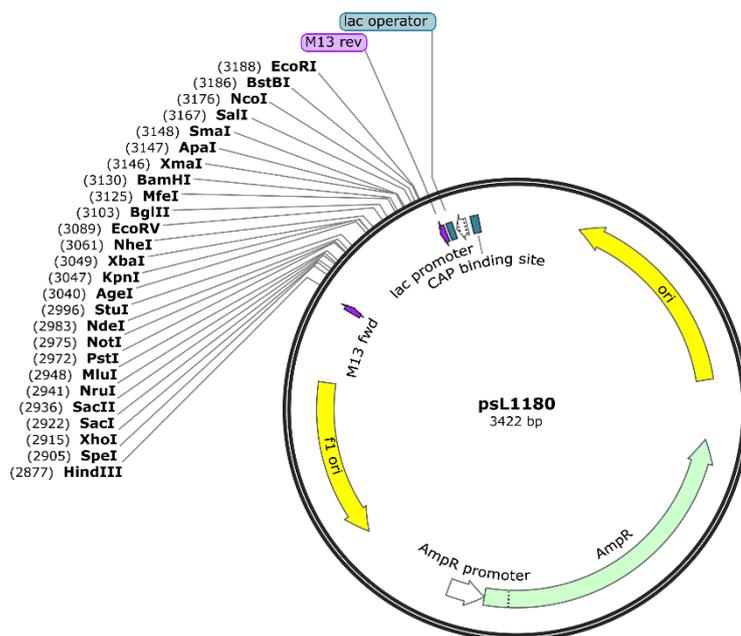
**Figura 7.** Mapa demonstrativo com *primers* universais. A espécie representada corresponde a *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), de maneira que se observa o nonanucleotídeo na região de *stem-loop*, e as ORFs descritas são: AV1 (vermelho), AC3 (azul claro), AC2 (roxo), AC1 (amarelo) e AC4 (rosa). Os sítios de ligação dos *primers forward* estão representados em verde claro, os de sentido *reverse* em verde escuro. Os *amplicons* gerados por cada par de *primers* estão evidenciados na cor laranja (Fonte: Fonseca e colaboradores, dados não publicados).

**Tabela 3.** Isolados virais selecionados para este trabalho de acordo com ano/local de coleta e identificação com base em sequência parcial e completa do componente A de begomovírus

Identificação	Local	Ano/Mês de Coleta	Isolado	Espécie viral (sequência parcial)	BLASTn Identidade (%)
01	Gama (DF)	2003/03	DF-023	<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	88,5%
02	Gama (DF)	2003/03	DF-024	<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	88,5%
03	Gama (DF)	2003/03	DF-027	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	89,3%
04	Gama (DF)	2003/03	DF-028	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	88,1%
05	Gama (DF)	2003/05	DF-046	<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	86,7%
06	Gama (DF)	2003/05	DF-048	<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	89,7%
07	Gama (DF)	2003/05	DF-050	<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	87,3%
08	Núcleo Rural São José (DF)	2005/05	DF-167	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	87,0%
09	Núcleo Rural São José (DF)	2005/05	DF-169	<i>Tomato severe rugose virus</i>	89,0%
10	Taquara (DF)	2005/04	DF-209	<i>Tomato golden vein virus</i>	88,0%
11	Taquara (DF)	2005/04	DF-216	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	89,0%
12	Rajadinha (DF)	2012/09	DF-480	<i>Sida mosaic Alagoas virus</i>	91,0%
13	Pipiripau (DF)	2013/05	DF-550	<i>Tomato severe rugose virus</i>	86,2%
14	Tabatinga (DF)	2013/05	DF-556	<i>Tomato severe rugose virus</i>	86,8%
15	Novo Gama (DF)	2016/04	DF-640	<i>Tomato rugose yellow leaf curl virus</i>	87,0%
16	Planaltina (DF)	2016/10	DF-676	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	86,0%
17	Goianápolis (GO)	2003/04	GO-121	<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	88,6%
18	Leopoldo de Bulhões (GO)	2003/05	GO-127	<i>Tomato golden vein virus</i>	88,2%
19	Goianápolis (GO)	2003/05	GO-188	<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	87,7%
20	Leopoldo de Bulhões (GO)	2004/11	GO-310	<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	88,4%
21	Goiânia (GO)	2006/07	GO-356	<i>Tomato severe rugose virus</i>	87,5%
22	Goianápolis (GO)	2010/06	GO-488	<i>Tomato golden vein virus</i>	88,7%
23	Goianápolis (GO)	2013/11	GO-583	<i>Tomato severe rugose virus</i>	89,0%

### 5.3 Obtenção de inserto de aproximadamente 2.6 kb para DF-640

Após a realização de RCA da amostra DF-640 e digestões com enzimas de restrição *ApaI*, *BamHI*, *BglIII*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *NcoI*, *NdeI*, *SalI*, e *XbaI* (Anza, Invitrogen) selecionou-se enzimas que geraram um único sítio de clivagem no vírus e vetor pSL1180 (**Figura 8**). As imagens que representam o vetor foram elaboradas mediante o *software* SnapGene (GSL Biotech; disponível em: <http://www.snapgene.com>).



**Figura 8.** Mapa do vetor pSL1180. Observa-se na imagem o tamanho do vetor (3.422 pares de base), o sítio de restrição com as enzimas de corte único), origem de replicação do plasmídeo e a origem de replicação f1 (ambas em amarelo).

Para a digestão de cada amostra, em reação de 20 $\mu$ L, mix apresentando: 0,2  $\mu$ L da enzima de restrição (específica para cada isolado), 2 $\mu$ L de tampão da enzima (10X), 3 $\mu$ L de RCA, 14,8  $\mu$ L de água MilliQ, as reações foram incubadas a 37° C *overnight*. Após a visualização do padrão de corte, enzimas que geraram um único padrão de clivagem, foram usadas em outras reações de digestão para um volume final de 60 $\mu$ L. O mix empregado correspondeu a: 0,6 $\mu$ L da enzima de restrição (específica para cada isolado), 6 $\mu$ L de tampão (10X), 15  $\mu$ L de RCA, 38,4  $\mu$ L de água MilliQ

Após a digestão, as amostras foram aplicadas em gel de agarose (0,8%) e posteriormente purificadas utilizando o *Gel DNA Recovery Kit* (Zymoclean<sup>TM</sup>). Para a clonagem de DF-640, selecionou-se as enzimas *NdeI* e *BglIII* para os componentes A e B respectivamente. Assim, preparou-se as reações de ligação na proporção de 1:3 para vetor e inserto (aproximadamente

40-50 ng /  $\mu\text{L}$  do vetor). Empregou-se um sistema de 20  $\mu\text{L}$ , em que, tanto o vetor pSL1180 e a amostra foram clivadas com *NdeI* e *BglIII*. Para cada sistema adotou-se: 0,4  $\mu\text{L}$  do vetor pSL1180 já digerido com a endonuclease empregada na amostra e linearizado com a enzima fosfatase alcalina, 2  $\mu\text{L}$  de tampão (10X), 8  $\mu\text{L}$  de inserto (amostra purificada), 1  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligase (Invitrogen) e 7  $\mu\text{L}$  de água MilliQ. Neste ponto, as amostras estão prontas para a transformação por choque térmico.

#### 5.4 Transformação por choque térmico

As células competentes de *Escherichia coli* linhagem DH5 $\alpha$  empregadas estavam previamente estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Antes de adicionar as ligações preparadas para o componente A e B do isolado DF-640, cada tubo foi devidamente identificado, e logo após, adicionou-se 10 $\mu\text{L}$  das reações de ligação aos respectivos tubos que individualmente continha 50 $\mu\text{L}$  de células competentes. Os tubos permaneceram 30 minutos no gelo e logo após submetidos ao banho-maria por dois minutos a  $42^{\circ}\text{C}$ , para a realização do choque térmico.

Os tubos com a reação retornaram voltaram ao gelo por 5 minutos e foram adicionados 500 $\mu\text{L}$  de meio Luria–Bertani (LB) sem antibiótico em cada tubo e mantidos sob agitação e a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  durante duas horas. As células competentes transformadas foram plaqueadas em meio LB (duas placas) suplementado com ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), IPTG (isopropyl–beta–D–thiogalactopyranoside) a 100 mM, e X–Gal (5–bromo–4–chloro–4–indol–padra letra  $\beta$ –D–galactoside) a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As placas, foram incubadas na estufa do Laboratório de Virologia Vegetal (Departamento de Biologia Celular) a  $37^{\circ}\text{C}$  *overnight*. Após o período de crescimento, selecionou-se apenas colônias brancas (recombinantes). Inicialmente 8 colônias foram selecionadas. Em caso de não encontrar recombinantes, nova seleção era realizada. As colônias foram repicadas para tubos falcon com 3mL de meio LB, suplementado com 3 $\mu\text{L}$  de ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os tubos cresceram a  $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação durante *overnight*.

Os clones resultantes foram submetidos à extração de DNA plasmidial (MINIPREP) para confirmação da clonagem através de digestão com a mesma enzima utilizada inicialmente em cada amostra. Uma vez que foram identificados os clones corretos, estes foram cultivados em meio LB e posteriormente realizou-se extração de DNA plasmidial com *Plasmid kits* (QIAGEN). Os clones foram enviados para sequenciamento pela metodologia de *Sanger*. *Primers* foram desenhados para obtenção das sequências completas dos clones.

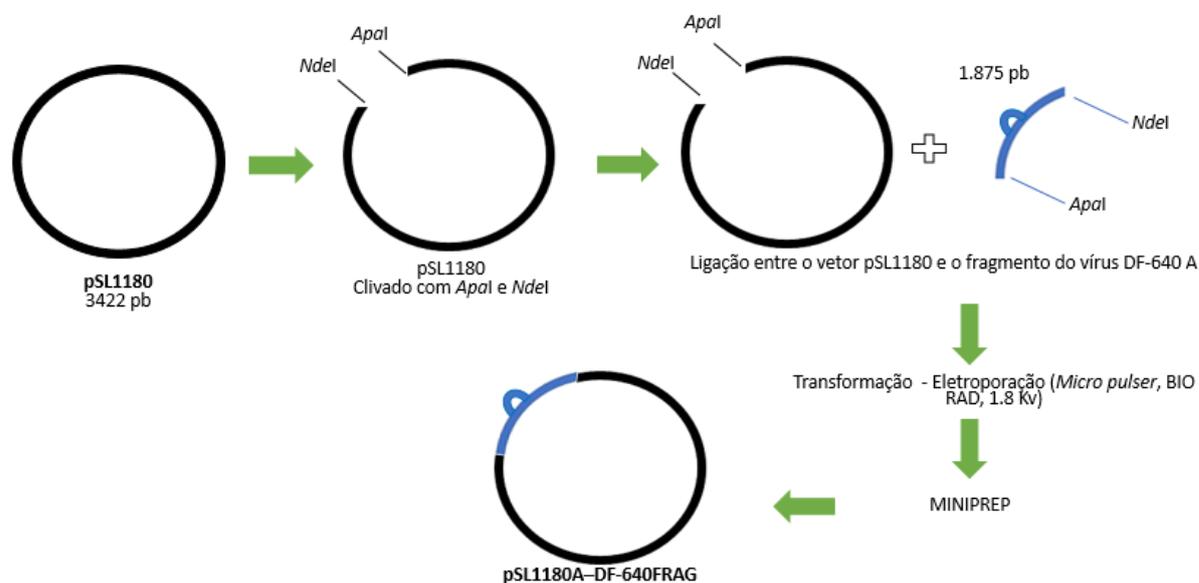
## 5.5 Confirmação da infectividade de monômeros para os componentes A e B de DF-640

Este trabalho foi realizado por um membro da equipe no Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade de Davis – California (UC-Davis) que verificou infectividade de clones monoméricos de begomovírus, incluindo DF-640 (componentes A e B). A construção dos clones monoméricos e inoculação por bombardeamento de partículas em plantas de tomate e *Nicotiana benthamiana* foram realizadas com adaptações a partir de Melgarejo, Kon e Gilbertson (2015) e Aragão e colaboradores (1996). Maiores detalhes serão apresentados na publicação oriunda deste trabalho e os resultados serão comentados brevemente no tópico resultados e discussão e foram usados como critério de seleção para iniciar os procedimentos de construção dos clones multiméricos.

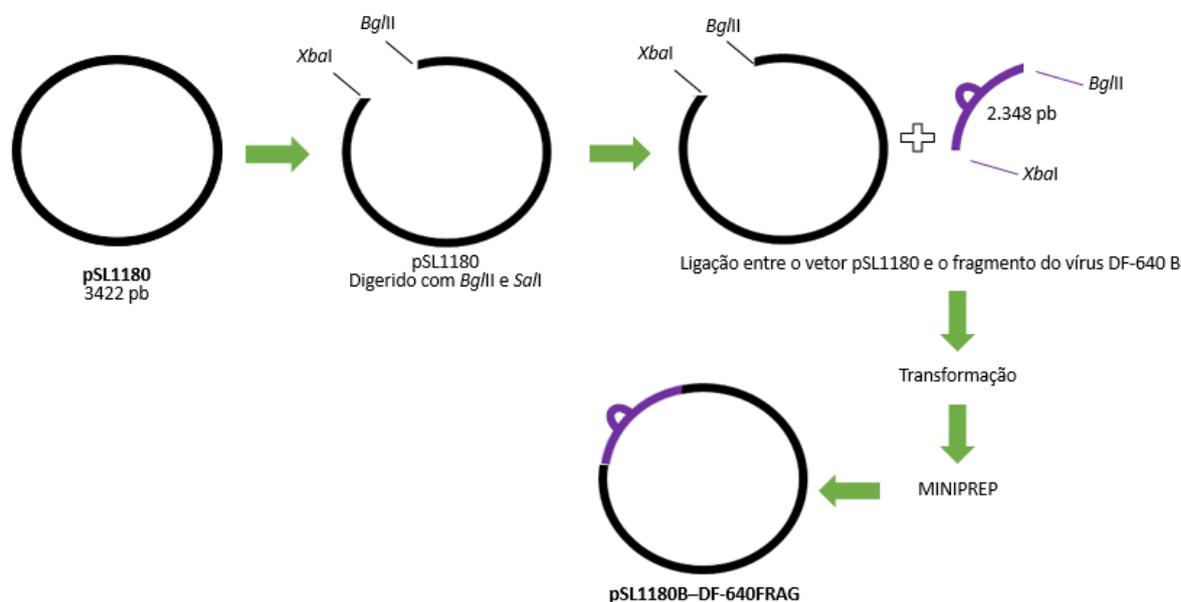
## 5.6 Desenvolvimento de clone multimérico para componentes A e B da nova espécie viral

As sequências nucleotídicas de cada componente genômico (DNA-A e DNA-B) provenientes do sequenciamento do isolado DF-640 foram usadas para montagem do genoma e anotação das ORFS. As sequências de cada componente foram submetidas à verificação de sítios de restrição no *software* Geneious (KEARSE et al., 2012). As enzimas que clivaram o DNA viral originando um fragmento incluindo a região comum foram escolhidas, e o produto da clivagem foi clonado inicialmente no vetor pSL1180, resultando nas construções pSL1180–A–DF-640FRAG e pSL1180–B–DF-640FRAG.

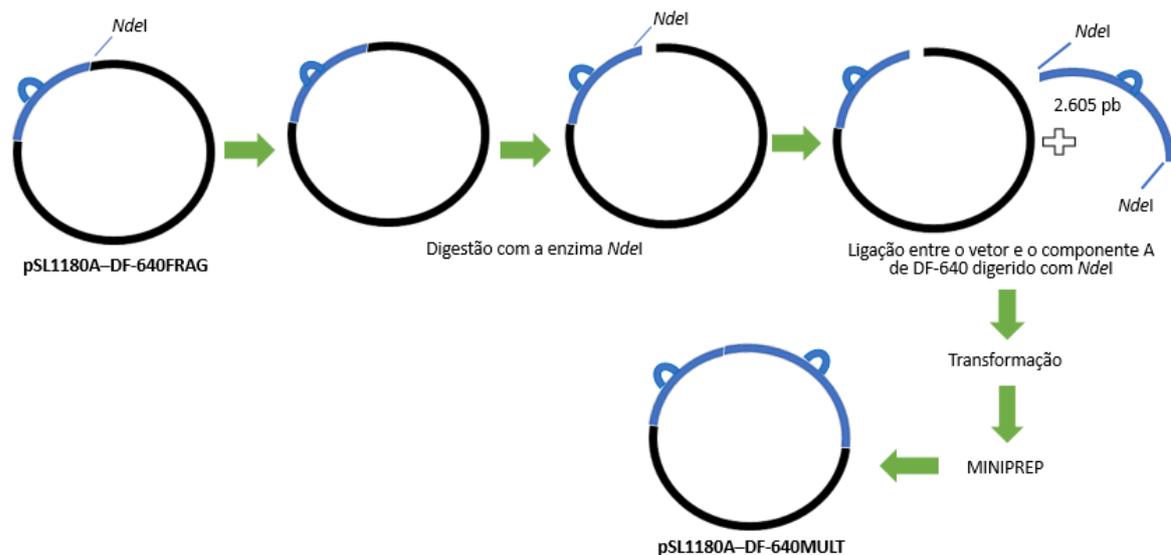
Para o componente A de DF-640 foram empregadas as enzimas *ApaI* e *NdeI*, de forma a gerar o fragmento com 1958 pb (**Figura 9**). Para o componente B, foram utilizadas inicialmente as enzimas *SalI* e *BglII* proporcionando o fragmento de 1875 pb. No entanto, como não foi possível avançar com esta escolha de enzimas, foram adotadas posteriormente as enzimas *XbaI* e *BglIII*, que resultaram em um fragmento de 2.348 pb (**Figura 10**). Os produtos das construções com o fragmento, pSL1180–A–DF-640FRAG (**Figura 11**) e pSL1180–B–DF-640FRAG (**Figura 12**) foram ligados aos seus respectivos monômeros, resultando nas construções pSL1180–A–DF-640MULT e pSL1180–B–DF-640MULT. Após a ligação dos componentes nos plasmídeos, foi realizada novamente transformação, seguida de extração de DNA plasmidial.



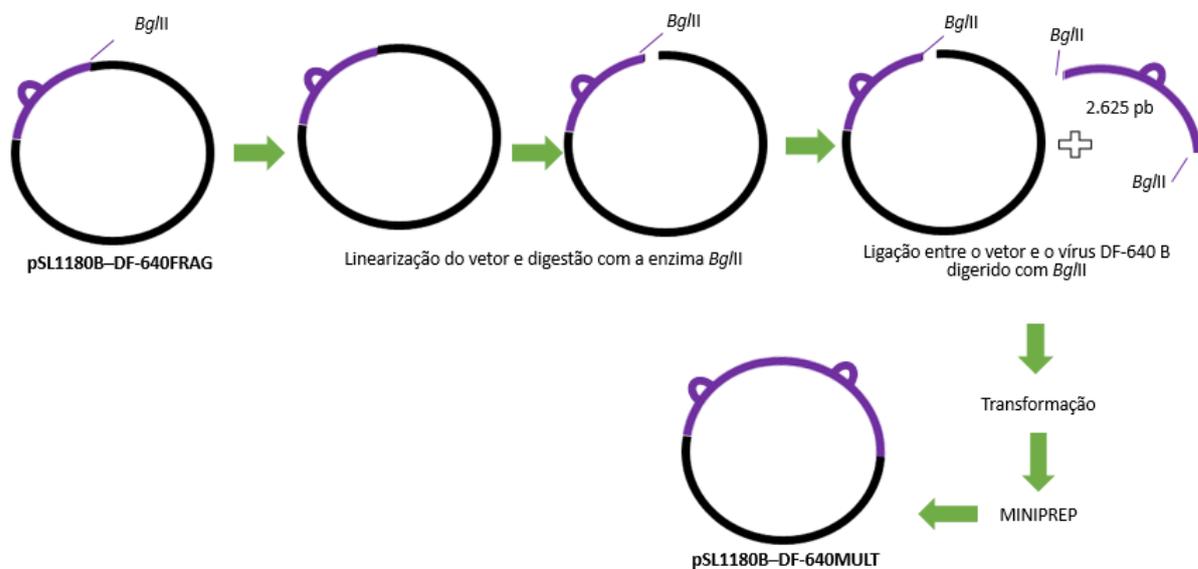
**Figura 9.** Primeira etapa para produção de clone multimérico: obtenção de **pSL1180A-DF-640FRAG** (fragmento). O vetor pSL1180 encontra-se representado em preto e o fragmento contendo a origem de replicação viral de DF-640A em azul. No esquema pode-se observar diferentes etapas de clonagem para a obtenção de um fragmento viral usando as enzimas *ApaI* (usada em associação com *NdeI* para obtenção de fragmento) e *NdeI* (usada anteriormente para obtenção do monômero).



**Figura 10.** Primeira etapa para produção de clone multimérico: obtenção de **pSL1180B-DF-640FRAG** (fragmento). O vetor pSL1180 encontra-se representado em preto e o fragmento contendo a origem de replicação viral de DF-640B em roxo. No esquema pode-se observar diferentes etapas de clonagem para a obtenção de um fragmento viral usando as enzimas *XbaI* (usada em associação com *BglII* para obtenção de fragmento) e *BglII* (usada anteriormente para obtenção do monômero).



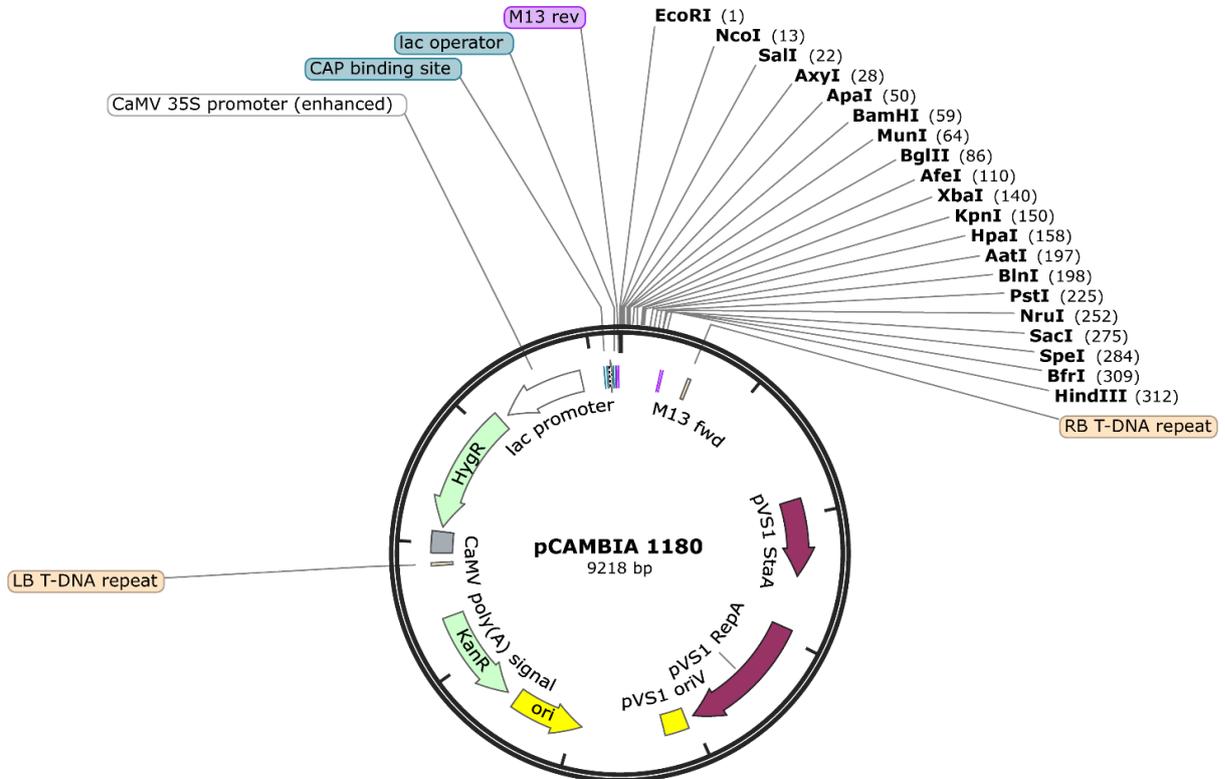
**Figura 11.** Segunda etapa para produção de clone multimérico: obtenção de pSL1180A-DF-640MULT (multimérico). O vetor pSL1180 (em preto) já ligado ao fragmento será ligado ao genoma completo viral (monômero previamente obtido com a enzima *NdeI*). No esquema pode-se observar diferentes etapas de clonagem para a obtenção do clone multimérico em pSL1180.



**Figura 12.** Segunda etapa para produção de clone multimérico: obtenção de pSL1180B-DF-640MULT (multimérico). O vetor pSL1180 (em preto) já ligado ao fragmento será ligado ao genoma completo viral (monômero previamente obtido com a enzima *BglII*). No esquema pode-se observar diferentes etapas de clonagem para a obtenção do clone multimérico em pSL1180.

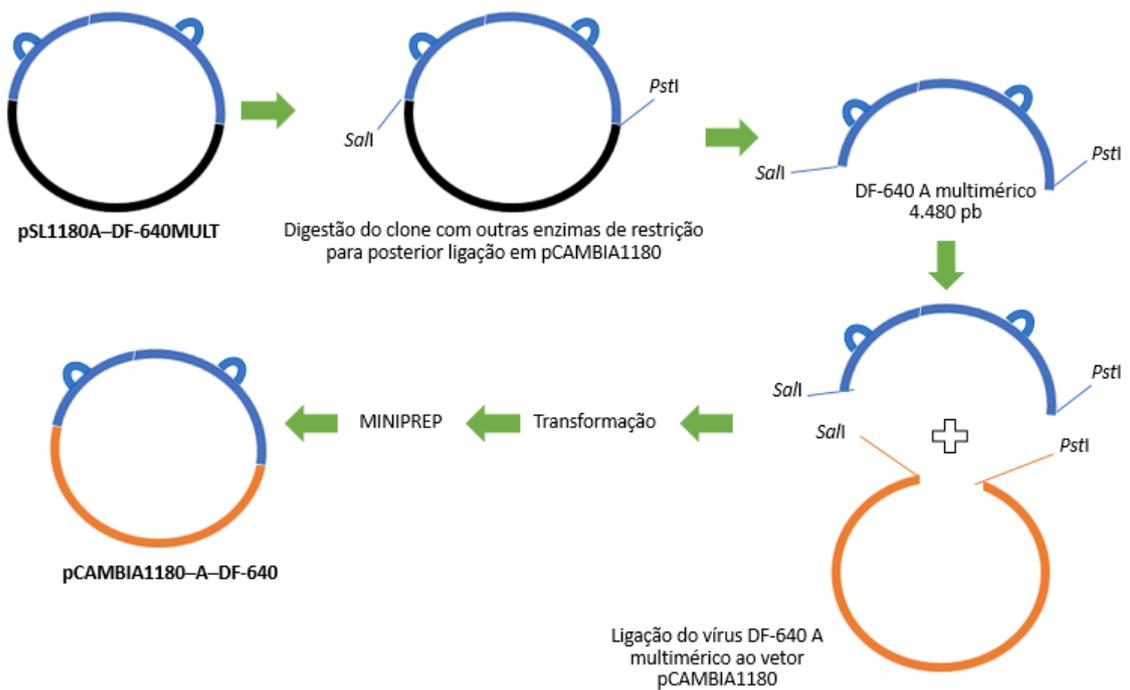
Para obter os clones multiméricos, a região viral que apresenta a origem de replicação foi digerida com a mesma enzima empregada na obtenção do monômero em uma das extremidades e na outra, uma enzima que estava também presente no sítio de clonagem do vetor pSL1180 e pCAMBIA1180 (**Figura 13**). Ao final, foi obtido uma construção correspondente a

aproximadamente 1,7 cópia para o componente A e 1,8 para o componente B, dispondo de duas origens de replicação.

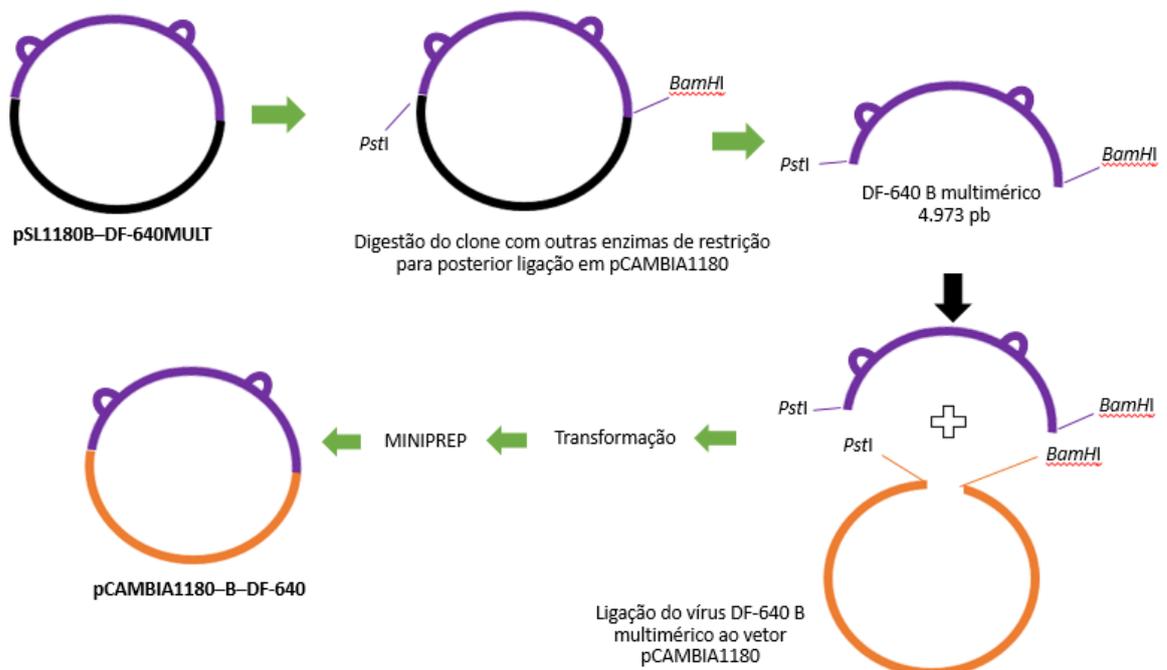


**Figura 13.** Mapa do vetor pCAMBIA1180. Os segmentos em verde claro representam as ORF (open reading frame) da Higromicina e Canamicina, em amarelo estão as origens de replicação e em roxo o gene *repA*

Como o componente A de DF-640 foi clonado utilizando-se *NdeI*, precisou-se empregar outro conjunto de enzimas de restrição na passagem da região viral para pCAMBIA1180, visto que *NdeI* cliva pCAMBIA1180 em mais de uma região. Assim, adotou-se as enzimas que estão em posições mais externas, como *PstI* e *SalI* (**Figura 14**). Para o componente B, as enzimas escolhidas para realizar a ligação do vírus para pCAMBIA1180 foram *PstI* e *BamHI* (**Figura 15**).



**Figura 14.** Etapa final para produção de clone multimérico em pCAMBIA1180: obtenção de **pCAMBIA1180-A-DF-640**. O esquema ilustra diferentes etapas de digestão e clonagem para transferência da região **A-DF-640MULTI** (em azul) de **pSL1180A-DF-640MULTI** (em azul e preto) para pCAMBIA1180 (em laranja), por intermédio da digestão utilizando as enzimas *SalI* e *PstI*.



**Figura 15.** Etapa final para produção de clone multimérico em pCAMBIA1180: obtenção de **pCAMBIA1180-B-DF-640**. O esquema ilustra diferentes etapas de digestão e clonagem para transferência da região **B-DF-640MULTI** (em roxo) de **pSL1180B-DF-640MULTI** (em azul e preto) para pCAMBIA1180 (em laranja), por intermédio da digestão utilizando as enzimas *PstI* e *BamHI*.

A RCA de cada componente foi usada para digestão com enzimas de restrição de corte único, selecionadas para que ocorra o início do processo da construção do clone infeccioso, tanto vetor pCAMBIA1180 e cada componente da espécie viral (2600 pb) foram digeridos com a mesma enzima de corte único. A reação para a digestão e obtenção do monômero e do fragmento contendo a origem de replicação foram realizadas para um volume total de 60 µL, com 1 µL da enzima escolhida, 6 µL do tampão da enzima, 4µL do produto do RCA (obtido de DNA com cerca de 100–200 ng/µL) e 49 µL de água MilliQ.

Após a digestão do vetor e do vírus, realizou-se uma eletroforese em gel (0,8% de agarose) para purificação das amostras. Após este tratamento, ocorreu o procedimento de ligação onde a proporção vetor e inserto foi dependente da concentração do DNA, entretanto variou de 1:3 a 1:5 para vetor:inserto. O mix da reação de ligação foi preparado para um volume total de 20 µL, com 1µL da enzima T4 DNA ligase (3 U/µL), 2 µL do tampão da enzima (10X), 8 µL do inserto, 2 µL do vetor e 7 µL de água MilliQ.

### **5.7 Identificação da presença do gene *Ty-1* nos acessos selecionados no estudo**

Isolados das 23 amostras selecionadas neste estudo, foram submetidas a ensaio de *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences* PCR (PCR – CAPS), para verificar a presença do gene *Ty-1*. Adotou-se como testemunhas dominante, recessiva e heterozigota respectivamente: til83, tii-8, tim-6. Os *primers* utilizados foram ‘UWTy1F’ (5’ ATA-AGC-ATT-TCA-TGT-CAG-ATG-TCT-A 3’) e ‘UWTy1R’ (5’ CTA-GAT-CCT-GGA-TGA-CTT-CAA-TAG-C 3’) (FERRO, 2013). O mix da reação foi preparado para o volume final de 12,5µL e composto por: 1,25 µL de tampão da enzima Taq DNA polimerase (10 X), 1,25 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,5 µL de cada *primer* (UWTy1F/UWTy1R) (10 µM), 0,2 µL da enzima Taq DNA polimerase (5 U/µL), 5,05 µL de água Milli-Q e 3,0 µL de DNA (20 ng/µL).

A programação adotada no termociclador correspondeu a desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos, sendo que cada um compreendia desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, e uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os *amplicons* foram submetidos à clivagem com a enzima de restrição *Taq-1* para verificação dos alelos de resistência e suscetibilidade. O mix de clivagem foi constituído por 1,7µL de tampão (10 X), 0,12µL de BSA, 0,12µL da enzima de restrição *Taq-1* (5U/µL), 3,06µL de água Milli-Q e 12,5µL do produto da PCR, resultando em um volume final de 17,5µL, posteriormente incubado a 60°C por 24 horas. Os produtos da reação

foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizados sob luz UV.

## 5.8 Alinhamento de sequências e análise filogenética

As sequências obtidas por *Sanger* foram analisadas e montadas no programa *Geneious* 11.0 (KEARSE et al., 2012), com posterior análise de iterons (ARGUELLO–ASTORGA; RUIZ–MEDRANO, 2001). O alinhamento das sequências selecionadas foi executado com o *software* MUSCLE (EDGAR, 2004). Para a construção das árvores filogenéticas foi empregada inferência Bayesiana, com o *software* Mr.Bayes (RONQUIST et al., 2012). As comparações entre os isolados e as espécies foram observadas empregando-se o programa *Sequence Demarcation Tool* (SDT) (MUHIRE; VARSANI; MARTIN, 2014) de acordo com recomendação para taxonomia de espécies do gênero *Begomovirus* (BROWN et al., 2015).

Para a realização da análise filogenética dos componentes virais, adotou-se a mesma estratégia para ambos os componentes de Tomato mosaic severe dwarf virus (DF-640). Para cada componente foram selecionadas as 11 sequências iniciais de vírus diferentes que apresentavam maior identidade nucleotídica com a espécie de trabalho, e as demais sequências correspondem a isolados que compõem os clados referentes à espécies identificadas no Brasil, e as espécies: *Squash leaf curl virus* (SLCV), *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) e *Abutilon mosaic virus* (AbMV) semelhante ao observado no estudo de Melgarejo e colaboradores (2015) (MELGAREJO; KON; GILBERTSON, 2015) (Tabelas 4 e 5).

**Tabela 4.** Espécies de vírus empregadas para análise filogenética do componente A de Tomato mosaic severe dwarf virus

Identificação	Vírus	Origem geográfica	Identidade nucleotídica (%)	Número de acesso (GenBank)
1	<i>Tomato rugose yellow leaf curl virus</i>	Uruguai	85%	JN381825
2	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	Brasil	83%	KC706539
3	<i>Cucumber chlorotic leaf virus</i>	México	79%	MN013786
4	<i>Wissadula yellow mosaic virus</i>	Brasil	79%	KX691411
5	<i>Euphorbia mosaic virus</i>	México	79%	DQ318937
6	<i>Abutilon mosaic Brazil virus</i>	Brasil	79%	JF694481
7	<i>Tomato severe leaf curl virus</i>	Guatemala	82%	AF130415
8	<i>Jacquemontia yellow vein virus</i>	Venezuela	80%	NC_043526
9	<i>Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus</i>	Jamaica	79%	KP641349
10	<i>Cabbage leaf curl virus</i>	Equador	80%	MH359394
11	<i>Tomato common mosaic virus</i>	Brasil	82%	KC706588
12	<i>Bean golden yellow mosaic virus</i>	Porto Rico	-	M10070
13	<i>Sida golden mosaic virus</i>	Estados Unidos	-	AF049336
14	<i>Macroptilium yellow mosaic Florida virus</i>	Estados Unidos	-	AY044135
15	<i>Squash leaf curl virus</i>	Estados Unidos	-	M38183
16	<i>Cucurbit leaf curl virus</i>	Estados Unidos	-	AF224760
17	<i>Abutilon mosaic virus</i>	Geórgia	-	X15983
18	<i>Rhynchosia rugose golden mosaic virus</i>	Rússia	-	HM236370
19	<i>Tomato rugose mosaic virus-</i>	Brasil	-	AF291705
20	<i>Wissadula golden mosaic virus</i>	Jamaica	-	GQ355488
21	<i>Tomato mosaic Havana virus</i>	Cuba	-	Y14874
22	<i>Bean golden mosaic virus</i>	Brasil	-	M88686
23	<i>Pepper golden mosaic virus</i>	México	-	GU128148
24	<i>Bean dwarf mosaic virus</i>	Colômbia	-	M88179
25	<i>Tomato chlorotic leaf curl virus</i>	Brasil	-	MK558058
26	<i>Sida yellow mosaic Yucatan virus</i>	México	-	DQ875872
27	<i>Jatropha mosaic virus</i>	República Dominicana	-	KJ174330
28	<i>Chino del tomate Amazonas virus</i>	Brasil	-	MH243423
29	<i>Tomato mottle virus</i>	Estados Unidos	-	L14460
30	<i>Tomato golden mosaic virus</i>	Brasil	-	K02029
31	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	Israel	-	AB110218

**Tabela 5.** Espécies de vírus empregadas para análise filogenética do componente B de Tomato mosaic severe dwarf virus

Identificação	Vírus	Origem geográfica	Identidade nucleotídica (%)	Número de acesso (GenBank)
1	<i>Abutilon Brazil virus</i>	Brasil	78%	FN434439
2	<i>Wissadula golden mosaic virus</i>	Jamaica	77%	GQ355487
3	<i>Tomato yellow spot virus</i>	Brasil	76%	KX348210
4	<i>Tomato mild mosaic virus</i>	Brasil	77%	KC706609
5	<i>Tomato interveinal chlorosis virus-2</i>	Brasil	80%	MK087039
6	<i>Tomato dwarf leaf virus</i>	Argentina	78%	JN564750
7	<i>Tomato chlorotic leaf curl virus</i>	Brasil	77%	MK558059
8	<i>Rhynchosia golden mosaic virus</i>	México	77%	DQ356429
9	<i>Pavonia yellow mosaic virus</i>	Brasil	78%	NC_037611
10	<i>Melochia mosaic virus</i>	Brasil	75%	KT201152
11	<i>Jatropha mosaic virus</i>	Jamaica	-	KF723262
12	<i>Euphorbia mosaic virus</i>	México	-	HQ185235
13	<i>Abutilon mosaic virus</i>	Geórgia	-	X15984
14	<i>Cucurbit leaf curl virus</i>	Estados Unidos	-	AF224761
15	<i>Macroptilium yellow mosaic Florida virus</i>	Estados Unidos	-	AY044136
16	<i>Pepper golden mosaic virus</i>	México	-	GU128147
17	<i>Squash leaf curl virus</i>	Estados Unidos	-	M38182
18	<i>Rhynchosia rugose golden mosaic virus</i>	Rússia	-	HM236371
19	<i>Sida yellow mosaic Yucatan virus</i>	México	-	DQ875873

## 5.9 Análise de recombinação dos componentes A e B de Tomato mosaic severe dwarf virus

Os prováveis eventos de recombinação foram estudados com o programa RDP4 Beta 4.13 (MARTIN et al., 2010). Para a realização das análises de recombinação dos componentes A e B foram empregadas as principais sequências de vírus que infectam tomateiro no Brasil dispostas no banco de dados (identidade nucleotídica não caracterizada), e algumas espécies que apresentavam identidade nucleotídica inferior à 84% em relação aos componentes A e B de Tomato mosaic severe dwarf virus (**Tabelas 5 e 6**). Os prováveis pontos de recombinação e sequências parentais foram estipulados mediante os métodos de RDP, Bootscan, Maximum Chi Square, 3 Seq e SisterScan dispostos no *software* RDP4 (MARTIN et al., 2015).

**Tabela 6.** Amostras empregadas para análise de recombinação do componente A de Tomato mosaic severe dwarf virus

<b>Vírus</b>	<b>Origem geográfica</b>	<b>Identidade nucleotídica (%)</b>	<b>Número de acesso (GenBank)</b>
<i>Tomato leaf curl purple vein virus</i>	Brasil	-	NC_035481
<i>Chino del tomate Amazonas virus</i>	Brasil	-	MH_243423
<i>Tomato golden leaf distortion virus</i>	Brasil	-	HM_357456
<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	Brasil	-	JF_803250
<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	Brasil	-	NC_032006
<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	Brasil	-	NC_010949
<i>Tomato golden vein virus</i>	Brasil	-	NC_038807
<i>Tomato golden mosaic virus</i>	-	-	NC_001507
<i>Tomato bright yellow mosaic virus</i>	Brasil	-	NC_038467
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	Brasil	-	NC_002555
<i>Tomato severe rugose virus</i>	Brasil	-	NC_009607
<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	Brasil	-	NC_038469
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	Brasil	-	NC_003664
<i>Tomato bright yellow mottle virus</i>	Brasil	-	KC_791691
<i>Tomato golden leaf spot virus</i>	Brasil	-	NC_021579
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>	Brasil	-	NC_012553
<i>Tomato twisted leaf virus</i>	Venezuela	80%	MK_440292
<i>Rhynchosia golden mosaic Sinaloa virus</i>	México	80%	MK_618662
<i>Sida golden mosaic Lara virus strain</i>	Venezuela	80%	NC_038459

<i>Desmodium leaf distortion virus</i>	México	80%	DQ_875870
<i>Abutilon golden mosaic Yucatan virus</i>	México	80%	NC_038438
<i>Tomato rugose yellow leaf curl virus</i>	Uruguai	-	NC_020257
<i>Tomato rugose yellow leaf curl virus</i>	Uruguai	84%	JN_381813
<i>Tomato rugose yellow leaf curl virus</i>	Uruguai	84%	JN_381815
<i>Tomato mild mosaic virus</i>	Brasil	-	NC_010833
<i>Tomato severe leaf curl virus</i>	Guatemala	81%	AF_130415
<i>Tomato severe leaf curl virus</i>	México	80%	JN_680352
<i>Tomato severe leaf curl virus</i>	Nicarágua	80%	AJ_508784
<i>Tomato severe leaf curl virus</i>	Nicarágua	80%	AJ_508785
<i>Abutilon Brazil virus</i>	Brasil	79%	FN_434438
<i>Abutilon mosaic Brazil virus</i>	Brasil	79%	JF_694482
<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	Brasil	82%	KC_706539
<i>Tomato common mosaic virus</i>	Brasil	82%	KC_706587
<i>Tomato common mosaic virus</i>	Brasil	82%	NC_010835
<i>Tomato yellow spot virus</i>	Brasil	-	NC_007726
<i>Sida yellow net virus</i>	Brasil	-	NC_020253
<i>Sida mottle virus</i>	Brasil	-	NC_004637
<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	Brasil	-	NC_005330
<i>Tomato leaf distortion virus</i>	Brasil	-	NC_038474

Fonte: Autor.

**Tabela 7.** Amostras empregadas para análise de recombinação do componente B de Tomato mosaic severe dwarf virus

<b>Vírus</b>	<b>Origem geográfica</b>	<b>Identidade nucleotídica (%)</b>	<b>Número de acesso (GenBank)</b>
<i>Tomato mosaic Barbados virus</i>	Barbados	81%	AF_213014
<i>Tomato dwarf leaf curl virus</i>	Jamaica	80%	AF_035225
<i>Melon chlorotic leaf curl virus</i>	Guatemala	73%	AF_325498
<i>Jacquemontia yellow vein virus</i>	Venezuela	76%	KY_617096
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>	Brasil	72%	FN_435998
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>	Brasil	-	NC_012554
<i>Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus</i>	Brasil	75%	NC_040184
<i>Tomato common mosaic virus</i>	Brasil	-	NC_010836
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	Brasil	76%	AF_491306
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	Brasil	-	NC_003665
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	Brasil	74%	DQ_336354
<i>Euphorbia mosaic virus</i>	México	76%	HQ_185235
<i>Macroptilium yellow spot virus</i>	Brasil	75%	KT_779563
<i>Tomato mild mosaic virus</i>	Brasil	-	NC_010834
<i>Chenopodium leaf curl virus</i>	Estados Unidos	78%	KJ_826528

<i>Sida golden mosaic virus</i>	Estados Unidos	76%	AF_039841
<i>Sida golden yellow vein virus</i>	Cuba	75%	JF_907582
<i>Jatropha mosaic virus</i>	Jamaica	80%	AF_324411
<i>Jatropha mosaic virus</i>	Jamaica	76%	KF_723262
<i>Datura leaf distortion virus</i>	Venezuela	77%	JN_848774
<i>Potato yellow mosaic virus</i>	Colombia	75%	JQ_045706
<i>Chino del tomate Amazonas virus</i>	Brasil	-	MG_675220
<i>Tomato chlorotic leaf distortion virus</i>	Venezuela	-	JN_241633
<i>Tomato chlorotic mottle Guyane virus</i>	Guiana Francesa	75%	KR_263175
<i>Dalechampia chlorotic mosaic virus</i>	Venezuela	78%	JN_848776
<i>Bean golden mosaic virus</i>	Brasil	77%	JN_419017
<i>Merremia mosaic Puerto Rico virus</i>	Porto Rico	75%	FJ_944022
<i>Macroptilium mosaic Puerto Rico virus</i>	Porto Rico	76%	AY_044134
<i>Macroptilium golden yellow mosaic virus</i>	República Dominicana	76%	KY_196220
<i>Tomato rugose yellow leaf curl virus</i>	Uruguai	-	NC_038234
<i>Tomato yellow spot virus</i>	Brasil	-	NC_007727
<i>Abutilon Brazil virus</i>	Brasil	79%	FN_434439
<i>Abutilon mosaic Brazil virus</i>	Brasil	77%	JF_694483
<i>Passionfruit severe leaf distortion virus</i>	Brasil	77%	FJ_972768
<i>Sida mosaic Alagoas virus</i>	Brasil	77%	JF_694475
<i>Sida yellow blotch virus</i>	Brasil	77%	KX_640992
<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	Brasil	-	NC_005331
<i>Melochia mosaic virus</i>	Brasil	79%	KT_201152
<i>Tomato golden mosaic virus</i>	Brasil	76%	JF_694489
<i>Tomato golden mosaic virus</i>	Brasil	77%	JF_694491
<i>Tomato severe rugose virus</i>	Brasil	75%	GU_358449
<i>Tomato severe rugose virus</i>	Brasil	75%	KY_964449
<i>Tomato severe rugose virus</i>	Brasil	-	NC_009612
<i>Tomato severe rugose virus</i>	Brasil	75%	MG_837739
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	Brasil	-	NC_002556
<i>Tomato interveinal chlorosis virus-2</i>	Brasil	81%	MK_087039
<i>Pepper blistering leaf virus</i>	Argentina	77%	MN_518740
<i>Solanum mosaic Bolivia virus</i>	Bolivia	81%	HM_585436
<i>Tomato golden vein virus</i>	Brasil	-	NC_038806
<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	Chile	78%	KC_136340
<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	Brasil	-	NC_010950

Fonte: Autor.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

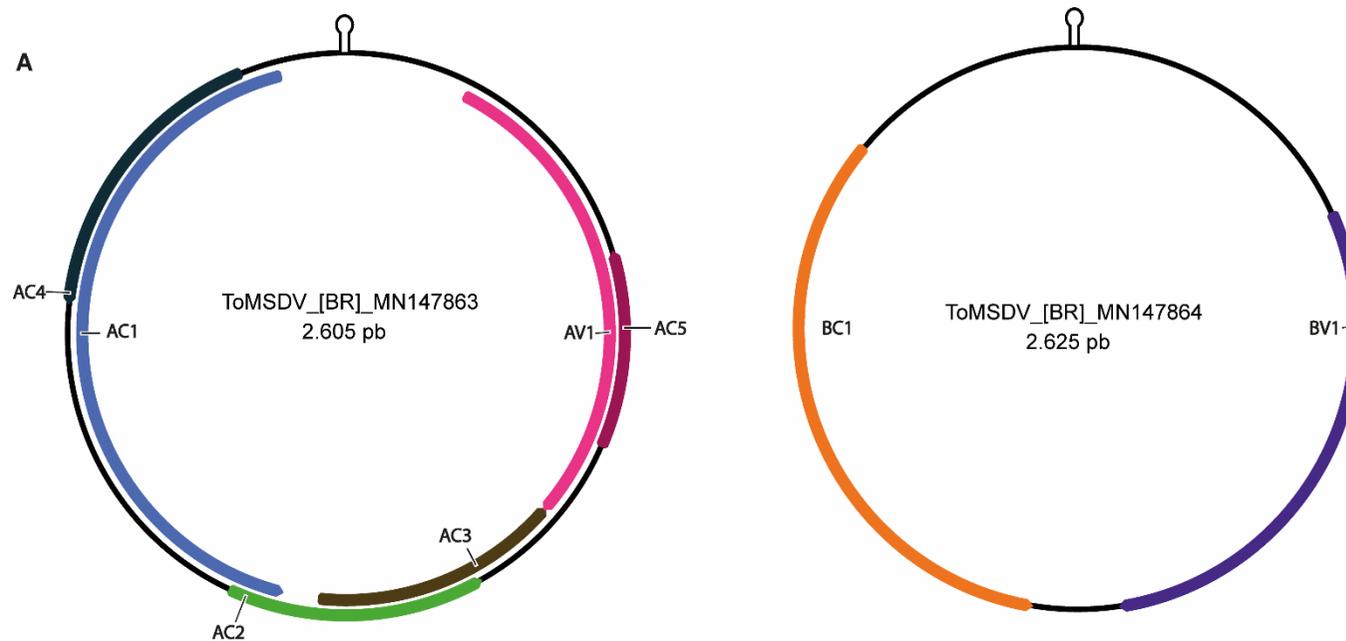
### 6.1 Caracterização molecular dos componentes A e B de Tomato mosaic severe dwarf virus

Ao todo procurou-se recuperar as sequências completas referentes ao DNA-A dos 23 isolados deste trabalho. Os amplicóns foram obtidos usando pares de *primers* sobrepostos para recuperar o genoma completo de 20 destes isolados. Estes amplicóns foram enviados para sequenciamento.

Três (DF-023, DF-480 e DF-640) dos 23 isolados tiveram a sequência completa do componente A recuperada por *primers* e todos apresentaram identidade de nucleotídeos inferior a 91%, sendo considerados como novas espécies. O componente B (parcial para dois destes isolados) confirmou, tratar-se de espécies de begomovírus bipartidos.

Para DF-023 identidade de nucleotídeos de 94,5% foi observada com isolado da espécie *Chino del tomate Amazonas virus* - (MH243423.1), já caracterizada biológica e molecularmente (em fase de publicação por um membro da equipe). Observou-se também organização genômica típica de begomovírus bipartido. Sequência parcial para o componente B confirmou também esta espécie viral. Para DF-480 identidade de nucleotídeos de 89% foi observada com *Sida mosaic Alagoas virus* (JF694472.1).

Além disto, o isolado identificado como DF-640, também apresentou identidade nucleotídica inferior a 91% com as demais espécies presentes em banco de dados. Este isolado foi selecionado para caracterização biológica e molecular. Verificou-se através de análise de cognatos que esta espécie é bipartida (**Figura 16**), o seu componente A apresenta 2.605 pares de base (pb) e codifica seis proteínas, de maneira que a AV1 (CP), disposta no sentido viral, possui 759 pb; e no sentido complementar nota-se a AC1 (REP) com 1.101 pb, AC2 (TrAP) 390 pb, AC3 (REn) 399 pb, AC4 com 447 pb, e por fim, AC5 com 294 pb. O componente B possui 2.625 pb, com duas ORFs, sendo estas BC1 (MP) com 882 pb e BV1 (NSP) com 771 pb. Além disso seus componentes são cognatos e compartilham de 92% de identidade, apresentando o mesmo iteron de núcleo TGGTGTCC, com respectivo sítio de ligação da REP (**Figura 16**).



**B**

ToMSDV\_[BR]\_MN147863 TGGCATTTTGGTAAATATAGGGCAGGACACCAGCAATGGCTCTCAACTTCTATGCAATGTGTTGGTGTCTGGTGTCCCATTTATACTAAAACCCCTCTAGGACACTGGGGGGCACGTGGCGCCATCCGTTTAATATTACCGGATGGCCGCGATTTTTGGTGTCCCACCCGCGCGC M P R N P N Q F R L A  
 ToMSDV\_[BR]\_MN147864 TGGCATTTTAGTAAATATGTGTGAGGACACCAGCGATGGCTCTCAACTTCTATGCAATGTGTTGGTGTCTGGTGTCCCATTTATACTAAAACCCCTCTAGGACACTGGGGGGTACGTGGCGCCATCCG-TTAAATATTACCGGATGGCCGCGATTTTTGGTGTCTGACCCGCTACCCG IRD  
 ITERON - REVERSO COMPLEMENTAR ITERON ITERON TATA BOX NONANUCLEOTÍDEO

**Figura 16.** Organização genômica da espécie DF-640 nomeada como Tomato mosaic severe dwarf virus (ToMSDV), com organização típica de isolados bipartidos do novo mundo e alinhamento da região comum de ambos os componentes. Em **A** observa-se o componente A da referida espécie com 2.605 pares de base; a região comum, com ênfase na região de *stem-loop*, e seu respectivo código de acesso do GenBank, o DNA-A apresenta seis ORFs, sendo estas AV1 (CP), AC1 (REP), AC2 (TrAP), AC3 (REn), AC4 e AC5. Nota-se também o componente B com 2.625 pb, a região comum destacada pelo *stem-loop*, e o código de acesso do GenBank, o DNA-B apresenta duas ORFs, BC1 (MP) e BV1 (NSP). Em **B** observa-se o alinhamento da região comum (RC) da espécie *Tomato mosaic severe dwarf virus* (ToMSDV), que apresenta 156 nucleotídeos e o iteron GGTG é identificado duas vezes após a tata box. Nota-se também o domínio relacionado ao iteron (IRD) em negrito, esta região é relacionada como domínio de ligação da proteína REP.

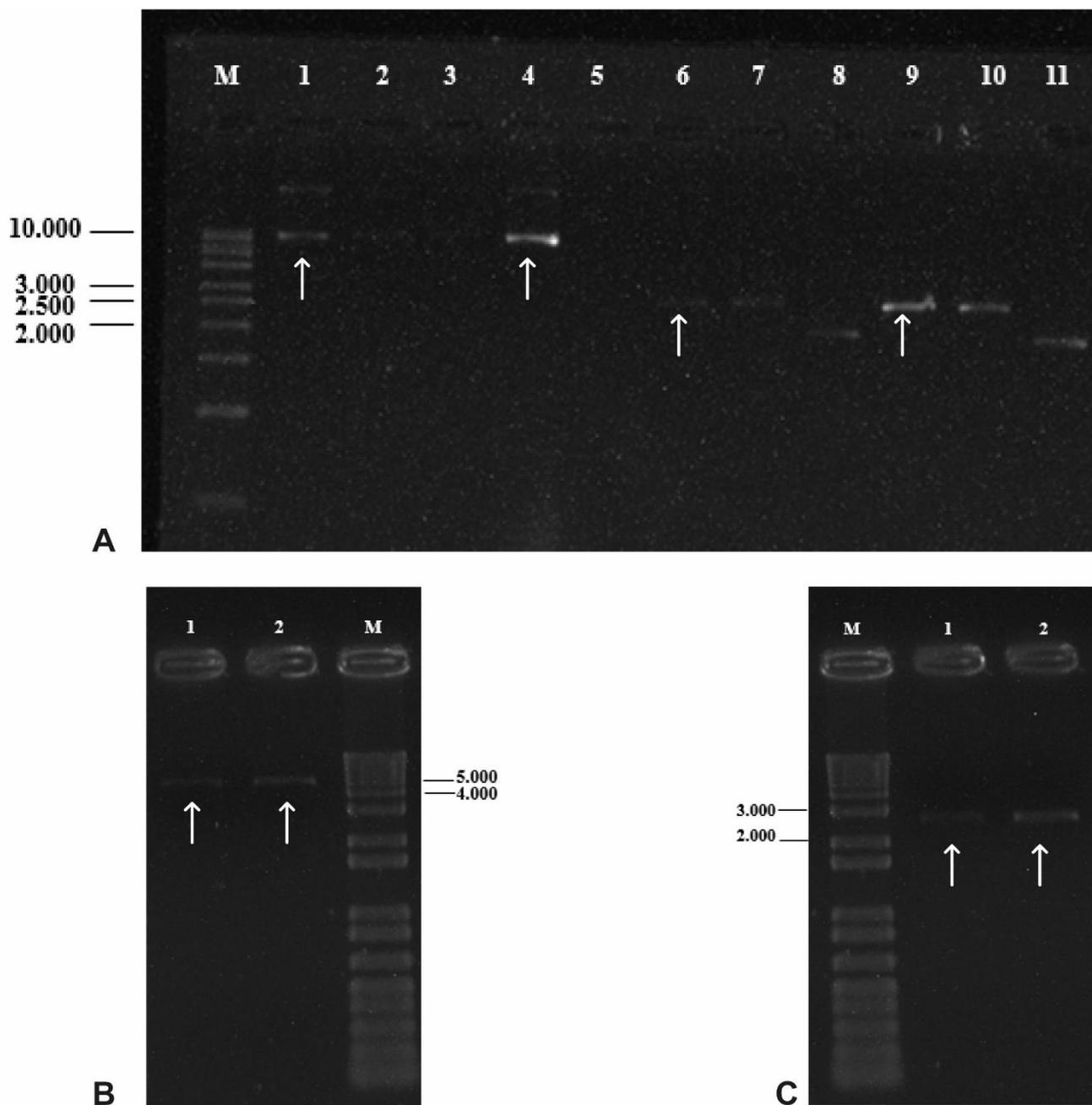
## 6.2 Confirmação da infectividade dos monômeros dos componentes A e B de DF-640

Os resultados descritos neste tópico foram gerados no Laboratório de Virologia da Universidade de Davis por um membro da equipe e são considerados em conjunto à este trabalho (e futura publicação) visto que os clones (monômeros) inoculados em tomate e *Nicotiana benthamiana* foram capazes de causar sintomas de mosaico e nanismo severo em tomate e deformação foliar em *Nicotiana benthamiana*. Plantas positivas e sintomáticas foram confirmadas positivas por PCR usando *primers* para os componentes A e B de DF-640. Clones monoméricos podem ser inoculados mediante bombardeamento de partículas, entretanto apresentam o inconveniente do custo e necessidade de aparelho. Estes monômeros foram usados para produção de clones multiméricos por considerar custo e a facilidade de inoculação. Estudos futuros serão conduzidos para determinar a gama de hospedeiras de DF-640, mediante inoculação destes monômeros (e/ou multiméricos) em outras plantas da família solanácea. Testes em plantas contendo distintos genes de resistência também serão realizados futuramente.

## 6.3 Construção dos clones infecciosos

Para a construção dos clones multiméricos, procedimentos de clonagens foram realizados a partir de duas construções intituladas DF-640AFRAG (F1/2) e DF-640BFRAG (F2/6). A primeira apresentava o vetor pSL1180 ligado ao fragmento do componente A preparado com as enzimas *ApaI* e *NdeI* (1.958 pb) e a correspondia ao fragmento produzido com as enzimas *BglIII* e *SalI* (1.875) ligados ao mesmo vetor. Na figura **Figura 17 A** pode-se observar o resultado da extração de DNA plasmidial empregada inicialmente de F1/2 (componente A) (Figura 17 A item 1) e F2/6 (componente B) (Figura 17 A item 4), e as amostras iniciais do componente A (Figura 17 A item 6) e B (Figura 17 A item 9).

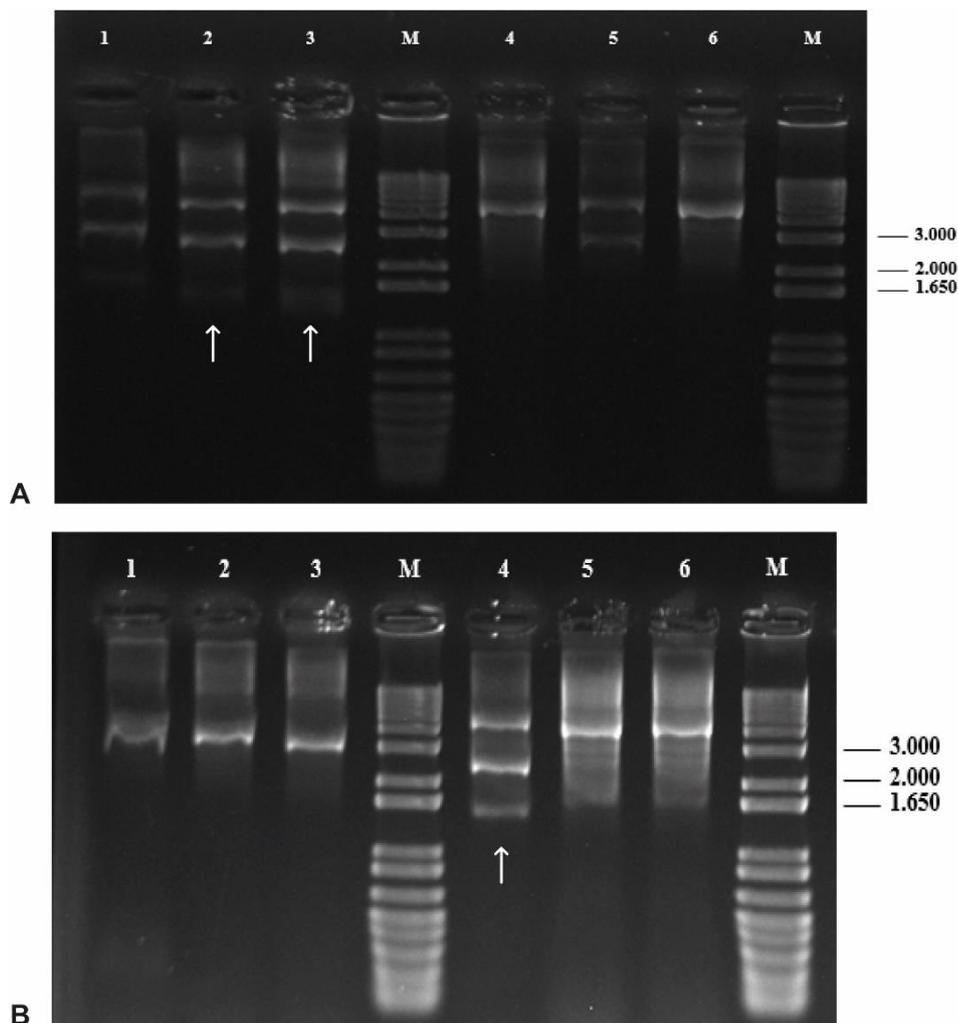
As construções F1/2 e F2/6 (**Figura 17 B**) empregadas como vetor tiveram seus tamanhos esperados confirmados após digestão respectivamente com as enzimas *NdeI* e *BglIII*. A primeira correspondeu a 5.380 pb (Figura 17 B item 1) e a segunda 5.297 pb (Figura 17 B item 2), para posterior ligação aos respectivos monômeros (componentes A e B completos), e posteriormente purificadas. Os monômeros (**Figura 17 C**) foram obtidos mediante o crescimento dos clones armazenados a -80°C e submetidos a extração de DNA plasmidial com kit *ZR Plasmid Kit – Classic* (ZR Research), de maneira que o componente A apresentou 2.605 pb (Figura 17 C item 1) e o componente B 2.625 pb (Figura 17 C item 2).



**Figura 17.** Eletroforese em gel (1%) das etapas iniciais de clonagem. As setas brancas direcionam para o segmento de interesse. Em **A**, observa-se os géis referentes às extrações de DNA plasmidial das construções com fragmento e monômeros e fragmento de DF640. **M** representa o marcador molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Sigma, 4 $\mu$ L), enquanto: **1** (MP F1/2, componente A) **2** (MP F1/5, componente A), **3** (MP F2/3, componente B), **4** (MP F2/6, componente B), **5** (poço vazio), **6** (DF640A clone 1.3), **7** (DF640A clone 1.3 tratado com BspI), **8** (DF640A Fragmento), **9** (DF640B clone 2.2), **10** (DF640B clone 2.2 tratado com BamHI) e **11** (DF640B Fragmento). Para cada amostra aplicou-se 1 $\mu$ L e 2 $\mu$ L de solução tampão. Em **B**, nota-se construções DF-640AFRAG e DF-640BFRAG purificadas. **M** representa o marcador molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, 3 $\mu$ L), enquanto: **1** corresponde a amostra Purificada DF-640AFRAG (5.380 pb) e **2** a amostra Purificada DF-640BFRAG (5.297 pb). Para cada amostra aplicou-se 1 $\mu$ L e 2 $\mu$ L de solução tampão. Em **C**, têm-se os monômeros DF-640A e DF-640B purificados. **M** representa o marcador molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, 3 $\mu$ L), enquanto: **1** corresponde a amostra Pur extenso DF-640A (2.605 pb) e **2** a amostra DF-640B (2.625 pb). Para cada amostra aplicou-se 1 $\mu$ L e 2 $\mu$ L de solução tampão

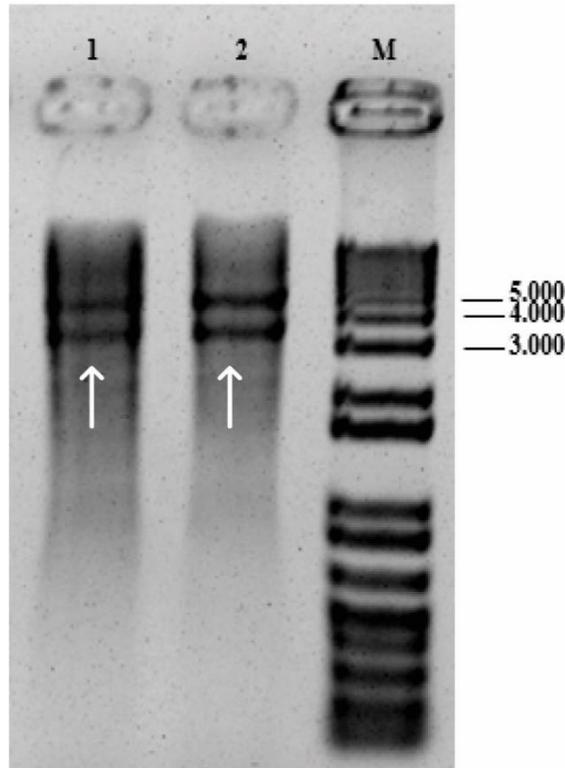
Uma vez que tanto vetor (construções F1/2 e F2/6) e insertos (monômeros de DF640A e B) estavam devidamente preparados, prosseguiu-se com a etapa de transformação, agora por eletroporação (*Micro pulser*, BIO RAD, 1.8 kV), e foram selecionados seis clones recombinantes para cada construção (pSL1180ADF640MULT e pSL1180BDF640MULT). A confirmação da transformação foi realizada após a visualização em gel de agarose (1%) do vetor (pSL1180), do fragmento e do monômero, por intermédio do uso das enzimas: *ApaI* e *NdeI* para pSL1180ADF640MULT e *SalI* e *BglII* para pSL1180BDF640MULT (**Figuras 18 A e B**). Assim, observou-se que clones multiméricos 1.2 e 1.3 referentes ao componente A apresentavam as três bandas desejadas, referentes ao vetor, componente completo e fragmento (**Figura 18 A itens 2 e 3**), enquanto apenas o clone multimérico 2.3 (componente B) dispôs do perfil desejado (**Figura 18 B item 4**), entretanto para o componente B, a enzima selecionada para clonagem digeriu o genoma viral. Neste sentido ensaios para retirar a construção deste vetor psl1180 e transferir para um vetor binário poderão ser realizados futuramente.

Esforços foram conduzidos para providenciar uma nova construção multimérica para o componente B, entretanto devido ao curto do prazo do mestrado estes ensaios deverão ser retomados futuramente, bem como bombardeamento dos monômeros para estudo de gama de hospedeiras, visto que não foram concluídos



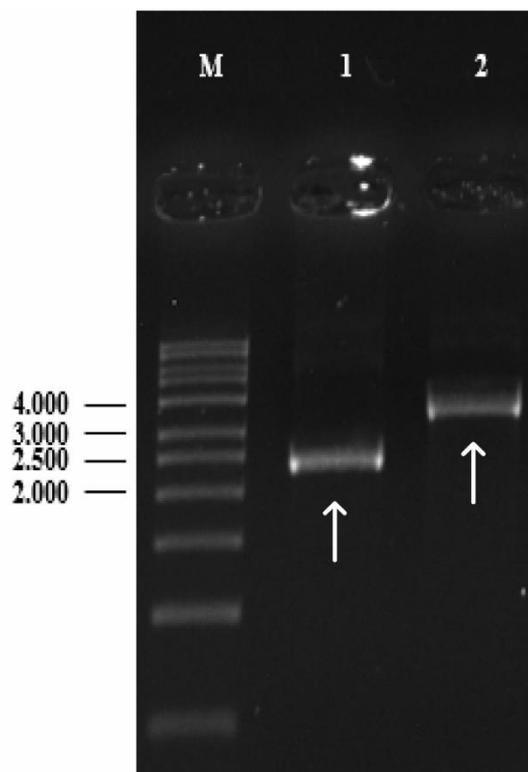
**Figura 18.** Eletroforese em gel de agarose (1%) da digestão dos clones recombinantes com as construções multiméricas pSL1180ADF640MULT e pSL1180BDF640MULT. Em **A**, observou-se que o padrão de bandas esperado na visualização corresponde a primeira um pouco acima de 3.000 pb (vetor pSL1180), a segunda entre 2.000 e 3.000 pb (monômero), e a terceira entre 1.650 e 2.000 pb (fragmento). **M** representa o marcador molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, 3 $\mu$ L) e os poços devidamente enumerados são: **1** (pSL1180ADF640MULT clone 1.2), **2** (pSL1180ADF640MULT clone 1.3), **3** (pSL1180ADF640MULT clone 1.6); **4** (pSL1180ADF640MULT clone 2.1), **5** (pSL1180BDF640MULT clone 2.2) e **6** (pSL1180BDF640MULT clone 2.4). Para cada amostra aplicou-se 5 $\mu$ L de digestão. Em **B**, o padrão de bandas esperado na visualização corresponde a primeira um pouco acima de 3.000 pb (vetor pSL1180), a segunda entre 2.000 e 3.000 pb (monômero), e a terceira entre 1.650 e 2.000 pb (fragmento). **M** representa o marcador molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, 3 $\mu$ L) e os poços devidamente enumerados são: **1** (pSL1180ADF640MULT clone 1.1), **2** (pSL1180ADF640MULT clone 1.4), **3** (pSL1180ADF640MULT clone 1.5); **4** (pSL1180ADF640MULT clone 2.3), **5** (pSL1180BDF640MULT clone 2.5) e **6** (pSL1180BDF640MULT clone 2.6). Para cada amostra aplicou-se 5 $\mu$ L de digestão.

No intuito de confirmar a retirada dos vírus multiméricos referentes ao componente A do vetor, digeriu-se os clones multiméricos 1.2 e 1.3 com as enzimas *Sall* e *PstI* (**Figura 19**) esperando-se verificar duas bandas, a primeira na altura de 3.000 pb (vetor pSL1180) e a segunda entre 4.000 e 5.000 pb (vírus multimérico, 4.563 pb). Os clones multiméricos 1.2 e 1.3 (pSL1180ADF640MULT) foram armazenados em glicerol 30%.



**Figura 19.** Eletroforese em gel de agarose (1%) da digestão dos clones recombinantes com a construção multimérica pSL1180ADF640MULT. O padrão de bandas esperado na visualização corresponde a primeira um pouco acima de 3.000 pb (vetor pSL1180) e a segunda entre 4.000 e 5.000 pb (vírus multimérico). **M** representa o marcador molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, 3 $\mu$ L) e os poços devidamente enumerados são: **1** (pSL1180ADF640MULT clone 1.2), **2** (pSL1180ADF640MULT clone 1.3).

Neste sentido, ao longo dos demais meses todos os esforços foram direcionados para a construção de um novo fragmento, sendo este providenciado pela clivagem com as enzimas *Xba*I e *Bg*II, além da digestão do vetor pSL1180 com as referidas enzimas (**Figura 20**). No entanto, devido à diversos contratempos como fatores relacionados a clonagem, chegada de enzima de trabalho, possível contaminação e viabilidade do vetor, não foi possível realizar a construção pSL1180BDF640MULT, para agroinfiltração, em tempo viável para a defesa de meu trabalho. Os trabalhos com o isolado DF-640 finalizaram em outubro de 2019, devido aos problemas relatados e a realização de outros testes.



**Figura 20.** Eletroforese em gel de agarose (1%) das amostras purificadas para a nova construção pSL1180BDF640FRAG. O padrão de bandas esperado na visualização corresponde a primeira um pouco acima de 3.000 pb (vetor pSL1180) e a segunda entre 2.000 e 2.500 pb (DF640BFRAG, 2.346pb). **M** representa o marcador molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Sigma, 4µL), e os poços devidamente enumerados são: **1** (DF640BFRAG XbaI+BglII, 2.346 pb), **2** (pSL1180 XbaI+BglII 3.382pb).

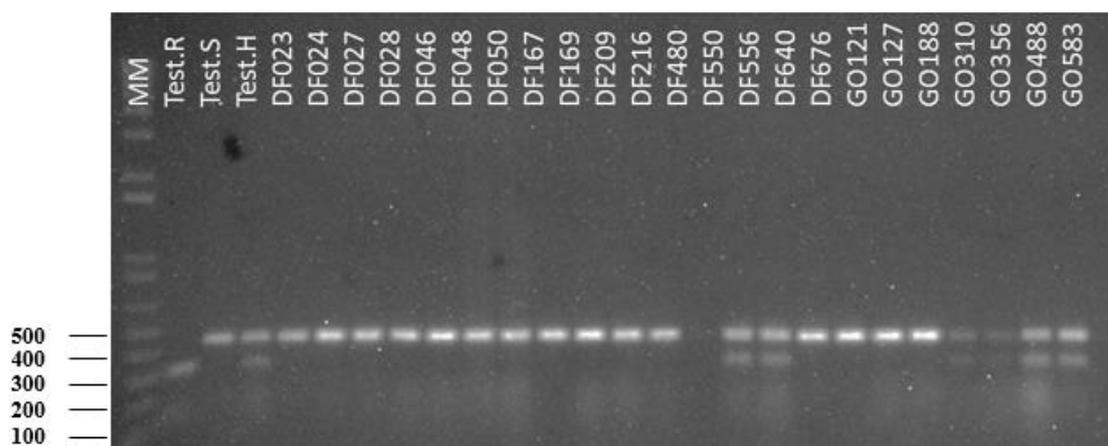
#### 6.4 Verificação da presença do gene de resistência *Ty-1* nos isolados de begomovírus

A verificação da presença do gene de resistência decorre da interpretação do padrão de clivagem do *amplicon* obtido com o par de *primers* UWTy1F/UWTy1R (450 pb) com a enzima *Taq-1*. Quando não há verificação de clivagem, ou seja, apenas uma única banda de 450 pb trata-se de um indivíduo homozigoto suscetível (*ty-1/ty-1*), no entanto, constatado duas bandas (320 pb e 150 pb) têm-se um indivíduo homozigoto resistente (*Ty-1/Ty-1*). Caso existam três bandas (450 pb, 320 pb e 150 pb) constata-se que a cultivar é heterozigota resistente (*Ty-1/ty-1*) (**Figura 21**). Dentre as 23 amostras de trabalho, 16 apresentaram padrão de suscetíveis, seis apresentam-se como heterozigotas e para uma das amostras (DF550) não foi possível observar amplificação.

Dentre os genes descritos atualmente, reforça-se que *Ty-1* é o mais empregado nas lavouras, visto que confere resistência a espécies bipartidas, e em especial, a espécie monopartida do Velho Mundo *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), conhecida por desencadear sintomas agressivos ao tomateiro (TORRE et al., 2018). No Brasil, sabe-se que a maior parte das culturas apresenta este gene, devido também a promoção de resistência a

espécies bipartidas predominantes no país (AGUILERA et al., 2011). O mecanismo de ação tanto de *Ty-1* e seu alelo *Ty-3* corresponde a codificação de uma molécula de RNA polimerase dependente de RNA que atua no silenciamento gênico transcricional (VERLAAN et al., 2013) e maior indução de metilação do material genético viral (BUTTERBACH et al., 2014). Isto possibilita que a replicação viral aconteça, todavia, em níveis menores, ao contrário de cultivares suscetíveis (TORRE et al., 2018).

Este estudo possibilitou a identificação de uma nova espécie em uma cultivar com resistência heterozigota. Tal informação estimula o desenvolvimento de novos estudos no campo de melhoramento genético, uma vez que este resultado sugere a superação de resistência de um gene amplamente distribuído em cultivares brasileiras. O conhecimento sobre as características biológicas deste vírus pode possibilitar a compreensão de como ocorreu a superação da resistência, e a redução de possíveis prejuízos econômicos caso patógenos com características semelhantes sejam encontrados em grande escala no campo.



**Figura 21.** Verificação da presença do gene *Ty-1* nos acessos utilizados neste trabalho. Como testemunha resistente empregou-se a cultivar til83, suscetível: tii-8, e heterozigota: tim-6. O perfil de bandas para determinação de homozigoto resistente (*Ty-1/Ty-1*) corresponde a duas bandas (320 pb e 150 pb), indivíduo homozigoto suscetível (*ty-1/ty-1*) apenas uma banda de 450 pb, e heterozigota resistente (*Ty-1/ty-1*) três bandas (450 pb, 320 pb e 150 pb). **MM** corresponde ao marcador molecular adotado 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, 3μL). Para cada amostras pipetou-se 12μL.

## 6.5 Análise filogenética e de recombinação

As árvores filogenéticas foram construídas mediante inferência bayesiana, a análise também foi complementada com SDT. Pôde-se observar que o componente A de ToMSDV apresentou a maior identidade (84%) com o isolado de *Tomato rugose yellow leaf curl virus* (ToRYLCV), de maneira que ambos estão agrupados no mesmo clado (**Figura 22**). O

componente B (**Figura 23**) apresenta maior identidade (79%), por sua vez, com a espécie *Tomato interveinal chlorosis virus-2* (ToICV2).

As análises de recombinação, por sua vez, evidenciaram que este isolado da espécie é recombinante. Através dos dados do *software* RDP4, pôde-se notar cinco eventos de recombinação no componente A, com os possíveis pontos de recombinação (*breakpoints*) em genes como *CP*, *TrAP*, *REn* e *REP*. As espécies associadas com os possíveis eventos recombinantes são *Tomato rugose yellow leaf curl virus*, *Tomato severe leaf curl virus*, *Tomato mottle leaf curl virus*, *Rynchosia golden mosaic Sinaloa virus* e *Tomato severe rugose virus* para o componente A (**Tabela 8**) e *Jatropha mosaic virus*, *Tomato interveinal chlorosis-2* e *Tomato common mosaic virus* para o componente B (**Tabela 9**).

O componente B também é recombinante, todavia, não evidenciou nenhuma identidade com espécies conhecidas. A troca de segmentos genéticos em vírus de plantas, estimulado por eventos de recombinação decorrentes de infecções mistas, podem proporcionar que o isolado cause sintomas mais acentuados em seu hospedeiro e a verificação de tais eventos possibilita compreender melhor sobre a biologia do patógeno (VARSANI et al., 2018). Tal associação pode ser corroborada com os achados deste trabalho, visto que a espécie apresenta evidente caráter recombinante, e em campo, foi isolada de uma cultura que apresentava severos sintomas. Na literatura, outra espécie recombinante recentemente descoberta no Brasil corresponde a *Tomato leaf curl purple vein virus* (ToLCPVV) (MACEDO et al., 2018).

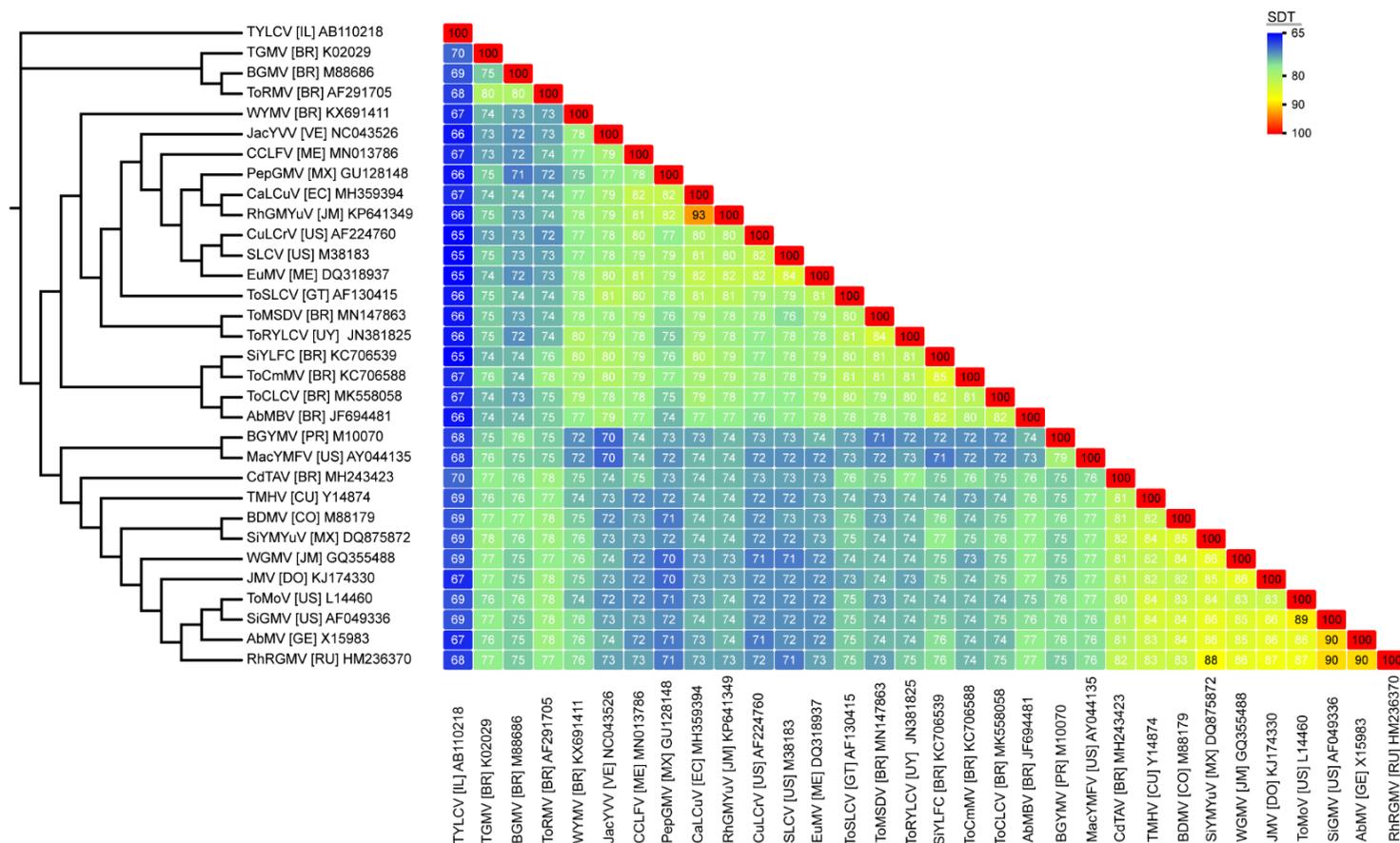
**Tabela 8.** Eventos de recombinação identificados no componente A de Tomato mosaic severe dwarf virus

Eventos	Pontos de recombinação		Região de recombinação (ORF)	Recombinante	Sequências parentais		Método <sup>1</sup>	Valor de P
	Início	Final			Principal	Secundária		
1	828 nt	1076 nt	AV1	Tomato mosaic severe dwarf virus	<i>Tomato rugose yellow leaf curl virus</i>	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	RDP GENECONV BootScan MaxChi SiScan 3Seq	4,92 <sup>-8</sup>
2	1154 nt	1286 nt	AC2 / AC3	Tomato mosaic severe dwarf virus	<i>Tomato severe leaf curl virus</i>	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	GENECONV BootScan MaxChi Chimaera SiScan	3,53 <sup>-7</sup>
3	1368 nt	1798 nt	AC2 / AC1	Tomato mosaic severe dwarf virus	<i>Rynchosia golden mosaic Sinaloa virus</i>	<i>Tomato severe rugose virus</i>	RDP GENECONV MaxChi BootScan MaxChi	5,466 <sup>-30</sup>

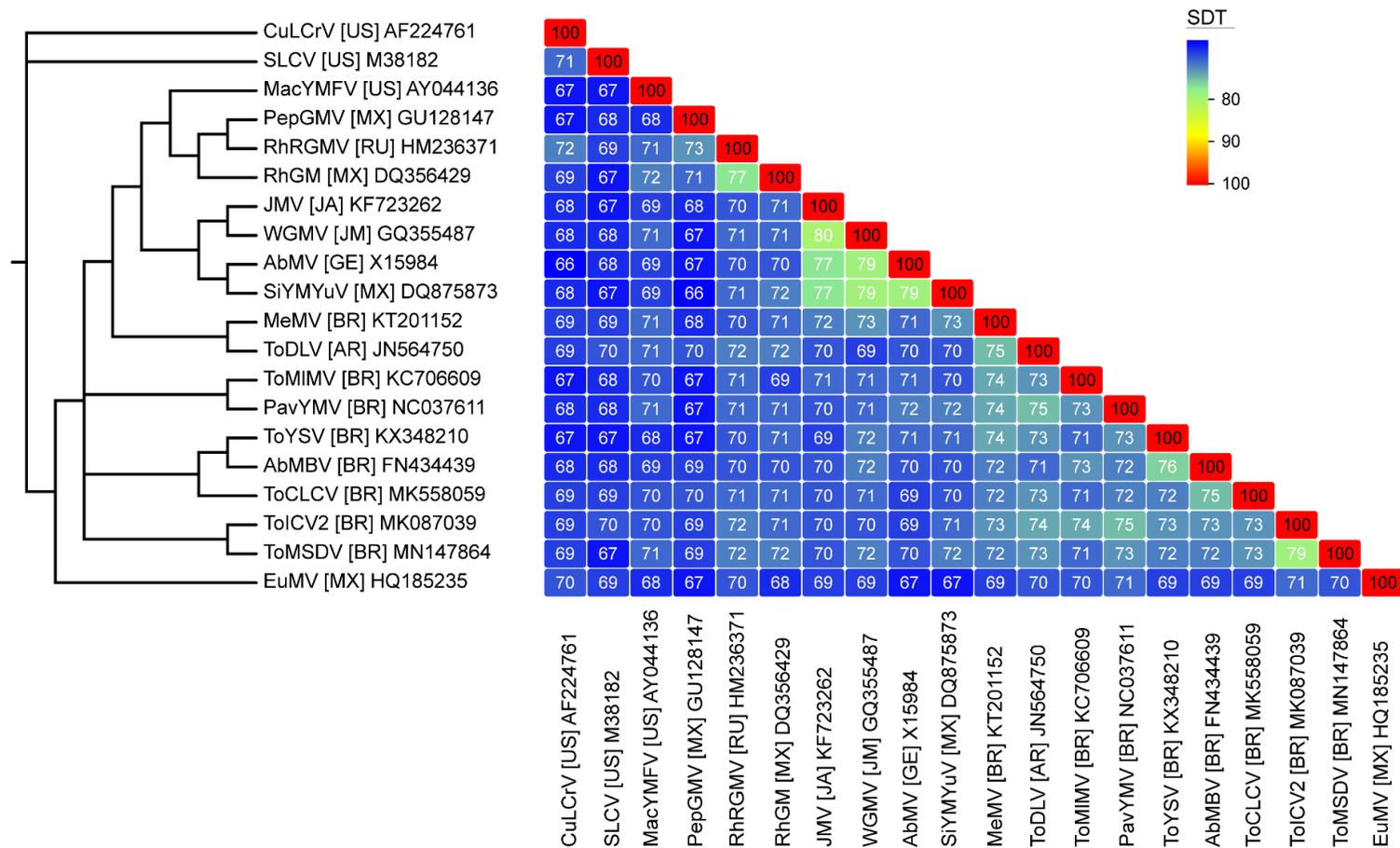
							SiScan	
							3Seq	
4	1918 nt	2135 nt	AC1	Tomato mosaic severe dwarf virus	Desconhecido	<i>Tomato severe rugose virus</i>	RDP GENECONV MaxChi BootScan MaxChi SiScan 3Seq	3,661 <sup>-15</sup>
5	2239 nt	2572 nt	AC1	Tomato mosaic severe dwarf virus	<i>Tomato severe rugose virus</i>	<i>Tomato severe leaf curl virus</i>	RDP GENECONV MaxChi BootScan MaxChi SiScan 3Seq	1,448 <sup>-18</sup>

**Tabela 9.** Eventos de recombinação identificados no componente B de Tomato mosaic severe dwarf virus

Eventos	Pontos de recombinação		Região de recombinação (ORF)	Recombinante	Sequências parentais		Método <sup>1</sup>	Valor de P
	Início	Final			Principal	Secundária		
1	1088 nt	1227 nt	BV1	Tomato mosaic severe dwarf virus	<i>Jatropha mosaic virus</i>	Desconhecido	RDP GENECONV MaxChi BootScan MaxChi SiScan 3Seq	1,11 <sup>-7</sup>
2	2510 nt	2590 nt	-	Tomato mosaic severe dwarf virus	<i>Tomato interveinal chlorosis-2</i>	<i>Tomato common mosaic virus</i>	GENECONV BootScan MaxChi Chimaera SiScan	3,49 <sup>-12</sup>



**Figura 22.** Árvore filogenética com modelo baesiano do componente A da espécie ToMSDV complementada com SDT. As espécies presentes na imagem são: *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV); *Tomato golden mosaic virus* (TGMV); *Bean golden mosaic virus* (BGMV); *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); *Wissadula yellow mosaic virus* (WYMV); *Jacquemontia yellow vein virus* (JacYVV); *Cucumber chlorotic leaf virus* (CCLFV); *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV); *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV); *Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus* (RhGMYuV); *Cucurbit leaf curl virus* (CuLcCrV); *Squash leaf curl virus* (SLCV); *Euphorbia mosaic virus* (EuMV); *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV); *Tomato mosaic severe dwarf virus* (ToMSDV); *Tomato rugose yellow leaf curl virus* (ToRYLCV); *Sida yellow leaf curl virus* (SiYLCV); *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV); *Tomato chlorotic leaf curl virus* (ToCLCV); *Abutilon mosaic Brazil virus* (AbMBV); *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV); *Macroptilium yellow mosaic Florida virus* (MacYMFV); *Chino del tomate Amazonas virus* (CdTAV); *Tomato mosaic Havana virus* (TMHV); *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV); *Sida yellow mosaic Yucatan virus* (SiYMYuV); *Wissadula golden mosaic St Thomas Virus* (WGMV); *Jatropha mosaic virus* (JMV); *Tomato mottle virus* (ToMoV); *Sida golden mosaic virus* (SiGMV); *Abutilon mosaic virus* (AbMV) e *Rhynchosia rugose golden mosaic virus* (RhRGMV).



**Figura 23.** Árvore filogenética com modelo baesiano do componente B da espécie ToMSDV complementada com SDT. As espécies presentes na imagem são: *Cucurbit leaf curl virus* (CuLCrV); *Squash leaf curl virus* (SLCV); *Macroptilium yellow mosaic Florida virus* (MacYMFV); *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV); *Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus* (RhGMYuV); *Rhynchosia golden mosaic virus* (RhGMV); *Jatropha mosaic virus* (JMV); *Wissadula golden mosaic St Thomas Virus* (WGMV); *Abutilon mosaic virus* (AbMV); *Sida yellow mosaic Yucatan virus* (SiYMYuV); *Melochia mosaic virus* (MeMV); *Tomato dwarf leaf virus* (ToDLV); *Tomato mild mosaic virus* (ToMIMV); *Pavonia yellow mosaic virus* (PavYMV); *Tomato yellow spot virus* (ToYSV); *Abutilon mosaic Brazil virus* (AbMBV); *Tomato chlorotic leaf curl virus* (ToCLCV); *Tomato interveinal chlorosis virus-2* (ToICV2); *Tomato mosaic severe dwarf virus* (ToMSDV); *Euphorbia mosaic virus* (EuMV).

## 7. CONCLUSÃO

Estudos direcionados a caracterização tanto molecular, quanto biológica de vírus que afetam plantas são de fundamental importância para melhor compreensão de aspectos biológicos do patógeno. Reforça-se também que quando o escopo de trabalho envolve espécies virais que causam algum prejuízo a uma planta de interesse econômico, os dados gerados auxiliam na elaboração de medidas de controle dos danos, resultando assim na minimização dos prejuízos econômicos.

Tais estudos são recorrentes no Brasil, visto que a agricultura movimenta uma parcela considerável da economia do país. Além disso, diversos grupos de pesquisa que atuam no segmento de Fitopatologia e Melhoramento genético de plantas almejam compreender certas lacunas no tocante as características dos vírus e seu mecanismo de interação com o hospedeiro.

Este trabalho teve como enfoque a caracterização molecular de um novo begomovírus bipartido isolado de tomateiro, além da descrição de prováveis novas espécies presentes na região de Distrito Federal e Goiás. A espécie em questão foi nomeada como *Tomato severe mosaic dwarf virus* em decorrência dos severos sintomas de mosaico e comprometimento da área foliar observados. A caracterização molecular indica que a referida espécie apresenta as características típicas de um begomovírus bipartido de Novo Mundo, e a filogenia corrobora o caráter de nova espécie. A análise de recombinação evidencia a considerável permuta de trechos genéticos nos componentes A e B. A caracterização dos demais isolados está pendente dos resultados de sequenciamento.

Além disso, tal espécie foi identificada em um cultivar que apresentava o gene de resistência *Ty-1*, o mais adotado nas plantações brasileiras. A presença de uma nova espécie que consegue superar a resistência do hospedeiro indica que novas estratégias precisam ser implementadas para tentar contornar tal situação e impedir que a mesma se torne recorrente no campo. A emergência de novas espécies decorre, em muitos casos, de eventos genéticos que estimulam a alteração de trechos gênicos nos componentes, o que pode conferir maior capacidade adaptativa e patogenicidade ao vírus. Pode-se sugerir então que o caráter recombinante de *Tomato mosaci severe dwarf virus* está intimamente relacionado com seus severos sintomas e habilidade de superar resistência.

Este trabalho também detinha como um dos objetivos iniciais a construção do clone infeccioso multimérico para ensaios de agroinoculação, pois já foi verificado que o monômero é infeccioso. No entanto, em decorrência de fatores inerentes à Ciência e ao curto prazo estudos

futuros deverão ser realizados, incluindo finalização de multimérico para o componente B e teste de gama de hospedeiras e inoculação em plantas resistentes.

Como conclusão, a descoberta de novas espécies de vírus é importante para compreender a dinâmica da atividade viral nas lavouras e verificar a emergência de novos isolados. Novos estudos são necessários para melhor compreensão da interação do vírus descrito neste trabalho com possíveis novos hospedeiros. Os dados serão de grande auxílio para fomento de atividades relacionadas ao melhoramento genético de plantas e minimização de impactos em cadeias produtivas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILERA, Jorge González; HURTADO, Francisco Dueñas; GIL, Marta Alvarez; XAVIER, Cesar Augusto Diniz; ZERBINI, Francisco Murilo; LAURINDO, Bruno Soares; NICK, Carlos; DA SILVA, Derly José Henriques. Identificação dos genes *Ty-2* e *Ty-3* de resistência a begomovírus em genótipos de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S. l.], v. 46, n. 7, p. 772–775, 2011. DOI: 10.1590/S0100-204X2011000700014.
- ALBUQUERQUE, L. C.; MARTIN, D. P.; ÁVILA, A. C.; INOUE-NAGATA, A. K. Characterization of *Tomato yellow vein streak virus*, a begomovirus from Brazil. **Virus Genes**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 140–147, 2010. DOI: 10.1007/s11262-009-0426-2.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. Bergamin; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia**. 5° ed. Ouro Fino: Editora Agronômica Ceres, 2016.
- ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L. M. G.; BRASILEIRO, A. C. M.; RIBEIRO, S. G.; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, [S. l.], v. 93, p. 142–150, 1996. DOI: 10.1007/BF00225739.
- ARGUELLO-ASTORGA, Gerardo; HERRERA-ESTRELLA, Luis; RIVERA-BUSTAMANTE, Rafael. Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. **Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 553–556, 1994. DOI: 10.1007/BF00013742.
- ARGÜELLO-ASTORGA, G. R.; RUIZ-MEDRANO, R. An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: Identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 146, n. 8, p. 1465–1485, 2001. DOI: 10.1007/s007050170072.
- ANDRADE, E. C.; MANHANI, G. G.; ALFENAS, P. F.; CALEGARIO, R. F.; FONTES, E. P. B.; ZERBINI, F. M. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. **Journal of General Virology**, [S. l.], v. 87, n. 12, p. 3687–3696, 2006. DOI: 10.1099/vir.0.82279-0.
- ANBINDER, Ilana; REUVENI, Moshe; AZARI, Raviv; PARAN, Ilan; NAHON, Sahadia; SHLOMO, Haviva; CHEN, Lea; LAPIDOT, Moshe; LEVIN, Ilan. Molecular dissection of *Tomato leaf curl virus* resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. **Theoretical and Applied Genetics**, [S. l.], v. 119, n. 3, p. 519–530, 2009. DOI: 10.1007/s00122-009-1060-z.
- ANDRADE, Domingos Eduardo Guimarães Tavares de; SOUZA, Leonardo Tavares De; ASSIS, Tereza Cristina De. Murcha-de-Fusário: Importante Doença Do Tomateiro No Estado de Pernambuco. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, [S. l.], v. 5, p. 243–263, 2009.
- BARBOSA, L. F. **Diversidade de Bemisia tabaci na América latina e detecção de seus endossimbiontes**. 2014. Universidade de São Paulo, [S. l.], 2014.

BARBOSA, Leonardo da Fonseca et al. First report of *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. **Pest Management Science**, [S. l.], v. 71, n. 4, p. 501–504, 2015. DOI: 10.1002/ps.3909.

BARBOSA, J. C.; TEIXEIRA, A. P. M.; MOREIRA, A. G.; CAMARGO, L. E. A.; BERGAMIN FILHO, A.; KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A. M. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Brazil. **Plant Disease**, [S. l.], v. 92, n. 12, p. 1709, 2008. DOI: 10.1094/PDIS-92-12-1709C.

BERNI, Roberto; ROMI, Marco; CANTINI, Claudio; HAUSMAN, Jean Francois; GUERRIERO, Gea; CAI, Giampiero. Functional molecules in locally-adapted crops: The case study of tomatoes, onions, and sweet cherry fruits from tuscany in Italy. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 9, p. 1–8, 2019. DOI: 10.3389/fpls.2018.01983.

BIAN, Xue Yu; THOMAS, Mark R.; RASHEED, M. Saif; SAEED, Muhammad; HANSON, Peter; DE BARRO, Paul J.; REZAIAN, M. Ali. A recessive allele (*tgr-1*) conditioning tomato resistance to geminivirus infection is associated with impaired viral movement. **Phytopathology**, [S. l.], v. 97, n. 8, p. 930–937, 2007. DOI: 10.1094/PHYTO-97-8-0930.

BRIDDON, Rob W. et al. Diversity of DNA  $\beta$ , a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. **Virology**, [S. l.], v. 312, p. 106–121, 2003. DOI: 10.1016/S0042-6822(03)00200-9.

BRIDDON, R. W.; STANLEY, J. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. **Virology**, [S. l.], v. 344, n. 1, p. 198–210, 2006. DOI: 10.1016/j.virol.2005.09.042.

BROWN, Judith K. et al. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. **Archives of virology**, [S. l.], v. 160, p. 1593–1619, 2015. DOI: 10.1007/s00705-015-2398-y.

BOITEUX, L. S.; FONSECA, M. E. N.; SIMON, P. W. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, [S. l.], v. 124, n. 1, p. 32–38, 1999. DOI: 10.21273/jashs.124.1.32.

BOITEUX, Leonardo Silva; OLIVEIRA, Valter Rodrigues; SILVA, César Honório; MAKISHIMA, Nozomu; INOUE-NAGATA, Alice K.; FONSECA, Maria Esther De Noronha; GIORDANO, Leonardo De Britto. Reaction of tomato hybrids carrying the *Ty-1* locus to Brazilian bipartite Begomovirus species. **Horticultura Brasileira**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 20–23, 2007. DOI: 10.1590/s0102-05362007000100005.

BOITEUX, L.; FONSECA, M. E. de Noronha; VIEIRA, J.; PEREIRA-CARVALHO, R. C. Breeding for Resistance to Viral Diseases. In: **Plant Breeding for Biotic Stress Resistance**. In: Fritsc ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 57–59. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-33087-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-33087-2_4).

BULL, Simon E.; BRIDDON, Rob W.; SSERUBOMBWE, William S.; NGUGI, Kahi; MARKHAM, Peter G.; STANLEY, John. Infectivity, pseudorecombination and mutagenesis of Kenyan cassava mosaic begomoviruses. **Journal of General Virology**, [S. l.], v. 88, n. 5, p. 1624–1633, 2007. DOI: 10.1099/vir.0.82662-0.

BUTTERBACH, Patrick; VERLAAN, Maarten G.; DULLEMANS, Annette; LOHUIS, Dick; VISSER, Richard G. F.; BAI, Yuling; KORMELINK, Richard. *Tomato yellow leaf curl virus* resistance by *Ty-1* involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by *Cucumber mosaic virus* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 111, n. 35, p. 12942–12947, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1400894111.

CARVALHO, Claudine M.; FONTENELLE, Mariana R.; FLORENTINO, Lílian H.; SANTOS, Anésia A.; ZERBINI, Francisco M.; FONTES, Elizabeth P. B. A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. **Plant Journal**, [S. l.], v. 55, n. 5, p. 869–880, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03556.x.

CARVALHO, Jefferson Luiz de; PAGLIUCA, Larissa Gui. Tomate, um mercado que não para de crescer. **Hortifruti Brasil**, [S. l.], v. 6, n. 58, p. 6–14, 2007. DOI: 10.2307/473453.

CASINI, Arturo; STORCH, Marko; BALDWIN, Geoffrey S.; ELLIS, Tom. Bricks and blueprints: Methods and standards for DNA assembly. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 16, n. 9, p. 568–576, 2015. DOI: 10.1038/nrm4014.

CHAVES, Alexandre Levi Rodrigues; EIRAS, Marcelo; RODRIGUES, Leilane Karam; RAMOS, Alyne de Fátima; COLARICCIO, Addolorata. First report of *Tomato mottle leaf curl virus* infecting tomato in São Paulo state, Brazil. **Summa Phytopathologica**, [S. l.], v. 43, n. 4, p. 353, 2017. DOI: 10.1590/0100-5405/175450.

CHETELAT, Roger T.; PERTUZÉ, Ricardo A.; FAÚNDEZ, Luis; GRAHAM, Elaine B.; JONES, Carl M. Distribution, ecology and reproductive biology of wild tomatoes and related nightshades from the Atacama Desert region of northern Chile. **Euphytica**, [S. l.], v. 167, n. 1, p. 77–93, 2009. DOI: 10.1007/s10681-008-9863-6.

CUI, X.; LI, G.; WANG, D.; HU, D.; ZHOU, X. A Begomovirus DNA -Encoded Protein Binds DNA, Functions as a Suppressor of RNA Silencing, and Targets the Cell Nucleus. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 79, n. 16, p. 10764–10775, 2005. DOI: 10.1128/JVI.79.16.10764-10775.2005.

DAVINO, Salvatore; NAPOLI, Chiara; DELLACROCE, Chiara; MIOZZI, Laura; NORIS, Emanuela; DAVINO, Mario; ACCOTTO, Gian Paolo. Two new natural begomovirus recombinants associated with the Tomato yellow leaf curl disease co-exist with parental viruses in tomato epidemics in Italy. **Virus Research**, [S. l.], v. 143, p. 15–23, 2009. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.03.001.

DE BARRO, Paul J.; LIU, Shu-Sheng; BOYKIN, Laura M.; DINSDALE, Adam B. *Bemisia tabaci*: A Statement of Species Status. **Annual Review of Entomology**, [S. l.], v. 56, n. 1, p. 1–19, 2011. DOI: 10.1146/annurev-ento-112408-085504.

DUFFY, Siobain; HOLMES, Edward C. Phylogenetic Evidence for Rapid Rates of Molecular Evolution in the Single-Stranded DNA Begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus*. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 82, n. 2, p. 957–965, 2008. DOI: 10.1128/jvi.01929-07.

DUFFY, S.; SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: Patterns and determinants. **Nature Reviews Genetics**, [S. l.], v. 9, p. 267–276, 2008.

EDGAR, Robert C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004. DOI: 10.1093/nar/gkh340.

EINI, Omid; SAHRAEI, Ghazal Ebadzad; BEHJATNIA, Seyed Ali Akbar. Molecular characterization and construction of an infectious clone of a pepper isolate of *Beet curly top Iran virus*. **Molecular Biology Research Communications**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 101–113, 2016.

ESASHIKA, Danilo AS; MICHEREFF-FILHO, Miguel; BASTOS, Cristina S.; INOUE-NAGATA, Alice K.; DIAS, Antônio M.; RIBEIRO, Matheus GPM. Suscetibilidade de adultos de *Bemisia tabaci* biótipo B a inseticidas. **Horticultura Brasileira**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 189–195, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620160000200007>.

FAO. **FAO - Food and Agriculture Organization**. 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.

FARIA, J. C.; SOUZA-DIAS, J. A. C.; SLACK, S.; MAXWELL, D. P. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, [S. l.], v. 81, p. 423, 1997.

FAUQUET, C. M.; BRIDDON, R. W.; BROWN, J. K.; MORIONES, E.; STANLEY, J.; ZERBINI, M.; ZHOU, X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 153, n. 4, p. 783-821, 2008.

FERNANDES, Fernanda Rausch; ALBUQUERQUE, Leonardo Cunha de; BRITTO, Leonardo Giordano de; BOITEUX, Leonardo Silva; DE ÁVILA, Antonio Carlos; INOUE-NAGATA, Alice Kazuko. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 251–258, 2008. DOI: 10.1007/s11262-007-0184-y.

FERNANDES, Fernanda Rausch. **Caracterização molecular e biológica de begomovírus de soja (*Glycine max*) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) e resistência a vírus mediada por RNA interferente em plantas transgênicas de soja**. 2009. Universidade Federal de Viçosa, [S. l.], 2009.

FERRO, Daniela Damasceno Xavier. **Estudos com o locus *Ty-1* do tomateiro e busca por novos marcadores moleculares para tolerância ao *Tomato severe rugose virus***. 2013. Universidade de Brasília, [S. l.], 2013.

FILHO, José de Souza Reis; MARIN, Joel Orlando Bevilaqua; FERNANDES, Paulo Marçal. Os agrotóxicos na produção de tomate de mesa na região de Goianópolis, Goiás. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 39, n. 4, p. 307-316, 2009.

FLORES, E. L. Z. A.; SILBERSCHMIDT, K.; KRAMER, M. Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. **O Biológico**, [S. l.], v. 26, p. 65–69, 1960.

FONTES, Elizabeth P. B.; EAGLE, Patricia A.; SIPE, Patrick S.; LUCKOW, Verne A.; HANLEY-BOWDOIN, Linda. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 269,

n. 11, p. 8459–8465, 1994.

FRANÇA, F. H. ...; VILAS-BOAS, G. L.; CASTELO-BRANCO, M. Occurrence of *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) in the Federal District. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, [S. l.], v. 25, p. 369–372, 1996.

FRISCHMUTH, S.; WEGE, C.; HÜLSER, D.; JESKE, H. The movement protein BC1 promotes redirection of the nuclear shuttle protein BV1 of Abutilon mosaic geminivirus to the plasma membrane in fission yeast. **Protoplasma**, [S. l.], v. 230, n. 1–2, p. 117–123, 2007. DOI: 10.1007/s00709-006-0223-x.

GAFNI, Y.; EPEL, B. L. The role of host and viral proteins in intra- and intercellular trafficking of geminiviruses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [S. l.], v. 60, p. 231–241., 2002.

GARCÍA-ANDRÉS, Susana; MONCI, Francisco; NAVAS-CASTILLO, Jesús; MORIONES, Enrique. *Begomovirus* genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. **Virology**, [S. l.], v. 350, n. 2, p. 433–442, 2006. DOI: 10.1016/j.virol.2006.02.028.

GARCÍA-ANDRÉS, Susana; ACCOTTO, Gian Paolo; NAVAS-CASTILLO, Jesús; MORIONES, Enrique. Founder effect, plant host, and recombination shape the emergent population of begomoviruses that cause the tomato yellow leaf curl disease in the Mediterranean basin. **Virology**, [S. l.], v. 359, p. 302–312, 2007. DOI: 10.1016/j.virol.2006.09.030.

GARCÍA-ARENAL, F.; FRAILE, A.; MALPICA, J. M. Variation and evolution of plant virus populations. **International Microbiology**, [S. l.], v. 6, p. 225–232, 2003.

GARCÍA-CANO, E.; RESENDE, R. O.; BOITEUX, L. S.; GIORDANO, L. B.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MORIONES, E. Phenotypic expression, stability, and inheritance of a recessive resistance to monopartite begomoviruses associated with Tomato yellow leaf curl disease in tomato. **Phytopathology**, [S. l.], v. 98, n. 5, p. 618–627, 2008. DOI: 10.1094/PHYTO-98-5-0618.

GE, L.; ZHANG, J.; ZHOU, X.; LI, H. Genetic Structure and Population Variability of *Tomato yellow leaf curl China virus*. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 81, n. 11, p. 5902–5907, 2007. DOI: 10.1128/jvi.02431-06.

GILBERTSON, R. L.; FARIA, J. C.; AHLQUIST, P.; MAXWELL, D. P. Genetic diversity in geminiviruses causing bean golden mosaic disease: the nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of a Brazilian isolate of bean golden mosaic geminivirus. **Phytopathology**, [S. l.], v. 83, p. 709–715, 1993.

GILBERTSON, Robert L.; SUDARSHANA, Mysore; JIANG, Hao; ROJAS, Maria R.; LUCAS, William J. Limitations on Geminivirus Genome Size Imposed by Plasmodesmata and Virus-Encoded Movement Protein: Insights into DNA Trafficking. **Plant Cell**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. 2578–2591, 2003. DOI: 10.1105/tpc.015057.

GILL, Upinder; SCOTT, John W.; SHEKASTEBAND, Reza; OGUNDIWIN, Eben; SCHUIT, Cees; FRANCIS, David M.; SIM, Sung Chur; SMITH, Hugh; HUTTON, Samuel

F. Ty-6, a major begomovirus resistance gene on chromosome 10, is effective against *Tomato yellow leaf curl virus* and *Tomato mottle virus*. **Theoretical and Applied Genetics**, [S. l.], v. 132, n. 5, p. 1543–1554, 2019. DOI: 10.1007/s00122-019-03298-0.

GIORDANO, L. B.; SILVA-LOBO, V. L.; SANTANA, F. M.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S. Inheritance of resistance to the bipartite Tomato chlorotic mottle begomovirus derived from *Lycopersicon esculentum* cv. “Tyking”. **Euphytica**, [S. l.], v. 143, n. 1–2, p. 27–33, 2005. DOI: 10.1007/s10681-005-1685-1.

GRONENBORN, Bruno. Nanoviruses: Genome organisation and protein function. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 98, n. 2, p. 103–109, 2004. DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.10.015.

HAMILTON, W. D. O.; STEIN, V. E.; COUTTS, R. H. A.; BUCK, K. W. Complete nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of *Tomato golden mosaic virus*: potential coding regions and regulatory sequences. **The EMBO Journal**, [S. l.], v. 3, n. 9, p. 2197–2205, 1984. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1984.tb02114.x.

HANLEY-BOWDOIN, Linda et al. Geminiviruses : Models for Plant DNA Replication , Transcription , and Cell Cycle Regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 71–106, 1999. DOI: 10.1080/07352689991309162.

HANLEY-BOWDOIN, Linda; BEJARANO, Eduardo R.; ROBERTSON, Dominique; MANSOOR, Shahid. Geminiviruses: Masters at redirecting and reprogramming plant processes. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 11, p. 777–788, 2013. DOI: 10.1038/nrmicro3117.

HANSON, Peter M. et al. Mapping a wild tomato introgression associated with *Tomato yellow leaf curl virus* resistance in a cultivated tomato line. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, [S. l.], v. 125, n. 1, p. 15–20, 2000. DOI: 10.21273/jashs.125.1.15.

HARKINS, G. W. et al. Experimental evidence indicating that mastreviruses probably did not co-diverge with their hosts. **Virology Journal**, [S. l.], v. 6, n.104, p.1-14 2009. DOI: 10.1186/1743-422X-6-104.

HILL, Janet E.; STRANDBERG, James O.; HIEBERT, Ernest; LAZAROWITZ, Sondra G. Asymmetric infectivity of pseudorecombinants of *Cabbage leaf curl virus* and *Squash leaf curl virus*: Implications for bipartite geminivirus evolution and movement. **Virology**, [S. l.], v. 250, n. 2, p. 283–292, 1998. DOI: 10.1006/viro.1998.9366.

HÖFER, Petra; BEDFORD, Ian D.; MARKHAM, Peter G.; JESKE, Holger; FRISCHMUTH, Thomas. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. **Virology**, [S. l.], v. 236, n. 2, p. 288–295, 1997. DOI: 10.1006/viro.1997.8751.

HUTTON, Samuel F.; SCOTT, Jay W.; SCHUSTER, David J. Recessive resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from the tomato cultivar Tyking is located in the same region as Ty-5 on chromosome 4. **HortScience**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 324–327, 2012. DOI: 10.21273/HORTSCI.47.3.324.

IBGE. **IBGE - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola LSPA 2018**. 2019a. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>. Acesso em: 20 maio. 2019.

IBGE. **IBGE - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola LSPA 2017**. 2019b. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612>. Acesso em: 20 maio. 2019.

ICTV. **ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses - Taxonomy**. 2019. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em: 11 jan. 2019.

IDRIS, A. M.; BRIDDON, Rob W.; BULL, Simon E.; BROWN, J. K. Cotton leaf curl Gezira virus-satellite DNAs represent a divergent, geographically isolated Nile Basin lineage: Predictive identification of a satDNA REP-binding motif. **Virus Research**, [S. l.], v. 109, n. 1, p. 19–32, 2005. DOI: 10.1016/j.virusres.2004.10.002.

INOUE-NAGATA, Alice K.; ALBUQUERQUE, Leonardo C.; ROCHA, Wesley B.; NAGATA, Tatsuya. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage  $\phi$ 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, [S. l.], v. 116, n. 2, p. 209–211, 2004. DOI: 10.1016/j.jviromet.2003.11.015.

INOUE-NAGATA, Alice Kazuko; MARTIN, Darren Patrick; BOITEUX, Leonardo Silva; GIORDANO, Leonardo De Britto; BEZERRA, Isabel Cristina; DE ÁVILA, Antonio Carlos. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting *Begomovirus* complex. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S. l.], v. 41, n. 8, p. 1329–1332, 2006. DOI: 10.1590/S0100-204X2006000800018.

INOUE-NAGATA, Alice Kazuko; ÁVILLA, Antônio Carlos de; BÔAS, Geni Litvin Villas. Os Geminivírus em Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria. **Embrapa Hortaliças: Circular Técnica**, [S. l.], p. 1–12, ISSN 1415-3033, 2009.

INOUE-NAGATA, Alice K.; LIMA, Mirtes F.; GILBERTSON, Robert L. A review of geminivirus (begomovirus) diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. **Horticultura Brasileira**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 8–18, 2016.

ISLAM, Waqar; AKUTSE, Komivi Senyo; QASIM, Muhammad; KHAN, Khalid Ali; GHRAMH, Hamed A.; IDREES, Atif; LATIF, Shahid. *Bemisia tabaci*-mediated facilitation in diversity of begomoviruses: Evidence from recent molecular studies. **Microbial Pathogenesis**, v.123, p. 162-168, 2018. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.07.008.

JACOBSON, Alana Lynn; DUFFY, Siobain; SSERUWAGI, Peter. Whitefly-transmitted viruses threatening cassava production in Africa. **Current Opinion in Virology**, [S. l.], v. 33, p. 167–176, 2018. DOI: 10.1016/j.coviro.2018.08.016.

JI, Yuanfu; SCHUSTER, David J.; SCOTT, Jay W. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. **Molecular Breeding**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 271–284, 2007. DOI: 10.1007/s11032-007-9089-7.

KLEINOW, Tatjana; HOLEITER, Gerlinde; NISCHANG, Marc; STEIN, Monika; KARAYAVUZ, Miriam; WEGE, Christina; JESKE, Holger. Post-translational modifications of *Abutilon mosaic virus* movement protein (BC1) in fission yeast. **Virus Research**, [S. l.], v. 131, n. 1, p. 86–94, 2008. DOI: 10.1016/j.virusres.2007.08.011.

KOONIN; Eugene V.; ILYINA; Tatyana V. Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. **Journal of General Virology**, [S. l.], v. 73, n. 10, p. 2763–2766, 1992.

LAUFS, Jorgen; TRAUTT, Wolfgang; HEYRAUDT, Françoise; MATZEITT, Volker; ROGERSF, Stephen G.; SCHELLT, Jeff; GRONENBORN, Bruno. In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of *Tomato yellow leaf curl virus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 92, p. 3879–3883, 1995.

LEFEUVRE, P.; VARSANI, A.; MARTIN, D. P. Widely Conserved Recombination Patterns among Single-Stranded DNA Viruses. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 83, n. 6, p. 2697–2707, 2009. DOI: 10.1128/JVI.02152-08.

LEKE, Walter N.; MIGNOUNA, Djana B.; BROWN, Judith K.; KVARNHEDEN, Anders. Begomovirus disease complex: Emerging threat to vegetable production systems of West and Central Africa. **Agriculture and Food Security**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 1–14, 2015. DOI: 10.1186/s40066-014-0020-2.

LEVY, Avner; TZFIRA, Tzvi. *Bean dwarf mosaic virus*: A model system for the study of viral movement. **Molecular Plant Pathology**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 451–461, 2010. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2010.00619.x.

LI, Fangfang; XU, Xiongbiao; HUANG, Changjun; GU, Zhouhang; CAO, Linge; HU, Tao; DING, Ming; LI, Zhenghe; ZHOU, Xueping. The AC5 protein encoded by *Mungbean yellow mosaic India virus* is a pathogenicity determinant that suppresses RNA silencing-based antiviral defenses. **New Phytologist**, [S. l.], v. 208, n. 2, p. 555–569, 2015. DOI: 10.1111/nph.13473.

LOURENÇÃO, André L.; PALAZZO, Silvia R. L.; SIQUEIRA, Walter J.; COLARICCIO, Addolorata; MELO, Arlete M. T.; MELO, Paulo C. T. Resistência de cultivares e linhagens de tomateiro a *Tomato chlorotic spot virus* e a *Potato virus Y*. **Fitopatologia Brasileira**, [S. l.], v. 30, n. 6, p. 609–614, 2005. DOI: 10.1590/s0100-41582005000600007.

MACEDO, M. A.; ALBUQUERQUE, L. C.; MALIANO, M. R.; SOUZA, J. O.; ROJAS, M. R.; INOUE-NAGATA, A. K.; GILBERTSON, R. L. Characterization of *Tomato leaf curl purple vein virus*, a new monopartite New World begomovirus infecting tomato in Northeast Brazil. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 163, n. 3, p. 737–743, 2018. DOI: 10.1007/s00705-017-3662-0.

MARTIN, Darren P.; SHEPHERD, Dionne N. The epidemiology, economic impact and control of Maize streak disease. **Food Security**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 305–315, 2009. DOI: 10.1007/s12571-009-0023-1.

MARTIN, Darren P.; LEMEY, Philippe; LOTT, Martin; MOULTON, Vincent; POSADA, David; LEFEUVRE, Pierre. RDP3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 26, n. 19, p. 2462–2463, 2010. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq467.

MAYTIS, J.; SILVA, D.; OLIVEIRA, A.; COSTA, A. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, [S. l.], v. 1, 1975.

MELGAREJO, T. A.; KON, T.; ROJAS, M. R.; PAZ-CARRASCO, L.; ZERBINI, F. M.; GILBERTSON, R. L. Characterization of a New World Monopartite Begomovirus Causing Leaf Curl Disease of Tomato in Ecuador and Peru Reveals a New Direction in Geminivirus Evolution. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 87, n. 10, p. 5397–5413, 2013. DOI: 10.1128/jvi.00234-13.

MELGAREJO, Tomas A.; KON, Tatsuya; GILBERTSON, Robert L. Molecular and biological characterization of distinct strains of *Jatropha mosaic virus* from the Dominican Republic reveal a potential to infect crop plants. **Phytopathology**, [S. l.], v. 105, n. 1, p. 141–153, 2015. DOI: 10.1094/PHYTO-05-14-0135-R.

MONCI, Francisco; SÁNCHEZ-CAMPOS, Sonia; NAVAS-CASTILLO, Jesús; MORIONES, Enrique. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. **Virology**, [S. l.], v. 303, n. 2, p. 317–326, 2002. DOI: 10.1006/viro.2002.1633.

MOREIRA, Silvia R.; EIRAS, Marcelo; CHAVES, Alexandre L. R.; GALLETI, Silvia R.; COLARICCIO, Addolorata. Caracterização de uma nova estirpe do *Tomato mosaic virus* isolada de tomateiro no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, [S. l.], v. 28, n. 6, p. 602–607, 2003. DOI: 10.1590/S0100-41582003000600004.

MORILLA, Gabriel; JESKE, Holger; BEJARANO, Eduardo R.; WEGE, Christina. Tête à Tête of *Tomato yellow leaf curl virus* and *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* in Single Nuclei. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 78, n. 19, p. 10715–10723, 2004. DOI: 10.1128/JVI.78.19.10715.

MUHIRE, Brejnev Muhizi; VARSANI, Arvind; MARTIN, Darren Patrick. SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0108277.

NAKHLA, M. K.; SORENSEN, A.; MEJIA, L.; RAMIREZ, P.; KARKASHIAN, J. P.; MAXWELL, D. P. Molecular characterization of tomato-infecting begomoviruses in Central America and development of DNA-based detection methods. **Acta Horti**, [S. l.], v. 695, p. 277–288, 2005. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.31>.

NOUEIRY, Amine O.; LUCAS, William J.; GILBERTSON, Robert L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, [S. l.], v. 76, n. 5, p. 925–932, 1994. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90366-2.

OROZCO, Beverly M.; MILLER, Ann B.; SETTLAGE, Sharon B.; HANLEY-BOWDOIN, Linda. Functional domains of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 272, n. 15, p. 9840–9846, 1997. DOI: 10.1074/jbc.272.15.9840.

OROZCO, Beverly M.; HANLEY-BOWDOIN, Linda. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 273, n. 38, p. 24448–24456, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.38.24448.

PALMER, Kenneth E.; RYBICKI, Edward P. The molecular biology of mastreviruses. **Advances in Virus Research**, [S. l.], v. 50, p. 183–234, 1998.

PAPROTKA, T.; METZLER, V.; JESKE, H. The first DNA 1-like  $\alpha$  satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. **Virology**, [S. l.], v. 404, n. 2, p. 148–157, 2010. DOI: 10.1016/j.virol.2010.05.003.

PEDERSEN, Thomas J.; HANLEY-BOWDOIN, Linda. Molecular Characterization of the AL3 Protein encoded by a bipartite geminivirus. **Viro**, [S. l.], v. 202, p. 1070–1075, 1994.

PERALTA, Iris E.; KNAPP, Sandra; SPOONER, David M. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. **Tomato Genetics Cooperative Report**, [S. l.], v. 56, p. 6–12, 2006.

PEREIRA-CARVALHO, R. C.; BOITEUX, L. S.; FONSECA, M. E. N.; DÍAZ-PENDÓN, J. A.; MORIONES, E.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; CHARCHAR, J. M.; RESENDE, R. O. Multiple resistance to *Meloidogyne* spp. and to bipartite and monopartite *Begomovirus* spp. in wild *Solanum* (*Lycopersicon*) accessions. **Plant Disease**, [S. l.], v. 94, n. 2, p. 179–185, 2010. DOI: 10.1094/PDIS-94-2-0179.

PEREIRA-CARVALHO, Rita De Cássia; TOBAR, Leidy Lorena Mendoza; DIANESE, Érico de Campos; FONSECA, Maria Esther de Noronha; BOITEUX, Leonardo Silva. Melhoramento Genético Do Tomateiro Para Resistência a Doenças de Etiologia Viral : Avanços e Perspectivas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, [S. l.], v. 22, p. 280–361, 2014.

PINHEIRO, Jadir Borges; PERREIRA, Ricaardo Borges; SUINAGA, Fabio Akiyoshi. Manejo de nematoides na cultura do tomate. **Embrapa Hortaliças**, [S. l.], p. 01–12, ISSN 1415-3033, 2014.

PITA, J. S.; FONDONG, V. N.; SANGARE, A.; OGWAL, S.; FAUQUET, C. M. Recombination , pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. **Journal of General Virology**, [S. l.], v. 82, p. 655–665, 2001.

PRADHAN, Bhubaneswar; TIEN, Vu Van; DEY, Nrisingha; MUKHERJEE, Sunil Kumar. Molecular Biology of Geminivirus DNA Replication. In: **Viral Replication**. [s.l.] : Avid Science, 2017. p. 2–35.

PREISS, W.; JESKE, H. Multitasking in Replication Is Common among Geminiviruses. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 77, n. 5, p. 2972–2980, 2003. DOI: 10.1128/jvi.77.5.2972-2980.2003.

QUEIROZ, Paulo Roberto; MARTINS, Erica Soares; GUIMARÃES, Maria de Nazaré; Klatau; LIMA, Luzia; PRAÇA, Lilian; MONNERAT, Rose Gomes. Identification of the B, Q, and native Brazilian biotypes of the *Bemisia tabaci* species complex using scar markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S. l.], v. 51, n. 5, p. 555–562, 2016. DOI: 10.1590/S0100-204X2016000500016.

REIS-FILHO, José de Souza; MARIN, José Orlando Bevilaqua; FERNANDES, Paulo Marçal. Os agrotóxicos na produção de tomate de mesa na região de Goianópolis, Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 307–316, 2009.

REGO-MACHADO, Camila M.; NAKASU, Erich Y. T.; BLAWID, Rosana; NAGATA, Tatsuya; INOUE-NAGATA, Alice K. Complete genome sequence of a new bipartite

begomovirus infecting tomato in Brazil. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 164, n. 11, p. 2873–2875, 2019. DOI: 10.1007/s00705-019-04380-0.

RIBEIRO, S. G.; INOUE-NAGATA, A. K.; DANIELS, J.; DE ÁVILA, A. C. Potato deforming mosaic disease is caused by an isolate of *Tomato yellow vein streak virus*. **Plant Pathology**, [S. l.], v. 55, n. 4, p. 569, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2006.01432.x.

ROCHA, Kelly C. G. et al. Evaluation of resistance to *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) in *Capsicum* spp. genotypes. **Tropical Plant Pathology**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 314–318, 2012. DOI: 10.1590/s1982-56762012000500002.

RODRIGUES, Edson T.; LEAL, Paulo AM; COSTA, Edilson; PAULA, Thiago S. de; GOMES, Viviane do A. Produção de mudas de tomateiro em diferentes substratos e recipientes em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, [S. l.], v. 28, p. 483–488, 2010. DOI: 10.1590/S0102-05362010000400018.

RONQUIST, Fredrik et al. Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012. DOI: 10.1093/sysbio/sys029.

ROJAS, Maria R.; JIANG, Hao; SALATI, Raquel; XOCONOSTLE-CÁZARES, Beatriz; SUDARSHANA, M. R.; LUCAS, William J.; GILBERTSON, Robert L. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, *Tomato yellow leaf curl virus*. **Virology**, [S. l.], v. 291, n. 1, p. 110–125, 2001. DOI: 10.1006/viro.2001.1194.

ROJAS, Maria R.; HAGEN, Charles; LUCAS, William J.; GILBERTSON, Robert L. Exploiting Chinks in the Plant's Armor: Evolution and Emergence of Geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 361–394, 2005. DOI: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135939.

ROJAS, Maria R. et al. World Management of Geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, [S. l.], v. 56, p. 637–677, 2018. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080615-100327.

ROMAY, G.; CHIRINOS, D.; GERAUD-POUEY, F.; DESBIEZ, C. Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 155, n. 11, p. 1843–1847, 2010. DOI: 10.1007/s00705-010-0760-7.

SANDERFOOT, Anton A.; LAZAROWITZ, Sondra C. Getting it together in plant virus movement: Cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. **Trends in Cell Biology**, [S. l.], v. 6, n. 9, p. 353–358, 1996. DOI: 10.1016/0962-8924(96)10031-3.

SAUNDERS, Keith; BEDFORD, I. D.; BRIDDON, R. W.; MARKHAM, P. G.; WONG, S. M.; STANLEY, J. A unique virus complex causes *Ageratum* yellow vein disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 97, n. 12, p. 6890–6895, 2000. DOI: 10.1073/pnas.97.12.6890.

SCHIRO, Gabriele; VERCH, Gernot; GRIMM, Volker; MÜLLER, Marina E. H. *Alternaria* and *fusarium* fungi: Differences in distribution and spore deposition in a topographically heterogeneous wheat field. **Journal of Fungi**, [S. l.], v. 4, n. 2, 2018. DOI:

10.3390/jof4020063.

SEAL, S. E.; VANDENBOSCH, F.; JEGER, M. J. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 23–46, 2006. DOI: 10.1080/07352680500365257.

SHAMI, Najua Juma Ismail Esh; MOREIRA, Emilia Addison Machado. Licopeno como agente antioxidante Lycopene as an antioxidant agent. **Revista de Nutrição**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 227–236, 2004. DOI: 10.1007/BF00351976.

SILVA, Fábio N.; LIMA, Alison T.; ROCHA, Carolina S.; CASTILLO-URQUIZA, Gloria P.; ALVES-JÚNIOR, Miguel; ZERBINI, F. Murilo. Recombination and pseudorecombination driving the evolution of the begomoviruses *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) and *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV): Two recombinant DNA-A components sharing the same DNA-B. **Virology Journal**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–11, 2014. DOI: 10.1186/1743-422X-11-66.

SPOONER, David M.; PERALTA, Iris E.; KNAPP, Sandra. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum L.* section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. **Taxon**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 43–61, 2005. DOI: 10.2307/25065301.

STANLEY, John. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. **Virology**, [S. l.], v. 206, n. 1, p. 707–712, 1995. DOI: 10.1016/S0042-6822(95)80093-X.

STENGER, Drake C.; REVINGTON, Gwen N.; STEVENSON, Matthew C.; BISARO, David M. Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: Evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 88, n. 18, p. 8029–8033, 1991. DOI: 10.1073/pnas.88.18.8029.

SUSI, Hanna et al. Genome sequences of a capulavirus infecting *Plantago lanceolata* in the Åland archipelago of Finland. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 162, n. 7, p. 2041–2045, 2017. DOI: 10.1007/s00705-017-3298-0.

TIMCHENKO, Tatiana; KATUL, Lina; SANO, Yoshitaka; KOUCHKOVSKY, Françoise de; VETTEN, Heinrich Josef; GRONENBORN, Bruno. The master rep concept in nanovirus replication: Identification of missing genome components and potential for natural genetic reassortment. **Virology**, [S. l.], v. 274, n. 1, p. 189–195, 2000. DOI: 10.1006/viro.2000.0439.

TORRE, Covadonga; DONAIRE, Livia; GÓMEZ-AIX, Cristina; JUÁREZ, Miguel; PETERSCHMITT, Michel; URBINO, Cica; HERNANDO, Yolanda; AGÜERO, Jesús; ARANDA, Miguel A. Characterization of begomoviruses sampled during severe epidemics in tomato cultivars carrying the *Ty-1* gene. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, p. 1–22, 2018. DOI: 10.3390/ijms19092614.

VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J. S.; FAUQUET, C. M. Differential Roles of AC2 and AC4 of Cassava Geminiviruses in Mediating Synergism and Suppression of Posttranscriptional Gene Silencing. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 78, n. 17, p. 9487–9498,

2004. DOI: 10.1128/jvi.78.17.9487-9498.2004.

VARSANI, Arvind; NAVAS-CASTILLO, Jesús; MORIONES, Enrique; HERNÁNDEZ-ZEPEDA, Cecilia; IDRIS, Ali; BROWN, Judith K.; MURILO ZERBINI, F.; MARTIN, Darren P. Establishment of three new genera in the family *Geminiviridae*: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 159, n. 8, p. 2193–2203, 2014. DOI: 10.1007/s00705-014-2050-2.

VARSANI, Arvind et al. Capulavirus and Grablovirus: two new genera in the family Geminiviridae. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 162, n. 6, p. 1819–1831, 2017. DOI: 10.1007/s00705-017-3268-6.

VARSANI, Arvind; LEFEUVRE, Pierre; ROUMAGNAC, Philippe; MARTIN, Darren. Notes on recombination and reassortment in multipartite/segmented viruses. **Current Opinion in Virology**, [S. l.], v. 33, n. September, p. 156–166, 2018. DOI: 10.1016/j.coviro.2018.08.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.08.013>.

VERLAAN, Maarten G.; SZINAY, Dóra; HUTTON, Samuel F.; DE JONG, Hans; KORMELINK, Richard; VISSER, Richard G. F.; SCOTT, John W.; BAI, Yuling. Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping and breeding of the TYLCV resistance gene *Ty-1*. **Plant Journal**, [S. l.], v. 68, n. 6, p. 1093–1103, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04762.x.

VERLAAN, Maarten G.; HUTTON, Samuel F.; IBRAHEM, Ragy M.; KORMELINK, Richard; VISSER, Richard G. F.; SCOTT, John W.; EDWARDS, Jeremy D.; BAI, Yuling. The *Tomato yellow leaf curl virus* Resistance Genes *Ty-1* and *Ty-3* Are Allelic and Code for DFDGD-Class RNA-Dependent RNA Polymerases. **PLoS Genetics**, [S. l.], v. 9, n. 3, 2013. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003399.

VOINNET, O.; PINTO, Y. M.; BAULCOMBE, D. C. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 96, n. 24, p. 14147–14152, 1999. DOI: 10.1073/pnas.96.24.14147.

VOORBURG, Corien M.; YAN, Zhe; BERGUA-VIDAL, Maria; WOLTERS, Anne-Marie A.; BAI, Yuling; KORMELINK, Richard. *Ty-1*, a universal resistance gene against geminiviruses that is compromised by co-replication of a betasatellite. **Molecular Plant Pathology**, [S. l.], p. 1–6, 2019. DOI: 10.1111/mpp.12885.

WALIA, Abhishek; MEHTA, Preeti; CHAUHAN, Anjali; SHIRKOT, C. K. Effect of *Bacillus subtilis* strain CKT1 as Inoculum on Growth of Tomato Seedlings Under Net House Conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1007/s40011-013-0189-3.

WHITFIELD, Anna E.; FALK, Bryce W.; ROTENBERG, Dorith. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. **Virology**, [S. l.], v. 479–480, p. 278–289, 2015. DOI: 10.1016/j.virol.2015.03.026.

YAN, Zhe; PÉREZ-DE-CASTRO, Ana; DÍEZ, Maria J.; HUTTON, Samuel F.; VISSER, Richard G. F.; WOLTERS, Anne Marie A.; BAI, Yuling; LI, Junming. Resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato germplasm. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 9, p. 1–14,

2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.01198.

YULIAR; Yanetri Asi Nion; TOYOTA, Koki. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. **Microbes and Environments**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 1–11, 2015. DOI: 10.1264/jsme2.ME14144.

ZAMIR, D. et al. Mapping and introgression of a *Tomato yellow leaf curl virus* tolerance gene, *Ty-1*. **Theoretical and Applied Genetics**, [S. l.], v. 88, n. 2, p. 141–146, 1994. DOI: 10.1007/BF00225889.

ZERBINI, F. Murilo; BRIDDON, Rob W.; IDRIS, Ali; MARTIN, Darren P.; MORIONES, Enrique; NAVAS-CASTILLO, Jesús; RIVERA-BUSTAMANTE, Rafael; VARSANI, Arvind. ICTV virus taxonomy profile: Geminiviridae. **Journal of General Virology**, [S. l.], v. 98, n. 2, p. 131–133, 2017. DOI: 10.1099/jgv.0.000738.

ZHOU, Xueping. Advances in Understanding Begomovirus Satellites. **Annual Review of Phytopathology**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 357–381, 2013. DOI: 10.1146/annurev-phyto-082712-102234.

## ANEXOS

### ANEXO A – TABELAS REFERENTES À PRODUÇÃO, ÁREA PLANTADA E COLHIDA DE TOMATE NO BRASIL E NO MUNDO

**Tabela 10.** Produção de tomate no mundo e nos principais países produtores (produção em toneladas) de 2010 a 2017

País/ano	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Brasil	4.106.846	4.416.652	3.873.985	4.187.646	4.302.777	4.187.729	4.167.629	4.230.150
China	46.876.084	49.323.221	48.168.616	50.694.136	52.613.996	55.891.807	57.582.954	59.626.900
Egito	8.544.993	8.105.263	8.625.219	8.290.551	8.288.043	7.737.827	7.320.714	7.297.108
Espanha	4.312.709	3.864.120	4.046.400	3.776.800	4.888.880	4.832.700	5.233.542	5.163.466
Estados Unidos	14.053.000	13.761.700	14.478.750	13.828.580	15.875.000	14580440	12.936.420	10.910.990
Índia	12.433.200	16.526.000	18.653.000	18.227.000	18.735.910	16.385.000	18.732.000	20.708.000
Irã	5.696.111	5.642.550	5.566.962	5.757.447	6.362.902	6.013.142	5.828.557	6.177.290
Itália	6.024.800	5.950.215	5.592.302	5.321.249	5.624.245	6.410.249	6.437.572	6.015.868
México	2.997.641	2.435.788	3.433.567	3.282.583	3.536.305	3.782.314	4.047.171	4.243.058
Turquia	10.052.000	11.003.433	11.350.000	11.820.000	11.850.000	12.615.000	12.600.000	12.750.000
Mundo	153.305.465	159.515.827	163.181.128	165.295.864	174.861.783	177.501.042	179.508.401	182.301.395

Fonte: FAO, 2019.

**Tabela 11.** Área plantada (hectares) de tomate no Brasil de 2010 a 2018

País/ano	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Brasil	68.086	71.703	64.782	62.782	64.471	63.626	64.281	61.640	59.738

Fonte: IBGE, 2019a.

**Tabela 12.** Área colhida (hectares) de tomate no Brasil de 2010 – 2018

País/ano	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Brasil	67.892	71.473	63.859	62.687	64.363	63.572	63.980	61.534	59.726

Fonte: IBGE, 2019a.

**Tabela 13.** Quantidade produzida (toneladas) de tomate no Brasil de 2010 a 2018

País/ano	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Brasil	4.106.846	4.416.652	3.873.985	4.187.646	4.302.777	4.187.729	4.167.629	4.230.150	4.084.910

Fonte: IBGE, 2019a.

**Tabela 14.** Área colhida (hectares) de tomate nas regiões e estados brasileiros de 2010 – 2018

Regiões	2.010	2.011	2.012	2.013	2.014	2.015	2.016	2.017	2.018
<b>Norte</b>	<b>1.295</b>	<b>1.306</b>	<b>3.160</b>	<b>1.106</b>	<b>952</b>	<b>784</b>	<b>693</b>	<b>507</b>	<b>563</b>
Acre	2	4	2	–	–	–	–	–	–
Amapá	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Amazonas	122	110	91	76	42	20	13	6	–
Pará	435	465	412	370	347	360	254	242	237
Rondônia									62
Roraima	439	439	307	426	296	250	246	121	264
Tocantins	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>Nordeste</b>	<b>14.588</b>	<b>14.749</b>	<b>10.855</b>	<b>10.591</b>	<b>13.578</b>	<b>12.896</b>	<b>12.117</b>	<b>10.222</b>	<b>11.778</b>
Alagoas	61	66	56	58	68	72	109	105	152
Bahia	7.332	8.109	4.405	4.223	6.447	7.103	7.096	5.056	6.740
Ceará	2.278	2.239	2.309	2.788	2.230	2.198	2.532	2.575	2.395
Maranhão	259	228	197	216	210	217	189	197	205
Paraíba	793	697	460	450	403	439	287	380	605
Pernambuco	3.192	2.637	2.844	2.406	3.731	2.527	1.602	1.631	1.337
Piauí	156	144	167	166	161	141	132	141	176
Rio Grande do Norte	226	356	153	129	230	123	148	137	168
Sergipe	291	273	264	155	98	76	22	–	–
<b>Sudeste</b>	<b>22.905</b>	<b>24.944</b>	<b>24.938</b>	<b>24.633</b>	<b>27.297</b>	<b>29.755</b>	<b>30.076</b>	<b>24.746</b>	<b>23.505</b>

Espírito Santo	1.886	1.918	1.983	2.024	2.605	2.503	2.510	2.532	2.629
Minas Gerais	7.735	7.362	6.878	8.151	9.293	9.758	10.303	7.556	7.259
Rio de Janeiro	2.677	2.580	2.617	2.387	2.714	2.529	2.444	2.550	2.402
São Paulo	10.607	13.084	13.460	12.071	12.685	14.965	14.819	12.108	11.215
<b>Sul</b>	<b>10.085</b>	<b>10.932</b>	<b>10.202</b>	<b>9.659</b>	<b>9.504</b>	<b>8.659</b>	<b>8.909</b>	<b>9.131</b>	<b>8.878</b>
Paraná	5.025	5.715	5.585	4.965	4.396	3.746	3.823	4.155	4.190
Rio Grande do Sul	2.364	2.354	2.311	2.304	2.373	2.269	2.317	2.277	1.955
Santa Catarina	2.696	2.863	2.306	2.390	2.735	2.644	2.769	2.699	2.733
<b>Centro-Oeste</b>	<b>19.019</b>	<b>19.542</b>	<b>14.704</b>	<b>16.698</b>	<b>13.032</b>	<b>11.478</b>	<b>12.185</b>	<b>16.928</b>	<b>15.002</b>
Distrito Federal	371	593	412	772	1.011	529	413	328	350
Goiás	18.337	18.679	14.028	15.679	11.720	10.653	11.452	16.307	14.408
Mato Grosso	228	197	207	202	232	227	243	227	184
Mato Grosso do Sul	83	73	57	45	69	69	77	66	60

Fonte: IBGE, 2019a.

**Tabela 15.** Produção (toneladas) de tomate nas regiões e estados brasileiros de 2010 – 2018

<b>Regiões</b>	<b>2.010</b>	<b>2.011</b>	<b>2.012</b>	<b>2.013</b>	<b>2.014</b>	<b>2.015</b>	<b>2.016</b>	<b>2.017</b>	<b>2.018</b>
<b>Norte</b>	<b>21.688</b>	<b>23.588</b>	<b>58.494</b>	<b>19.774</b>	<b>18.066</b>	<b>16.173</b>	<b>13.527</b>	<b>12.931</b>	<b>12.551</b>
Acre	50	77	23	–	–	–	–	–	–
Amapá	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Amazonas	1.782	1.640	1.430	1.231	601	249	162	55	–
Pará	10.686	12.621	10.007	9.055	8.700	9.315	6.580	6.240	6.322
Rondônia	3.902	3.982	43.350	4.442	4.986	2.542	2.766	4.868	1.540
Roraima	5.268	5.268	3.684	5.046	3.779	4.067	4.019	1.768	4.689
Tocantins	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>Nordeste</b>	<b>604.409</b>	<b>622.215</b>	<b>421.258</b>	<b>454.473</b>	<b>566.027</b>	<b>543.483</b>	<b>538.566</b>	<b>499.763</b>	<b>473.321</b>
Alagoas	3.944	4.374	4.570	4.572	5.032	5.380	7.168	6.641	9.041
Bahia	302.783	341.008	179.707	201.842	288.477	323.660	335.044	286.936	230.800
Ceará	114.564	114.583	106.489	128.499	113.724	95.128	122.846	120.397	134.856
Maranhão	5.712	4.739	3.961	4.272	4.199	4.330	3.671	4.005	4.482
Paraíba	26.125	23.102	12.771	13.378	14.155	13.045	8.955	10.536	17.898
Pernambuco	135.508	115.123	100.441	91.619	128.881	93.718	53.331	64.330	63.346
Piauí	4.110	3.801	4.478	3.963	3.320	3.120	2.498	3.150	7.936
Rio Grande do Norte	7.062	11.172	4.535	3.732	6.606	3.828	4.696	3.768	4.962
Sergipe	4.601	4.313	4.306	2.596	1.633	1.274	357	–	–
<b>Sudeste</b>	<b>1.472.499</b>	<b>1.633.135</b>	<b>1.601.052</b>	<b>1.777.783</b>	<b>2.027.675</b>	<b>2.144.550</b>	<b>2.135.075</b>	<b>1.842.968</b>	<b>1.689.558</b>
Espírito Santo	127.478	134.387	136.435	146.495	188.420	144.834	152.024	164.781	175.583
Minas Gerais	492.323	476.113	444.615	563.325	674.962	715.890	702.510	572.273	535.906
Rio de Janeiro	204.905	195.535	195.665	182.069	207.424	185.889	179.205	175.751	166.969
São Paulo	647.793	827.100	824.337	885.894	956.869	1.097.937	1.101.336	930.163	811.100
<b>Sul</b>	<b>603.325</b>	<b>641.884</b>	<b>599.087</b>	<b>563.499</b>	<b>555.020</b>	<b>522.168</b>	<b>501.908</b>	<b>541.982</b>	<b>540.466</b>

Paraná	312.319	347.528	338.488	285.176	253.362	230.319	217.070	252.073	247.083
Rio Grande do Sul	104.062	106.456	107.585	112.196	117.176	111.363	112.563	116.742	98.605
Santa Catarina	186.944	187.900	153.014	166.127	184.482	180.486	172.275	173.167	194.778
<b>Centro-Oeste</b>	<b>1.404.925</b>	<b>1.495.830</b>	<b>1.194.094</b>	<b>1.372.117</b>	<b>1.135.989</b>	<b>961.355</b>	<b>978.553</b>	<b>1.332.506</b>	<b>1.369.014</b>
Distrito Federal	26.054	47.907	29.864	48.254	68.435	36.691	31.553	26.200	28.000
Goiás	1.369.822	1.440.961	1.157.078	1.317.607	1.055.337	912.976	934.658	1.298.088	1.334.500
Mato Grosso	4.410	3.655	4.397	4.597	9.426	9.268	9.637	5.498	3.931
Mato Grosso do Sul	4.639	3.307	2.755	1.659	2.791	2.420	2.705	2.720	2.583

Fonte: IBGE, 2019a.

**Tabela 16.** Produção (toneladas) de tomate nas principais cidades de Goiás de 2010 – 2017

<b>Cidades</b>	<b>2.010</b>	<b>2.011</b>	<b>2.012</b>	<b>2.013</b>	<b>2.014</b>	<b>2.015</b>	<b>2.016</b>	<b>2.017</b>
Cristalina (GO)	245.000	233.250	256.800	485.000	333.000	301.000	224.000	288.000
Morrinhos (GO)	199.800	231.250	102.000	113.100	125.500	112.160	167.940	269.000
Itaberaí (GO)	108.750	90.250	85.290	100.000	230.300	119.260	130.180	257.785
Vianópolis (GO)	29.750	94.000	65.500	99.000	46.000	66.500	66.500	70.000
Piracanjuba (GO)	67.500	71.000	19.320	9.750	25.040	40.000	64.000	95.000
Silvânia (GO)	25.200	71.500	53.045	53.125	28.500	44.444	31.925	49.050
Goianésia (GO)	29.325	36.000	36.000	16.830	18.100	19.110	19.110	18.655
Orizona (GO)	22.400	17.050	24.700	38.655	9.500	9.500	9.500	30.000
Corumbá de Goiás (GO)	4.500	14.180	15.250	9.130	9.900	8.500	7.290	8.150
Goianópolis (GO)	3.600	3.600	9.600	8.433	9.000	7.380	14.800	15.250

Fonte: IBGE, 2019b