



**Universidade de Brasília**

**Universidade de Brasília – UnB**

**Instituto de Ciências Biológicas – IB**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana**

**Diversidade espaço-temporal de espécies de *Begomovirus* em regiões produtoras de tomateiro no Bioma Mata Atlântica**

Macária Ferreira Duarte

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

Co-orientador: Dr. Leonardo Silva Boiteux

*Dissertação de Mestrado*

Brasília–DF, março/2019.

**Macária Ferreira Duarte**

**Diversidade espaço-temporal de espécies de *Begomovirus* em regiões  
produtoras de tomateiro no Bioma Mata Atlântica**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação da  
Universidade de Brasília como  
parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em  
Biologia Microbiana.

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

Co-orientador: Dr. Leonardo Silva Boiteux

Brasília–DF, março/2019.



Macária Ferreira Duarte

**Diversidade espaço-temporal de espécies de *Begomovirus* em regiões produtoras de  
tomateiro no Bioma Mata Atlântica**

Dissertação de Mestrado

Banca Examinadora:

---

Dr<sup>a</sup>. Maria Esther de Noronha Fonseca

Embrapa Hortaliças - CNPH

Membro externo

---

Dr<sup>a</sup>. Mirtes Freitas Lima

Embrapa Hortaliças - CNPH

Membro externo

---

Dr. Helson Mario Martins do Vale

Departamento de Biologia Microbiana - Universidade de Brasília – UnB

Suplente

---

Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Pereira-Carvalho

Departamento de Biologia Microbiana - Universidade de Brasília – UnB

Orientadora

Brasília–DF, março/2019.

*A minha mãe, pelo amor,  
apoio e incentivo de sempre, **dedico.***

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Pereira-Carvalho, por todos os ensinamentos, otimismo, atenção, incentivo, paciência e confiança que me permitiram chegar até aqui.

Ao meu co-orientador, Dr<sup>o</sup>. Leonardo Silva Boiteux, pelos ensinamento, apoio e entusiasmo inspirador.

Ao Dr<sup>o</sup>. Fernando Lucas Melo, pela contribuição para a realização desse trabalho e pela paciência e disponibilidade.

Aos técnicos dos Laboratórios de Genômica e de Melhoramento Genético da Embrapa Hortaliças, Willian, Getúlio e em especial ao Francisco Costa (Chico) por toda a disponibilidade.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Fitopatologia da UnB, Luciane, Josiane, Fernanda, Felipe, Ângela, Flávia e Ikaró, por sempre estarem a disposição para ajudar e por tornar o ambiente de trabalho mais agradável e divertido.

Aos meus queridos amigos Fernanda Marins, Larissa, Stêfania, Ísis, Stephanie, Fernanda Araújo, Ritane, Iolanda, Lays, Nayana, Tiago pelo incentivo, apoio, torcida e momentos de descontração.

Aos meus pais, Aparecida e Ideodato, meus irmãos, Kaliana, Carlos e Gustavo, pela compreensão, auxílio, conforto nos momentos difíceis e apoio na conquista dos meus objetivos. Obrigada!

Aos professores da UnB por dividirem conhecimentos inestimáveis que carregarei por toda a vida. Aos técnicos e funcionários, especialmente a Luciana Medeiros.

À Embrapa Hortaliças, pela infraestrutura fornecida para a execução dos experimentos.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção dispensada.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida.”

Carl Sagan

# Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	IX
LISTA DE TABELAS .....	XI
RESUMO .....	XII
ABSTRACT .....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
<b>2.1 A CULTURA DO TOMATE .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 PRINCIPAIS VIROSES AFETANDO O CULTIVO DO TOMATEIRO NO BRASIL .....</b>	<b>4</b>
<b>2.3 FAMÍLIA <i>GEMINIVIRIDAE</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>2.4 O GÊNERO <i>BEGOMOVIRUS</i> .....</b>	<b>11</b>
2.4.1 GENOMA DOS <i>BEGOMOVIRUS</i> .....	12
2.4.2 REPLICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>BEGOMOVIRUS</i> .....	16
2.4.3 VARIABILIDADE GENÉTICA E EVOLUÇÃO DOS <i>BEGOMOVIRUS</i> .....	18
<b>2.5 ESPÉCIES DE <i>BEGOMOVIRUS</i> QUE INFECTAM TOMATEIRO NO BRASIL .....</b>	<b>19</b>
2.5.1 <i>TOMATO COMMON MOSAIC VIRUS</i> – TOCMMV .....	19
2.5.1 <i>TOMATO SEVERE RUGOSE VIRUS</i> – TOSRV .....	20
<b>2.6 O GENE DE RESISTÊNCIA A <i>BEGOMOVIRUS TY-1</i> .....</b>	<b>20</b>
3. OBJETIVOS .....	22
<b>3.1 OBJETIVOS GERAIS:.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....</b>	<b>22</b>
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	23
<b>4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2 DETECÇÃO E PRÉ-CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS POSITIVOS PARA <i>BEGOMOVÍRUS</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>4.3 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE DE RESISTÊNCIA <i>TY-1</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>4.4 AMPLIFICAÇÃO DO COMPONENTE DNA-A VIA PCR UTILIZANDO <i>PRIMERS</i> UNIVERSAIS.....</b>	<b>25</b>
<b>4.5 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....</b>	<b>26</b>
<b>4.6 DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS PARA OBTENÇÃO DO COMPONENTE DNA-A COMPLETO .....</b>	<b>27</b>
<b>4.7 PREPARO DO BANCO DE DADOS PARA AS ANÁLISES .....</b>	<b>30</b>

<b>4.8 ANÁLISES DE FILOGEOGRÁFIA</b> .....	<b>32</b>
<b>5. RESULTADOS &amp; DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>5.1 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE/LOCUS DE RESISTÊNCIA <i>Ty-1</i> EM ASSOCIAÇÃO COM OS DIFERENTES ISOLADOS VIRAIS</b> .....	<b>33</b>
<b>5.2 VARIABILIDADE DOS ISOLADOS PRÉ-CARACTERIZADOS</b> .....	<b>35</b>
<b>5.3 SEQUÊNCIAS COMPLETAS DO COMPONENTE DNA-A QUE FORAM RECUPERADAS NO PRESENTE ESTUDO</b> .....	<b>37</b>
<b>5.4 ANÁLISES DE FILOGEOGRÁFIA</b> .....	<b>41</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>51</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>63</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>63</b>
<b>ANEXO 2</b> .....	<b>69</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Dados de produção (toneladas) de tomate nas cinco regiões do Brasil no ano de 2017. Fonte: IBGE (2018) .....03

**Figura 2:** Organização genômica dos membros da família *Geminiviridae*. LIR: região intergênica longa, SIR: região intergênica curta, CR: região comum, cp (V1): proteína capsidial, mp (V2): proteína de movimento, reg (V3): gene regulador, rep/repA (C1/C1:C2): proteína associada a replicação, ren (C3): proteína potencializadora de replicação, trap/ss (C2): proteína de transcrição/supressor de silenciamento gênico, ds: determinante de sintomas (extraída e modificada de VARSANI et al., 2017) .....09

**Figura 3:** Organização genômica dos begomovírus LIR: região intergênica longa, SIR: região intergênica curta, CR: região comum, nsp (BV1): proteína de movimento nuclear, cp (V1/AV1): proteína capsidial, mp (V2/BC2): proteína de movimento, rep (C1): proteína associada a replicação, ren (C3/AC3): proteína potencializadora de replicação, trap (C2/AC2): proteína de transcrição/supressor de silenciamento gênico (modificada de VARSANI et al., 2017) .....14

**Figura 4:** Plantas de tomate com sintomas característicos de infecção por begomovírus. A: mosaico e deformação foliar. B: rugosidade, desvio de cor e epinastia. C e D: amarelecimento internerval. Fonte: Leonardo Boiteux e Leonardo Giordano.....23

**Figura 5:** Diagrama do componente DNA-A de um begomovírus de genoma bipartido. As barras em cor laranja no interior do genoma representam as regiões amplificadas por quatro pares de iniciadores universais: PALv1978/PARc496 (Rojas et al., 1993); BegoAFor1/BegoARev1 (Ha et al., 2006) e mais três pares de iniciadores (4AF/12AR, 13AF/13AR e 14AF/14AR) desenvolvidos e validados por M.E.N. Fonseca et al. (dados não publicados).....26

**Figura 6:** Diagrama das posições dos *primers* desenhados para amplificar o componente DNA-A da espécie *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV). .....28

**Figura 7:** Diagrama das posições dos *primers* desenhados para amplificar o componente DNA-A da espécie *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). .....29

**Figura 8:** Perfil de fragmentos de DNA dos produtos de PCR obtidos com os *primers* 'UWTy1F/ UWTy1R' e clivados com a enzima de restrição *Taq-1* em gel de agarose 1,5%. **Ty1** = Controle para indivíduos homocigotos resistentes (*Ty-1/Ty-1*); **Ohio** = cultivar de tomate usada como controle para indivíduos homocigotos suscetíveis (*ty-1/ty-1*); **TyH** = controle para indivíduos heterocigotos contendo as duas variantes alélicas do gene (*Ty-1/ty-1*). **R** = indivíduos homocigotos resistentes (320 pb e 150 pb); **S**= indivíduos homocigotos suscetíveis (450 pb) e **H** = indivíduos heterocigotos resistentes

(450 pb, 320 pb e 150 pb). **M** = Marcador molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).  
.....33

**Figura 9:** Dados sobre a avaliação da presença do gene/locus de resistência *Ty-1* em plantas de tomateiro amostradas nos estados do ES (A), MG (B) e RJ (C) .....34

**Figura 10:** Organização genômica do isolado ES-176. A: diagrama dos componentes DNA-A e DNA-B completo; AV1: 756 pb, AC1: 1.059, AC2: 390, AC3: 399, AC4: 264, BV1: 894 e BC1: 882. B: iterons comprovando que os componentes são cognatos. C: distância genética entre os dois componentes .....38

**Figura 11:** Filogeografia de todos os genomas com componentes DNA-A completos da espécie *Tomato common mosaic virus* – ToCmMV disponíveis no Genbank bem como de isolados sequenciados no presente trabalho. Os valores nos ramos indicam os anos.  
.....42

**Figura 12:** Perfil de distribuição da espécie *Tomato common mosaic virus* - ToCmMV, baseado nas análises filogeográficas, gerado no programa SPREAD3. O raio dos círculos em vermelho é determinado conforme o número de linhagens que compartilham o mesmo estado ancestral.....44

**Figura 13:** Filogeografia de todos os genomas da espécie *Tomato severe rugose virus* - ToSRV disponíveis no Genbank e sequenciadas nesse trabalho com componentes DNA-A completos. Os valores nos ramos indicam os anos.....45

**Figura 14:** Perfil de distribuição da espécie *Tomato severe rugose virus* - ToSRV, baseado nas análises filogeográficas, gerado no programa SPREAD3. O raio dos círculos em vermelho é determinado conforme o número de linhagens que compartilham o mesmo estado ancestral.....47

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Gêneros que compõem a família *Geminiviridae* de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, 2018) .....07

**Tabela 2:** *Primers* específicos para recuperação do componente DNA-A completo, das espécies *Tomato severe rugose virus* - ToSRV e *Tomato common mosaic virus* - ToCmMV .....29

**Tabela 3:** Isolados utilizados para montar o banco de dados para as análises de filogeografia com agrupados por cidades.....31

**Tabela 4:** Lista de isolados para os quais foi possível sequenciar o componente DNA-A por completo no presente estudo .....39

## RESUMO

DUARTE, MACÁRIA FERREIRA. Universidade de Brasília, março de 2019. **Diversidade espaço-temporal de espécies de *Begomovirus* em regiões produtoras de tomateiro no Bioma Mata Atlântica.** Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Rita de Cássia Pereira-Carvalho

Espécies virais classificadas na família *Geminiviridae* possuem genoma monopartido ou bipartido composto por DNA circular de fita simples. Estas espécies apresentam uma ampla gama de hospedeiras, podendo infectar plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. *Begomovirus* representa o gênero com o maior número de espécies dentre os nove classificados na família *Geminiviridae*. A ocorrência de um complexo de espécies de *Begomovirus* infectando o tomateiro tem resultado em perdas econômicas significativas em diversas regiões produtoras no Brasil. Até o presente momento, 18 espécies de begomovírus foram descritas infectando tomateiro no país. Levantamentos ao nível nacional têm apontado a espécie *Tomato severe rugose virus* - ToSRV como sendo a predominante infectando tomateiro no país. *Tomato common mosaic virus* - ToCmMV é uma espécie viral de ocorrência endêmica, sendo, até recentemente, o begomovírus predominante em regiões produtoras de tomate dentro do bioma Mata Atlântica (englobando áreas de produção dos Estados do Espírito Santo–ES, Mesorregião da Zona da Mata de Minas Gerais–MG e Rio de Janeiro–RJ). No presente trabalho foram caracterizados isolados coletados em plantas de tomateiro sintomáticas nestas três regiões entre os anos de 2006 e 2018. Os resultados demonstraram que o ToCmMV era a espécie predominante até o ano de 2015. No entanto, a partir do ano de 2016 o ToSRV passou a predominar tanto no ES quanto no RJ. No entanto, na Zona da Mata de Minas Gerais, ToCmMV ainda permanece como o begomovírus predominante. Registros de “superção da resistência” por begomovírus em híbridos contendo o gene/locus *Ty-1* foram reportados nas três regiões e a caracterização desses isolados também foi objeto de estudo no presente trabalho, assim como os fatores associados com estes eventos. Além disso, também foi realizado estudo de filogeografia para um melhor entendimento da dispersão de ToCmMV e ToSRV. Os resultados indicaram que o gene de resistência *Ty-1* influenciou o padrão de diversidade de ToCmMV e ToSRV em algumas regiões. Os estudos de filogeografia indicaram que o ancestral comum mais próximo da espécie

ToCmMV teve como sua provável origem a cidade de Coimbra–MG, enquanto que o ancestral comum mais próximo da espécie ToSRV teve como sua provável origem a cidade de Uberlândia–MG. Foi possível reconstruir um fluxograma de disseminação para o ToCmMV no decorrer dos anos de 1982 a 2015 e para o ToSRV no decorrer dos anos de 1986 a 2018.

PALAVRAS-CHAVE: *Geminiviridae*, *Begomovirus*, *Tomato severe rugose virus*, *Tomato common mosaic virus*.

## ABSTRACT

DUARTE, MACÁRIA FERREIRA. University of Brasília, March 2019. **Spatio-temporal diversity of *Begomovirus* species in tomato-producing regions within the Atlantic Rain Forest Biome.** Advisor: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Pereira-Carvalho

Viral species classified in the *Geminiviridae* family have single-stranded or bipartite single-stranded circular DNA. These species present a wide host range being able to infect both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Begomovirus* represents the largest genus in relation to the number of species among the nine genera classified in the *Geminiviridae* family. The occurrence of a *Begomovirus* species complex infecting the tomatoes has resulted in significant economic losses in several producing regions in Brazil. To date, 18 begomovirus species have been described infecting tomato across the country. Surveys at the national level indicated that *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) is so far the predominant begomovirus infecting tomatoes in the country. *Tomato common mosaic virus* – ToCmMV (a species of endemic occurrence) was, until recently, identified as predominant begomovirus in tomato-producing regions within the Atlantic Rain Forest biome (encompassing production areas of the States of Espírito Santo–ES, Minas Gerais–MG and Rio de Janeiro–RJ). In the present work, studies were carried out aiming to characterize isolates collected in symptomatic tomato plants in these three States between the years 2006 and 2018. The results showed that the ToCmMV was the predominant begomovirus species until the year 2015. However, after this year, ToSRV has been becoming the predominant begomovirus species in both ES and RJ. ToCmMV still predominates in the “Zona da Mata” meso-region of Minas Gerais State. Reports of “resistance breakdown” are occurring in tomato hybrids containing the *Ty-1* gene across all the three regions and the partial characterization of these isolates was also carried out in the present work aiming to understand the potential factors associated with these events. In addition, phylogeography studies were carried out to better understand the dispersion of ToSRV and ToCmMV. The results indicated that the *Ty-1* resistance gene had influence on the pattern of ToSRV and ToCmMV diversity in some Brazilian regions. The phylogeography studies indicated that the closest common ancestor of the ToCmMV species had as its probable origin the city of Coimbra-MG, while the closest common ancestor of the ToSRV species had its probable origin as the city of Uberlândia-MG. It

was also possible to evaluate the dissemination flowchart for ToCmMV during the years 1982 to 2015 and for ToSRV during 1986 to 2018.

**KEYWORDS:** *Geminiviridae, Begomovirus, Tomato severe rugose virus, Tomato common mosaic virus.*

# 1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é umas das hortaliças mais consumidas no Brasil, sendo a região Sudeste a maior produtora com 1.961.047 toneladas (IBGE, 2018). Dentre os vários patógenos que afetam a cultura, destacam-se os vírus, em especial as espécies classificadas no gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*). As espécies virais classificadas em *Begomovirus* que têm causado grandes perdas na produção do tomateiro apresentam DNA fita simples (*single strand* DNA - ssDNA), circulares, com um (monopartidas) ou dois (bipartidas) componentes genômicos. Estas espécies são transmitidas entre plantas dicotiledôneas por espécies de mosca-branca do complexo *Bemisia tabaci* (BROWN et al., 2015).

No Brasil, os begomovírus têm sido relatados em tomateiro desde a década de 1960 (COSTA, 1976). Atualmente, 17 espécies de *Begomovirus* que infectam o tomateiro são reconhecidas pelo International Committee on Taxonomy of Viruses (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus – ICTV): *Tomato bright yellow mosaic virus* – ToBYMV, *Tomato bright yellow mottle virus* – ToBYMoV, *Tomato chlorotic mottle virus* – ToCMoV, *Tomato common mosaic virus* – ToCmMV, *Tomato golden leaf distortion virus* – ToGLDV, *Tomato golden leaf spot virus* – ToGLSV, *Tomato golden mosaic virus* – TGMV, *Tomato golden vein virus* – TGVV, *Tomato interveinal chlorosis virus* – ToICV, *Tomato leaf distortion virus* – ToLDV, *Tomato mild mosaic virus* – ToMMV, *Tomato mottle leaf curl virus* – ToMoLCV, *Tomato rugose mosaic virus* – ToRMV, *Tomato severe rugose virus* – ToSRV, *Tomato yellow spot virus* – ToYSV, *Tomato yellow vein streak virus* – ToYVSV (BROWN et al., 2015), *Tomato rugose yellow leaf curl virus* – TRYLCV (FONSECA et al. 2016, sequência depositada no GenBank – NCBI mas ainda sem dados publicados) e *Tomato leaf curl purple vein virus* – ToLCPVV (MACEDO et al., 2018).

Estratégias de manejo de begomovírus envolvendo o controle do inseto vetor não têm se mostrado efetivas em condições de campo (BOITEUX et al., 2012), demandando o emprego de táticas alternativas. O uso de variedades resistentes a esses vírus tem se mostrado como a estratégia mais eficiente e com maior sustentabilidade. Genes de resistência já foram descritos e introgrididos em cultivares comerciais. Dentre estes, destaca-se o *Ty-1* (ZAMIR et al., 1994). Esse gene de resistência apresentou eficiência que foi inicialmente confirmada contra isolados de *Tomato yellow leaf curl virus* –

TYLCV (ZAMIR et al., 1994). No Brasil, o *Ty-1* tem sido reportado como sendo capaz de também conferir resistência contra diferentes espécies de begomovírus (BOITEUX et al., 2007; BOITEUX et al., 2012; TOBAR, 2013).

ToSRV é a espécie de begomovírus predominante, especialmente no Centro-Sul do país (FERNANDES et al., 2008). O ToCmMV, por sua vez, é um vírus de distribuição endêmica que tem sido relatado exclusivamente nas regiões produtoras localizadas no bioma Mata Atlântica, englobando os estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e a porção oriental de Minas Gerais (BARBOSA et al., 2016; ROCHA et al., 2013).

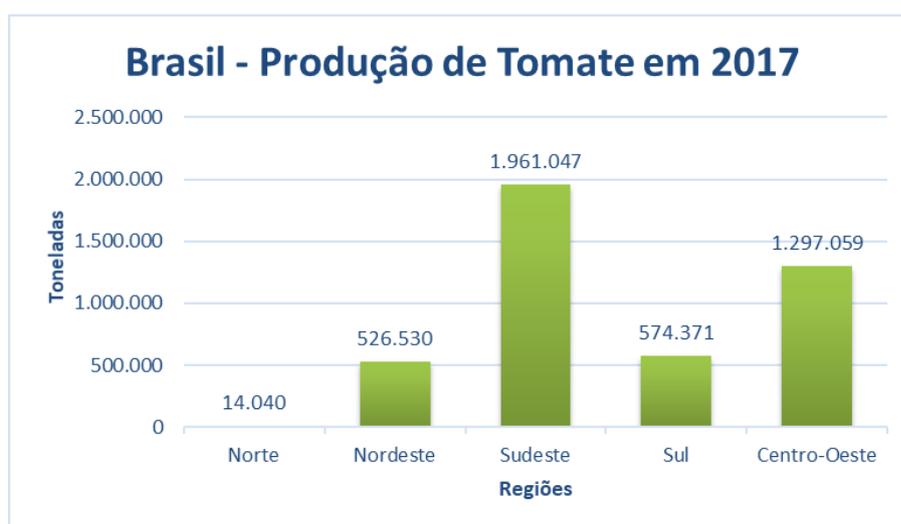
O panorama varietal no cultivo do tomateiro tem sido recentemente modificado com o uso mais intenso de híbridos resistentes aos begomovírus, especialmente aqueles contendo o gene/locus *Ty-1* (BOITEUX et al., 2012). O impacto na diversidade viral resultante da adoção de cultivares resistentes não foi ainda adequadamente avaliado nas regiões produtoras do Espírito Santo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Estudos sobre diversidade de begomovírus em cultivares que apresentam (ou não) fatores de resistência bem como levantamentos sobre a distribuição geográfica e prevalência de espécies são de grande valia. As informações geradas nesses estudos são de grande importância servindo de suporte para programas de melhoramento genético de plantas, elucidando aspectos relativos a dinâmica de populações, processos evolutivos e surgimento de novas espécies virais. Além disso, esses dados podem ser essenciais para produção de novas variedades contendo combinações de genes de resistência capazes de conferir maior estabilidade, durabilidade e eficiência contra essa ampla e variada gama de espécies de begomovírus.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) pertence à família Solanaceae e tem como centro de origem a América do Sul, mais precisamente a região do Andes, que abrange uma vasta área, incluindo Norte do Chile, Peru e Equador. As ilhas equatorianas de Galápagos são também o centro de origem de algumas espécies silvestres de tomate (DARWIN; KNAPP; PERALTA, 2003; PERALTA; KNAPP; SPOONER, 2005). Em meados do século XVI, o tomate foi descoberto pelos espanhóis e introduzido na Europa e, no Brasil, foi reintroduzido no final do século XIX por imigrantes europeus (ALVARENGA, 1976; JENKINS, 1948).

O Brasil ocupa, atualmente, a décima posição no *ranking* mundial de produção de tomate (FAO, 2017). A área plantada com tomate no país em 2017 foi de 64.715 hectares (ha), com a produção total de 4.373.047 toneladas (IBGE, 2018). Em 2017 o Sudeste destacou-se como a maior região produtora de tomate com 1.961.047 toneladas, seguida pelas regiões Centro-Oeste (com 1.297.059 toneladas) e Sul com 574.371 toneladas, conforme ilustrado na **Figura 1** (IBGE, 2018). No Sudeste, os estados de Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ) e Espírito Santo (ES) são importantes produtores de tomate, sendo MG o 3º maior produtor de tomate do país (676.420 toneladas), o RJ o 7º (180.980 toneladas) e o ES o 8º (164.847 toneladas) (IBGE, 2018).



**Figura 1:** Dados de produção (toneladas) de tomate nas cinco regiões do Brasil no ano de 2017. Fonte: IBGE (2018).

O tomateiro é uma das culturas de maior importância econômica no Brasil, sendo uma das hortaliças mais cultivadas em várias regiões do país, durante quase todo o ano, o que torna a cultura suscetível ao ataque de diversos patógenos e pragas. Entre os patógenos que afetam a cultura do tomateiro, um grande destaque é dado às espécies virais, principalmente pelas perdas ocasionadas na cultura e pelas dificuldades inerentes ao controle (COLARICCIO, 2004).

## 2.2 Principais viroses afetando o cultivo do tomateiro no Brasil

Espécies classificadas nos gêneros *Crinivirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Tospovirus* e *Begomovirus* podem causar perdas significativas na produção de tomate. A seguir será feito um breve relato das principais espécies virais descritas infectando tomate no Brasil.

A espécie *Tomato chlorosis virus* – ToCV (gênero *Crinivirus*, família *Closteroviridae*) foi relatada inicialmente em São Paulo no ano de 2008 (BARBOSA et al., 2008), e em 2011, NOGUEIRA et al. (2011) detectaram o vírus no Distrito Federal. Ainda no mesmo ano, BARBOSA et al. (2011a) relataram ToCV nos estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Goiás e Rio de Janeiro. Esta espécie é transmitida por espécies de aleirodídeos. Dentre eles destaca-se o mesmo vetor das espécies de *Begomovirus*, *Bemisia tabaci* (VARGAS-ASENCIO et al., 2013).

A espécie *Potato virus Y* – PVY (gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*) foi responsável por grandes perdas na produção de tomate, porém a partir da introdução de variedades resistentes (LOURENÇÃO et al., 2005), o PVY deixou de ter importância e deu espaço para uma nova espécie, o *Pepper yellow mosaic virus* – PepYMV (gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*), identificada em tomate em 2004 (ÁVILA et al., 2004). Espécies do gênero *Potyvirus* são transmitidos por diferentes espécies de afídeos, com destaque para a espécie *Myzus persicae* (AGEITEC, 2018).

As espécies *Tomato mosaic virus* – ToMV e *Tobacco mosaic virus* – TMV (gênero *Tobamovirus* família *Virgaviridae*) não possuem vetor conhecido, mas apresentam eficiência na transmissão mecânica e podem ser transmitidos também por sementes de tomate (LANFERMEIJER; WARMINK; HILLE, 2005; MOREIRA et al., 2003).

As espécies *Tomato spotted wilt virus* – TSWV, *Tomato chlorotic spot virus* – TCSV,

*Groundnut ringspot virus* – GRSV e *Chrysanthemum stem necrosis virus* – CSNV pertencentes ao gênero *Tospovirus* (família *Peribunyaviridae*) são os quatro representantes do gênero infectando tomate no Brasil (BEZERRA et al., 1999) e são transmitidas por trips (ordem Thysanoptera) (ÁVILA et al., 2004; FONTES, 2017).

O gênero *Begomovirus* está classificado na família *Geminiviridae* e possui 22 espécies que já foram descritas infectando tomateiro no país. Maiores informações sobre a família e os gêneros classificados em *Geminiviridae* serão apresentadas a seguir.

### **2.3 Família *Geminiviridae***

Atualmente 441 espécies virais já foram reconhecidas na família *Geminiviridae*, de acordo com o ICTV. Esta família de vírus de plantas é considerada uma das mais importantes principalmente em países de clima tropical e subtropical, causando problemas em várias culturas economicamente importantes, tais como, tomate, pimentão (*Capsicum annuum*) (LIMA et al., 2001), batata (*S. tuberosum*), soja (*Glycine max*) (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016), mandioca (*Manihot esculenta*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), abóboras (*Cucurbita* spp.), algodão (*Gossypium hirsutum*), quiabo (*Abelmoschus esculentus*), pimentas (*Capsicum* spp.) e batata-doce (*Ipomoea batatas*) (SOUZA et al., 2018).

A família *Geminiviridae* é composta por vírus de partículas geminadas com  $\approx 18$  nm de diâmetro e 30 nm de comprimento, o que caracteriza e dá nome à família. O genoma é de DNA fita simples (ssDNA, single strand DNA), circular, com  $\approx 2,5-3,0$  kb, podendo ser monopartido ou bipartido, sendo que as espécies de genoma bipartido possuem componentes de DNA-A e DNA-B. Estes dois componentes apresentam  $\approx 2.600$  nt não havendo homologia de sequência entre eles, exceto por uma região comum de  $\approx 200$  nucleotídeos (nt), onde encontra-se motivos relacionados à replicação viral (ARGÜELLO-ASTORGA; RUIZ-MEDRANO, 2001; BROWN et al., 2015; ROJAS et al., 2005).

Os membros da família *Geminiviridae* possuem genoma pequeno e como estratégia de replicação utilizam a transcrição bidirecional e sobreposição dos genes para codificar proteínas (ROJAS et al., 2005). Os vírus dessa família codificam até oito genes, que são nomeados de acordo com o sentido viral, que é bidirecional; sendo assim, usa-se **V** para

o sentido viral e C para sentido complementar. No caso de espécies com genoma bipartido, os genes se localizam no componente A ou B do genoma. Dentre os genes codificados, apenas aqueles relacionados à replicação viral e à capa proteica são conservados em toda a família (VARSANI et al., 2014). Atualmente a família *Geminiviridae* é composta por nove gêneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus* (**Tabela 1**). Os critérios para separação dos gêneros na família incluem gama de hospedeiros, inseto vetor, organização genômica e a identidade de pares de sequências de todo o genoma (BROWN et al., 2015; VARSANI et al., 2017). Até o momento, duas espécies não atribuídas a nenhum gênero também foram classificadas na família: *Citrus chlorotic dwarf associated virus* – CCDaV e *Mulberry mosaic dwarf associated virus* – MMDaV (VARSANI et al., 2017; ZELL et al., 2017). O CCDaV é o agente causador de grandes perdas em plantações de plantas cítricas na Turquia e China e é transmitido pela mosca-branca *Parabemisia myricae* (LOCONSOLE et al., 2012; VARSANI et al., 2017). O MMDaV, cujo vetor ainda é desconhecido, foi relatado infectando amoreira. Análises comparativas das proteínas CP (capa proteína) e da RepA/Rep (proteína relacionada à replicação) demonstram que essa espécie tem relação mais próxima ao CCDaV, porém não foram encontrados dados referentes às proteínas V3 e V5, o que faz com que seja necessário que o MMDaV seja classificado em um novo gênero na família (MA et al., 2015). Além disto, um provável gênero novo infectando tomate na Argentina foi relatado recentemente: Tomato apical leaf curl virus – ToALCV. Comparações de sequências nucleotídicas indicaram alta divergência entre ToALCV e os demais membros da família *Geminiviridae* (identidade nucleotídica de 65% do genoma completo) (MEDINA et al., 2018). Características referentes à organização genômica (**Figura 2**), vetores, hospedeiras e número de espécies dos nove gêneros da família serão brevemente descritas a seguir.

**Tabela 1:** Gêneros que compõem a família *Geminiviridae* de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, 2018).

<b>Gênero</b>	<b>Nº de Espécies</b>	<b>Espécie-tipo</b>	<b>Tipo de genoma</b>	<b>Hospedeira</b>	<b>Vetor</b>
<i>Becurtovirus</i>	2	<i>Beet curly top Iran virus</i>	Monopartido	Dicotiledôneas	Cigarrinha
<i>Begomovirus</i>	388	<i>Bean golden yellow mosaic virus</i>	Monopartido & Bipartido	Dicotiledôneas	Mosca-branca
<i>Capulavirus</i>	4	<i>Euphorbia caput-medusae latent virus</i>	Monopartido	Monocotiledôneas & Dicotiledôneas	<i>Alfalfa leaf curl virus:</i> <i>Alphis craccivora</i> Demais espécies: Desconhecido
<i>Curtovirus</i>	3	<i>Beet curly top virus</i>	Monopartido	Dicotiledôneas	Cigarrinha
<i>Eragrovirus</i>	1	<i>Eragrostis curvula streak virus</i>	Monopartido	Monocotiledôneas	Desconhecido
<i>Grablovirus</i>	1	<i>Grapevine red blotch virus</i>	Monopartido	Dicotiledôneas	Membracídeo
<i>Mastrevirus</i>	37	<i>Maize streak virus</i>	Monopartido	Monocotiledônea & Dicotiledôneas	Cigarrinha
<i>Topocuvirus</i>	1	<i>Tomato pseudo-curly top virus</i>	Monopartido	Dicotiledôneas	Membracídeo
<i>Turncurtovirus</i>	2	<i>Turnip curly top virus</i>	Monopartido	Dicotiledôneas	Cigarrinha

As duas espécies classificadas no gênero *Becurtovirus*: *Beet curly top Iran virus* – BCTIV (espécie-tipo do gênero e transmitida pela cigarrinha *Circulifer haematoceps*) e *Spinach curly top Arizona virus* – SCTAV apresentam genoma monopartido e infectam dicotiledôneas (HEYDARNEJAD et al., 2013; ZERBINI et al., 2017). Essas espécies classificadas no gênero *Becurtovirus* se diferenciam dos demais membros da família por apresentarem sequência incomum de nucleotídeos (quarta e oitava posição) em sua origem de replicação, enquanto a sequência comum encontrada na maioria dos geminivírus é “TAATATTAC”, nos *Becurtovirus* encontramos “TAAGATTCC” (VARSANI et al., 2014; YAZDI; HEYDARNEJAD; MASSUMI, 2008). Os *Becurtovirus* possuem cinco Open Reading Frames (ORFs) em seu genoma, sendo três no sentido viral: V1 (que codifica para a proteína capsidial), V2 e V3 (que codificam para proteínas relacionadas ao movimento) e duas no sentido complementar: C1 (codificando para Rep A) e C1:C2 (codificando para Rep). Essas espécies apresentam duas regiões intergênicas (long intergenic region – LIR e short intergenic region - SIR), separando as ORFs do sentido viral e complementar (HEYDARNEJAD et al., 2013; YAZDI; HEYDARNEJAD; MASSUMI, 2008), conforme pode ser observado pela **Figura 2**.

O gênero *Capulavirus*, aceito recentemente pelo ICTV, apresenta quatro espécies com genoma monopartido: *Alfalfa leaf curl virus* – ALCV, *Euphorbia caput-medusae latente virus* – EcmLV, *French bean severe leaf curl virus* – FbSLCV e *Plantago lanceolata latente virus* – PILV. *Alfalfa leaf curl virus* são transmitidos pelo pulgão *Aphis craccivora*, enquanto a transmissão/vetores de isolados das demais espécies ainda são desconhecidos (ROUMAGNAC et al., 2015; VARSANI et al., 2017). Conforme pode ser observado na **Figura 2**, os capulavírus se diferenciam dos demais membros da família devido a sua complexa organização genômica, incluindo várias sobreposições e *splicing* (BERNARDO et al., 2013, 2016; VARSANI et al., 2017).



**Figura 2:** Organização genômica de espécies da família *Geminiviridae*. LIR: região intergênica longa, SIR: região intergênica curta, CR: região comum, cp (V1): proteína capsial, mp (V2): proteína de movimento, reg (V3): gene regulador, rep/repA (C1/C1:C2): proteína associada a replicação, ren (C3): proteína potencializadora de replicação, trap/ss (C2): proteína de transcrição/supressor de silenciamento gênico, sd: determinante de sintomas (extraída e modificada de VARSANI et al., 2017).

No gênero *Curtovirus* encontram-se classificadas três espécies: *Beet curly top virus* – BCTV (espécie-tipo), *Horseradish curly top virus* – HCTV e *Spinach severe curly top virus* - SpSCTV. Todas estas espécies infectam dicotiledôneas, são transmitidas por cigarrinhas (*Circulifer tenellus*) (SOTO; GILBERTSON, 2003) e possuem genoma monopartido com 2,8-3,0 kb, com sete ORFs, sendo três no sentido viral: V1 (que codifica a proteína capsidial), V2 (que codifica uma proteína reguladora) e a V3 (que codifica proteína de movimento) e quatro no sentido complementar: C1 (que codifica proteínas associadas a replicação viral), C2 (que codifica proteínas supressoras de silenciamento), C3 (que codifica uma proteína potencializadora da replicação viral) e C4 (que codifica proteína determinante de sintomas), como ilustrado na **Figura 2** (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013; VARSANI et al., 2014).

O gênero *Eragrovirus* é monotípico e a espécie monopartida *Eragrostis curvula streak virus* – ECSV foi descrita na África infectando uma espécie de capim conhecida como *Eragrostis curvula*. Assim como no gênero *Becurtovirus*, a origem de replicação dos eragrovírus tem uma sequência diferente (quarta e oitava posição) daquela encontrada na maioria dos geminivírus: “TAAGATTCC” (VARSANI et al., 2014). A organização genômica desta espécie encontra-se ilustrada na **Figura 2**.

O gênero *Grablovirus*, assim como o gênero *Capulavirus*, foi aceito recentemente pelo ICTV (ZERBINI et al., 2017) Ambos apresentam a sequência nonanucleotídica “TAATATTAC” típica de geminivírus (KRENZ et al., 2014; SUDARSHANA; PERRY; FUCHS, 2015) e infectam plantas dicotiledôneas. *Grablovirus* permanece monotípico e a espécie *Grapevine red blotch virus* – GRBV, transmitida por *Spissistilus festinus* (BAHDER et al., 2016), possuem genoma de 3.2 Kb com seis ORFs, sendo três no sentido viral (V1, V2 e V3) e três no complementar (C1, C2 e C3). A organização genômica de GRBV é similar à organização genômica de *Capulavirus* para as ORFs C1, C1:2, V1 e C3 (proteínas RepA, Rep, proteína capsidial, e C3 ainda com função desconhecida, respectivamente) conforme pode ser observado na **Figura 2** (KRENZ et al., 2014; SUDARSHANA; PERRY; FUCHS, 2015).

No gênero *Mastrevirus*, já foram descritas 37 espécies, sendo 30 infectando monocotiledôneas e sete dicotiledôneas: *Chickpea chlorosis Australia virus* – CpCAV, *Chickpea chlorosis virus* – CpCV, *Chickpea chlorotic dwarf virus* – CpCDV, *Chickpea*

*redleaf virus* – CpRLV, *Chickpea yellow dwarf virus* – CpYDV, *Chickpea yellows virus* – CpYV e *Tobacco yellow dwarf virus* – TbYDV (HADFIELD et al., 2012; KRABERGER et al., 2013; OUATTARA et al., 2017). Estas espécies são transmitidas por *Cicadulina mbila* e a maioria delas foram relatadas em países do Velho Mundo (AMMAR et al., 2009; SHEPHERD et al., 2010), porém, recentemente, foram relatadas espécies do gênero infectando batata doce no Peru, Uruguai e no Brasil em milho (FONTENELE et al., 2018) e em batata-doce (SOUZA et al., 2018).

O gênero monotípico *Topocuvirus* é representado pela espécie *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV). Esta espécie é transmitida pelo membracídeo (*Micrutalis malleifera*) para plantas dicotiledôneas (BRIDDON et al., 1996). O genoma, de aproximadamente 2.8 Kb, apresenta organização similar aos begomovírus, entretanto a proteína capsidial (V1) é mais relacionada aos curtovírus que aos begomovírus (BRIDDON et al., 1996).

O gênero *Turncurtovirus* é composto por duas espécies, de genoma monopartido, relatadas: *Turnip leaf roll virus* – TuLCV e *Turnip curly top virus* – TCTV que é a espécie-tipo, transmitida por cigarrinhas (*Circulifer haematoceps*) (BRIDDON et al., 2010b; RAZAVINEJAD et al., 2013). A espécie TCTV possui a mesma sequência de nucleotídeos comumente encontrada na família *Geminiviridae*, “TAATATTAC”. Este representantes do gênero já foram relatados infectando diversas culturas, tais como, nabo (*Brassica rapa*), rabanete (*Raphanus raphanistrum*), alface (*Lactuca sativa*), beterraba (*Beta vulgaris*) e berinjela (*S. melongena*) (KAMALI et al., 2016; VARSANI et al., 2014).

O gênero *Begomovirus* compõe um dos maiores e mais importantes grupos de vírus de planta do mundo, com 388 espécies relatadas até o momento dentre as 441 espécies pertencentes a família *Geminiviridae* (ICTV, 2017). Características referentes a este gênero serão abordadas no próximo tópico.

## **2.4 O gênero *Begomovirus***

O primeiro relato de *Begomovirus* em tomateiro no Brasil foi feito por Flores et al. (1960), entretanto até 1990 a ocorrência de espécies do gênero no país era esporádica e sem importância econômica (LOURENÇÃO; NAGAI, 1994). Espécies classificadas em begomovírus são transmitidos pelo vetor aleirodídeo *Bemisia tabaci* em uma relação do

tipo circulativa não propagativa. A transmissão de begomovirus é ainda mais eficiente e rápida com a espécie “Middle East-Ásia Minor 1” (MEAM 1), anteriormente conhecida como biótipo B, que chegou ao Brasil no início da década de 1990 e já causou as primeiras epidemias a partir de 1993 nas região central país (GÖTZ *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 1998). *Bemisia tabaci* consiste em um complexo com 11 grupos genéticos que não podem ser distinguidas por meio de características morfológicas e atualmente as espécies são identificadas por meio de análises moleculares, mais especificamente com base em sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase 1 (mtCOI) (DE BARRO *et al.*, 2011). A partir do estudo destas sequências tem sido aceito que o complexo *B. tabaci* contém cerca de 36 espécies, que tem pelo menos 3,5% de divergência nucleotídica do gene mtCOI e dentro deste complexo, o biótipo B pertence a espécie críptica MEAM 1 (BARBOSA *et al.*, 2014; DINSDALE *et al.*, 2010).

#### **2.4.1 Genoma dos *Begomovirus***

Espécies classificadas no gênero *Begomovirus* podem apresentar um componente de DNA (espécies monopartidas) ou dois componentes de DNA (espécies bipartidas com DNA-A e DNA-B encapsidados separadamente). Com base em estudos filogenéticos as espécies do gênero *Begomovirus* tem sido separadas em dois grupos: os begomovírus do “Velho Mundo” (Europa, Ásia e África) e os begomovírus do “Novo Mundo” (Américas) (BRIDDON *et al.*, 2010a). Os begomovírus do Velho Mundo são em sua maioria monopartidos e frequentemente são acompanhados de DNA satélites, enquanto os begomovírus do Novo Mundo apresentam maior frequência de genomas bipartidos. Considera-se necessária a presença de ambos os componentes dos begomovírus bipartidos para que ocorra infecção, porém alguns estudos demonstram que *Tomato chlorotic mottle virus* – ToCMoV é capaz causar infecção sistêmica na ausência do DNA-B (FONTENELLE *et al.*, 2007; GALVÃO *et al.*, 2003; HAMILTON, BISARO, COUTTS, BUCK, 1983). No Peru e Equador, uma nova espécie de begomovirus, *Tomato leaf deformation virus* – ToLDeV, foi identificada como uma espécie monopartida, não apresentando o componente DNA-B ou DNA satélite. Análises filogenéticas mostraram que este vírus se trata de uma espécie nativa do Novo Mundo, e não possui relação próxima com espécies de *Begomovirus* de Velho Mundo, demonstrando a flexibilidade evolutiva e capacidade adaptativa dentro do gênero (MELGAREJO *et al.*, 2013).

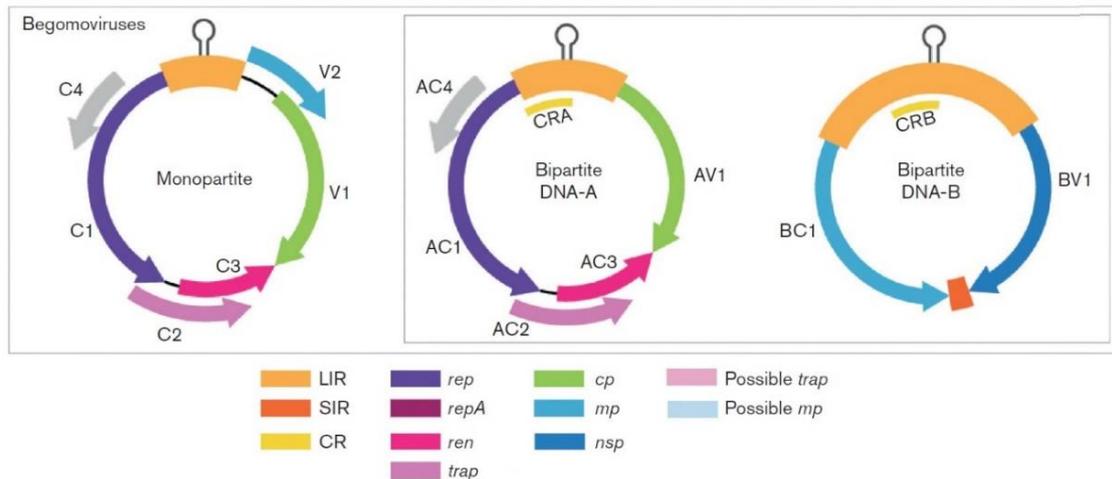
As partículas virais são formadas por dois icosaedros incompletos típicos da família *Geminiviridae* (GUTIERREZ et al., 2004). O gênero *Begomovirus* é composto por moléculas de DNA fita simples, circular com tamanho de 2,7 a 2,9 kb em genomas monopartidos e 2.5-2,7 kb em genomas bipartidos. Os genomas dos begomovírus não apresentam homologia em suas sequências nucleotídicas exceto por um fragmento encontrado na região intergênica (IR) denominado região comum (RC) de aproximadamente 200 nucleotídeos, onde se encontra a origem de replicação (*ori*) dos geminivírus: TATA “box”, contendo a sequência nucleotídica ‘TAATATTAC’ que é o sítio de clivagem da proteína REP, responsável pela replicação viral (BRIDDON et al., 2010a; HEYRAUD et al., 1993). A RC possui alta identidade (acima de 90%) entre os membros que compõem uma mesma espécie porém é divergente entre membros de espécies diferentes (FAUQUET et al., 2008; HARRISON, 1985). Os critérios de demarcação utilizados para identificação de novas espécies de *Begomovirus* são com base na identidade das sequências alinhadas. Espécie com identidade menor que 91% quando em comparação com todas as demais sequências de begomovirus já classificadas pode ser considerada como nova espécie. Caso a sequência tenha menos que 94% de identidade nucleotídica ela pode ser considerada como uma nova estirpe (BROWN et al., 2015),

A transcrição genômica em begomovírus é bidirecional e o genes são sobrepostos para uma maior eficiência na codificação de proteínas (ROJAS et al., 2018). O componente DNA-A dos begomovírus bipartidos é homólogo ao dos monopartidos e contém entre cinco e seis ORFs que codificam proteínas fundamentais para a replicação, transcrição e encapsidação viral conforme pode ser observado na **Figura 3**. No sentido viral encontram-se as ORFs AV1 (CP) e AV2 (*precoat*) (nas espécies do Velho Mundo) e no sentido complementar as ORFs AC1 (Rep), AC2 (Trap), AC3 (REn), AC4 e AC5. O componente DNA-B contém duas ORFs. No sentido viral encontram-se a ORF BV1 (NSP) e no sentido complementar a ORF BC1 (MP) (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999).

A ORF AV1/V1 codifica a proteína capsial (CP), uma proteína multifuncional e estrutural, que atua na proteção do material genético e na transmissão pelo vetor (AZZAM et al., 1994; BRIDDON et al., 1990; FRISCHMUTH; STANLEY, 1998; HARRISON; SWANSON; FARGETTE, 2002) .

A ORF AV2/V2 é encontrada somente em begomovírus do Velho Mundo e codifica uma proteína denominada “*Pre-coat protein*” que associa-se ao movimento

sistêmico mais eficiente do vírus na planta (PADIDAM; BEACHY; FAUQUET, 1996). Além disso, a V2 pode atuar como uma determinante de virulência, resposta hipersensível e supressão do silenciamento gênico pós-transcricional em *Tomato leaf curl Java virus-A* – ToLCJV-A (SHARMA; IKEGAMI, 2010).



**Figura 3:** Organização genômica dos begomovírus. LIR: região intergênica longa, SIR: região intergênica curta, CR: região comum, nsp (BV1): proteína de movimento nuclear, cp (V1/AV1): proteína capsidial, mp (V2/BC2): proteína de movimento, rep (C1): proteína associada a replicação, ren (C3/AC3): proteína potencializadora de replicação, trap (C2/AC2): proteína de transcrição/supressor de silenciamento gênico (modificada de VARSANI et al., 2017).

A ORF AC1/C1 codifica a proteína Rep, que é a única proteína essencial para a replicação viral. Os membros da família *Geminiviridae* não carregam uma enzima polimerase em seus capsídeos, dependendo inteiramente das enzimas polimerases da planta hospedeira para a replicação de seu DNA (KOONIN; IIYINA, 1992), sendo assim ela é capaz de induzir a produção de enzimas e outras proteínas que serão necessárias para o processo de síntese de DNA viral na hospedeira (GUTIERREZ, 2002; NAGAR et al., 1995). A Rep tem como função se ligar ao sítio de iniciação da replicação, que consiste em uma sequência 5'-TAATATTAC-3' localizada na região comum, e clivar o DNA viral dando início ao processo de replicação (FONTES; LUCKOW; HANLEY-BOWDOIN, 1992; LAUFS et al., 1995). Além disso, a Rep também é capaz de se autorregular, reprimindo sua própria síntese a nível de transcrição (SUNTER; HARTITZ; BISARO, 1993). A Rep também pode interferir no ciclo de metilação da planta, responsável pelo silenciamento gênico transcricional, prevenindo que ele ocorra (RODRÍGUEZ-NEGRETE et al., 2013).

A ORF AC2/C2 codifica a proteína TrAP, uma proteína ativadora de transcrição, responsável por ativar a expressão das proteínas CP e NSP (GRONING; HAYES; BUCK, 1994; SUNTER; BISARO, 1991). Essa proteína também é importante na supressão de mecanismos de silenciamento gênico da hospedeira, um mecanismo conservado evolutivamente para regulação da expressão gênica da própria planta e também proteção contra patógenos, como vírus (KUMAR et al., 2015; TRINKS et al., 2005).

A ORF AC3/C3 codifica a proteína REn que tem como função potencializar a replicação viral. Esta proteína não é essencial para a replicação, como é o caso da Rep, mas sua presença aumenta consideravelmente o acúmulo tanto de ssDNA quanto de dsDNA (double strand) virais. Além disso, mutações na AC3 podem causar uma diminuição de sintomas virais na hospedeira (SUNTER et al., 1990). A REn é bem conservada entre os begomovírus. Possui localização nuclear e capacidade de interagir com a Rep, o que sugere que a REn possa auxiliar a recrutar a maquinaria de replicação da hospedeira para a replicação viral, e na ausência da REN a eficiência da replicação diminui (CASTILLO et al., 2003). Ela é encontrada na maioria das espécies da família *Geminiviridae* que infectam dicotiledôneas (SETTLAGE; SEE; HANLEY-BOWDOIN, 2005).

A ORF AC4/C4 encontra-se completamente inserida na ORF AC1, porém é codificada em uma fase de leitura diferente e é altamente variável entre os begomovírus (VANITHARANI et al., 2004). Nos begomovírus monopartidos, a C4 está envolvida na determinação da severidade de sintomas, além de atuar no movimento viral (JUPIN et al., 1994). Em begomovírus bipartidos ela também atua no movimento viral, porém não é necessária para que ocorra infecção (FONTENELLE et al., 2007). Além disso, a AC4 também pode suprimir o sistema de defesa da planta logo no início da infecção, o que ocasiona o rápido surgimento de sintomas (VANITHARANI et al., 2004).

A ORF AC5/C5 é encontrada em algumas espécies de begomovírus mono e bipartidos. Ela é localizada à jusante da ORF AC3/C3 e está sobreposta a uma parte da ORF AV1/V1. Estudos mais recentes realizados com *Mungbean yellow mosaic India virus* (MYMIV) demonstram que a AC5 atua na patogenicidade viral, assim como na supressão de silenciamento de RNA, empregando novos mecanismos capazes de suprimir as defesas da planta (LI et al., 2015).

A ORF BV1 codifica a proteína NSP, uma proteína de transporte nuclear em begomovírus bipartidos, que atua no transporte do DNA viral do núcleo para o citoplasma da célula (NOUEIRY; LUCAS; GILBERTSON, 1994). Em begomovírus monopartidos esse transporte intracelular é feito pela proteína CP, o que faz com que se acredite que essas duas proteínas possam ter uma origem evolucionária de um DNA comum, tendo em vista que podem compartilhar da mesma função (KIKUNO et al., 1984; UNSELD et al., 2001).

A ORF BC1 é responsável por codificar a proteína MP, proteína de movimento em begomovírus bipartido. Nos begomovírus monopartidos a ORF V2 é responsável por codificar a proteína de movimento. Embora compartilhem a mesma função, essas duas proteínas não possuem identidade de sequências nucleotídicas (ETESSAMI et al., 1988). A MP atua no movimento célula-a-célula e junto com a NSP e o DNA formam um complexo viral que transporta o DNA através do plasmodesma para as células próximas (HEHNLE; WEGE; JESKE, 2004; NOUEIRY; LUCAS; GILBERTSON, 1994).

#### **2.4.2 Replicação das espécies de *Begomovirus***

A replicação das espécies do gênero *Begomovirus*, assim como dos demais membros da família *Geminiviridae*, ocorre no núcleo da célula hospedeira, através do mecanismo círculo rolante (RCR – *rolling circle replication*) e depende da maquinaria da célula hospedeira ] (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999; NAGAR et al., 1995). O vírus consegue penetrar na célula através do inseto vetor, e após a decapsidação, o genoma viral é transportado para o núcleo da célula com o auxílio da maquinaria da célula hospedeira (GAFNI; EPEL, 2002; LAZAROWITZ; SHEPHERD, 1992).

Após a chegada ao núcleo o ssDNA viral é replicado em três estágios e a proteína Rep é a responsável por catalisar o início e o término da replicação (BISARO, 1996), mas não atua como uma DNA-polimerase, já que espécies da família *Geminiviridae* não possuem sua própria polimerase e essa fase inicial da replicação é realizada pela polimerase da célula hospedeira (PILARTZ; JESKE, 2003). O N-terminal da Rep compreende quatro sequências conservadas chamadas de motivos I, II, III e GRS. O motivo I (**FLTY**) é fundamental para que ocorra ligação específica do dsDNA. O motivo II (**HLH**) é um sítio de ligação de íon metálicos que está envolvido na conformação da

proteína Rep e na clivagem do DNA. O motivo III (**YxxxKG/E**) é o sítio catalizador da clivagem do DNA. O motivo GRS (**Geminivirus Rep Sequence**), que encontra-se localizado entre os motivos II e III, é necessário para o início da replicação círculo rolante e no desenvolvimento da infecção (NASH et al., 2011). O primeiro estágio da replicação viral é onde ocorre a conversão do ssDNA em uma forma replicativa (RF) de dsDNA. Essa RF é uma forma intermediária que será utilizada como molde para a produção de novas fitas de ssDNA pelo mecanismo círculo rolante e também servirá como molde para a transcrição das proteínas virais (GUTIERREZ, 1999; STANLEY, 1995).

No segundo estágio da replicação o dsDNA é utilizado como molde para amplificar novas moléculas de ssDNA pelo mecanismo círculo rolante. Esta etapa é iniciada pela proteína Rep, que tem como função cortar (↓) o nonanucleotídeo conservado 5'-TAATATT↓AC-3' presente na região comum (CR) (ROJAS et al., 2018). Vários fatores da célula hospedeira são necessários para este processo e os componentes DNA-A e DNA-B, apesar de possuírem sequências diferentes, são replicados utilizando os mesmos mecanismos, pois partilham de uma região comum (CR) de aproximadamente 200 nucleotídeos com sequências repetitivas chamadas de iterons. Os iterons possuem alta especificidade com a Rep, auxiliando-a no início da replicação e controle da expressão dos genes de sentido complementar ao genoma viral (ARGÜELLO-ASTORGA; RUIZ-MEDRANO, 2001; HANLEY-BOWDOIN et al., 1999; PRADHAN et al., 2017).

No terceiro estágio ocorre o acúmulo de dsDNA. Para cada molécula de dsDNA vários ssDNA serão sintetizados e logo a célula estará repleta de genomas virais. Simultaneamente ao processo de replicação ocorre a transcrição das proteínas virais e acredita-se que o acúmulo da proteína capsidial (CP) seja um sinalizador para a interrupção do processo de replicação (MALIK et al., 2005). Os ssDNA são então encapsidados pela CP formando os vírions, que poderão ser transmitidos para outras plantas com o auxílio do aleirodídeo vetor *B. tabaci* (mosca-branca), ou poderão ainda serem transportados para as células vizinhas via plasmodesmas com o auxílio da MP (PRADHAN et al., 2017).

### 2.4.3 Variabilidade genética e evolução dos begomovírus

Os begomovírus apresentam um alto índice de variabilidade genética, que permitem as suas populações adaptar-se a ambientes em constantes modificações (LIMA et al., 2017). Os vírus de DNA de fita simples como as espécies da família *Geminiviridae* são capazes de evoluir tão rapidamente quanto os vírus de RNA (DUFFY; SHACKELTON; HOLMES, 2008). Em espécies de *Begomovirus* as taxas de substituições inferidas são semelhantes as inferidas em vírus de RNA (DUFFY; HOLMES, 2009). A variabilidade genética nos begomovírus ocorre por meio de três mecanismos: mutação, recombinação e pseudo-recombinação (ROJAS et al., 2018).

A mutação é uma das principais fontes de variabilidade genética e ela é determinada por forças como o ciclo de replicação, o tempo de geração e a seleção natural. No caso do vírus de ssDNA acredita-se que suas altas taxas de mutações são devido a um reparo ineficiente, ou até mesmo inexistente, das polimerases da célula hospedeira, que podem não replicar ou reparar o genoma viral com a mesma precisão com que o fazem com o genoma celular (SHACKELTON; HOLMES, 2006).

A recombinação tem papel importante em vírus de plantas e animais, nela segmentos genéticos podem ser trocados entre cadeias de DNA ou RNA de variantes genéticos virais diferentes durante o processo de replicação, resultando em uma progênie diferente dos vírus de parentais (GARCÍA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2001). Na família *Geminiviridae*, eventos de recombinação também podem propiciar a variabilidade genética de modo que venham a surgir novas espécies e até novos gêneros. O gênero *Becurtovirus* é um exemplo onde acredita-se que houve uma recombinação entre espécies virais do gênero *Curtovirus* e *Mastrevirus* que deram origem a espécies desse novo gênero, uma vez que as ORFs V1, V2 e V3 são análogas as de espécies do gênero *Curtovirus*, enquanto as ORFs C1 e C2 são análogas as de espécies do gênero *Mastrevirus* (VARSANI et al., 2014; YAZDI; HEYDARNEJAD; MASSUMI, 2008). A recombinação é o principal mecanismo de geração de variabilidade genética nos begomovírus e alguns fatores como a alta incidência de infecções mistas, altos níveis de replicação viral e o vetor *B. tabaci*, principalmente o biótipo B que permitiu um amplo aumento da gama de hospedeiros, colaboram para que ocorram mais eventos de recombinação (PADIDAM; SAWYER; FAUQUET, 1999).

A pseudo-recombinação ocorre quando há uma troca dos componentes DNA-A e

DNA-B de vírus diferentes. Essa troca só é possível se a interação da Rep com a região em torno da origem de replicação for altamente específica (BULL et al., 2007; STANLEY; TOWNSEND; CURSON, 1985). A ocorrência de pseudo-recombinações em tomateiros no Brasil é de fundamental importância para a evolução e surgimento de espécies novas e mais adaptadas (ANDRADE et al., 2006).

## 2.5 Espécies de *Begomovirus* que infectam tomateiro no Brasil

Begomoviroses representam umas das principais causas de perdas em produções de tomate no Brasil. Mais de 170 espécies de begomovírus infectando tomateiro foram relatadas em todo o mundo (BROWN et al., 2015; INOUE-NAGATA; LIMA & GILBERTSON, 2016), dentre elas 22 foram relatadas no Brasil, sendo 18 em tomate e quatro, inicialmente, relatadas em plantas daninhas e que são capazes de infectar o tomateiro (BARRETO et al., 2013; BEMISIA TABACI, [s.d.]; BERNARDO et al., 2016; CALEGARIO et al., 2004; COTRIM et al., 2007). Dentre as espécies relatadas em tomate no Brasil podemos citar: *Tomato bright yellow mosaic virus* – ToBYMV, *Tomato bright yellow mottle virus* – ToBYMoV, *Tomato chlorotic mottle virus* – ToCMoV, *Tomato common mosaic virus* – ToCmMV, *Tomato golden leaf distortion virus* – ToGLDV, *Tomato golden leaf spot virus* – ToGLSV, *Tomato golden mosaic virus* – TGMV, *Tomato golden vein virus* – ToGVV, *Tomato interveinal chlorosis virus* – ToICV, *Tomato leaf distortion virus* – ToLDV, *Tomato mild mosaic virus* – ToMMV, *Tomato mottle leaf curl virus* – ToMoLCV, *Tomato rugose mosaic virus* – ToRMV, *Tomato severe rugose virus* – ToSRV, *Tomato yellow spot virus* – ToYSV, *Tomato yellow vein streak virus* – ToYVSV (BROWN et al., 2015), *Tomato rugose yellow leaf curl virus* – TRYLCV (FONSECA et al. 2016, sequência depositada no GenBank – NCBI mas ainda sem dados publicados) e *Tomato leaf curl purple vein virus* – ToLCPVV (MACEDO et al., 2018). Dentre todas as espécies, ToSRV é a que tem sido predominante reportada infectando tomateiro no Brasil. A espécie TGVV tem sido mais frequentemente reportada no Brasil Central e a espécie TMoLCV predomina na região Nordeste (FERNANDES et al., 2008). O ToCmMV, por sua vez, é um vírus de distribuição endêmica que tem sido relatado exclusivamente nas regiões produtoras localizadas no bioma Mata Atlântica, englobando os estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e a porção oriental (Zona da Mata) de Minas Gerais (BARBOSA et al., 2016; ROCHA et al., 2013).

### **2.5.1 *Tomato common mosaic virus* – ToCmMV**

*Tomato common mosaic virus* – ToCmMV foi descrito pela primeira vez infectando tomateiro em 2007 na cidade de Coimbra (localizada na Mesorregião da Zona da Mata) no Estado de Minas Gerais (CASTILLO-URQUIZA et al., 2008). Esta espécie e *Begomovirus* foi única detectada infectando tomate no município de Coimbra–MG. Em levantamentos posteriores o ToCmMV foi também uma das espécies de *Begomovirus* predominantes na cidade de Paty do Alferes, Rio de Janeiro (ROCHA et al., 2013). Em levantamentos conduzidos no Estado do Espírito Santo (na região de Venda Nova do Imigrante), o ToCmMV foi identificado como a única espécie de *Begomovirus* infectando tomate entres os anos de 2007 e 2011 (BARBOSA et al., 2016), e se tornando a espécie predominante infectando plantações de tomate do Espírito Santo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (TOLOY et al., 2018).

### **2.5.2 *Tomato severe rugose virus* – ToSRV**

*Tomato severe rugose virus* – ToSRV foi relatado pela primeira vez em 2001 por Rezende et al. (dados não publicados), e atualmente, esta espécie é considerada predominante em todo o país (FERNANDES et al., 2008). A predominância desta espécie pode estar relacionada a diversos fatores, dentre eles a uma maior eficiência de transmissão por mosca-branca e eficiência de inoculação. Além disso, a espécie também é capaz de infectar outras plantas, tais como: soja (MACEDO et al., 2017), berinjela (MOURA et al., 2018) e pimenta (BEZERRA-AGASIE et al., 2006).

Dentre as diversas estratégias de manejo implementadas até o momento o uso de plantas resistentes é a que tem se mostrado mais eficiente e rentável para minimizar as perdas causadas pelos begomovírus. Dentre os genes de resistência descritos até o momento o *Ty-1* tem se mostrado efetivo contra diversas espécies de begomovírus no Brasil (BOITEUX et al., 2007) e este tópico será abordado a seguir.

## **2.6 O gene de resistência às espécies de *Begomovirus Ty-1***

Estratégias como manejo de cultura e controle do vetor não têm sido efetivas no combate à begomovirose. A migração de populações de moscas-brancas entre lavouras

e o fato de que algumas populações têm adquirido resistência a inseticidas vem agravando o quadro de dificuldade de controle de begomovirose (HARRISON, 1985; HOROWITZ; DENHOLM; MORIN, 2007).

O método de controle de begomovirose em tomateiro que tem apresentado melhor resultado é o uso de cultivares com resistência genética (LOURENÇÃO et al., 2004; NIZIO et al., 2008; ROCHA et al., 2012). Diversos estudos feitos no decorrer dos anos puderam identificar genes de resistência a begomovírus em espécies cultivadas e selvagens e um número considerável de genes de resistência foram caracterizados e mapeados, tais como: *Ty-1* (ZAMIR et al., 1994), *Ty-2* (HANSON et al., 2000), *Ty-3* (JI et al., 2007), *Ty-4* (JI et al., 2009), *tcm-1* (GIORDANO et al., 2005) e *ty-5* (HUTTON; SCOTT; SCHUSTER, 2012).

Atualmente o mercado brasileiro já dispõe de variedades de tomate portadoras de genes de resistência, em especial o gene/locus *Ty-1*. O fator de resistência *Ty-1* foi introgridido na espécie cultivada a partir de acessos da espécie selvagem *Solanum chilense* e confere resistência ao begomovírus monopartido *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (MICHELSON; ZAMIR; CZOSNEK, 1994). No Brasil o *Ty-1* tem conferido tolerância a diversas espécies de begomovírus bipartidos (BOITEUX et al., 2007; MICHELSON; ZAMIR; CZOSNEK, 1994; TOBAR, 2013).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos Gerais:

O objetivo deste trabalho é catalogar a diversidade espaço-temporal bem como a distribuição e dinâmica de espécies de *Begomovirus* relatadas infectando tomateiro nos na última década nos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e na Mesorregião da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais.

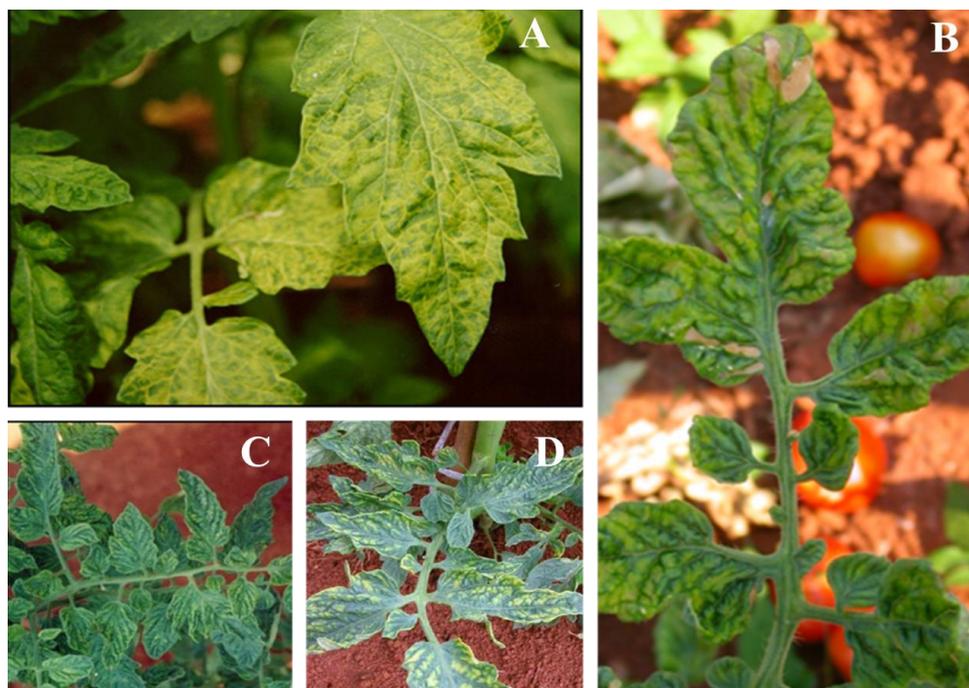
#### 3.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a dinâmica populacional das espécies *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) nos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e na Mesorregião da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais.
- Avaliar o fato aparente de que isolados da espécie *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) vêm sendo gradualmente substituídos por isolados do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) no Espírito Santo e Rio de Janeiro.
- Avaliar o efeito do uso do fator de resistência de resistência *Ty-1* na distribuição, evolução e diversidade viral em condições de campo.
- Realizar análises de filogeografia para reconstruir a dinâmica espaço/temporal de isolados das espécies *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção dos isolados

Os isolados utilizados neste trabalho pertencem à Coleção de begomovírus de tomateiro do Laboratório de Melhoramento Vegetal da Embrapa Hortaliças (Brasília – DF). Os isolados desta coleção são provenientes de amostras foliares de tomate que apresentavam sintomas de infecção, provavelmente induzidos por isolados de espécies classificadas em *Begomovirus* (**Figura 4**), e que foram coletadas em regiões produtoras em todas as cinco regiões do país entre os anos de 2001 até 2018. Para este estudo 277 isolados foram selecionados, sendo 167 isolados procedentes do Espírito Santos, 76 procedentes do Rio de Janeiro e 34 procedentes de Minas Gerais (**Anexo 1**).



**Figura 4.** Plantas de tomate com sintomas característicos de infecção por begomovírus. **A:** mosaico e deformação foliar. **B:** rugosidade, desvio de cor e epinastia. **C e D:** amarelecimento internerval. Fonte: Leonardo Boiteux e Leonardo Giordano.

### 4.2 Detecção e pré-caracterização dos isolados positivos para begomovírus

As 277 amostras foliares selecionadas foram submetidas a extração de DNA total usando metodologia com tampão CTAB 2X e solventes orgânicos (BOITEUX et al., 1999). As amostras de DNA total que apresentaram baixa concentração na quantificação

feita com Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE, USA) foram submetidas à amplificação por círculo rolante (RCA – *Rolling Circle Amplification*) (INOUE-NAGATA et al., 2004), para aumento da concentração do DNA viral. Para a reação de RCA foram utilizados 1,0 µL de DNA total, 2,0 µL de tampão da enzima *Phi-29* DNA polimerase (10 X), 2,0 µL de BSA (10 X), 2,0 µL de dNTPs (2,5 mM), 2,0 µL de *primer* randômico (50 mM), 0,2 µL da enzima *Phi-29* DNA polimerase (5U/µL) e 10,8 µL de água Milli-Q para um total de 20 µL. A reação foi então incubada em termociclador à temperatura de 20°C por 24 horas. Em seguida a enzima foi inativada à 65°C por 10 minutos.

As amostras de DNA total e/ou RCA dos isolados foram então submetidas a ensaios de PCR com o *primers* “universais” ‘PAL1v1978’ (5’ GCA-TCT-GCA-GGC-CCA-CAT-YGT-CTT-YCC-NGT 3’) e ‘PAR1c496’ (5’ CAT-GCT-GCA-GTA-CAT-YGG-CCT-YTT-DAC-CC 3’) para detecção de begomovírus (ROJAS et al., 1993). Para o preparo do mix da reação utilizou-se 2,0 µL de tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (10 X), 2,0 µL de dNTPs (2,5 mM), 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,5 µL de cada *primer* (PAL1v1978/PAR1c496) (10 µM), 0,32 µL da enzima *Taq* DNA polimerase (5U/µL), 10,48 µL de água Milli-Q e 3,0 µL de DNA total (20 ng/µL) para um total de 20 µL. O DNA foi amplificado usando as seguintes condições: 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos, sendo cada um deles composto por: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 50°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão, e uma etapa de extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos da reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo e visualizados.

#### **4.3 Verificação da presença do gene de resistência *Ty-1***

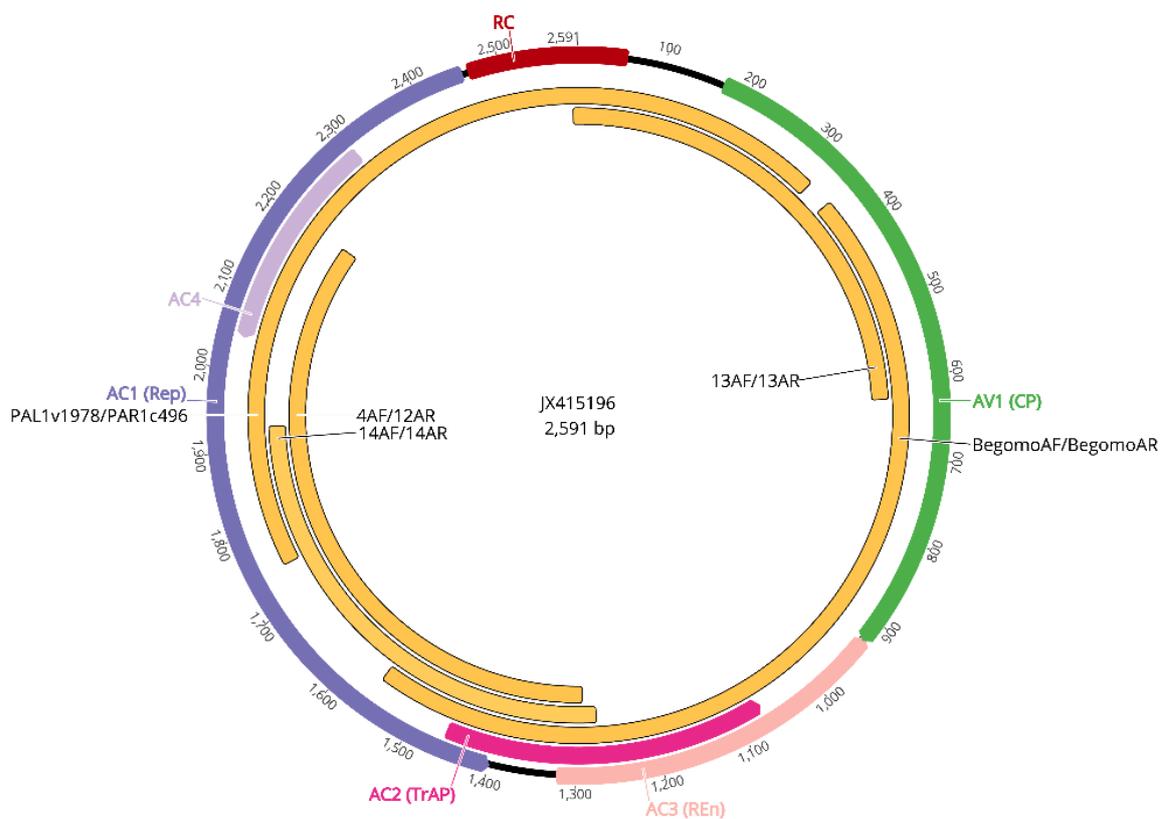
As mesmas 277 amostras de DNA total (englobando DNA genômico das hospedeiras + DNA viral) obtidas de plantas de tomateiro coletadas nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e Minas Gerais foram também submetidas a ensaios de PCR – CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*). Amplicons foram obtidos empregando os *primers* ‘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’) de acordo com FERRO (2013). A reação foi realizada com um *mix* composto por 1,25 µL de tampão da

enzima *Taq* 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), perfazendo um volume final de 12,5 µL. As amostras foram então submetidas à PCR com as seguintes condições: 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos, sendo cada um composto por 94°C por 30 segundos para desnaturação, 53°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão, e uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto da PCR foi então submetido à clivagem com a enzima de restrição *Taq*-1 para identificação dos alelos contrastantes (resistente vs. suscetível). Para o *mix* de clivagem foram utilizados 1,75 µL de tampão (10 X), 0,12 µL de BSA, 0,12 µL da enzima de restrição *Taq*-1 (5U/µL), 3,01 µL de água Milli-Q e os 12,5 µL do produto da PCR, totalizando 17,5 µL de produto final que foi 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 etídeo e visualizados sob luz UV.

#### **4.4 Amplificação do componente DNA-A via PCR utilizando *primers* universais compreendendo o genoma A inteiro.**

Dentre os isolados que obtiveram resultados positivos usando os *primers* ‘PAL1v1978/PAR1c496’ foi selecionado um representante de diferentes ações de coleta (selecionados isolados com mês, ano e local de coleta distintos). Esses isolados foram submetidos a PCR com mais quatro pares de *primers*, capazes de gerar fragmentos do componente DNA-A que se sobrepõem parcialmente, permitindo a geração/obtenção da informação completa deste componente viral (**Figura 5**). Foram utilizados os seguintes *primers* ‘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); ‘13AF’ (5’ TAA-TAT-TAC-CGG-ATG-GCC-GC 3’) e ‘13AR’ (5’ CTT-RAA-MAC-CTG-DCC-RAA-RTC-C 3’); ‘14AF’ (5’ CAT-TCT-CYG-CYT-GAK-GYR-CAG-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’ ATT-TCC-ATC-CGA-ACA-TTC-AGG-GAG-C 3’). Estes *primers* foram desenhados e validados por FONSECA *et al.* (dados não publicados). Para o preparo do *mix* da reação de cada um dos pares de *primers*, foi utilizado 2,0 µL de tampão da enzima *Taq* DNA

polimerase (10 X), 2,0  $\mu$ L de dNTPs (2,5 mM), 1,2  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (50 mM), 0,5  $\mu$ L de cada *primer* (Primer Forward/Primer Reverse) (10  $\mu$ M), 0,32  $\mu$ L da enzima *Taq* DNA polimerase (5U/ $\mu$ L), 10,48  $\mu$ L de água Milli-Q e 3,0  $\mu$ L de DNA total (20  $\eta$ g/ $\mu$ L), com um volume total de 20  $\mu$ L por reação. A reação foi amplificada em termociclador configurado da seguinte forma: uma etapa de 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos, a 94°C por 30 segundos para desnaturação, 50°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão, e uma etapa de extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos da reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo e visualização sob luz ultravioleta.



**Figura 5:** Diagrama do componente DNA-A de um begomovírus de genoma bipartido. As barras em cor laranja no interior do genoma representam as regiões amplificadas por quatro pares de iniciadores universais: PALv1978/PARc496 (Rojas et al. 1993); BegoAFor1/BegoAREv1 (Ha et al., 2006) e mais três novos pares de iniciadores (4AF/12AR, 13AF/13AR e 14AF/14AR) desenvolvidos e validados por M.E.N. Fonseca et al. (dados não publicados).

#### 4.5 Sequenciamento e análise das sequências

O sequenciamento das amostras com resultado positivo para os cinco pares de *primers* (PAL1v1978/PAR1c496, Begomo AF/Begomo AR, 13 AF/13AR, 14 AF/14AR e 4 AF/12 AF) foi realizado no Laboratório de Análise Genômica da Embrapa Hortaliças, com sequenciador ABI PRISM 3100 utilizando o protocolo BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 3.1 (Applied Biosystems).

As sequências de cada um dos pares de *primers* (PAL1v1978/PAR1c496, Begomo AF/Begomo AR, 13 AF/13AR, 14 AF/14AR e 4 AF/12 AF) obtidas no sequenciamento foram analisadas utilizando o programa Geneious 11.0.5 (<https://www.geneious.com/>). Primeiramente foi feita uma montagem *De Novo* (*De Novo Assembly*) das sequências dos amplicons obtidos com a utilização dos cinco pares de *primers* universais, visando obter os componentes DNA-As completos para cada um dos isolados. Após a montagem dos *contigs* e análise de qualidade, as sequências obtidas foram analisadas por meio da ferramenta BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997). Essa ferramenta foi empregada na comparação das sequências obtidas com as sequências depositadas no banco público de dados **GenBank** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), visando identificar as espécies virais. As sequências montadas foram alinhadas com os genomas de referência de maior porcentagem de identidade obtidos no BLASTn, e a partir destes foi realizada a anotação dos genomas montados.

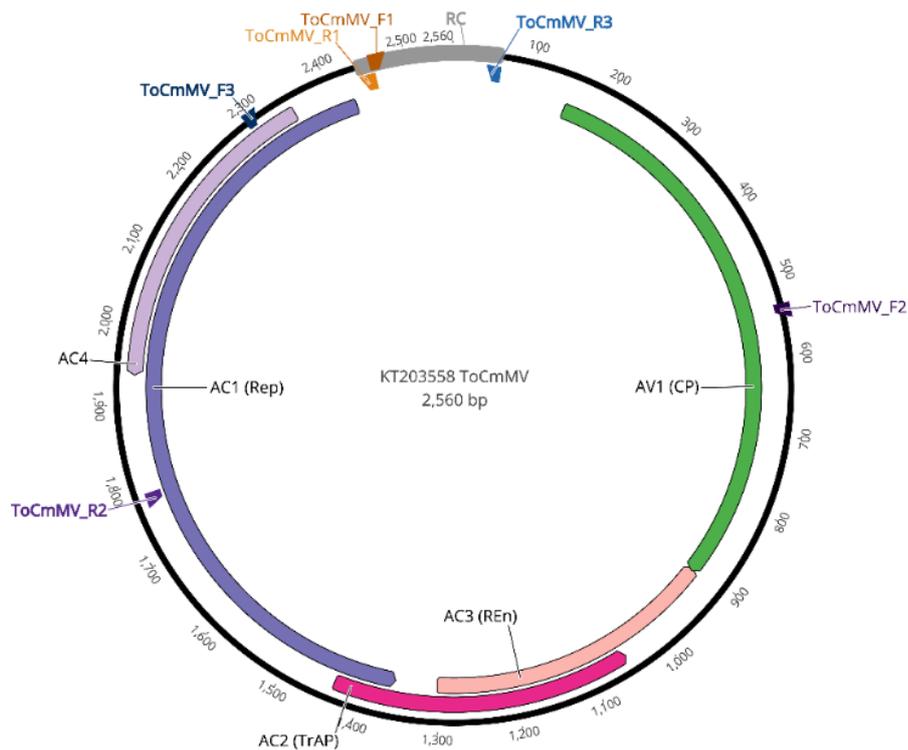
#### **4.6 Desenho de oligonucleotídeos específicos para obtenção do componente DNA-A completo**

Para alguns isolados não foi possível obter a sequência completa do componente DNA-A a partir da informação obtida com o conjunto de cinco *primers* universais (**Tabela 2**). Desta forma, com o objetivo de obter o genoma completo do componente DNA-A, foram desenhados novos *primers* específicos a partir do alinhamento das sequências obtidas com os primers universais e seus respectivas genomas de referência. Com o auxílio do programa *Geneious*, foi realizado um alinhamento múltiplo de todas as sequências que foram montadas (**Tabela 4**) e sequências de referência para cada uma das espécies sequenciadas depositadas no banco de dados **GenBank**. O alinhamento foi feito utilizando o algoritmo MAFFT, adotando os parâmetros padrões.

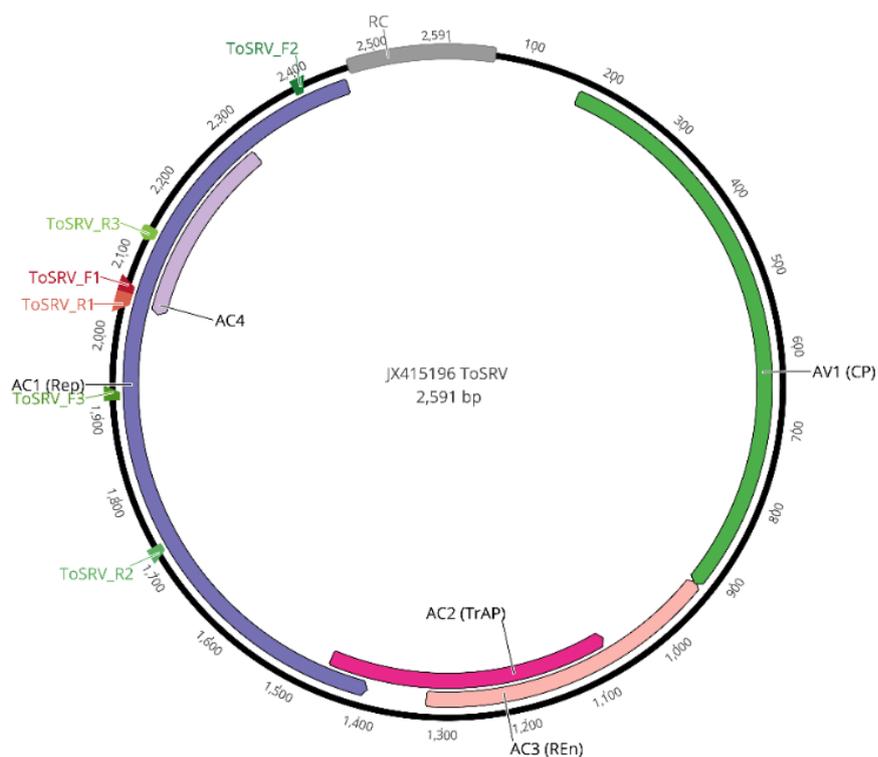
A partir do alinhamento múltiplo foram analisadas regiões do genoma conservadas e

divergentes entre um conjunto de diferentes espécies virais. Para a escolha das sequências dos *primers* foram observados parâmetros como número de nucleotídeos (acima de 18 bases), relação GC/AT (GC% entre 40-60%), ausência de bases repetidas que possam formar estruturas secundárias (hairpin e dímeros), temperatura de *melting* ( $T_m$ ) e presença de G e C na extremidade 3'.

Foram desenhados *primers* específicos por espécies capazes de amplificar todo o componente DNA-A e *primers* cobrindo diversos fragmentos de cada uma das espécies de interesse (ToCmMV e ToSRV), de modo que todo o genoma pudesse ser sequenciado de forma fragmentada pelo método Sanger. As regiões que foram selecionadas para obtenção dos *primers* podem ser observadas na **Figura 6** para os vírus da espécie ToCmMV e na **Figura 7** para os vírus da espécie ToSRV. Os *primers* F1/R1 são *primers* para a amplificação de todo o genoma das espécies, os *primers* F2/R2 foram baseados nas sequências obtidas pelos *primers* F1/R1 visando completar a informação do genoma A.



**Figura 6:** Diagrama das posições dos *primers* desenhados para amplificar o componente DNA-A da espécie *Tomato common mosaic vírus* (ToCmMV).



**Figura 7:** Diagrama das posições dos *primers* desenhados para amplificar o componente DNA-A da espécie *Tomato severe rugose virus* (ToSRV).

**Tabela 2:** *Primers* específicos para recuperação do componente DNA-A completo, das espécies *Tomato severe rugose virus* – ToSRV e *Tomato common mosaic virus* – ToCmMV.

Primer	Sequência 5' - 3'	Tamanho (nt)	T <sub>m</sub> * (°C)
ToCmMV_F1	ATTGCTCTCAACTTCTGTGC	20	56.3
ToCmMV_R1	GCAATCCCTGGTGTCCCTCAC	20	60.7
ToCmMV_F2**	GTGCTATGTTCTGGTTG	17	44
ToCmMV_R2**	GTATTGTCATCGAGGGT	17	44
ToCmMV_F3**	TATATGTGGGTTTGACGA	18	44
ToCmMV_R3**	CTGTTCTAATTGGGCCA	17	45
ToSRV_F1	AGCGTCGTTAGCTGTCTGGCA	21	64.4
ToSRV_R1	TGCCGCAGAAGCCTTGAACGCACCT	25	71.3
ToSRV_F2**	GCATTTGGGATATGTGAGG	19	48
ToSRV_R2**	AGTGGACACCTAGATTTC	18	45
ToSRV_F3**	CCGGAGCCCTTGAAAT	17	48
ToSRV_R3**	TATCTCCGTCCTTGTCG	17	47

\*T<sub>m</sub>: Temperatura de *melting*. \*\*Primers *walking*

#### 4.7 Preparo do banco de dados para as análises

Para estabelecer a filogeografia das espécies ToCmMV e ToSRV foi montado um banco de dados com sequências dos componentes DNA-A completos para diferentes isolados de cada uma das espécies. Para isso, além das sequências recuperadas nesse trabalho, foram selecionadas sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) que apresentavam informações sobre local/ano de coleta e componente DNA-A completos. No total, foram utilizadas 28 sequências da espécie ToCmMV, sendo cinco delas recuperadas no presente trabalho e 23 provenientes do GenBank; e 103 sequências de ToSRV, 21 recuperadas no presente trabalho e 82 provenientes do GenBank (**Tabela 3**). Para cada conjunto de sequências separadas por espécie foi realizado um alinhamento múltiplo com o programa Geneious, utilizando o algoritmo MAFFT de acordo com as configurações padrões, e a partir destes alinhamentos foram geradas árvores filogenéticas com a ferramenta FastTree do programa *Geneious*.

**Tabela 3:** Isolados utilizados para montar o banco de dados para as análises de filogeografia agrupados por cidades/municípios.

<i>Tomato severe rugose virus (ToSRV)</i>											<i>Tomato common mosaic virus (ToCmMV)</i>			
Isolado	Ano	Local	Isolado	Ano	Local	Isolado	Ano	Local	Isolado	Ano	Local	Isolado	Ano	Local
JX415201	2009	Acreúna-GO	AY029750	2000	Uberlândia-MG	JX415193	2008	Luziânia-GO	JX865629	2010	Viçosa-MG	EU710754	2007	Coimbra-MG
JX415202	2009		ES206	2017	Vargem Alta-ES	JX415196	2008		JX865630	2010		KC706569	2007	
ES187	2016	Afonso Cláudio-ES	EU086591	2007	Sumaré-SP	KX828624	2014	Minas Gerais	JX865631	2010		KC706570	2007	
ES202	2016		ES146	2016	Domingos Martins-ES	FJ824808	2005	Pirajú-SP	JX865632	2010		KC706571	2007	
JF803260	2003	Brasília-DF	ES196	2016		ES144	2016	Santa Maria de Jetibá-ES	JX865633	2010		KC706572	2007	
JF803261	2003		ES285	2018		ES255	2017	Venda Nova do Imigrante-ES	JX865634	2009		KC706573	2007	
JF803263	2004		ES286	2018		ES117	2015		JX865635	2009		KC706574	2007	
KY524458	2015		ES287	2018		ES120	2015		JX865636	2010		KC706575	2007	
KC004075	2008		ES288	2018		ES173	2016		JX865637	2010		KC706576	2007	
KC004076	2008		ES289	2018		ES176	2016	JX865638	2010	KC706577		2007		
KC004077	2008	ES290	2018	ES183		2016	JX865639	2009	KC706578	2007				
KC004078	2008	ES291	2018	ES271		2017	JX865640	2009	KC706579	2007				
KC004079	2008	ES292	2018	KC004090		2010	JX865641	2009	KC706580	2005				
KC004080	2008	KX458238	2014	JX865615	2009	JX865642	2010	KC706581	2005					
KC004081	2008	KC004070	2008	JX865616	2009	JX865643	2010	KC706582	2005					
KC004082	2008	KC004071	2008	JX865617	2009	JX865644	2010	KC706583	2005					
KC004083	2008	KC004072	2008	JX865618	2009	JX865645	2010	KC706584	2005					
KC004084	2008	KC004073	2008	JX865619	2009	JX865646	2010	KC706585	2005					
KC004085	2008	KC004074	2008	JX865620	2010	JX865647	2010	KC706586	2005					
KC004086	2008	JX415188	2008	JX865621	2010	JX865648	2010	KC706587	2005					
KC004087	2008	JX415197	2008	JX865622	2010	JX865649	2010	KC706588	2005					
KC004088	2008	JX415198	2008	JX865623	2010	JX865650	2010	KC706589	2005					
KC004089	2008	JX415199	2008	JX865624	2010	Viçosa-MG		KC706589	2005	Paty do Alferes-RJ				
KC706617	2008	JF803262	2004	Indiana-GO	JX865625			2010	ES103		2013	Santa Maria de Jetibá-ES		
KC706618	2008	KC004068	2008	Jaíba-MG	JX865626			2010	ES051		2012	Santa Tereza-ES		
KC706619	2008	KC004069	2008		JX865627			2010	ES007	2009	Venda Nova do Imigrante-ES			
KC706620	2008	JX415190	2008	Luziânia-GO	JX865628			2010	ES111	2013				
										ES113	2015			

## 4.8 Análises de filogeografia

A partir das árvores filogenéticas geradas para cada uma das espécies (ToCmMV e ToSRV) foi utilizado o programa TempEst (RAMBAUT et al., 2016), para avaliar se as sequências selecionadas possuíam sinal temporal para que se pudesse proceder com as análises filogeográficas.

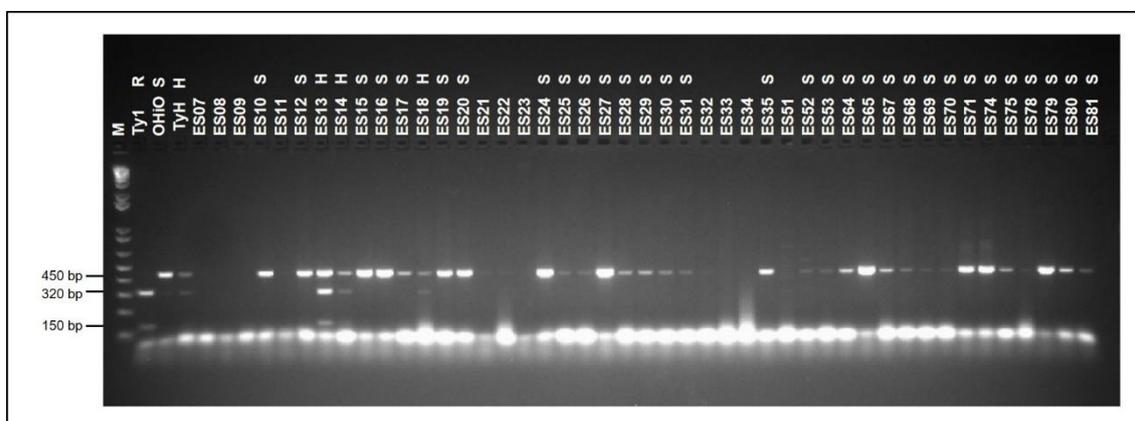
As análises de filogeografia foram realizadas utilizando o programa BEAST v1.10.4 (<http://beast.community/index.html>) e para isso foram criados arquivos XML de cada um dos conjunto de sequências de cada espécie (ToCmMV e ToSRV), para serem executados no BEAST com o auxílio da ferramenta BEAUTi (inclusa no pacote de download do BEAST), onde foram atribuídos parâmetros de modelo de substituição de nucleotídeo: HKY; modelo de substituição de características discreta: modelo de substituição simétrico com inferência variável de busca estocástica bayesiana (*Bayesian stochastic search variable selection* - BSSVS); tipo de relógio: estrito; modelo de árvore: Coalescente - *Bayesian Skyline* (DRUMMOND et al., 2005); para reconstrução do estado ancestral: reconstruir estado em todos os ancestrais. Por fim, as árvores filogenéticas foram calculadas usando o *Bayesian Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) em cadeias de 80.000.000 de gerações, com frequência de amostragem de 8.000, no programa BEAST.

A convergência das cadeias foi realizada no programa TRACER v1.7.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>) para avaliar o cálculo do tamanho efetivo da amostragem (*Effective Sample Size* – ESS), após um *burnin* de 10%, sendo aceitos apenas resultados com valores de  $ESS \geq 200$ . A sumarização das árvores geradas em uma árvore de máxima credibilidade (*Maximum Clade Credibility* – MCC) foi realizada no programa TreeAnnotator v1.10.4 (também incluso o pacote do programa BEAST). As árvores de máxima credibilidade de cada uma das espécies virais foram visualizadas com o programa FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), e os dados de filogeografia gerados nas análises baesianas foram plotados em mapas por meio do programa SpreaD3 (*Spatial Phylogenetics Reconstruction of Evolutionary Dynamics using Data-Driven Documents* (D3)) (<https://rega.kuleuven.be/cev/ecv/software/SpreaD3>), para visualização das trajetórias de distribuição das espécies ToCmMV e ToSRV.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação da presença do gene/locus de resistência *Ty-1* em associação com os diferentes isolados virais

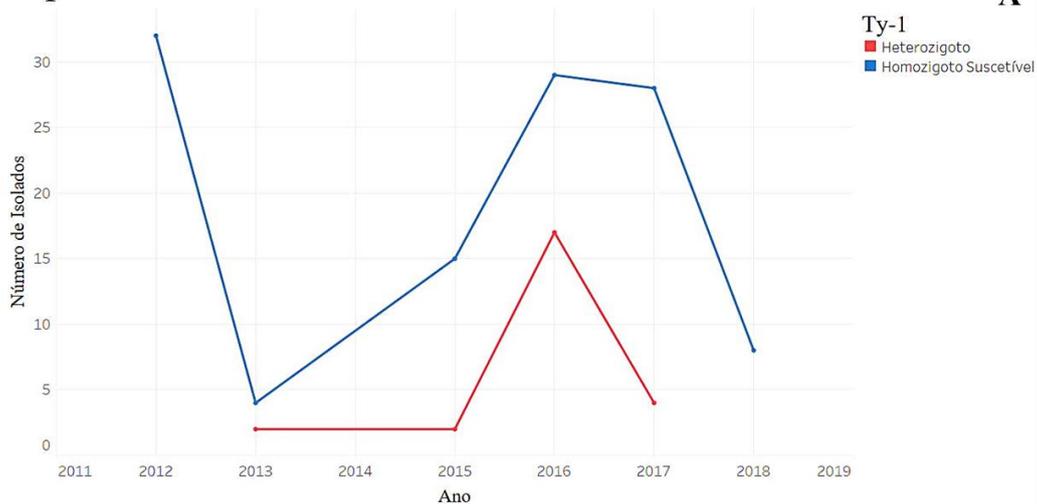
Os amplicons obtidos com o par de *primers* ‘UWTy1F/UWTy1R’ quando submetidos a eletroforese em gel de agarose produziram um padrão de fragmento de DNA único de aproximadamente 450 pb. Quando o produto foi submetido à clivagem com a enzima de restrição *Taq-1*, apresentou três padrões distintos de fragmentos, conforme ilustrado na **Figura 8**: padrão de uma única banda (não clivada) de 450 pb é associado com indivíduos homocigotos/suscetíveis (*ty-1/ty-1*); o padrão de duas bandas (uma de 320 pb e outra de 150 pb) após clivagem com enzima *Taq-1* é associado com indivíduos homocigotos/resistentes (*Ty-1/Ty-1*) e o padrão exibindo três bandas (450 pb, 320 pb e 150 pb) é associado com indivíduos heterocigotos que possuem duas variantes alélicas (uma dominante e outra recessiva – *Ty-1/ty-1*) do gene/locus de resistência (**Figura 8**).



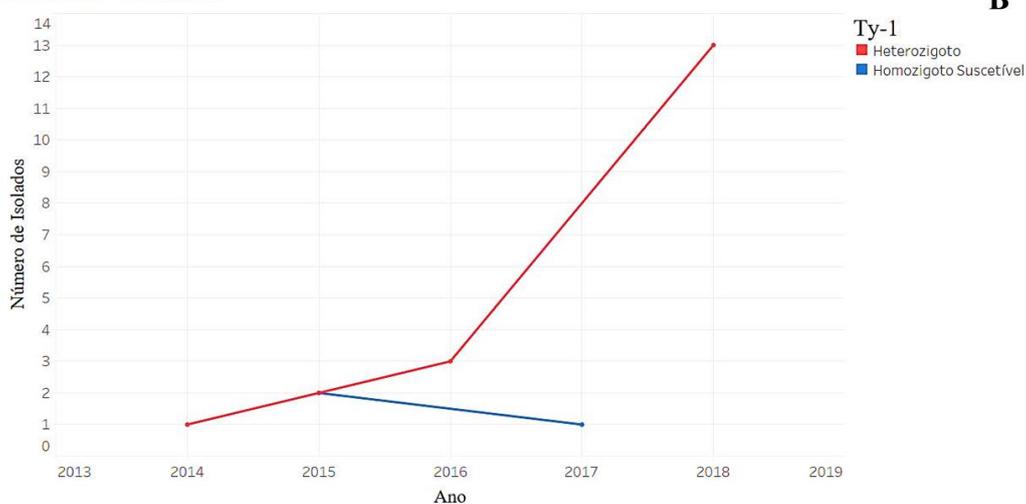
**Figura 8:** Perfil de fragmentos de DNA dos produtos de PCR obtidos com os *primers* ‘UWTy1F/UWTy1R’ e clivados com a enzima de restrição *Taq-1* em gel de agarose 1,5%. **Ty-1** = DNA extraído da linhagem de tomate LAM 144R, usada como controle para indivíduos homocigotos resistentes (*Ty-1/Ty-1*); **Ohio** = cultivar de tomate que serve como controle para indivíduos homocigotos suscetíveis (*ty-1/ty-1*); **TyH** = DNA extraído do híbrido BRS Imigrante, utilizado como controle para indivíduos heterocigotos contendo as duas variantes alélicas do gene (*Ty-1/ty-1*). **R** = indivíduos homocigotos resistentes (320 pb e 150 pb); **S** = indivíduos homocigotos suscetíveis (450 pb) e **H** = indivíduos heterocigotos resistentes (450 pb, 320 pb e 150 pb). **M** = Marcador molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

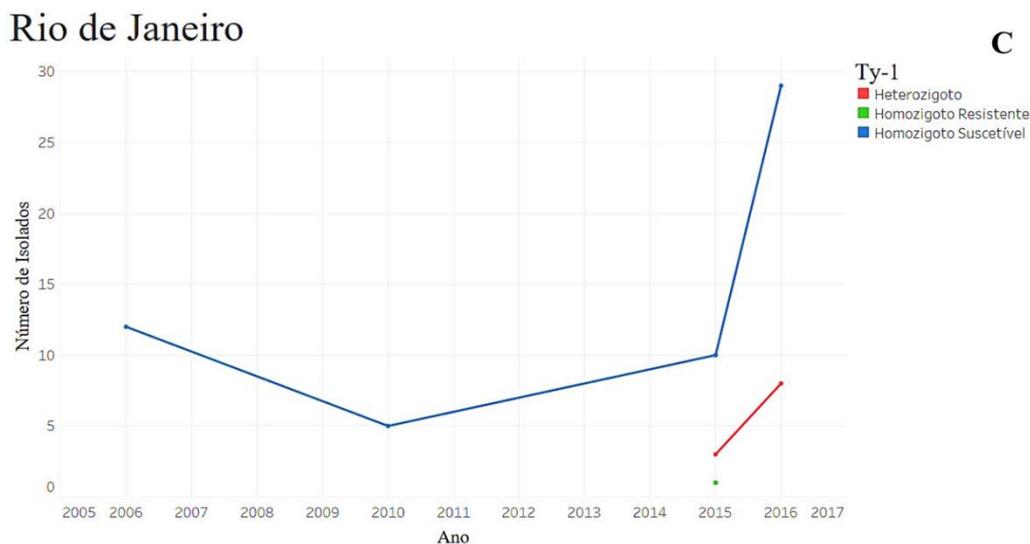
Das 277 amostras foliares (= isolados) analisadas nesse ensaio (167 isolados procedentes do Espírito Santo, 76 procedentes do Rio de Janeiro e 34 procedentes de Minas Gerais), 175 plantas apresentaram padrões associados a indivíduos homozigotos suscetíveis ( $ty-1/ty-1$ ); 01 amostra apresentou padrão associado a indivíduos homozigotos resistentes ( $Ty-1/Ty-1$ ) e 53 isolados apresentaram padrões associados a indivíduos heterozigotos contendo duas variantes alélicas do gene/locus ( $Ty-1/ty-1$ ) (**Figura 9**). Desta forma, os dados mostraram que, no presente estudo, foi utilizada uma grande maioria das amostras é oriunda de plantas que ainda não apresentam o gene/locus de resistência  $Ty-1$ . Observou-se também que a frequência no emprego do gene/locus  $Ty-1$  (majoritariamente em heterozigose) aumentou de maneira mais acentuada entre os anos de 2015 e 2016 (**Anexo 2 e Figura 9**).

### Espírito Santo



### Minas Gerais





**Figura 9.** Dados sobre a avaliação da presença do gene/locus de resistência *Ty-1* em plantas de tomateiro amostradas nos estados do ES (A), MG (B) e RJ (C).

## 5.2 Variabilidade dos isolados da coleção de sequências de begomovírus da EMBRAPA Hortaliças

Os fragmentos de cerca de 1.100 nts gerados a partir dos *primers* PAL1v1978/PAR1c496' foram obtidos no banco de sequências da EMBRAPA Hortaliças e re-submetidas a análises com a ferramenta BLASTn, fornecendo dados preliminares com relação a diversidade de espécies virais encontradas nos três estados estudados (ES, MG e RJ) (**Anexo 1**).

Essas análises indicaram a presença, no estado do Espírito Santo, de cinco espécies virais: *Tomato common mosaic virus* – ToCmMV, *Tomato interveinal chlorosis virus* – ToICV, *Tomato mottle leaf curl virus* – ToMLCV, *Tomato severe rugose virus* – ToSRV e *Euphorbia yellow mosaic virus* – EuYMV. No intervalo amostral entre os anos de 2009 e 2015 a prevalência foi da espécie ToCmMV. No entanto, as amostras coletadas no intervalo entre os anos de 2016 a 2018, a espécie ToSRV passou a aumentar a frequência, sobrepondo ao ToCmMV e se tornando a espécie predominante.

No Rio de Janeiro foram detectadas seis espécies virais: ToCmMV, ToICV, ToMLCV, ToSRV, *Sida yellow net virus* – SiYNV e *Sida common mosaic virus* –

SiCMV. A espécie ToCmMV também predominava até o início do ano de 2016. No entanto, nas coletas a partir do mês de julho 2016, ToSRV passou a ser a espécie predominante (**Anexo 1**).

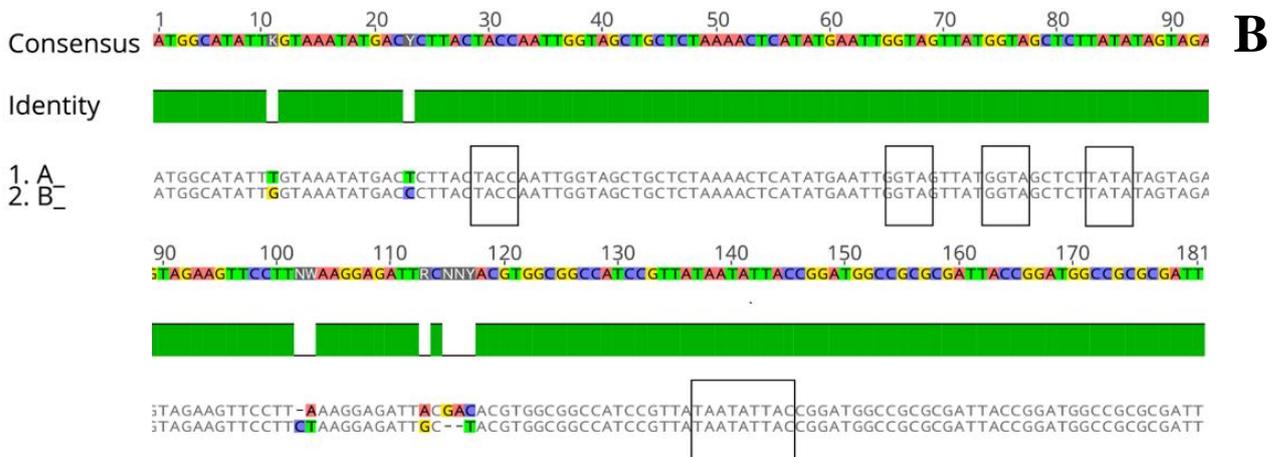
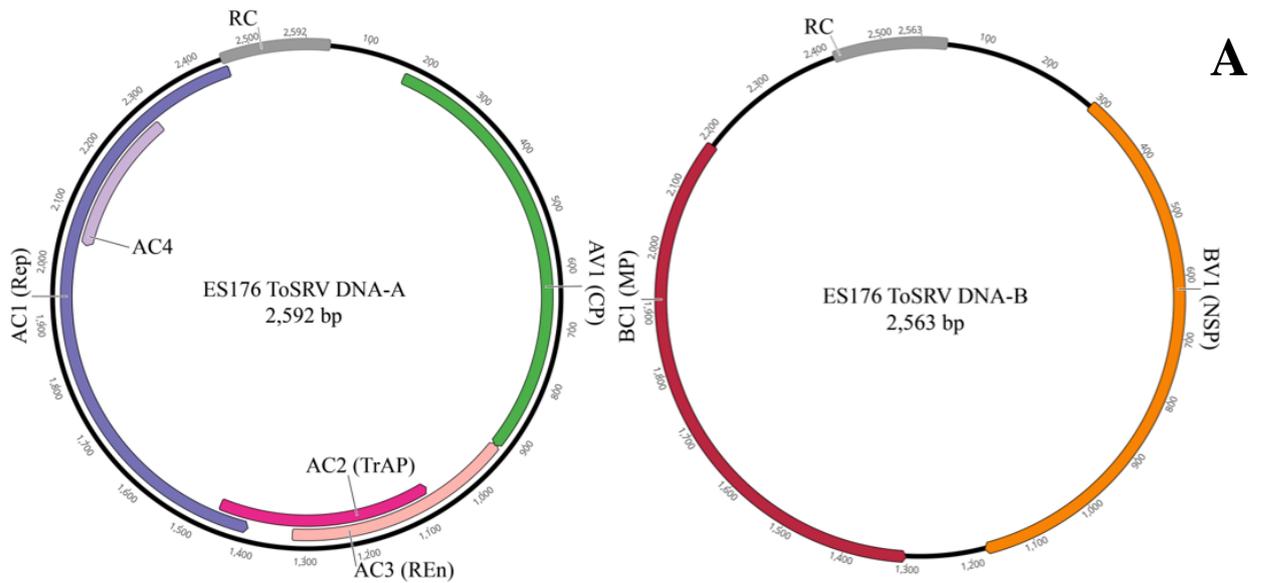
A diversidade viral no estado de Minas Gerais foi menor que aquelas observadas no Espírito Santo e Rio de Janeiro, tendo sido detectadas três espécies virais: ToCmMV, ToMLCV e ToSRV. A espécie ToCmMV foi a predominante no intervalo amostral entre os anos de 2016 e 2018.

A predominância da espécie ToCmMV nos estados do ES e RJ sendo gradativamente (e em alguns casos abruptamente) sobreposta pela predominância da espécie ToSRV. Essa mudança pode ser explicada, em parte, pelo incremento no uso de híbridos contendo o fator de resistência *Ty-1* nestas regiões. De fato, a partir dos anos de 2015 e 2016 (**Figura 9, A e C**), a distribuição de frequência viral sugere que os isolados de ToCmMV encontrados nesses estados não foram capazes de se adaptar e/ou superar esse fator de resistência, abrindo espaço para expansão da espécie ToSRV. Por sua vez, o ToSRV demonstra ser, aparentemente, um vírus mais adaptado e/ou que apresenta uma maior capacidade de replicação em plantas contendo esse fator de resistência. De fato, ToSRV vem sendo catalogado em diferentes levantamentos como a espécie de begomovírus predominante também em diversas outras regiões, especialmente no Centro-Sul do país onde variedades com o fator de resistência *Ty-1* também têm sido utilizadas com maior frequência (FERNANDES, 2015). Além disso, a grande incidência de ToSRV pode ser atribuída a sua maior eficiência de transmissão pelo vetor *B. tabaci* (TOLOY et al., 2018) e também por apresentar um círculo de plantas hospedeiras mais amplo (BARBOSA et al., 2009, 2011b; BEZERRA-AGASIE et al., 2006; MACEDO et al., 2017; MOURA et al., 2018). No estado de Minas Gerais o aumento de isolados obtidos de plantas contendo o gene de resistência *Ty-1*, também se ampliou a partir do ano de 2016 (**Figura 9, B**). No entanto, aparentemente, ainda não interferiu no balanço ToCmMV/ToSRV. Esse resultado sugere que os isolados de ToCmMV dessa região estão mais bem adaptados e podem representar um subgrupo viral capaz infectar/replicar em plantas contendo o fator de resistência *Ty-1*. Para confirmar essa hipótese se fazem necessárias novas e mais robustas ações de coleta e caracterização viral nessa região após a introdução de cultivares híbridas resistentes.

### 5.3 Sequências completas do componente DNA-A que foram recuperadas no presente estudo

Foram recuperadas 30 sequências completas do componente DNA-A, (cinco da espécie ToCmMV; 22 da espécie ToSRV, uma da espécie ToICV, uma de EuYMV e uma de SiYNV). Merece destaque o isolado ES-176 que representa o primeiro relato da espécie ToSRV infectando *Physalis* sp. em condições naturais. Foram sequenciados os componentes DNA-A e DNA-B por completo deste isolado para avaliar se de fato o isolado possuía dois componentes virais, se os componentes eram cognatos (verificação dos interons) e distância genética (**Figura 10**). Além disso, um dos isolados com similaridade de sequência nucleotídica de 92% com ToICV (isolado RJ-019) foi identificado como uma provável nova estirpe. Foram também caracterizados um isolado da espécie EuYMV (isolado ES-148) e um isolado da espécie SiYNV (isolado RJ-018), ambas ainda não relatadas infectando o tomateiro em condições naturais.

Dados sobre os isolados sequenciados, cujo componente DNA-A completo foi recuperado, podem ser observados na **Tabela 3**. Os demais isolados não puderam ser recuperados por completo com os *primers* universais. A análise dos eletroferogramas obtidos destes isolados revelaram picos elevados e duplos e múltiplos *contigs*. As análises via Blastn revelaram que cada *contig* poderia ser uma espécie distinta, indicando a presença de infecções mistas. A identificação das espécies virais presentes nestas amostras demandaria a clonagem dos amplicons que não foi realizada no presente trabalho.



**C**

	A_	B_
A_		95.580%
B_	95.580%	

**Figura 10:** Organização genômica do isolado ES-176. **A:** diagrama dos componentes DNA-A e DNA-B completo; AV1: 756 pb, AC1: 1.059, AC2: 390, AC3: 399, AC4: 264, BV1: 894 e BC1: 882. **B:** itérons comprovando que os componentes são cognatos e nonanucleotídeo. **C:** distância genética entre os dois componentes.

**Tabela 4:** Lista de isolados para os quais foi possível sequenciar o componente DNA-A por completo no presente estudo.

<b>Isolado</b>	<b>Data da Coleta</b>	<b>Local da Coleta</b>	<b>Espécie Viral (DNA-A)</b>	<b>BLATSn (%)</b>	<b>Acesso (GenBank)</b>
<b>ES-007</b>	nov/09	Venda Nova do Imigrante – ES	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99%	KT203558
<b>ES-051</b>	set/12	Santa Tereza – ES	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99%	KT203558
<b>ES-103</b>	jan/13	Santa Maria de Jetibá – ES	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99%	KT203558
<b>ES-111</b>	abr/13	Venda Nova do Imigrante – ES	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99%	KT203558
<b>ES-113</b>	abr/15	Venda Nova do Imigrante – ES	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99%	KT203558
<b>ES-117</b>	mar/15	Venda Nova do Imigrante – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99%	KC004075
<b>ES-120</b>	abr/15	Venda Nova do Imigrante – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196
<b>ES-144</b>	fev/16	Santa Maria de Jetibá – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196
<b>ES-146</b>	mar/16	Domingos Martins – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196
<b>ES-148</b>	mar/16	Domingos Martins – ES	<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>	96%	KY559532
<b>ES-173</b>	jun/16	Venda Nova do Imigrante – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196
<b>ES-176</b>	jun/16	Venda Nova do Imigrante – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196
<b>ES-183</b>	jul/16	Venda Nova do Imigrante – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196
<b>ES-187</b>	out/10	Afonso Cláudio – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196
<b>ES-196</b>	nov/16	Domingos Martins – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196

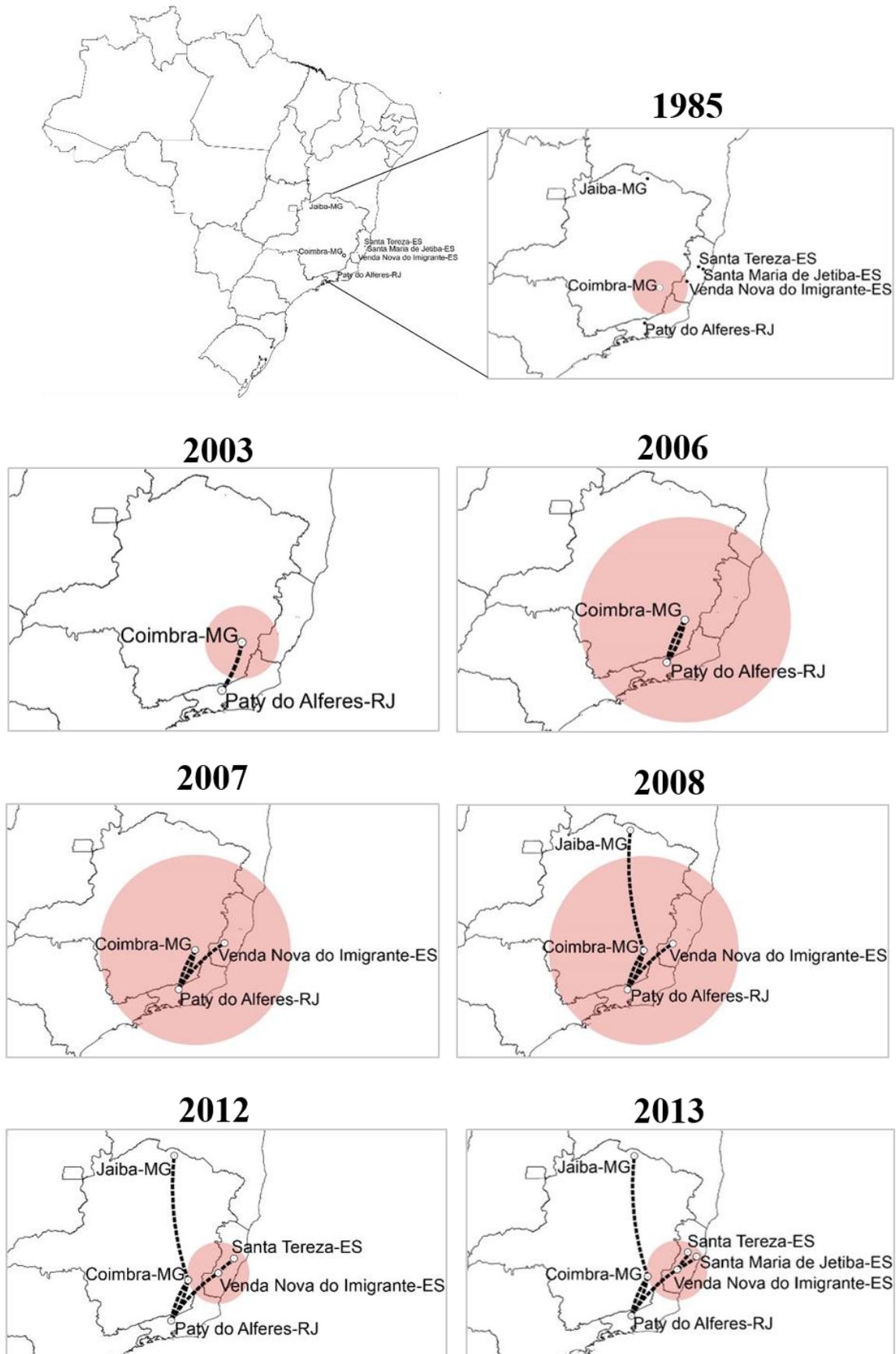
<b>ES-202</b>	nov/16	Afonso Cláudio – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196
<b>ES-206</b>	abr/17	Vargem Alta – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196
<b>ES-255</b>	nov/17	Santa Maria do Jetibá – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99%	JX415196
<b>ES-271</b>	nov/17	Venda Nova – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	97%	JX415196
<b>ES-285</b>	mar/18	Domingos Martins – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196
<b>ES-286</b>	mar/18	Domingos Martins – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196
<b>ES-287</b>	mar/18	Domingos Martins – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196
<b>ES-288</b>	mar/18	Domingos Martins – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196
<b>ES-289</b>	mar/18	Domingos Martins – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196
<b>ES-290</b>	mar/18	Domingos Martins – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196
<b>ES-291</b>	mar/18	Domingos Martins – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196
<b>ES-292</b>	mar/18	Domingos Martins – ES	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196
<b>RJ-018</b>	jul/06	São José do Ubá – RJ	<i>Sida yellow net virus</i>	98%	JX871376
<b>RJ-019</b>	jul/06	São José do Ubá – RJ	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	92%	JF803253
<b>RJ-071</b>	mar/16	Trajano de Moraes – RJ	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98%	JX415196

#### 5.4 Análises filogeográficas

As análises de reconstrução da filogeografia permitiram identificar que a espécie ToCmMV teve como seu ancestral mais próximo isolados originários da cidade de Coimbra em Minas Gerais, há cerca de 37 anos atrás (**Figuras 10 e 11**). Os dados indicam que a população de ToCmMV se manteve estável até o ano 2003, quando ocorreram os primeiros eventos de migração para cidade de Paty do Alferes no Rio de Janeiro. Porém, somente a partir do ano de 2006 é que os eventos de migração se tornaram mais intensos, de Paty do Alferes ocorreram eventos de migração para cidades Coimbra (2006) e Venda Nova do Imigrante (2007) no Espírito Santo; de Coimbra para Jaíba, ainda em Minas Gerais (2008) e de Venda Nova do Imigrante para Santa Tereza (2012) e Santa Maria do Jetibá (2013), todas localidades geograficamente próximas na região serrana do estado do Espírito Santo (**Figuras 10 e 11**). A árvore filogenética inferida a partir das análises filogeográficas de isolados de ToCmMV (**Figura 10**) apresentou três clados: o primeiro clado, contendo isolados de Coimbra e Jaíba e o segundo, contendo isolados de Paty do Alferes. Esses resultados indicam que esses isolados permaneceram agrupados nessas regiões (MG e RJ) e atingiram relativa estabilidade genética. Levando em consideração os dados recentes das coletas realizadas em MG (**Anexo 1**), ToCmMV permanece bem adaptado à região e, conforme foi mencionado anteriormente, mesmo com o aumento do uso de plantas com o fator de resistência *Ty-1* em condições de campo (**Figura 9, B**) esta espécie viral vem se mostrando capaz de infectar e replicar nessas plantas pois ainda apresenta frequências elevadas até o ano de 2018. O terceiro clado, contendo isolados de Venda Nova do Imigrante, Santa Tereza e Santa Maria de Jetibá, mostra que ocorreu um grande fluxo de migrações entre as três regiões, que pode significar que a espécie se adaptou bem ao nicho ecológico dessas localidades 2012 e 2015. A espécie ToCmMV também foi relatada como a predominante no estado do ES entre os anos de 2007 e 2011 (BARBOSA et al., 2016). No entanto, a partir do ano de 2016 isolados desta espécie não foram recuperados em coletas subsequentes, indicando a presença de algum fator e/ou fatores ambientais de instabilidade, incluindo o emprego de cultivares com o fator de resistência *Ty-1* (**Figura 9, A**).

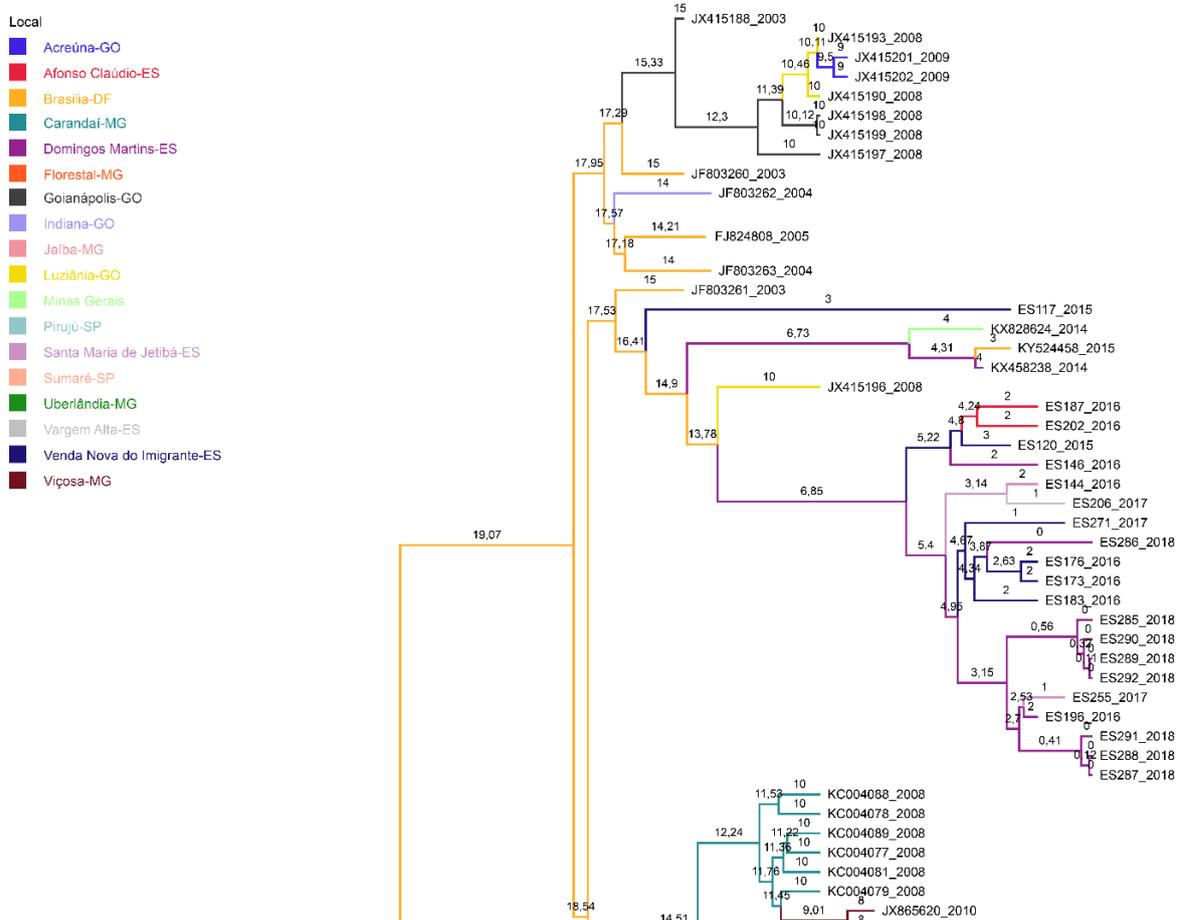


**Figura 11:** Filogeografia de todos os genomas com componentes DNA-A completos da espécie *Tomato common mosaic virus* – ToCmMV disponíveis no Genbank bem como de isolados sequenciados no presente trabalho. Os valores nos ramos indicam os anos.

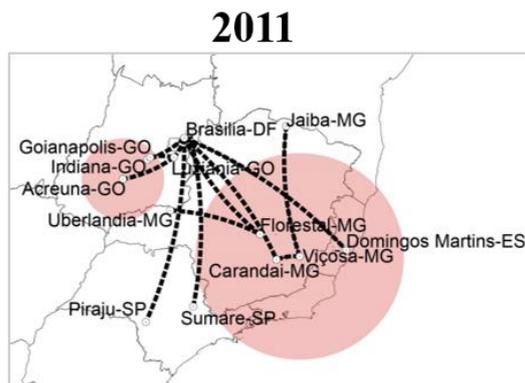
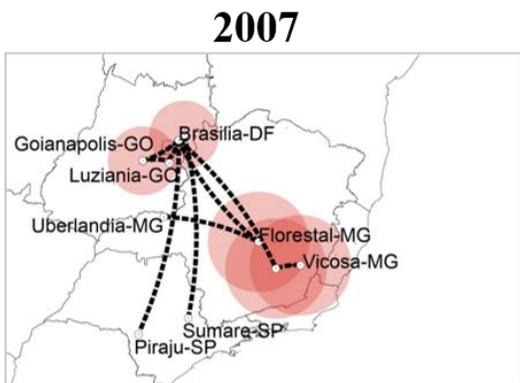
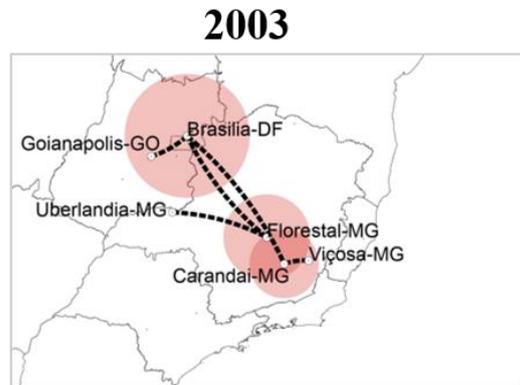
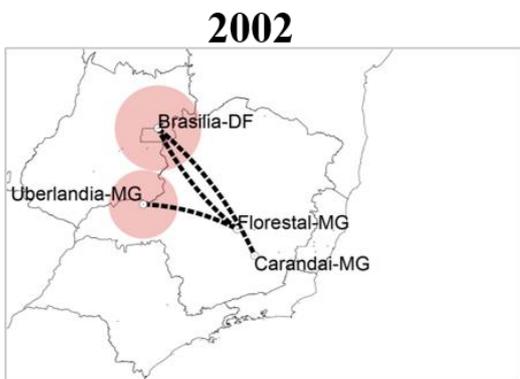
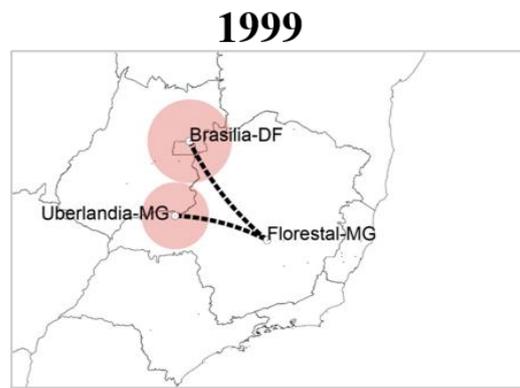
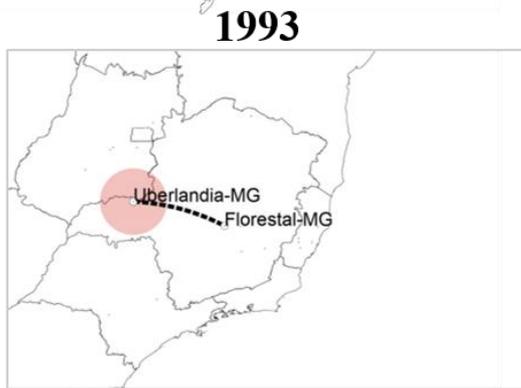
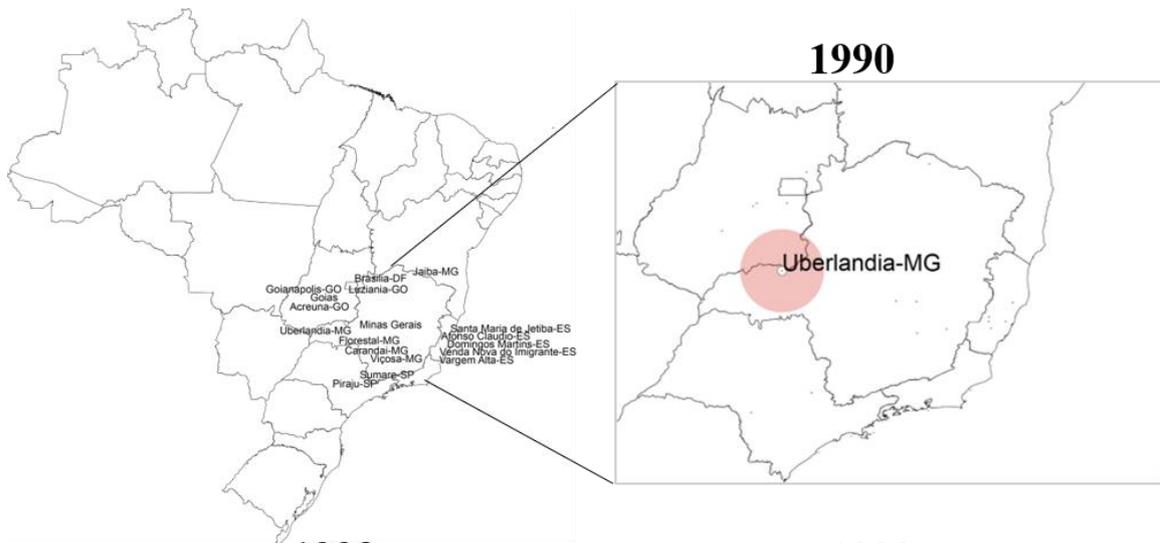


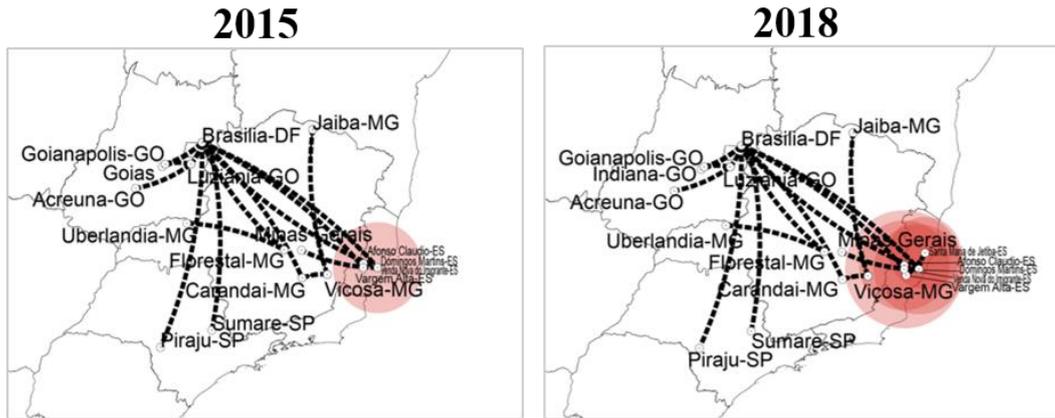
**Figura 12.** Perfil de distribuição da espécie *Tomato common mosaic virus* - ToCmMV, baseado nas análises filogeográficas, gerado no programa SPREAD3. O raio dos círculos em vermelho é determinado conforme o número de linhagens que compartilham o mesmo estado ancestral.

As análises de reconstrução da filogeografia da espécie ToSRV permitiram identificar que ancestral mais próximo tem como origem a cidade de Uberlândia no (localizada no Triângulo Mineiro, uma região tradicionalmente produtora de tomate para mesa) em Minas Gerais, há cerca de 34 anos atrás (**Figuras 12 e 13**), e teve seu primeiro evento de migração para cidade de Florestal em Minas Gerais no ano de 1993 e migrou para Brasília no ano de 1999, de onde partiram grandes fluxos de migração a partir do ano de 2005, para várias regiões do centro-oeste e sudeste do país (**Figuras 12 e 13**). Os padrões de distribuição que puderam ser observados na árvore filogenética (**Figura 12**) sugerem que Brasília foi a cidade responsável pela disseminação da espécie para as demais regiões. Além disso, também foi possível observar um grande fluxo da espécie entre os isolados coletados no estado do ES entre as cidades de Domingos Martins, Venda Nova do Imigrante, Afonso Cláudio e Vargem Alta, que provavelmente evoluíram de forma conjunta, o que pode ser explicado pela proximidade entre as cidades. A grande incidência e o elevado fluxo de migrações da espécie ToSRV pode ter forte influência na sua relação com o vetor *B. tabaci* (GOUVÊA et al., 2017) e a sua capacidade de infectar várias outras plantas (BARBOSA et al., 2011b) que podem servir de fonte de inóculo posteriormente.









**Figura 14:** Perfil de distribuição da espécie *Tomato severe rugose virus* – ToSRV, baseado nas análises filogeográficas, gerado no programa SPREAD3. O raio dos círculos em vermelho é determinado conforme o número de linhagens que compartilham o mesmo estado ancestral.

## 6. CONCLUSÃO

O emprego de materiais portadores do fator de resistência *Ty-1* apresentou um aparente impacto com relação à presença de isolados de ToCmMV nos estados do ES e RJ, uma vez que as coletas com isolados recuperados desta espécie diminuíram drasticamente a partir do ano de 2016, ano em que também foi documentado um maior emprego de cultivares híbridas portadoras do gene. No entanto, o uso de materiais resistentes portadores do fator de resistência *Ty-1* ainda não apresentou similar impacto nas populações de ToCmMV na região de MG da região, que continuou apresentando frequência considerável dessa espécie viral.

Nos estados do ES e RJ a predominância de isolados de ToCmMV foram sendo gradativamente sobrepostos pela predominância de isolados de ToSRV. Além disso, o ToSRV também foi encontrado com uma frequência considerável no estado de MG.

Com bases nas análises realizadas nesse estudo, podemos concluir que isolados da espécie ToCmMV são mais bem adaptados as regiões do bioma Mata Atlântica, não havendo, até o presente momento, registros de eventos de migração deste vírus para outras regiões do Brasil.

Isolados de ToCmMV se mostraram ainda mais adaptados ao estado de MG, onde muitos destes isolados foram encontrados infectando plantas detentoras do fator de resistência *Ty-1*. Poucos são os estudos relacionados ao ToCmMV, talvez por se tratar de uma espécie endêmica dessa região. A redução da representatividade de ToCmMV no últimos anos no ES e RJ observada no presente estudo, bem como o fato desta espécie ainda estar frequente na região de MG (mesmo com o aumento do uso de materiais portadores do fator de resistência *Ty-1*), torna necessário análises mais aprofundadas com relação essa espécie e os mecanismos que possam estar envolvidos em sua permanência e superação/adaptação a esse fator de resistência nessa região, a fim de se evitar que surtos da espécie possam ocorrer futuramente.

A prevalência de isolados de ToSRV bem como a sua alta incidência em todas as regiões estudadas, comprova que este vírus é altamente adaptado ao tomateiro e tem, muito provavelmente, uma relação vírus/vetor extremamente eficiente (GOUVÊA et al., 2017; TOLOY et al., 2018). Além disso, os isolados possuem capacidade adaptativa mais elevada, que se manifesta pela sua capacidade de infectar diversas plantas em diferentes

famílias botânicas (BARBOSA et al., 2009, 2011b; BEZERRA-AGASIE et al., 2006; MACEDO et al., 2017; MOURA et al., 2018). Este conjunto de atributos pode trazer grande influência na permanência de isolados de ToSRV em campo, mesmo quando são implementadas medidas de controle, tais como as de vazão sanitário em que o cultivo de tomate é interrompido durante 60 a 120 dias consecutivos. Em relação aos isolados de ToSRV, o vazão sanitário se torna menos eficiente, pois mesmo sem a presença da hospedeira principal no campo este vírus persiste no ambiente através da infecção de outras hospedeiras alternativas que se tornam fonte de inóculo primário quando o cultivo do tomateiro volta a ser realizado.

Mesmo com o uso de cultivares contendo o fator de resistência *Ty-1* têm-se observado uma frequência considerável de infecções por begomovirose em algumas regiões produtoras estudadas no presente trabalho. Desta forma, torna-se de grande importância estudos relacionados à busca de novas fontes de resistência de begomovirus em tomateiro, para que se possa produzir cultivares apresentando vários fatores que sejam capazes de conferir elevados níveis de resistência a uma ampla variedade de espécies virais.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGEITEC, A. E. DE I. T. **Potyviroses**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/pimenta/arvore/CONT000gvxs5g3t02wx7ha0g934vvggzmktsa.html>>. Acesso em: 23 ago. 2018.

ALTSCHUL, S. F. et al. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs** *Nucleic Acids Research*. [s.l.] Oxford University Press, 1997.

ALVARENGA, M. A. R. **Influência da idade da muda no transplante sobre o comportamento de três cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.)**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG., 1976.

AMMAR, E. D. et al. Large accumulations of maize streak virus in the filter chamber and midgut cells of the leafhopper vector *Cicadulina mbila*. **Archives of Virology**, v. 154, n. 2, p. 255–262, 17 fev. 2009.

ANDRADE, E. C. et al. 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**, v. 87, n. 12, p. 3687–3696, 1 dez. 2006.

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**, v. 146, n. 8, p. 1465–1485, 2001.

ÁVILA, A. C. DE et al. Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 655–658, set. 2004.

AZZAM, O. et al. Whitefly Transmission and Efficient ssDNA Accumulation of Bean Golden Mosaic Geminivirus Require Functional Coat Protein. **Virology**, v. 204, n. 1, p. 289–296, 1 out. 1994.

BAHDER, B. W. et al. Phylogeny of Geminivirus Coat Protein Sequences and Digital PCR Aid in Identifying *Spissistilus festinus* as a Vector of Grapevine red blotch-associated virus. **Phytopathology**, v. 106, n. 10, p. 1223–1230, 27 out. 2016.

BARBOSA, J. C. et al. First Report of Tomato chlorosis virus Infecting Tomato Crops in Brazil. **Plant Disease**, v. 92, n. 12, p. 1709–1709, 13 dez. 2008.

BARBOSA, J. C. et al. Natural infection of *Nicandra physaloides* by Tomato severe rugose virus in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, n. 6, p. 440–443, 30 dez. 2009.

BARBOSA, J. C. et al. Occurrence of Tomato chlorosis virus in tomato crops in five Brazilian states. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 4, p. 256–258, 2011a.

BARBOSA, J. C. et al. Characterization and experimental host range of a Brazilian tomato isolate of Tomato severe rugose virus. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 9,

p. 644–646, 2011b.

BARBOSA, J. C. et al. Occurrence and molecular characterization of Tomato common mosaic virus (ToCmMV) in tomato fields in Espírito Santo state, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 62–66, 2016.

BARBOSA, L. DA F. et al. Indigenous American species of the Bemisia tabaci complex are still widespread in the Americas. **Pest Management Science**, v. 70, n. 10, p. 1440–1445, 1 out. 2014.

BARRETO, S. S. et al. A Study of Weeds as Potential Inoculum Sources for a Tomato-Infecting Begomovirus in Central Brazil. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 436–444, 2013.

BERNARDO, P. et al. Identification and characterisation of a highly divergent geminivirus: Evolutionary and taxonomic implications. **Virus Research**, v. 177, n. 1, p. 35–45, 1 out. 2013.

BERNARDO, P. et al. Molecular characterization and prevalence of two capulaviruses: Alfalfa leaf curl virus from France and Euphorbia caput-medusae latent virus from South Africa. **Virology**, v. 493, p. 142–153, 1 jun. 2016.

BEZERRA-AGASIE, I. C. et al. First Report of *Tomato severe rugose virus* in Chili Pepper in Brazil. **Plant Disease**, v. 90, n. 1, p. 114–114, 7 jan. 2006.

BEZERRA, I. C. et al. Increase of Tospoviral Diversity in Brazil with the Identification of Two New Tospovirus Species, One from Chrysanthemum and One from Zucchini. **Phytopathology**, v. 89, n. 9, p. 823–830, 1999.

BISARO, D. M. Geminivirus DNA Replication. **DNA replication in eukaryotic cells**, v. 31, p. 833–854, 1996.

BOITEUX, L. S. 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**, v. 124, n. 1, p. 32–38, 1 jan. 1999.

BOITEUX, L. S. et al. Reaction of tomato hybrids carrying the Ty-1 locus to Brazilian bipartite Begomovirus species. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 20–23, mar. 2007.

BRIDDON, R. W. et al. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, v. 177, n. 1, p. 85–94, 1990.

BRIDDON, R. W. et al. Analysis of the Nucleotide Sequence of the Treehopper-Transmitted Geminivirus, Tomato Pseudo-Curly Top Virus, Suggests a Recombinant Origin. **Virology**, v. 219, n. 2, p. 387–394, 15 maio 1996.

BRIDDON, R. W. et al. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, 2010a.

BRIDDON, R. W. et al. Turnip curly top virus, a highly divergent geminivirus infecting turnip in Iran. **Virus Research**, v. 152, n. 1–2, p. 169–175, set. 2010b.

BROWN, J. K. et al. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence

- comparisons. **Archives of Virology**, v. 160, n. 6, p. 1593–1619, 2015.
- BULL, S. E. et al. Infectivity, pseudorecombination and mutagenesis of Kenyan cassava mosaic begomoviruses. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 5, p. 1624–1633, 2007.
- CALEGARIO, R. F. et al. Caracterização de um isolado do Begomovirus Sida micrantha virus (SimMV) obtido de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. S150, 2004.
- CASTILLO-URQUIZA, G. P. et al. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, v. 153, n. 10, p. 1985–1989, 2008.
- CASTILLO, A. G. et al. Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (REn) and viral replication protein (Rep). **Virology**, v. 312, n. 2, p. 381–394, 2003.
- COLARICCIO, A. O impacto das viroses na cultura do tomateiro, 2004. **Arquivos Unicamp**. <http://www.agr.unicamp.br/tomates/pdfs/impacviro.pdf>.
- COSTA, A. S. Whitefly-transmitted plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 14, n. 1, p. 429–449, 28 set. 1976.
- COTRIM, A. de A. et al. Diversidade genética de begomovirus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 3, p. 300–303, 2007.
- DARWIN, S. C.; KNAPP, S.; PERALTA, I. E. Taxonomy of tomatoes in the galápagos islands: Native and introduced species of solarium section lycopersicon (solanaceae). **Systematics and Biodiversity**, v. 1, n. 1, p. 29–53, 2003.
- DE BARRO, P. J. et al. Bemisia tabaci: A Statement of Species Status. **Annual Review of Entomology**, v. 56, n. 1, p. 1–19, 7 jan. 2011.
- DINSDALE, A. et al. Refined Global Analysis of Bemisia tabaci (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) Mitochondrial Cytochrome Oxidase 1 to Identify Species Level Genetic Boundaries. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 103, n. 2, p. 196–208, 1 mar. 2010.
- DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 5, p. 1185–1192, 9 fev. 2005.
- DUFFY, S.; HOLMES, E. C. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: Phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 6, p. 1539–1547, 2009.
- DUFFY, S.; SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 4, p. 267–276, 4 abr. 2008.
- ETESSAMI, P. et al. Delimitation of essential genes of cassava latent virus DNA 2. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 11, p. 4811–4829, 10 jun. 1988.

- FAO. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION**. 2017 Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em: 8 ago. 2018.
- FAUQUET, C. M. et al. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. **Arch Virol**, v. 153, p. 783–821, 2008.
- FERNANDES, F. R. et al. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, v. 36, n. 1, p. 251–258, 2008.
- FERNANDES, N. A. N. **Begomoviroses no cultivo do tomateiro no Brasil: variabilidade e caracterização de novas espécies virais e diversidade do vetor *Bemisia tabaci***. [s.l.] UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA, 2015.
- FERRO, D. D. X. **Estudos com o locus *Ty-1* do tomateiro e busca por novos marcadores moleculares para tolerância ao *Tomato severe rugose virus***. [s.l.] Universidade de Brasília - UnB, 2013.
- FLORES, E. ; SILBERSCHMIDT, K. ; KRAMER, M. Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. **O Biológico**, v. 26, p. 65–69, 1960.
- FONTENELE, R. S. et al. Discovery of the first maize-infecting mastrevirus in the Americas using a vector-enabled metagenomics approach. **Archives of Virology**, v. 163, n. 1, p. 263–267, 27 jan. 2018.
- FONTENELLE, M. R. et al. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus Tomato chlorotic mottle virus. **Virus Research**, v. 126, p. 262–267, 2007.
- FONTES, E. P.; LUCKOW, V. A.; HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. **The Plant cell**, v. 4, n. 5, p. 597–608, 1992.
- FONTES, M. G. **Estudo da interação tospovírus – tomateiro: Análise transcritômica, espectro da resistência no acesso ‘PI 203230’ e identificação de novas hospedeiras de Groundnut ringspot virus (GRSV)**. [s.l.] UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, 2017.
- FRISCHMUTH, T.; STANLEY, J. Printed in Great Britain Recombination between viral DNA and the transgenic coat protein gene of African cassava mosaic geminivirus. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 1265–1271, 1998.
- GAFNI, Y.; EPEL, B. L. The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 60, n. 5, p. 231–241, 1 maio 2002.
- GALVÃO, R. M. et al. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 3, p. 715–726, 1 mar. 2003.
- GARCÍA-ARENAL, F.; FRAILE, A.; MALPICA, J. M. Variability and genetic structure of plant virus populations. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, n. 1, p. 157–186, set. 2001.

GIORDANO, L. B. et al. Inheritance of resistance to the bipartite Tomato chlorotic mottle begomovirus derived from *Lycopersicon esculentum* cv. "Tyking". **Euphytica**, v. 143, n. 1–2, p. 27–33, jan. 2005.

GOTZ, M. et al. Implication of *Bemisia tabaci* Heat Shock Protein 70 in Begomovirus-Whitefly Interactions. **Journal of Virology**, v. 86, n. 24, p. 13241–13252, 15 dez. 2012.

GOUVÊA, M. M. et al. Bioassay of insecticides on mortality of *Bemisia tabaci* biotype B and transmission of Tomato severe rugose virus (ToSRV) on tomatoes. **Phytoparasitica**, v. 45, n. 1, p. 95–101, 11 fev. 2017.

GRONING, B. R.; HAYES, R. J.; BUCK, K. W. Simultaneous regulation of tomato golden mosaic virus coat protein and AL1 gene expression: Expression of the AL4 gene may contribute to suppression of the AL1 gene. **Journal of General Virology**, v. 75, n. 4, p. 721–726, 1994.

GUTIERREZ, C. **Geminivirus DNA replication Cellular and Molecular Life Sciences** Birkhäuser Verlag, , 1 out. 1999. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s000180050433>>. Acesso em: 31 maio. 2018

GUTIERREZ, C. **Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference Physiological and Molecular Plant Pathology** Academic Press, , 1 maio 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0885576502904017>>. Acesso em: 6 maio. 2018

GUTIERREZ, C. et al. **Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions.** Veterinary Microbiology. **Anais...**2004 Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S0378113503003262/1-s2.0-S0378113503003262-main.pdf?\\_tid=69dc2dab-a937-4366-82b7-30f9f3683ee3&acdnat=1524498455\\_145bc9e69d7c618b58085fd3b6f1704e](https://ac.els-cdn.com/S0378113503003262/1-s2.0-S0378113503003262-main.pdf?_tid=69dc2dab-a937-4366-82b7-30f9f3683ee3&acdnat=1524498455_145bc9e69d7c618b58085fd3b6f1704e)>. Acesso em: 23 abr. 2018

HA, C. et al. Corchorus yellow vein virus, a New World geminivirus from the Old World. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 4, p. 997–1003, 2006.

HADFIELD, J. et al. Molecular characterisation of dicot-infecting mastreviruses from Australia. **Virus Research**, v. 166, n. 1–2, p. 13–22, 1 jun. 2012.

HAMILTON, W.D.O., BISARO, D.M., COUTTS, R.H.A., BUCK, K. . Demonstration of the bipartite nature of the genome of a single stranded DNA virus by infection with cloned DNA components. **Nucleic Acids Res**, v. 11, n. 21, p. 7387–7396, 1983.

HANLEY-BOWDOIN, L. et al. **Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation.** [s.l.] Taylor & Francis Group, 1999. v. 18

HANLEY-BOWDOIN, L. et al. Geminiviruses: Masters at redirecting and reprogramming plant processes. **Nature Reviews Microbiology.** Nature Publishing Group, , 8 nov. 2013.

HANSON, P. M. et al. Mapping a Wild Tomato Introgression Associated with Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance in a Cultivated Tomato Line. **Journal of American**

- Society for Horticultural Science**, v. 125, n. 1251, p. 15–2015, 1 jan. 2000.
- HARRISON, B. D. Advances in Geminivirus Research. **Ann. Rev. Phytopathol**, v. 23, p. 55–82, 1985.
- HARRISON, B. D.; SWANSON, M. M.; FARGETTE, D. Begomovirus coat protein: Serology, variation and functions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 60, n. 5, p. 257–271, 2002.
- HEHNLE, S.; WEGE, C.; JESKE, H. Interaction of DNA with the Movement Proteins of Geminiviruses Revisited. **Journal of Virology**, v. 78, n. 14, p. 7698–7706, 15 jul. 2004.
- HEYDARNEJAD, J. et al. Fulfilling Koch's postulates for beet curly top Iran virus and proposal for consideration of new genus in the family Geminiviridae. **Archives of Virology**, v. 158, n. 2, p. 435–443, 19 fev. 2013.
- HEYRAUD, F. et al. The conserved nonanucleotide motif of the geminivirus stem-loop sequence promotes replicational release of virus molecules from redundant copies. **Biochimie**, v. 75, n. 7, p. 605–615, 1993.
- HOROWITZ, R.; DENHOLM, I.; MORIN, S. Resistance to insecticides in the TYLCV vector, *Bemisia tabaci*. In: **Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 305–325.
- HUTTON, S. F.; SCOTT, J. W.; SCHUSTER, D. 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**, v. 47, n. 3, p. 324–327, 2012.
- IBGE. **IBGE - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola LSPA**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>>. Acesso em: 8 ago. 2018.
- ICTV. **International Committee on Taxonomy of Viruses**. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 3 ago. 2018.
- INOUE-NAGATA, A. K. et al. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, v. 116, p. 209–211, 2004.
- INOUE-NAGATA, A. K.; LIMA, M. F.; GILBERTSON, R. L. A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 8–18, mar. 2016.
- JENKINS, J. A. The origin of the cultivated tomato. **Economic Botany**, v. 2, n. 4, p. 379–392, out. 1948.
- Jl, Y. et al. Sources of resistance, inheritance, and location of genetic loci conferring resistance to members of the tomato-infecting begomoviruses. In: **Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 343–362.
- Jl, Y. et al. Molecular Mapping of Ty-4 , a New Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Locus on Chromosome 3 of Tomato. **Journal of the American Society for**

**the Horticultural Science**, v. 134, n. 2, p. 281–288, 1 mar. 2009.

JUPIN, I. et al. Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): Involvement of the protein encoded by ORF C4. **Virology**, v. 204, n. 1, p. 82–90, 1 out. 1994.

KAMALI, M. et al. Molecular diversity of turncurtoviruses in Iran. **Archives of Virology**, v. 161, n. 3, p. 551–561, 26 mar. 2016.

KIKUNO, R. et al. Sequence similarity between putative gene products of geminiviral DNAs. **Nature**, v. 308, n. 5959, p. 562, 5 abr. 1984.

KOONIN, E. V; IYINA, T. V. Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. **Journal of General Virology**, v. 73, 1992.

KRABERGER, S. et al. Evidence that dicot-infecting mastreviruses are particularly prone to inter-species recombination and have likely been circulating in Australia for longer than in Africa and the Middle East. **Virology**, v. 444, n. 1–2, p. 282–291, 1 set. 2013.

KRENZ, B. et al. Grapevine red blotch-associated virus Is Widespread in the United States. **Phytopathology**, v. 104, n. 11, p. 1232–1240, 22 nov. 2014.

KUMAR, V. et al. Mungbean yellow mosaic Indian virus encoded AC2 protein suppresses RNA silencing by inhibiting Arabidopsis RDR6 and AGO1 activities. **Virology**, v. 486, p. 158–172, 1 dez. 2015.

LANFERMEIJER, F. C.; WARMINK, J.; HILLE, J. The products of the broken Tm-2 and the durable Tm-22 resistance genes from tomato differ in four amino acids. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 421, p. 2925–2933, 1 nov. 2005.

LAUFS, J. et al. Geminivirus replication: Genetic and biochemical characterization of rep protein function, a review. **Biochimie**, v. 77, n. 10, p. 765–773, 1995.

LAZAROWITZ, S. G.; SHEPHERD, R. J. Critical Reviews in Plant Sciences Geminiviruses: Genome structure and gene function Geminiviruses: Genome Structure and Gene Function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 11, n. 4, p. 327–349, 1992.

LI, F. et al. The AC5 protein encoded by *Mungbean yellow mosaic India virus* is a pathogenicity determinant that suppresses RNA silencing-based antiviral defenses. **New Phytologist**, v. 208, n. 2, p. 555–569, 1 out. 2015.

LIMA, A. T. M. et al. The diversification of begomovirus populations is predominantly driven by mutational dynamics. **Virus Evolution**, v. 3, n. 1, p. vex005, 2017.

LIMA, M. F. et al. Distribuição de geminivírus nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 81–85, 2001.

LOCONSOLE, G. et al. Identification of a single-stranded DNA virus associated with citrus chlorotic dwarf disease, a new member in the family Geminiviridae. **Virology**, v. 432, n. 1, p. 162–172, 10 out. 2012.

- LOURENÇÃO, A. L. et al. Avaliação da resistência de acessos de tomateiro a tospovírus e a geminivírus. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 193–196, jun. 2004.
- LOURENÇÃO, A. L. et al. Resistência de cultivares e linhagens de tomateiro a Tomato chlorotic spot virus e a Potato virus Y. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 609–614, 2005.
- LOURENÇÃO, A. L.; NAGAI, H. Surto populacional de Bemisia tabaci no estado de São Paulo. **Bragantia**, v. 53, n. 1, p. 53–59, 1994.
- MA, Y. et al. Identification and molecular characterization of a novel monopartite geminivirus associated with mulberry mosaic dwarf disease. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 8, p. 2421–2434, 1 ago. 2015.
- MACEDO, M. A. et al. Characterization of tomato leaf curl purple vein virus, a new monopartite New World begomovirus infecting tomato in Northeast Brazil. **Archives of Virology**, v. 163, n. 3, p. 737–743, 9 mar. 2018.
- MACEDO, M. A. et al. First Report of Tomato severe rugose virus , a Tomato-Infecting Begomovirus, in Soybean Plants in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 11, p. 1959–1959, 25 nov. 2017.
- MALIK, P. S. et al. Interaction between coat protein and replication initiation protein of Mung bean yellow mosaic India virus might lead to control of viral DNA replication. **Virology**, v. 337, n. 2, p. 273–283, 2005.
- MEDINA, C. G. V. et al. Tomato apical leaf curl virus: A novel, monopartite geminivirus detected in tomatoes in Argentina. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 2665, 12 jan. 2018.
- MELGAREJO, T. A. et al. 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**, v. 87, n. 10, p. 5397–5413, 15 maio 2013.
- MICHELSON, I.; ZAMIR, D.; CZOSNEK, H. Accumulation and translocation of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in a Lycopersicon esculentum breeding line containing the L. chilense TYLCV tolerance gene Ty-1. **Phytopathology**, v. 84, n. 9, p. 928–933, 1994.
- MOREIRA, S. R. et al. Caracterização de uma nova estirpe do Tomato mosaic virus isolada de tomateiro no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 602–607, dez. 2003.
- MOURA, M. F. et al. First report of tomato severe rugose virus in eggplant. **Journal of Plant Pathology**, v. 100, n. 3, p. 599–599, 10 out. 2018.
- NAGAR, S. et al. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. **Plant Cell**, v. 7, n. 6, p. 705–719, jun. 1995.
- NASH, T. E. et al. Functional Analysis of a Novel Motif Conserved across Geminivirus Rep Proteins †. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 85, n. 3, p. 1182–1192, 2011.

NIZIO, D. A. DE C. et al. Caracterização de genótipos de tomateiro resistentes a begomovírus por marcador molecular co-dominante ligado ao gene Ty-1. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 12, p. 1699–1705, 2008.

NOGUEIRA, I. et al. **Detecção de Tomato chlorosis virus (Crinivirus, Closteroviridae) em tomateiro no Distrito Federal**. Anais XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA. Anais...Bento Gonçalves, RS: 2011Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/51322/1/1556.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2018

NOUEIRY, A. O.; LUCAS, W. J.; GILBERTSON, R. L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, v. 76, n. 5, p. 925–932, 11 mar. 1994.

OUATTARA, A. et al. New strains of chickpea chlorotic dwarf virus discovered on diseased papaya and tomato plants in Burkina Faso. **Archives of Virology**, v. 162, n. 6, p. 1791–1794, 22 jun. 2017.

PADIDAM, M.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. M. The role of AV2 ('precoat') and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. **Virology**, v. 224, n. 2, p. 390–404, 1996.

PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C. M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, v. 265, n. 2, p. 218–225, 1999.

PERALTA, I. E.; KNAPP, S.; SPOONER, D. M. New Species of Wild Tomatoes (Solanum Section Lycopersicon: Solanaceae) from Northern Peru. **Systematic Botany**, v. 30, n. 2, p. 424–434, 2005.

PILARTZ, M.; JESKE, H. Mapping of Abutilon Mosaic Geminivirus Minichromosomes. **Journal of Virology**, v. 77, n. 20, p. 10808–10818, 15 out. 2003.

PRADHAN, B. et al. Molecular Biology of Geminivirus DNA Replication. **Avid Science**, n. May, 2017.

RAMBAUT, A. et al. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). **Virus Evolution**, v. 2, n. 1, p. vew007, 10 jan. 2016.

RAZAVINEJAD, S. et al. Genetic diversity and host range studies of turnip curly top virus. **Virus Genes**, v. 46, n. 2, p. 345–353, 9 abr. 2013.

RIBEIRO, S. G. et al. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with new biotype of the whitefly vector. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. Plant Disease, St. Paul, v. 82, n. 7, p. 820, 1998.

ROCHA, C. S. et al. Brazilian Begomovirus Populations Are Highly Recombinant, Rapidly Evolving, and Segregated Based on Geographical Location. **Journal of Virology**, v. 87, n. 10, p. 5784–5799, 2013.

ROCHA, K. C. G. et al. Evaluation of resistance to Tomato severe rugose virus (ToSRV) in Capsicum spp. genotypes. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 5, p. 314–318, out.

2012.

RODRÍGUEZ-NEGRETE, E. et al. Geminivirus Rep protein interferes with the plant DNA methylation machinery and suppresses transcriptional gene silencing. **New Phytologist**, v. 199, n. 2, p. 464–475, jul. 2013.

ROJAS, M. R. Use of Degenerate Primers in the Polymerase Chain Reaction to Detect Whitefly-Transmitted Geminiviruses. **Plant Disease**, v. 77, n. 4, p. 340, 1993.

ROJAS, M. R. et al. Exploiting Chinks in the Plant's Armor: Evolution and Emergence of Geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, n. 1, p. 361–394, 2005.

ROJAS, M. R. et al. World Management of Geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, n. 1, p. 637–677, 25 ago. 2018.

ROUMAGNAC, P. et al. Alfalfa Leaf Curl Virus: an Aphid-Transmitted Geminivirus. **Journal of Virology**, v. 89, n. 18, p. 9683–9688, 2015.

SETTLAGE, S. B.; SEE, R. G.; HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus C3 Protein: Replication Enhancement and Protein Interactions. **Journal of Virology**, v. 79, n. 15, p. 9885–9895, 1 ago. 2005.

SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. Phylogenetic evidence for the rapid evolution of human B19 erythrovirus. **Journal of virology**, v. 80, n. 7, p. 3666–9, 2006.

SHARMA, P.; IKEGAMI, M. Tomato leaf curl Java virus V2 protein is a determinant of virulence, hypersensitive response and suppression of posttranscriptional gene silencing. **Virology**, v. 396, n. 1, p. 85–93, 5 jan. 2010.

SHEPHERD, D. N. et al. Maize streak virus: An old and complex “emerging” pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 1 jan. 2010.

SOTO, M. J.; GILBERTSON, R. L. Distribution and Rate of Movement of the Curtovirus Beet mild curly top virus (Family Geminiviridae ) in the Beet Leafhopper. **Phytopathology**, v. 93, n. 4, p. 478–484, 2003.

SOUZA, C. do A. et al. First Report of Sweet potato symptomless mastrevirus 1 Infecting Ipomoea batatas in Brazil. **Plant Disease**, p. PDIS-01-18-0083-PDN, 8 maio 2018.

STANLEY, J. 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**, v. 206, n. 1, p. 707–712, 1995.

STANLEY, J.; TOWNSEND, R.; CURSON, S. J. Pseudorecombinants between Cloned DNAs of Two Isolates of Cassava Latent Virus. **Journal of General Virology**, v. 66, n. 5, p. 1055–1061, 1985.

SUDARSHANA, M. R.; PERRY, K. L.; FUCHS, M. F. Grapevine Red Blotch-Associated Virus, an Emerging Threat to the Grapevine Industry. **Phytopathology**, v. 105, n. 7, p. 1026–1032, 25 jul. 2015.

SUNTER, G. et al. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required

for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. **Virology**, v. 179, n. 1, p. 69–77, 1990.

SUNTER, G.; BISARO, D. M. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. **Virology**, v. 180, n. 1, p. 416–419, 1 jan. 1991.

SUNTER, G.; HARTITZ, M. D.; BISARO, D. M. Tomato golden mosaic virus leftward gene expression: Autoregulation of geminivirus replication protein. **Virology**, v. 195, n. 1, p. 275–280, 1 jul. 1993.

TOBAR, L. L. M. **Avaliação de Mecanismos da Resistência Conferida pelo Gene Ty-1 Contra Tomato chlorotic mottle virus -ToCMoV na Linhagem de Tomate LAM 144R**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2013.

TOLOY, R. S. et al. Features of the relationship between Tomato severe rugose begomovirus and Bemisa tabaci MEAM1 reveal that the virus is acquired during a probe lasting only one minute. **European Journal of Plant Pathology**, v. 151, n. 2, p. 541–547, 2018.

TRINKS, D. et al. Suppression of RNA Silencing by a Geminivirus Nuclear Protein, AC2, Correlates with Transactivation of Host Genes. **Journal of Virology**, v. 79, n. 4, p. 2517–2527, 2005.

UNSELD, S. et al. Subcellular targeting of the coat protein of African cassava mosaic geminivirus. **Virology**, v. 286, n. 2, p. 373–383, 1 ago. 2001.

VANITHARANI, R. et al. Differential Roles of AC2 and AC4 of Cassava Geminiviruses in Mediating Synergism and Suppression of Posttranscriptional Gene Silencing. **Journal of Virology**, v. 78, n. 17, p. 9487–9498, set. 2004.

VARGAS-ASENCIO, J. A. et al. Detection of tomato chlorosis virus and its vector *Trialeurodes vaporariorum* in greenhouse-grown tomato and sweet pepper in the Cartago Province, Costa Rica. **Journal of Plant Pathology**, v. 95, n. 3, p. 627–630, 2013.

VARSANI, A. et al. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. **Archives of Virology**, v. 159, n. 8, p. 2193–2203, 22 ago. 2014.

VARSANI, A. et al. Capulavirus and Grablovirus: two new genera in the family Geminiviridae. **Archives of Virology**, v. 162, n. 6, p. 1819–1831, 2017.

YAZDI, H. R. B.; HEYDARNEJAD, J.; MASSUMI, H. Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. **Virus Genes**, v. 36, n. 3, p. 539–545, 10 jun. 2008.

ZAMIR, D. et al. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, TY-1. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, n. 2, p. 141–146, maio 1994.

ZELL, R. et al. ICTV virus taxonomy profile: Picornaviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 10, p. 2421–2422, 2017.

ZERBINI, F. M. et al. ICTV ICTV Virus Taxonomy Profile : Geminiviridae. **Journal of**

**General Virology**, v. 98, n. 2, p. 131–133, 1 fev. 2017.

**ANEXO 1** – Lista dos 277 isolados de begomovírus da coleção da EMBRAPA Hortaliças caracterizados previamente com os *primers* PAL1v1978/PAR1c496 (Rojas et al., 1993). Código do isolado, local e data de coleta (mês/ano), espécie viral com maior porcentagem de identidade, BLASTn (% de identidade) e número de acesso no GenBank correspondente a espécie viral. Os isolados foram analisados via sequenciamento de um segmento de aproximadamente 1200 pares de base do componente DNA-A.

Isolado	Local	Mês	Ano	Espécie Viral	Blastn	Acesso (Nº) no GenBank
<b>ESPÍRITO SANTO</b>						
ES-007	Venda Nova do Imigrante – ES	11	2009	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.3%	KC706584
ES-008	Venda Nova do Imigrante – ES	11	2009	<i>Tomato common mosaic virus</i>	97.3%	KC706585
ES-034	Venda Nova do Imigrante – ES	4	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.4%	KC706585
ES-051	Santa Tereza – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	86.0%	KC706589
ES-052	Santa Tereza – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	94.6%	KC706589
ES-053	Santa Tereza – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.2%	KC706585
ES-064	Santa Maria de Jetibá – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	92.3%	KC706589
ES-065	Santa Maria de Jetibá – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.8%	KC706585
ES-067	São Roque do Cannã – ES	9	2012	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	94.1%	JF803253
ES-068	São Roque do Cannã – ES	9	2012	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	95.0%	JF803253
ES-069	São Roque do Cannã – ES	9	2012	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	94.4%	JF803253
ES-070	São Roque do Cannã – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.4%	KC706585
ES-071	São Roque do Cannã – ES	9	2012	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	93.9%	JF803253
ES-078	Colatina – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.9%	KC706585
ES-079	Colatina – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	97.7%	KC706585
ES-080	Colatina – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.7%	KC706585
ES-081	Colatina – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.8%	KC706585
ES-082	Colatina – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.9%	KC706585
ES-083	Colatina – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.9%	KC706585
ES-084	Colatina – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706585
ES-085	Colatina – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.9%	KC706585
ES-086	Colatina – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.4%	KC706585
ES-087	Santa Maria de Jetibá – ES	9	2012	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	99.1%	KC706616
ES-088	Santa Maria de Jetibá – ES	9	2012	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.8%	JX415196
ES-089	Santa Maria de Jetibá – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706585
ES-091	Santa Maria de Jetibá – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.3%	KC706585
ES-092	Santa Maria de Jetibá – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	97.3%	KC706585
ES-094	Santa Maria de Jetibá – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.7%	KC706585
ES-095	Santa Maria de Jetibá – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.8%	KC706585
ES-097	Santa Maria de Jetibá – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.9%	KC706585
ES-098	Santa Maria de Jetibá – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706585
ES-134	Santa Maria de Jetibá – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706586
ES-135	Santa Maria de Jetibá – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.0%	KC706587
ES-136	Santa Maria de Jetibá – ES	9	2012	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706588
ES-103	Santa Maria de Jetibá – ES	1	2013	<i>Tomato common mosaic virus</i>	97.1%	KC706585
ES-106	Santa Maria de Jetibá – ES	4	2013	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706585
ES-107	Santa Maria de Jetibá – ES	4	2013	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.2%	KC706589
ES-108	Santa Maria de Jetibá – ES	4	2013	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.9%	KC706589

ES-109	Santa Maria de Jetibá – ES	4	2013	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706589
ES-111	Venda Nova do Imigrante – ES	4	2013	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.3%	KC706589
ES-112	Venda Nova do Imigrante – ES	4	2013	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706585
ES-113	Venda Nova do Imigrante – ES	4	2015	<i>Tomato common mosaic virus</i>	97.4%	KC706589
ES-115	Venda Nova do Imigrante – ES	3	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.3%	JF803263
ES-117	Venda Nova do Imigrante – ES	3	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.8%	JF803261
ES-118	Venda Nova do Imigrante – ES	4	2015	<i>Tomato common mosaic virus</i>	96.7%	KC706585
ES-119	Venda Nova do Imigrante – ES	4	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	97.0%	JF803261
ES-120	Venda Nova do Imigrante – ES	4	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.1%	JF803261
ES-121	Venda Nova do Imigrante – ES	4	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.9%	JX415196
ES-124	Venda Nova do Imigrante – ES	5	2015	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.8%	KC706585
ES-125	Venda Nova do Imigrante – ES	5	2015	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.0%	KC706585
ES-126	Venda Nova do Imigrante – ES	5	2015	<i>Tomato common mosaic virus</i>	96.9%	KC706585
ES-127	Venda Nova do Imigrante – ES	5	2015	<i>Tomato common mosaic virus</i>	97.0%	KC706585
ES-128	Venda Nova do Imigrante – ES	5	2015	<i>Tomato common mosaic virus</i>	96.9%	KC706575
ES-129	Venda Nova do Imigrante – ES	5	2015	<i>Tomato common mosaic virus</i>	97.0%	KC706575
ES-130	Venda Nova do Imigrante – ES	5	2015	<i>Tomato common mosaic virus</i>	97.0%	KC706575
ES-131	Venda Nova do Imigrante – ES	5	2015	<i>Tomato common mosaic virus</i>	94.0%	KC706575
ES-132	Venda Nova do Imigrante – ES	6	2015	<i>Tomato common mosaic virus</i>	90.0%	KC706589
ES-133	Marechal Floriano – ES	7	2015	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706585
ES-138	Santa Maria de Jetibá – ES	2	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	JX415196
ES-142	Santa Maria de Jetibá – ES	2	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KT203558
ES-143	Santa Maria de Jetibá – ES	2	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	95.0%	KT203558
ES-144	Santa Maria de Jetibá – ES	2	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-145	Santa Maria de Jetibá – ES	2	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-146	Domingos Martins – ES	3	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-147	Domingos Martins – ES	3	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-148	Domingos Martins – ES	3	2016	<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>	97.0%	JX415191
ES-149	Domingos Martins – ES	3	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-151	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-152	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	94.0%	KT203558
ES-154	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	96.0%	JX415196
ES-155	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.0%	KT203558
ES-158	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-159	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	93.0%	KT203558
ES-160	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	96.0%	KT203558
ES-161	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KT203558
ES-162	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-163	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-164	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-165	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-166	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-167	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-168	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-170	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-171	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KT203558
ES-172	Domingos Martins – ES	5	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-173	Venda Nova do Imigrante – ES	6	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	JX415196

ES-174	Venda Nova do Imigrante – ES	6	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-175	Venda Nova do Imigrante – ES	6	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	JX415196
ES-176	Venda Nova do Imigrante – ES	6	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	JX415196
ES-180	Venda Nova do Imigrante – ES	7	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	97.0%	EU600238
ES-181	Venda Nova do Imigrante – ES	7	2016	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	98.0%	AY049226
ES-182	Venda Nova do Imigrante – ES	7	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	95.0%	JX415196
ES-183	Venda Nova do Imigrante – ES	7	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-184	Venda Nova do Imigrante – ES	7	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	JX415196
ES-185	Alfredo Chaves – ES	8	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
ES-186	Alfredo Chaves – ES	8	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
ES-187	Afonso Cláudio – ES	10	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
ES-188	Afonso Cláudio – ES	10	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
ES-189	Afonso Cláudio – ES	10	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
ES-190	Afonso Cláudio – ES	10	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
ES-191	Afonso Cláudio – ES	10	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	97.0%	EU600238
ES-192	Domingos Martins – ES	11	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
ES-193	Domingos Martins – ES	11	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	EU600238
ES-194	Domingos Martins – ES	11	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	EU600238
ES-195	Domingos Martins – ES	11	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	EU600238
ES-196	Domingos Martins – ES	11	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
ES-197	Afonso Cláudio – ES	11	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
ES-198	Afonso Cláudio – ES	11	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
ES-199	Afonso Cláudio – ES	11	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	EU600238
ES-201	Afonso Cláudio – ES	11	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
ES-202	Afonso Cláudio – ES	11	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	EU600238
ES-203	Afonso Cláudio – ES	11	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
ES-205	Vargem Alta – ES	4	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-206	Vargem Alta – ES	4	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-207	Vargem Alta – ES	4	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-209	Domingos Martins – ES	4	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	94.0%	JX415196
ES-210	Domingos Martins – ES	4	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	95.0%	JX415196
ES-211	Domingos Martins – ES	4	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	JX415196
ES-215	Alfredo Chaves – ES	4	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-216	Alfredo Chaves – ES	4	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-217	Alfredo Chaves – ES	4	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-218	Alfredo Chaves – ES	4	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-230	Linhares – ES	10	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	JX415196
ES-231	Linhares – ES	10	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-232	Linhares – ES	10	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-233	Linhares – ES	10	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-234	Linhares – ES	10	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	97.0%	JX415196
ES-235	Linhares – ES	10	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-236	Linhares – ES	10	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	JX415196
ES-237	Linhares – ES	10	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-238	Linhares – ES	10	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	97.0%	JX415196
ES-239	Linhares – ES	10	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-240	Linhares – ES	10	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-241	Linhares – ES	10	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196

ES-250	Domingos Martins – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-252	Domingos Martins – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-253	Domingos Martins – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-254	Domingos Martins – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-255	Santa Maria de Jetibá – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-256	Santa Maria de Jetibá – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-257	Santa Maria de Jetibá – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-258	Afonso Cláudio – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-260	Afonso Cláudio – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-261	Afonso Cláudio – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-262	Afonso Cláudio – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-263	Afonso Cláudio – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-264	Afonso Cláudio – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-265	Afonso Cláudio – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-266	Afonso Cláudio – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-267	Afonso Cláudio – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-268	Afonso Cláudio – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-269	Venda Nova do Imigrante – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-271	Venda Nova do Imigrante – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-272	Venda Nova do Imigrante – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-273	Venda Nova do Imigrante – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-276	Venda Nova do Imigrante – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-280	Venda Nova do Imigrante – ES	11	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-281	Domingos Martins – ES	12	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-282	Domingos Martins – ES	12	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-285	Domingos Martins – ES	3	2018	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-286	Domingos Martins – ES	3	2018	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-287	Domingos Martins – ES	3	2018	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-288	Domingos Martins – ES	3	2018	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-289	Domingos Martins – ES	3	2018	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-290	Domingos Martins – ES	3	2018	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-291	Domingos Martins – ES	3	2018	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
ES-292	Domingos Martins – ES	3	2018	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
<b>MINAS GERAIS</b>						
MG-370	Coimbra – MG	11	2014	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.2%	KC706619
MG-371	Coimbra – MG	11	2014	<i>Tomato severe rugose virus</i>		
MG-388	Viçosa – MG	10	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	87.0%	JX415198
MG-390	Baldim – MG	12	2015	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	99.0%	KC706616
MG-391	Baldim – MG	12	2015	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	90.0%	KC706616
MG-394	Caratinga – MG	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-395	Caratinga – MG	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-396	Caratinga – MG	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-397	Caratinga – MG	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-398	Caratinga – MG	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-400	Caratinga – MG	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-401	Caratinga – MG	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-404	Baldim – MG	4	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
MG-406	Baldim – MG	4	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196

MG-408	Barbacena – MG	3	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
MG-409	Barbacena – MG	3	2017	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	JX415196
MG-412	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-413	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-414	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-416	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-417	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-418	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-419	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-420	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-421	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
MG-422	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-423	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
MG-424	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-425	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-426	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-428	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-429	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-430	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.0%	KC706579
MG-431	Caratinga – MG	8	2018	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
<b>RIO DE JANEIRO</b>						
RJ-001	Paty do Alferes – RJ	7	2006	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.8%	KC706585
RJ-003	Paty do Alferes – RJ	7	2006	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	90.3%	JF803252
RJ-006	Paty do Alferes – RJ	7	2006	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.4%	KC706589
RJ-007	Paty do Alferes – RJ	7	2006	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.9%	KC706585
RJ-008	Paty do Alferes – RJ	7	2006	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.6%	KC706589
RJ-009	Paty do Alferes – RJ	7	2006	<i>Tomato common mosaic virus</i>	99.5%	KC706589
RJ-015	São José do Ubá – RJ	7	2006	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	92.4%	JF803253
RJ-016	São José do Ubá – RJ	7	2006	<i>Sida yellow net virus</i>	96.4%	JX871376
RJ-017	São José do Ubá – RJ	7	2006	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	92.8%	JF803253
RJ-018	São José do Ubá – RJ	7	2006	<i>Sida yellow net virus</i>	98.1%	JX871376
RJ-019	São José do Ubá – RJ	7	2006	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	92.3%	JF803253
RJ-020	São José do Ubá – RJ	7	2006	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	92.5%	JF803253
RJ-021	São José do Ubá – RJ	6	2006	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	91.0%	JF803253
RJ-022	São José do Ubá – RJ	6	2006	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	92.0%	JF803253
RJ-023	São José do Ubá – RJ	6	2006	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	92.0%	JF803253
RJ-025	Cambuci – RJ	7	2010	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.2%	KC004069
RJ-026	Cambuci – RJ	7	2010	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.6%	KC706619
RJ-027	Cambuci – RJ	7	2010	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.1%	KC706619
RJ-028	Cambuci – RJ	7	2010	<i>Sida yellow net virus</i>	96.8%	JX871376
RJ-029	Cambuci – RJ	7	2010	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	92.1%	JF803253
RJ-030	Cambuci – RJ	7	2010	<i>Tomato severe rugose virus</i>	96.0%	EU600238
RJ-031	Cambuci – RJ	7	2010	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	95.9%	JF803251
RJ-032	Cambuci – RJ	7	2010	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	93.5%	JF803253
RJ-035	Aperibé – RJ	7	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-036	Aperibé – RJ	7	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-037	Aperibé – RJ	7	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	JX415196
RJ-038	Aperibé – RJ	7	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	96.0%	JX415196

RJ-039	Aperibé – RJ	7	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	JX415196
RJ-040	Aperibé – RJ	7	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-041	Paty do Alferes – RJ	10	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-042	Paty do Alferes – RJ	10	2015	<i>Tomato common mosaic virus</i>	92.0%	KC706585
RJ-044	Paty do Alferes – RJ	10	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	97.0%	JX415196
RJ-046	Paty do Alferes – RJ	10	2015	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.0%	KT203558
RJ-047	Paty do Alferes – RJ	10	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-048	Paty do Alferes – RJ	10	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-051	Paty do Alferes – RJ	10	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-052	Paty do Alferes – RJ	10	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-053	Paty do Alferes – RJ	10	2015	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-054	Vassouras – RJ	3	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-057	Trajano de Moraes – RJ	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.0%	KC706585
RJ-058	Trajano de Moraes – RJ	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.0%	KC706585
RJ-059	Trajano de Moraes – RJ	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	96.0%	KC706575
RJ-060	Trajano de Moraes – RJ	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	92.0%	KC706585
RJ-061	Trajano de Moraes – RJ	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	97.0%	KC706575
RJ-062	Trajano de Moraes – RJ	3	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-063	Trajano de Moraes – RJ	3	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-064	Trajano de Moraes – RJ	3	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-065	Trajano de Moraes – RJ	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	92.0%	KC706585
RJ-066	Trajano de Moraes – RJ	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	97.0%	KC706575
RJ-067	Trajano de Moraes – RJ	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.0%	KC706585
RJ-069	Trajano de Moraes – RJ	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	98.0%	KC706585
RJ-070	Trajano de Moraes – RJ	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	95.0%	KC706585
RJ-071	Trajano de Moraes – RJ	3	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-072	Trajano de Moraes – RJ	3	2016	<i>Tomato common mosaic virus</i>	97.0%	KC706585
RJ-073	Trajano de Moraes – RJ	3	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-075	Barra Alegre – RJ	3	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-076	Vassouras – RJ	6	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-077	Vassouras – RJ	6	2016	<i>Sida common mosaic virus</i>	95.0%	JX871372
RJ-078	Vassouras – RJ	6	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JF803261
RJ-079	Vassouras – RJ	6	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-080	Vassouras – RJ	6	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-082	Vassouras – RJ	6	2016	<i>Sida common mosaic virus</i>	95.0%	JX871372
RJ-083	Vassouras – RJ	6	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-085	Vassouras – RJ	6	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-086	Vassouras – RJ	6	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-088	Vassouras – RJ	6	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	JX415196
RJ-089	Bom Jardim – RJ	8	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
RJ-090	Bom Jardim – RJ	8	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	97.0%	EU600238
RJ-091	Bom Jardim – RJ	8	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
RJ-092	Bom Jardim – RJ	8	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
RJ-093	Bom Jardim – RJ	8	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
RJ-094	Bom Jardim – RJ	8	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
RJ-095	Bom Jardim – RJ	8	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	98.0%	EU600238
RJ-097	Bom Jardim – RJ	8	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	EU600238
RJ-098	Bom Jardim – RJ	8	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	EU600238

RJ-099	Paty do Alferes – RJ	9	2016	<i>Tomato severe rugose virus</i>	99.0%	EU600238
--------	----------------------	---	------	-----------------------------------	-------	----------

**ANEXO 2** – Lista de amostras foliares (= isolados) analisadas para avaliação da presença do gene/locus de resistência *Ty-1* em plantas de tomateiro amostradas nos estados do ES (A), MG (B) e RJ (C).

Isolado	Ano	<i>Ty-1</i>	Isolado	Ano	<i>Ty-1</i>	Isolado	Ano	<i>Ty-1</i>
<b>ESPÍRITO SANTO</b>			ES-172	2016	Heterozigoto	MG-420	2018	Heterozigoto
ES-034	2012	Homozigoto Suscetível	ES-173	2016	Homozigoto Suscetível	MG-422	2018	Heterozigoto
ES-051	2012	Homozigoto Suscetível	ES-174	2016	Homozigoto Suscetível	MG-425	2018	Heterozigoto
ES-052	2012	Homozigoto Suscetível	ES-175	2016	Homozigoto Suscetível	MG-426	2018	Heterozigoto
ES-053	2012	Homozigoto Suscetível	ES-180	2016	Heterozigoto	MG-428	2018	Heterozigoto
ES-064	2012	Homozigoto Suscetível	ES-181	2016	Heterozigoto	MG-429	2018	Heterozigoto
ES-065	2012	Homozigoto Suscetível	ES-182	2016	Heterozigoto	MG-430	2018	Heterozigoto
ES-067	2012	Homozigoto Suscetível	ES-183	2016	Heterozigoto	<b>RIO DE JANEIRO</b>		
ES-068	2012	Homozigoto Suscetível	ES-184	2016	Heterozigoto	RJ-001	2006	Homozigoto Suscetível
ES-069	2012	Homozigoto Suscetível	ES-185	2016	Homozigoto Suscetível	RJ-003	2006	Homozigoto Suscetível
ES-070	2012	Homozigoto Suscetível	ES-186	2016	Homozigoto Suscetível	RJ-006	2006	Homozigoto Suscetível
ES-071	2012	Homozigoto Suscetível	ES-187	2016	Homozigoto Suscetível	RJ-008	2006	Homozigoto Suscetível
ES-078	2012	Homozigoto Suscetível	ES-188	2016	Homozigoto Suscetível	RJ-009	2006	Homozigoto Suscetível
ES-079	2012	Homozigoto Suscetível	ES-189	2016	Homozigoto Suscetível	RJ-015	2006	Homozigoto Suscetível
ES-080	2012	Homozigoto Suscetível	ES-190	2016	Homozigoto Suscetível	RJ-016	2006	Homozigoto Suscetível
ES-081	2012	Homozigoto Suscetível	ES-191	2016	Homozigoto Suscetível	RJ-017	2006	Homozigoto Suscetível
ES-082	2012	Homozigoto Suscetível	ES-192	2016	Homozigoto Suscetível	RJ-018	2006	Homozigoto Suscetível
ES-083	2012	Homozigoto Suscetível	ES-193	2016	Homozigoto Suscetível	RJ-020	2006	Homozigoto Suscetível
ES-084	2012	Homozigoto Suscetível	ES-196	2016	Homozigoto Suscetível	RJ-022	2006	Homozigoto Suscetível
ES-085	2012	Homozigoto Suscetível	ES-197	2016	Homozigoto Suscetível	RJ-023	2006	Homozigoto Suscetível
ES-086	2012	Homozigoto Suscetível	ES-198	2016	Homozigoto Suscetível	RJ-028	2010	Homozigoto Suscetível
ES-087	2012	Homozigoto Suscetível	ES-201	2016	Homozigoto Suscetível	RJ-029	2010	Homozigoto Suscetível
ES-088	2012	Homozigoto Suscetível	ES-202	2016	Homozigoto Suscetível	RJ-030	2010	Homozigoto Suscetível
ES-089	2012	Homozigoto Suscetível	ES-203	2016	Homozigoto Suscetível	RJ-031	2010	Homozigoto Suscetível
ES-091	2012	Homozigoto Suscetível	ES-205	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-032	2010	Homozigoto Suscetível

ES-092	2012	Homozigoto Suscetível	ES-206	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-035	2015	Homozigoto Suscetível
ES-093	2012	Homozigoto Suscetível	ES-230	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-037	2015	Homozigoto Suscetível
ES-094	2012	Homozigoto Suscetível	ES-231	2017	Heterozigoto	RJ-038	2015	Homozigoto Suscetível
ES-096	2012	Homozigoto Suscetível	ES-232	2017	Suscetível	RJ-039	2015	Homozigoto Suscetível
ES-097	2012	Homozigoto Suscetível	ES-233	2017	Heterozigoto	RJ-040	2015	Homozigoto Suscetível
ES-134	2012	Homozigoto Suscetível	ES-234	2017	Heterozigoto	RJ-041	2015	Homozigoto Suscetível
ES-135	2012	Homozigoto Suscetível	ES-235	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-042	2015	Homozigoto Suscetível
ES-136	2012	Homozigoto Suscetível	ES-237	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-044	2015	Homozigoto Resistente
ES-103	2013	Homozigoto Suscetível	ES-238	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-046	2015	Homozigoto Suscetível
ES-106	2013	Homozigoto Suscetível	ES-240	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-047	2015	Homozigoto Suscetível
ES-107	2013	Homozigoto Suscetível	ES-250	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-048	2015	Homozigoto Suscetível
ES-108	2013	Heterozigoto	ES-252	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-051	2015	Heterozigoto
ES-109	2013	Heterozigoto	ES-253	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-052	2015	Heterozigoto
ES-112	2013	Homozigoto Suscetível	ES-254	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-053	2015	Heterozigoto
ES-113	2015	Homozigoto Suscetível	ES-255	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-054	2016	Homozigoto Suscetível
ES-115	2015	Homozigoto Suscetível	ES-256	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-057	2016	Homozigoto Suscetível
ES-117	2015	Homozigoto Suscetível	ES-257	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-058	2016	Homozigoto Suscetível
ES-118	2015	Homozigoto Suscetível	ES-258	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-059	2016	Homozigoto Suscetível
ES-119	2015	Heterozigoto	ES-260	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-060	2016	Homozigoto Suscetível
ES-120	2015	Homozigoto Suscetível	ES-261	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-061	2016	Homozigoto Suscetível
ES-121	2015	Heterozigoto	ES-262	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-062	2016	Homozigoto Suscetível
ES-124	2015	Homozigoto Suscetível	ES-264	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-063	2016	Homozigoto Suscetível
ES-125	2015	Homozigoto Suscetível	ES-265	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-064	2016	Homozigoto Suscetível
ES-126	2015	Homozigoto Suscetível	ES-266	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-065	2016	Homozigoto Suscetível
ES-127	2015	Homozigoto Suscetível	ES-267	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-066	2016	Homozigoto Suscetível
ES-128	2015	Homozigoto Suscetível	ES-268	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-067	2016	Homozigoto Suscetível
ES-129	2015	Homozigoto Suscetível	ES-269	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-069	2016	Homozigoto Suscetível
ES-130	2015	Homozigoto Suscetível	ES-271	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-070	2016	Homozigoto Suscetível
ES-131	2015	Homozigoto Suscetível	ES-272	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-071	2016	Homozigoto Suscetível

ES-132	2015	Homozigoto Suscetível	ES-280	2017	Heterozigoto	RJ-072	2016	Homozigoto Suscetível
ES-133	2015	Homozigoto Suscetível	ES-282	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-073	2016	Homozigoto Suscetível
ES-138	2016	Homozigoto Suscetível	ES-285	2018	Homozigoto Suscetível	RJ-076	2016	Homozigoto Suscetível
ES-142	2016	Heterozigoto	ES-286	2018	Homozigoto Suscetível	RJ-077	2016	Homozigoto Suscetível
ES-143	2016	Homozigoto Suscetível	ES-287	2018	Homozigoto Suscetível	RJ-078	2016	Heterozigoto
ES-145	2016	Homozigoto Suscetível	ES-288	2018	Homozigoto Suscetível	RJ-079	2016	Homozigoto Suscetível
ES-146	2016	Heterozigoto	ES-289	2018	Homozigoto Suscetível	RJ-080	2016	Homozigoto Suscetível
ES-147	2016	Homozigoto Suscetível	ES-290	2018	Homozigoto Suscetível	RJ-082	2016	Homozigoto Suscetível
ES-148	2016	Homozigoto Suscetível	ES-291	2018	Homozigoto Suscetível	RJ-083	2016	Homozigoto Suscetível
ES-154	2016	Heterozigoto	ES-292	2018	Homozigoto Suscetível	RJ-085	2016	Homozigoto Suscetível
ES-155	2016	Heterozigoto	<b>MINAS GERAIS</b>			RJ-086	2016	Homozigoto Suscetível
ES-158	2016	Heterozigoto	MG-371	2014	Heterozigoto	RJ-088	2016	Homozigoto Suscetível
ES-159	2016	Heterozigoto	MG-388	2015	Homozigoto Suscetível	RJ-089	2016	Homozigoto Suscetível
ES-160	2016	Heterozigoto	MG-391	2015	Homozigoto Suscetível	RJ-090	2016	Homozigoto Suscetível
ES-161	2016	Heterozigoto	MG-396	2016	Heterozigoto	RJ-091	2016	Heterozigoto
ES-162	2016	Homozigoto Suscetível	MG-397	2016	Heterozigoto	RJ-092	2016	Heterozigoto
ES-163	2016	Homozigoto Suscetível	MG-398	2016	Heterozigoto	RJ-093	2016	Homozigoto Suscetível
ES-164	2016	Homozigoto Suscetível	MG-409	2017	Homozigoto Suscetível	RJ-094	2016	Heterozigoto
ES-165	2016	Homozigoto Suscetível	MG-412	2018	Heterozigoto	RJ-095	2016	Heterozigoto
ES-166	2016	Homozigoto Suscetível	MG-414	2018	Heterozigoto	RJ-097	2016	Heterozigoto
ES-167	2016	Heterozigoto	MG-416	2018	Heterozigoto	RJ-098	2016	Heterozigoto
ES-168	2016	Homozigoto Suscetível	MG-417	2018	Heterozigoto	RJ-099	2016	Heterozigoto
ES-170	2016	Heterozigoto	MG-418	2018	Heterozigoto			
ES-171	2016	Heterozigoto	MG-419	2018	Heterozigoto			