



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**DIMINUIÇÃO TEMPORAL DA RIQUEZA DE ESPÉCIES  
DE BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIRO NO DISTRITO  
FEDERAL E AVALIAÇÃO DA APTIDÃO REPLICATIVA  
DOS TRÊS BEGOMOVÍRUS EPIDEMIOLOGICAMENTE  
MAIS IMPORTANTES**

**TADEU ARAÚJO DE SOUZA**

**BRASÍLIA-DF**

**2020**

**TADEU ARAÚJO DE SOUZA**

**DIMINUIÇÃO TEMPORAL DA RIQUEZA DE ESPÉCIES DE  
BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIRO NO DISTRITO FEDERAL E AVALIAÇÃO  
DA APTIDÃO REPLICATIVA DOS TRÊS BEGOMOVÍRUS  
EPIDEMIOLOGICAMENTE MAIS IMPORTANTES**

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

**Orientadora**

Alice Kazuko Inoue-Nagata

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL**

**BRASIL**

**2020**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Souza, Tadeu Araújo

Diminuição temporal da riqueza de espécies de begomovírus em tomateiro no Distrito Federal e avaliação da aptidão replicativa dos três begomovírus epidemiologicamente mais importantes. Tadeu Araújo de Souza.

Brasília, 2020.

p. 185 il.

Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

### 1. Begomovírus – Diversidade

I Universidade de Brasília. PPG/FIT

II Diminuição temporal da riqueza de espécies de begomovírus em tomateiro no Distrito Federal e avaliação da aptidão replicativa dos três begomovírus epidemiologicamente mais importantes.

***Dedicatória***

*A minha guerreira, Maria Angela Reis, pelo imenso amor  
de mãe, carinho e dedicação.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, meu guia e protetor;

Com muita admiração e respeito, agradeço a minha orientadora Alice Kazuko Inoue-Nagata. Sempre disposta, otimista e extremamente atenciosa. Obrigado pelos ensinamentos valiosos, conselhos e principalmente pela paciência, apoio e confiança;

Muito obrigado ao analista do laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Embrapa Hortaliças Erich Tempel Nakasu, e ao técnico de laboratório Lucio Flávio Barbosa pela prestatividade, amizade e companheirismo;

Muito obrigado aos meus amigos do laboratório, Camila, Cristiano, Vivian, Erick, Thiago, pela amizade e toda ajuda para realização deste trabalho;

Agradeço imensamente a Thais Pereira Martins pelo companheirismo, incentivo, conselhos, e pela ajuda em todos os momentos;

Meu agradecimento especial ao Just Erick por meu ajudar, com toda dedicação, na condução dos experimentos;

Ao Dr Tatsuya Nagata e ao João Marcos Facundes pela significativa contribuição para as análises dos resultados deste trabalho;

Muito obrigado a todos os professores e funcionários do Departamento de Pós-Graduação em Fitopatologia, por dividirem experiência e conhecimentos científicos tão preciosos;

Aos membros da banca examinadora, Dra. Simone da Graça Ribeiro, Dra. Thaís Ribeiro Santiago, Dr. Bergmann Morais Ribeiro e ao Dr. Maurício Rossato pela disponibilidade em contribuir com críticas e sugestões para a melhoria deste trabalho;

Ao departamento de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade;

À Embrapa Hortaliças pela excelente infraestrutura disponibilizada para a condução dos experimentos;

À CAPES e ao CNPH pelo auxílio financeiro;

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

Trabalho realizado junto ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da professora Dra. Alice Kazuko Inoue-Nagata, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Cordenação de aperfeiçoamento e Pessoal de Nível Superior, Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (Embrapa-CNPq) e Universidade de Brasília (UnB).

**DIMINUIÇÃO TEMPORAL DA RIQUEZA DE ESPÉCIES DE  
BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIRO NO DISTRITO FEDERAL E AVALIAÇÃO  
DA APTIDÃO REPLICATIVA DOS TRÊS BEGOMOVÍRUS  
EPIDEMIOLOGICAMENTE MAIS IMPORTANTES**

**TADEU ARAÚJO DE SOUZA**

TESE APROVADA em 09/07/2020 por

---

Dr. Bergmann Moraes Ribeiro  
Universidade de Brasília (Examinador Externo)

---

Dra. Simone da Graça Ribeiro  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Examinador Externo)

---

Dr. Maurício Rossato  
Universidade de Brasília (Examinador Interno)

---

Dra. Alice Kazuko Inoue-Nagata  
Embrapa Hortaliças (Presidente - Orientadora)

---

Dra. Thaís Ribeiro Santiago  
Universidade de Brasília (Suplente)

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL  
BRASIL  
2020**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL</b> .....	I
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	III
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>HIPÓTESES</b> .....	4
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	4
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	5
<b>Capítulo 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	7
1. Família <i>Geminiviridae</i> .....	7
1.1. Características gerais dos vírus do gênero <i>Begomovirus</i> .....	13
1.2. Características moleculares dos vírus do gênero <i>Begomovirus</i> .....	17
1.3. Mecanismo de replicação dos begomovírus .....	23
1.4. Histórico da diversidade de espécies de begomovírus infectando tomateiro no Brasil .....	25
1.5. Variabilidade genética dos begomovírus .....	34
1.6. Begomovírus em tomateiro, controle preventivo, químico e resistência genética .....	38
2. Aplicação de HTS para estudos metagenômicos de vírus em tomateiros .....	41
3. Aptidão replicativa de vírus .....	44
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	47
<b>Chapter 2: A TEMPORAL DIVERSITY ANALYSIS OF BRAZILIAN BEGOMOVIRUSES IN TOMATO BY HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING REVEALS A DECREASE IN SPECIES RICHNESS</b> .....	68
<b>RESUMO</b> .....	68
<b>ABSTRACT</b> .....	69
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	70
<b>2. MATERIAL AND METHODS</b> .....	73
2.1. Collection of tomato samples and detection of begomovirus .....	73
2.2. Diversity analysis of begomoviruses by rolling circle amplification and RFLP .....	74
2.3. HTS of RCA products from each group and identification of begomoviruses .....	74
2.4. Estimation of intraspecies diversity .....	76
2.5. <i>Ty-1</i> detection in individual total DNA samples.....	76
2.6. Detection of the major begomoviruses in individual samples .....	77
2.7. Phylogenetic analysis.....	77
<b>3. RESULTS</b> .....	78

3.1. Diversity analysis by RCA-RFLP -----	78
3.2. Metagenomic study confirms a gradual decrease in begomovirus diversity from 2003 to 2016 -----	79
3.3. Intraspecies diversity analysis-----	88
3.4. Validation of begomovirus sequences identified by HTS using PCR -----	91
3.5. Detection of selected begomoviruses in individual total DNA samples -----	94
3.6. Detection of the resistance gene <i>Ty-1</i> in the samples -----	95
<b>4. DISCUSSION</b> -----	97
<b>5. CONCLUSIONS</b> -----	103
<b>6. REFERENCES</b> -----	104

**Capítulo 3: ANÁLISE DA PROGRESSÃO DO ACÚMULO DO DNA VIRAL EM TOMATEIROS COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA INFECTADOS COM TRÊS BEGOMOVÍRUS EM INFECÇÕES SIMPLES E MISTAS**-----112

<b>RESUMO</b> -----	112
<b>ABSTRACT</b> -----	114
<b>1. INTRODUÇÃO</b> -----	116
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> -----	119
2.1. Extração de DNA total -----	119
2.2. Amplificação do DNA por círculo rolante e avaliação do comprimento de fragmentos de restrição (RCA/RFLP)-----	121
2.3. Análise dos perfis de restrição e aptidão replicativa -----	122
2.4. Método de inoculação -----	123
2.5. Estratégia experimental -----	124
2.6. Avaliação do efeito das infecções na sintomatologia -----	129
2.7. Avaliação da frutificação na cultivar Lanai em infecção simples-----	129
<b>3. RESULTADOS</b> -----	131
3.1. Avaliação sintomatológica das infecções simples de begomovírus em tomateiro -----	131
3.2. Avaliação sintomatológica da infecção de begomovírus em infecção mista em tomateiro-----	133
3.3. Efeito de infecções simples na frutificação da Cultivar Lanai.-----	134
3.4. Detecção do DNA dos begomovírus em infecção simples -----	138
3.5. Tratamentos em infecção mista com os begomovírus inoculados simultaneamente-----	139
3.5.1 Tratamento 4 (ToSRV+ToMoLCV) – cultivar H9553 -----	139
3.5.2 Tratamento 4 (ToSRV+ToMoLCV) – cultivar Lanai -----	141
3.5.3 Tratamento 4 (ToSRV+ToMoLCV) – cultivar BRS Sena-----	142
3.5.4 Tratamento 5 (ToSRV+TGVV) – cultivar H9553 -----	143
3.5.5 Tratamento 5 (ToSRV+TGVV) – cultivar Lanai-----	145
3.5.6 Tratamento 5 (ToSRV+TGVV) – cultivar BRS Sena-----	146
3.5.7 Tratamento 6 (ToMoLCV+TGVV) – cultivar H9553-----	147
3.5.8 Tratamento 6 (ToMoLCV+TGVV) – cultivar Lanai -----	150

3.5.9 Tratamento 6 (ToMoLCV+TGVV) – cultivar BRS Sena-----	151
3.5.10 Tratamento 7 (ToSRV+ToMoLCV+TGVV) – cultivar H9553 -----	151
3.5.11 Tratamento 7 (ToSRV+ToMoLCV+TGVV) – cultivar Lanai-----	152
3.5.12 Tratamento 7 (ToSRV+ToMoLCV+TGVV) – cultivar BRS Sena -----	153
3.6. Tratamentos em infecção mista com os begomovírus inoculados não simultaneamente -----	154
3.6.1 Tratamento 8 (T1-TGVV-10dpi, T2-ToSRV) – Cultivar H9553 -----	155
3.6.2 Tratamento 8 (T1-TGVV-10DPI, T2-ToSRV) – Cultivar Sena -----	156
3.6.3 Tratamento 9 (T1-TGVV-10DPI, T2-ToMoLCV) – Cultivar H9553-----	160
3.6.4 Tratamento 9 (T1-TGVV-10DPI, T2-ToMoLCV) – Cultivar Sena -----	161
3.6.5 Tratamento 10 (T1-ToSRV-10DPI, T2-ToMoLCV) – Cultivar H9553 --	162
3.6.6 Tratamento 10 (T1-ToSRV-10DPI, T2-ToMoLCV) – Cultivar Sena-----	163
<b>4. DISCUSSÃO</b> -----	165
<b>5. CONCLUSÕES</b> -----	177
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> -----	178
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	181

## RESUMO GERAL

O gênero *Begomovirus* é o maior e mais importante grupo de vírus infectando tomateiros em todo o mundo. Atualmente, dois begomovirus predominam no Brasil, são eles tomato severe rugose virus (ToSRV) e tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV). Por representar a principal e mais eficiente forma de controle, o uso de cultivares resistentes a begomovirus tem sido cada vez mais frequente. Com base em estudos de diversidade de espécies, tem se observado ao longo dos anos a mudança no panorama da diversidade de espécies de begomovirus no Brasil. Em vista dessa observação o principal objetivo desse trabalho de tese foi realizar a avaliação e a análise da diversidade de espécies de begomovirus em tomateiros resistentes e suscetíveis, em amostras coletadas em duas regiões produtoras no Distrito Federal, ao longo de 14 anos. Os temas de trabalho foram divididos em três capítulos. O capítulo 1 foi destinado a revisão bibliográfica. O capítulo 2 descreve o estudo temporal da diversidade de espécies de begomovirus em duas micro-regiões agrícolas. O capítulo 3 foi destinado ao estudo da capacidade replicativa de três espécies de begomovirus em tomateiros suscetíveis e resistente. No estudo da diversidade de begomovirus, utilizou-se amostras coletadas entre os anos de 2003 a 2016 que foram divididas em três grupos, grupo 1 (G1, 2003-2005), grupo 2 (G2, 2009-2011) e grupo 3 (G3, 2014-2016). O DNA viral presente nas amostras foi amplificado e submetido a análises preliminares da diversidade de espécies de begomovirus por meio da técnica de RCA/RFLP. Como resultado, observou-se uma diminuição da quantidade de diferentes perfis de restrição virais em amostras do G1 ao G3. A partir daí as amostras foram submetidas a sequenciamento de alto desempenho de modo a obter dados mais precisos da diversidade de espécies. Assim, as análises de sequenciamento de alto desempenho confirmaram a diminuição temporal da riqueza de begomovirus. Por exemplo, foram

detectadas seis espécies no G1, enquanto somente três espécies no G2 e G3. Essa diminuição da diversidade de espécies de begomovírus foi acompanhada pelo aumento do uso de cultivares resistentes na área de estudo desse trabalho. Por esta razão, é discutida a possibilidade do uso de cultivares resistentes estar influenciado a diversidade de espécies de begomovírus. Entre os principais resultados obtidos foi a prevalência de isolados dos begomovírus ToSRV e ToMoLCV nos três grupos de amostras avaliados. Isolados de tomate golden mosaic virus (TGVV) predominaram no grupo 1 e não foram mais detectados nos demais grupos, demonstrando seu desaparecimento da área onde este estudo foi realizado. A partir desses resultados, além da possível influência do uso de cultivares resistentes na prevalência de espécies, no capítulo 3 foi estudada a aptidão replicativa dos begomovírus ToSRV, ToMoLCV e TGVV em cultivares suscetíveis e resistente a begomovírus. Para o estudo, foram estabelecidos tratamentos com infecção simples de cada vírus a partir de clones infecciosos, infecção mista com inoculação simultânea e não simultânea. Como resultado, foi observada uma capacidade replicativa semelhante entre ToSRV e ToMoLCV em cultivares suscetíveis e maior capacidade replicativa de ToMoLCV em relação ToSRV na cultivar resistente. Além disso, determinou-se a baixa capacidade replicativa de TGVV em relação ToSRV e ToMoLCV, independentemente da cultivar. Verificou-se também uma maior chance de infecção mista em cultivares suscetíveis do que na cultivar resistente. Os resultados em conjunto contribuem para uma melhor compreensão do processo de evolução dos begomovírus levantando, a importância de se conhecer a diversidade de espécies dos begomovírus e os possíveis fatores relacionados as mudanças na diversidade ao longo dos anos.

**Palavras-chaves:** diversidade, sequenciamento de alto desempenho, aptidão replicativa

**Orientadora:** Alice Kazuko Inoue Nagata, Universidade de Brasília, Embrapa Hortaliças.

## GENERAL ABSTRACT

The genus *Begomovirus* is the largest and most important group of viruses infecting tomato plants worldwide. Today, two begomoviruses predominate in Brazil, tomato severe rugose virus (ToSRV) and tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV). It is frequent the use resistant cultivars to begomoviruses, being this the most popular and efficient control method. Based on species diversity studies, changes in the panorama of begomoviruses have been observed over the years. Thus, the main objective of this thesis was to conduct, an evaluation and analyses of the begomovirus species diversity in resistant and susceptible tomato plants, from samples collected in two producing regions in the Federal District over 14 years. The topics were divided in three chapters. Chapter 1 is a bibliographic review. Chapter 2 describes the temporal study of the diversity of begomovirus species in two agricultural micro-region. Chapter 3 is dedicated to the study of the replicative ability of three species of begomovirus in susceptible and resistant tomatoes. In the begomovirus diversity study, the samples collected between 2003 and 2016 were divided into three groups, group 1 (G1, 2003-2005), group 2 (G2, 2009-2011) and group 3 (G3, 2014-2016). The viral DNA present in the samples was amplified and subjected to a preliminary analysis of the diversity of begomovirus species. This analysis was performed by employing the RCA/RFLP method. As a result, a decrease in the amount of distinctive viral restriction profiles was observed in samples from G1 to G3. Then, the samples were subjected to high performance sequencing in order to obtain more accurate data on the species diversity. Thus, high-throughput sequencing analyses confirmed the temporal decrease in the begomovirus richness. For example, six species were detected in G1, while only three species in G2 and G3. This decrease in the diversity of begomovirus species occurred simultaneously to an increase in the use of resistant cultivars. Therefore, we discuss the

possible effects of the use of resistant cultivars in the overall virus diversity. One of the major results was the confirmation of the prevalence of the begomovirus ToSRV and ToMoLCV indicating its disappearance from the area where this study was conducted. Based on these results, and in addition to the possible influence of the use of resistant cultivars on the prevalence of species, in chapter 3 the replicative ability of the begomovirus ToSRV, ToMoLCV and TGVV in cultivars susceptible and resistant to begomovirus was studied. For this purpose, tested treatments included simple infection of each virus using infectious clones, and mixed infection with simultaneous and non-simultaneous inoculation. As a result, a similar replicative capacity was observed for ToSRV and ToMoLCV in susceptible cultivars and a higher replicative capacity of ToMoLCV in relation to ToSRV in the resistant cultivar. In addition, the low replicative capacity of TGVV in relation to ToSRV and ToMoLCV was observed, independent of the cultivar. Also, mixed infection was more frequent in susceptible cultivars than in the resistant one. The onset of results obtained in this study contributed for a better comprehension of the evolution process of begomoviruses, highlighting the importance of understanding the diversity of begomoviruses and the possible factors related to its changes over the years.

**Key words:** diversity, high-throughput sequencing, replicative fitness

**Supervisor:** Alice Kazuko Inoue Nagata, University of Brasilia, Embrapa Vegetables

## INTRODUÇÃO GERAL

A família *Geminiviridae* é estruturalmente caracterizada pela morfologia geminada da partícula viral. Geneticamente, seus representantes possuem um (monopartido, DNA-A) ou dois (bipartido, DNA-A e DNA-B) componentes genômicos DNA circular fita simples (ssDNA) (Zerbini *et al.*, 2017). Atualmente, a família é composta por nove gêneros, dentre eles o gênero *Begomovirus*. Esse gênero atualmente é o maior pertencente à família, com 409 espécies das 462 descritas. Os begomovírus são transmitidos para plantas dicotiledôneas pelo inseto vetor popularmente conhecido como mosca-branca (*Bemisia tabaci*).

Atualmente lista-se 25 espécies de begomovírus descritas infectando tomateiro no Brasil. Desde o primeiro relato de uma begomovirose na década de 1960 (Flores *et al.*, 1960), cada vez mais novas espécies de begomovírus estão sendo relatadas. Entretanto, o aumento da frequência de novos relatos, se deu principalmente a partir da entrada da espécie de mosca-branca *Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor I (MEAM1). A polifagia do inseto e alta eficiência de transmissão dos begomovírus está entre os principais fatores que levam a alta incidência desses vírus em campo (Macedo *et al.*, 2015).

Várias medidas podem ser adotadas para o controle das begomoviroses. O controle químico do vetor, de modo a evitar a disseminação do vírus, está entre as principais estratégias utilizadas. Entretanto, a eficiência desses produtos pode variar de acordo com a fase de vida do inseto, da cultura, do modo de aplicação e da resistência de populações aos princípios ativos (Dennehy *et al.*, 2005). Assim, o uso de plantas resistentes, portando principalmente o gene *Ty-1*, tem sido a estratégia mais eficiente e prática para minimizar as perdas causadas pelos begomovírus (Kumar *et al.*, 2017). Não

se sabe, contudo, se o amplo uso de materiais com resistência pode resultar em variações populacionais do vírus.

Como se sabe, vírus de DNA de fita simples pertencentes à família *Geminiviridae* mostram altos níveis de variação genética, em média  $2,88 \times 10^{-4}$  (subs/sítio/ano), similar a taxas de mutações encontradas em vírus de RNA (Duffy & Holmes, 2008). Além dos eventos de mutação a recombinação também contribui significativamente para a variabilidade desses vírus. Este último, é um importante mecanismo de fonte de variação genética, atuando também na manutenção e reparação de moléculas de DNA ou RNA (Klein *et al.*, 2019). O grande número de espécies nesta família e a facilidade da determinação da sequência do genoma completo desses vírus favoreceram o amplo estudo taxonômico e de diversidade deste grupo.

Mais recentemente, o sequenciamento em larga escala (*High-Throughput Sequencing* – HTS) tornou-se uma ferramenta útil e acessível para as análises genômicas de populações virais, somando às técnicas de amplificação de DNA circular e clonagens frequentemente adotadas para o estudo dos geminivírus.

Os estudos de diversidade de espécies de begomovírus são essenciais para o conhecimento do panorama de espécies presentes em determinadas áreas. Esse conhecimento gera aplicações em estratégias de controle que visem reduzir os danos econômicos causados por esses vírus. Entretanto, estudos dirigidos para essa área no Brasil são raros, desatualizados, esparços e muitas vezes não levam em consideração possíveis mudanças na diversidade, o que pode levar a existência de lacunas no conhecimento da diversidade de espécies. Essas lacunas podem dificultar as estratégias de elaboração de controle mais eficientes. Assim, com o intuito de gerar informações da diversidade de begomovírus ao longo dos anos e aproveitando uma coleção de isolados de begomovírus de tomateiro da Embrapa Hortaliças, objetivo desse trabalho foi avaliar

entre os anos de 2003 a 2016, por meio de sequenciamento de alto rendimento, a dinâmica do conjunto de espécies de begomovírus na cultura do tomateiro cultivado nos núcleos rurais de Taquara e Pípiripau (principais regiões produtoras de tomate para o consumo *in natura* no Distrito Federal). Avaliou-se também a aptidão das três espécies de begomovírus epidemiologicamente relevantes por meio da análise da progressão do acúmulo do DNA virais em tomateiros com diferentes níveis de resistência a begomovírus. Este estudo poderá contribuir diretamente com os programas de melhoramento genético de tomateiro visto que a partir das análises de composição dos begomovírus será possível compreender o processo de sucessão e evolução viral, particularmente o efeito do uso de cultivares com resistência à doença.

## **HIPÓTESES**

No espaço de tempo entre 2003 a 2016, a diversidade de espécies de begomovírus que infectam tomateiros destinados ao consumo fresco no Distrito Federal apresentou variação devido a vários fatores, entre eles o uso continuado de cultivares com resistência à infecção por begomovírus. Estes fatores causam alterações na estrutura genética das populações de begomovírus, como a seleção de variantes mais adaptadas e competitivas e resultando na alteração da presença e predominância de espécies na região. Quando begomovírus distintos co-infectam a mesma planta, há influência de um sobre o outro, alterando a quantidade de DNA de cada vírus ao longo do processo de infecção.

## **OBJETIVO GERAL**

Avaliar, por meio de sequenciamento de alto rendimento, a diversidade genética de espécies de begomovírus que infectam tomateiros plantados nos Núcleos Rurais de Taquara e Pipiripau entre os anos de 2003 a 2016 e avaliar a aptidão das três espécies de begomovírus epidemiologicamente mais relevantes por meio da análise da progressão do acúmulo do DNA viral em tomateiros com diferentes níveis de resistência a begomovírus.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### **CAPÍTULO 2. Análise da diversidade temporal de begomovírus brasileiros em tomate por sequenciamento de alto rendimento revela diminuição da riqueza de espécies**

- 1) Selecionar as amostras de DNA do grupo 1 (2003-2005), grupo 2 (2009-2011) e grupo 3 (2014-2015) a partir da coleção de DNA total da Embrapa Hortaliças;
- 2) Coletar novas amostras em 2016 para compor o grupo 3;
- 3) Avaliar a diversidade de espécies de begomovírus a partir da técnica de RCA/RFLP;
- 4) Sequenciar individualmente o pool de RCA dos três grupos de amostras;
- 5) Analisar, por meio de ferramentas de bioinformática, a diversidade de espécies a partir das sequências de DNA obtidas;
- 6) Realizar a detecção do gene *Ty-1*;
- 7) Analisar as sequências de DNA das espécies de begomovírus;
- 8) Confirmar a presença do DNA-A dos begomovírus encontrados nas amostras coletadas.
- 9) Avaliar a diversidade intraespecífica de duas espécies de begomovírus;
- 10) Comparar a identidade das sequências do DNA-A;
- 11) Avaliar a relação filogenética entre as espécies de begomovírus identificadas.

### **CAPÍTULO 3. Análise da progressão do acúmulo do DNA viral em tomateiros com diferentes níveis de resistência infectados com três begomovírus em infecções simples e mistas**

- 1) Avaliar a progressão do acúmulo do DNA em infecção simples e mista de três espécies de begomovírus em tomateiros suscetíveis e resistentes;
- 2) Avaliar o efeito das infecções no tipo e o tempo de surgimentos dos sintomas.

# **CAPÍTULO 1**

---

---

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## Capítulo 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Família *Geminiviridae*

As partículas virais das espécies classificadas dentro da família *Geminiviridae* são estruturalmente caracterizadas pela morfologia geminada (característica responsável pelo nome da família). As partículas dos geminivírus possuem o tamanho de 22 x 38 nm, estruturadas na forma de 22 capsômeros formando dois icosaedros incompletos (Brown *et al.* 2011), responsáveis por envolver individualmente o DNA das espécies bipartidas ou monopartidas. O genoma apresenta um tamanho que pode variar de 2,5 a 3,0 kb, a depender da espécie (Harrison, 1985).

Atualmente, essa é a maior família de vírus de plantas, com 462 espécies reconhecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV). Essas espécies estão divididas em nove gêneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus* (Figura 1). A classificação em nível gênero é realizada de acordo com a gama de hospedeiras, tipo de inseto vetor, organização genômica e a identidade de sequências do genoma completo (Brown *et al.*, 2015; Zerbini *et al.*, 2017; Varsani *et al.*, 2017).

Os vírus pertencentes ao gênero *Mastrevirus* (espécie-tipo *Maize streak virus*) possuem um único componente genômico de DNA circular fita simples (ssDNA) de 2,6 a 2,8kb. Estes codificam quatro genes, duas ORFs no sentido viral (V1 e V2) e duas no sentido complementar (C1 e C2) (Brown *et al.*, 2011). Os genes no sentido viral e complementar são separados por duas regiões intergênicas denominadas de *long intergenic region* (LIR) e *short intergenic region* (SIR) (Zerbini *et al.*, 2017) (Figura 1). Os mastrevírus utilizam o mecanismo de “splicing” para a expressão gênica (Wright *et al.*, 1997). Os membros desse gênero podem infectar plantas monocotiledôneas ou dicotiledôneas tanto no Velho Mundo, quanto no Novo Mundo (Kreuze *et al.*, 2009;

Shepherd *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2017; Fontenele *et al.*, 2017). A transmissão dos mastrevírus é realizada por espécies de cigarrinhas do gênero *Cicadulina* (Hemiptera Cicadellidae) de maneira circulativa não propagativa (Reynaud & Peterschmitt, 1992; Lett *et al.*, 2002). Os mastrevírus estão associados a importantes surtos de doenças de plantas cultivadas. Um exemplo é o a doença conhecida com Maize streak Disease (MSD). A MSD causa perdas econômicas importantes na cultura do milho (Shepherd *et al.*, 2010). Além do milho, outras culturas são economicamente afetadas por mastrevírus como trigo, grão de bico, lentilha e aveia (Nahid *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2014)

A espécie *Tomato pseudo-curly top virus* é a única espécie do gênero *Topocuvirus*. Esse vírus possui um único componente de ssDNA codificando seis genes com uma organização genômica muito similar a dos begomovírus monopartidos (Brown *et al.*, 2011; Zerbini *et al.*, 2017). A partir de análises de sequências, é sugerido que o tomato pseudo-curly top virus (TPCTV) possui características similares aos vírus pertencentes aos gêneros *Mastrevirus* e *Begomovirus*, o que sugere que esta espécie é um recombinante natural (Bridson *et al.*, 1996). Entretanto, de acordo com as análises das sequências da capa proteica (CP) do vírus TPCTV, foi possível demonstrar uma maior relação com os curtovírus quando comparada a CP de begomovírus. A gama de hospedeiras desse topocuvírus é rescrita a espécies de dicotiledôneas e sua transmissão é feita pelo membracídeo *Micrutalis malleifera* (Hemiptera, Membracidae) (Simons & Coe, 1958).

Os curtovírus possuem um único genoma composto de ssDNA de 2,9 a 3,0kb e codificam seis a sete proteínas (a depender do isolado), sendo que três dessas são codificadas no sentido viral (ORF V1, V2 e V3) e quatro no sentido complementar (ORF C1, C2, C3 e C4) (Brown *et al.*, 2011; Zerbini *et al.*, 2017) (Figura 1). Assim como os begomovírus, os curtovírus ocorrem no Novo e no Velho Mundo (Velásquez-

Valle *et al.*, 2008). A transmissão das espécies desse grupo de vírus para plantas dicotiledôneas é feita por cigarrinha (Hemiptera, Cicadellidae), de maneira circulativa não propagativa (Soto *et al.*, 2005). Comparações de sequências de nucleotídeos sugerem que os curtovírus divergiram dos begomovírus após um evento de recombinação, alterando a especificidade do vetor (Rybicki, 1994). Atualmente, além da espécie-tipo *Beet curly top virus* outras duas espécies são descritas como membros desse gênero. Isolados da espécie tipo têm sido descritos infectando mais 300 espécies em 44 famílias botânicas (Strausbaugh *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Organização genômica dos vírus pertencentes aos nove gêneros membros da família *Geminiviridae*. As ORFs no sentido viral (V) e complementar (C) e os produtos proteicos correspondentes são indicados de acordo com as cores da legenda da figura: rep/rep A (C1/AC1/C1:C2): proteína associada à replicação; trap (C2): proteína de transcrição/supressor de silenciamento gênico; ren (C3/AC3): proteína potenciadora de replicação; cp (V1/AV1): proteína capsidial; mp (V2/BC1), proteína de movimento; nsp (BV1): proteína de transporte nuclear. LIR: região intergênica longa; SIR: região intergênica curta; CR: região comum. A posição da estrutura em forma de “hairping” contendo a sequência conservada TAATATTAC está localizada na LIR [extraída e modificada de Varsani *et al.* (2017)].

Embora as propriedades biológicas dos becurtovírus sejam semelhantes aos dos curtovírus, eles compartilham apenas 60% da identidade do genoma completo. A CP dos becurtovírus é semelhante aos dos curtovírus, enquanto que a proteína associada a replicação (*replication-associated protein* - Rep) está relacionada com a CP dos mastrevírus (Varsani *et al.*, 2014). Além disso, os becurtovírus e eragrovírus têm a sequência de nonanucleotídeos (TAAGATTCC) que difere da sequência "TAATATTAC", presente na maioria dos geminivírus (Brown *et al.*, 2011). O genoma dos becurtovírus compreende três ORFs sobrepostas no sentido viral (V1, V2 e V3) e duas ORFs no sentido complementar (C1 e C2) (Figura 1). Outra característica que diferencia os becurtovírus dos curtovírus é que esses não possuem as ORFs C3 e C4 (Yazdi *et al.*, 2008). Baseado na sequência da Rep, é provável que esse genoma tenha o mesmo mecanismo de expressão gênica dos mastrevírus. Isolados da espécie-tipo o *Beet curly top iran virus* têm sido relatados infectando espécies de plantas dicotiledôneas como beterraba (*Beta vulgaris*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e tomate (*Solanum lycopersicum*) (Kardani *et al.*, 2013). Além da espécie-tipo, o gênero é composto por duas outras espécies. A transmissão das espécies desse gênero é realizada por *Circulifer haematoceps*, uma espécie de cigarrinha (Hernández-Zepeda *et al.*, 2013).

A espécie *Eragrostis curvula streak virus*, único membro do gênero *Eragrovirus*, é constituída de um único componente genômico de ssDNA com quatro ORFs, semelhante ao descritos para outros geminivírus. A espécie desse gênero é aparentemente um recombinante e possui regiões genômicas semelhantes a outros geminivírus. A ORF C2 é um análogo posicional do gene AC2/C2 dos begomovírus, topocovírus e curtovírus. Além disso, a ORF V1 se assemelha a V1 dos mastrevírus (Varsani *et al.*, 2009, 2014). A gama de hospedeira desse vírus é restrita, sendo que, até o momento foi isolado apenas em plantas monocotiledôneas. (Varsani *et al.*, 2009).

Os vírus do gênero *Turncurtovirus* contêm um único componente genômico de ssDNA com seis ORFs posicionalmente semelhantes aos dos outros geminivírus: duas ORFs no sentido viral (V1 e V2) e quatro no sentido complementar (C1, C2, C3 e C4) (Zerbini *et al.*, 2017) (Figura 1). Esse arranjo difere dos curtovírus por possuir dois genes em vez de três no sentido viral e dos mastrevírus por possuir quatro em vez de dois genes no sentido complementar (Varsani *et al.*, 2014). O gênero *Turncurtovirus* possui apenas duas espécies sendo a espécie-tipo *Turnip leaf roll virus*. A transmissão dos turncurtovírus é feita por cigarrinhas a plantas dicotiledôneas (Varsani *et al.*, 2014).

Os gêneros *Grablovirus* e *Capulavirus* foram os dois últimos gêneros recentemente criados dentro da família *Geminiviridae* (Varsani *et al.*, 2017). A espécie-tipo do gênero *Grablovirus* é *Grapevine red blotch virus*, a primeira das três espécies pertencentes a esse grupo. Uma importante característica desse gênero, que antes só existia nos becurtovírus e mastrevírus, é a presença da ORF C1:C2 (Rep). Os vírus deste gênero têm como vetor natural um inseto popularmente conhecido como gafanhoto da alfafa, *Spissistilus festinus* (Hemiptera, Membracidae) (Bahder *et al.*, 2016). O nome do gênero *Capulavirus* foi derivado da espécie-tipo, *Euphorbia caput-medusae latent virus*. Assim como os mastrevírus e becurtovírus, os capulavírus têm duas regiões intergênicas e expressam a Rep, assim como os grablovírus, utilizando o mecanismo de “splicing” para a expressão gênica. Todos os capulavírus conhecidos tem o motivo “TAATATTAC” comum para a maioria das espécies de geminivírus. Em comum ao genoma dos begomovírus e curtovírus, os capulavírus possuem uma grande ORF (C3), no sentido complementar sobreposta a Rep. A característica única dos capulavírus é um complexo arranjo de possíveis ORFs de codificação da MP localizados na posição 5’ da CP (V1) (Varsani *et al.*, 2017). A transmissão dos capulavírus possivelmente é feita pela espécie de afideo *Aphis craccivora*, como

recentemente relatado para a espécie membro *Alfalfa leaf curl virus* (Roumangnac *et al.*, 2015).

### **1.1. Características gerais dos vírus do gênero *Begomovirus***

O gênero *Begomovirus*, em termos de número e espécies, é considerado o maior grupo de vírus de plantas da atualidade (Zerbini *et al.*, 2017). Das 462 espécies descritas para a família *Geminiviridae*, 409 são espécies de begomovírus. Uma ampla gama de espécies de plantas cultivadas é economicamente afetada. Dentre as principais espécies de begomovírus causadoras de danos econômicos, estão as espécies *African cassava mosaic virus*, *Bean golden mosaic virus*, *Cotton leaf curl Kokhran virus* e *Tomato yellow leaf curl virus*. No geral, os sintomas causados por esses begomovírus, em plantas, são similares incluindo clareamento das nervuras, manchas cloróticas, mosaico, deformação foliar, epinastia, bolhosidade e nanismo. Dependendo do patossistema os sintomas podem variar no tipo e severidade.

A espécie *African cassava mosaic virus* é um dos principais agentes causadores da doença conhecida como “Cassava Mosaic Disease” (CMD). Essa doença afeta economicamente a produção de mandioca (*Manihot esculenta*) em regiões da África e Ásia (Chikoti *et al.*, 2019). A disseminação desse vírus ocorre por meio da propagação de estacas de plantas infectadas e por meio da transmissão por mosca-branca. Os sintomas expressados pela infecção desse vírus são visualizados por clorose, mosaico e severa deformação foliar.

Nas américas a bean golden mosaic (BGM) está entre as principais viroses da cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris*). No Brasil, essa doença foi relatada pela primeira vez em 1965 por Costa (1965). A partir daí, com a expansão do cultivo de plantas hospedeiras de moscas-brancas como soja e algodoeiro, houve a explosão da população de moscas-brancas, inseto vetor do vírus bean golden mosaic virus (BGMV), que se

disseminou rapidamente. Os sintomas apresentados pelo mosaico doutorado são expressados por meio de folíolos jovens encarquilhados, ou com as bordas foliares curvadas para baixo, seguido do clareamento ou leve amarelecimento das nervuras. À medida que as folhas desenvolvem-se começam a surgir machas cloróticas que mais tarde evoluem para o mosaico característico.

Na cultura do algodoeiro, entre as principais doenças que afetam o rendimento da produção está a "Cotton leaf curl disease" (CLCuD) (Farooq *et al.*, 2014). Essa doença é causada por um complexo de espécies de begomovírus, transmitidos por mosca-brancas, dentre elas a espécie *Cotton leaf curl Kokhran virus*. Essa doença é caracterizada pelo aumento do espessamento das nervuras, deformação e encurvamentos das bordas foliares.

O begomovírus monopartido tomato yellow leaf curl virus ocorre predominantemente infectando tomateiros em continentes como Africa, Américas, Asia e Europa. Essa espécie, juntamente com outros begomovírus formam o complexo de espécies causadores da tomato leaf curl disease (ToLCD) (Abhary *et al.*, 2007). As plantas infectadas por esse complexo de vírus apresentam sintomas severos com enrolamento das bordas foliares (sintoma conhecido com *la cuchara*), deformação foliar, clorose e nanismo.

No Brasil, o complexo de espécies de begomovírus que infectam tomateiros destacam-se entre os vírus de maior importância devido aos danos ocasionados, principalmente na tomaticultura (Inoue-Nagata *et al.*, 2016). Os begomovírus associados a altas populações de moscas-brancas têm sido considerados como um dos principais fatores limitantes para a cultura do tomateiro em diversas regiões do país. Em alguns casos, as perdas podem chegar a 100% dependendo do local e época do ano.

Os sintomas causados pela infecção por begomovírus em tomateiro normalmente são severos e são visualizados por meio de clareamento de nervuras (sintoma inicial), clorose internerval, bolhosidade, manchas necróticas, deformação foliar e nanismo. A infecção por begomovírus pode afetar significativamente a produtividade, pois diminui significativamente a área fotossintética da planta (Almási *et al.*, 2001). Normalmente, não são visualizados sintomas em frutos. Entretanto, plantas infectadas com begomovírus tendem a produzir menor número de frutos e com tamanho reduzido (Giordano *et al.*, 2005a; Lemos *et al.*, 2010)

Atualmente, os begomovírus que infectam o tomateiro, baseado na organização genômica, podem ser divididos em begomovírus do Velho Mundo (Europa, Ásia, África e Austrália) e do Novo Mundo (Américas). No Velho Mundo, a maioria dos begomovírus é monopartido, enquanto que no Novo Mundo são encontrados majoritariamente begomovírus bipartidos. Entretanto, algumas espécies monopartidas são relatadas nas américas (Malgarejo *et al.*, 2013; Vu *et al.*, 2015; Macedo *et al.*, 2018). Em geral, os begomovírus encontrados nas Américas são indígenas e não são encontrados em outros continentes.

A transmissão natural dos begomovírus dá-se pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*). Esses insetos, de comportamento polífago, tornam-se transmissores a partir da alimentação em plantas infectadas, que podem ser aquelas cultivadas, silvestres ou daninhas e adquirem a capacidade de vetorar diversas espécies de begomovírus para novos cultivos economicamente importantes (Silva *et al.*, 2010; Barreto *et al.*, 2013; Inoue-Nagata *et al.*, 2016). No Brasil, a introdução do biótipo B (espécie *Bemisia tabaci* Middle East Asia Minor 1 – MEAM1) ocorreu na década de 90, provavelmente via importação de plantas ornamentais (França *et al.*, 1996). Anterior a essa introdução, o biótipo A (New world) era o principal biótipo de mosca-branca presente no país

(Lourenção & Nagai, 1994). Ambos biótipos apresentavam comportamento biológico distintos. O biótipo B, comparado ao biótipo A, apresenta maior gama de plantas hospedeiras (incluindo o tomateiro), maior capacidade reprodutiva e um maior grau de adaptação e dispersão (Bedford *et al.*, 1994; Lü *et al.*, 2014).

A relação begomovírus-vetor é caracterizada como persistente circulativa (Santos *et al.*, 2003; Rosen *et al.*, 2015). A partir da interação com a planta infectada, a mosca-branca inicia o processo de alimentação inserindo o estilete no floema (local das células infectadas por begomovírus) para a sucção da seiva. As partículas virais são ingeridas juntamente com a seiva elaborada. Após a ingestão, as partículas atingem a câmara de filtro e intestino médio. A partir dessa etapa, de forma específica, proteínas da capa proteica dos begomovírus interagem com proteínas do epitélio intestinal do vetor (e.g., *midgut protein* –MGP) e são transportadas para a hemolinfa através da parede do intestino, alcançando as glândulas salivares (Rana *et al.*, 2016). O carreamento e a estabilidade dos vírions na hemolinfa até chegar às glândulas salivares é auxiliado por proteínas (homólogas a Groel) produzidas por endossimbiontes presentes no corpo do inseto (Morin *et al.*, 1999; Kliot *et al.*, 2014). A partir do momento em que as partículas virais chegam às glândulas salivares, estas já estão aptas a serem eliminadas durante o novo processo de alimentação em planta sadia (Czosnek *et al.*, 2017). Apesar da relação vírus-vetor definida como persistente e não propagativo, há controversia quanto à possibilidade desses vírus se replicarem dentro do corpo da mosca-branca. Experimentos demonstraram que moscas-brancas virulíferas a TYLCV, expostas a condições de estresse (moscas-brancas submetidas a exposição a inseticidas), os níveis virais aumentaram continuamente (Pakkianathan *et al.*, 2015). Segundo os autores, em condições normais, o sistema de defesa desses insetos possivelmente responde atuando na supressão da replicação viral.

## 1.2. Características moleculares dos vírus do gênero *Begomovirus*

A maioria das espécies pertencentes ao gênero *Begomovirus* é bipartida, composta por dois componentes genômicos de DNA circular fita simples (DNA-A e DNA-B.). Cada componente possui aproximadamente 2,6kb (Brown *et al.*, 2011). Esses componentes genômicos são encapsidados separadamente por subunidades da capa proteica, onde, dois icosaedros incompletos unidos são formados. Essa fusão entre os icosaedros confere aos begomovírus o aspecto geminado às partículas virais (Böttcher *et al.*, 2004; Hesketh *et al.*, 2018).

De modo geral, o DNA-A dos begomovírus codifica todas as proteínas envolvidas no processo de replicação e encapsidação de ambos os componentes genômicos virais, enquanto que o DNA-B codifica proteínas relacionadas com o movimento intercelular e intracelular do vírus na planta (Rojas *et al.*, 2005; Fondong, 2013). Os dois componentes genômicos compartilham identidade de sequências apenas em uma região de aproximadamente 200 nucleotídeos, chamada de região comum (RC), que é altamente conservada entre o DNA-A e o DNA-B de uma mesma espécie (Hamilton *et al.*, 1984). A RC contém elementos importantes para a replicação e transcrição do genoma viral. Dentro da RC há uma sequência de 30 nucleotídeos que forma uma estrutura estável em forma de grampo de cabelo denominada de *stem-loop*. Nesta estrutura encontra-se um nonanucleotídeo ("TAATATTAC") onde está inserido o sítio de clivagem do DNA e iniciação da replicação. A partir da região intergênica os genes divergem no sentido viral e complementar (Brown *et al.*, 2011).

O DNA-A de begomovírus bipartidos é homólogo ao genoma dos monopartidos. No sentido viral, existe a ORF V1/AV1, que codifica a CP e a ORF V2 (encontrada principalmente em begomovírus monopartidos do Velho Mundo), enquanto no sentido complementar há quatro ORF's, a ORF C1/AC1 (Rep), a C2/AC2 (transcriptional

activator protein – Trap), a C3/AC3 (replication enhancer protein – REn) e por último a ORF C4/AC4 (Brown *et al.*, 2011).

A ORF V1/AV1 codifica a CP, única proteína estrutural dos geminivírus. A CP dos geminivirus está envolvida em inúmeros processos durante o ciclo de replicação dos begomovírus. Além da predominante função de encapsidar ambos componentes genômicos, a CP também está envolvida com a proteção do genoma viral durante a transmissão pelo inseto vetor e também é essencial para a especificidade da transmissão (Ghanim, 2014). Uma das principais evidências de que a CP dos geminivirus desempenha um papel crítico na transmissão foi elucidado usando o vírus ACMV, um begomovírus transmitido por mosca-branca, e o curtovírus beet curly top virus (BCTV), transmitido por cigarrinhas. A construção de uma quimera de ACMV contendo o gene CP de BCTV resultou na alteração da especificidade do inseto vetor (Briddon *et al.* 1990). Além disso, é proposto, para begomovírus monopartidos, que a interação entre a proteína codificada pela ORF V2 e a CP de cotton leaf curl Kokhran virus –Dubawali (CLCuKV-Dab) pode desempenhar um papel predominante na movimentação célula-a-célula, auxiliando no processo de movimentação sistêmica do vírus (Priyadarshini *et al.*, 2011). Entretanto, para os begomovírus bipartidos, existem algumas controvérsias quanto à função da CP na movimentação sistêmica na hospedeira. Ensaio experimentais conduzidos usando tomato golden mosaic virus (TGMV) mostraram que a ocorrência de infecção sistêmica não é dependente da CP (Gardiner *et al.*, 1988). Já outros trabalhos demonstram o oposto, como é o caso do tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV), para o qual a ocorrência de infecção sistêmica desse vírus depende da CP na ausência do DNA-B. Outra importante função que a CP pode desempenhar é a substituição do funcionamento da NSP (*nuclear shuttle protein*) no transporte do DNA viral entre o núcleo e o citoplasma, como demonstrado utilizando a espécie *Squash leaf*

*curl virus* (Sanderfoot & Ingham, 1996). Ademais, foi demonstrado que a CP de mungbean yellow mosaic virus (MYMV) interage com a importina- $\alpha$ , um componente do complexo de direcionamento dos poros nucleares da célula (Guerra-Peraza *et al.*, 2005).

A ORF V2/AV2 codifica uma proteína multifuncional associada principalmente ao aumento da eficiência na movimentação sistêmica do vírus na planta. Essa função foi determinada por meio de estudos mutacionais, onde plantas inoculadas com clones infecciosos de TYLCV contendo deleções no gene V2 desenvolveram sintomas atenuados e baixa acumulação viral, entretanto, quando inoculada essa mesma construção em protoplastos, a acumulação viral foi semelhante aos vírus selvagens (Padidam *et al.*, 1996). Além de ser necessária para aumentar a eficiência da movimentação viral, a proteína codificada pela V2 também pode atuar na supressão de silenciamento gênico pós-transcricional (Roshan *et al.*, 2018).

A Rep, proteína codificada pela ORF C1/AC1 em begomovírus bipartidos), é essencial para a replicação viral (Etessami *et al.*, 1991). Vale ressaltar que a Rep não é uma polimerase, porém ela tem a capacidade de atuar como uma endonuclease clivando o DNA viral na sequência TAATATT↓AC, presente em quase todos os begomovírus, iniciando o processo de replicação por círculo rolante (RCR, *rolling circle replication*) (Ruhel & Chakraborty, 2019). Com exceção da Rep, as proteínas necessárias para a replicação do vírus são originárias da célula vegetal infectada. Além de iniciar o processo de replicação viral, a Rep também é capaz reprogramar o ciclo celular e assim induzir a superexpressão de proteínas responsáveis pela síntese de DNA polimerase dependente de DNA necessária para a replicação do DNA viral (Gutierrez, 2002; Rizvi *et al.*, 2015; Ramesh *et al.*, 2017).

A ORF C2/AC2 codifica a proteína multifuncional ativadora de transcrição viral, a Trap. Essa proteína é necessária para ativar a expressão dos genes AV1 (CP) e BV1 (NSP) presentes no DNA-A e DNA-B, respectivamente (Sunter *et al.*, 1990; Sunter & Bisaro, 1991). Esta proteína pode atuar ainda como supressora de silenciamento gênico e como determinante da patogenicidade viral (Vanitharani *et al.*, 2004). A Trap suprime o silenciamento de RNA da hospedeira inibindo a adenosina quinase 2 (ADK2), uma quinase envolvida na via de metilação do DNA (Wang *et al.*, 2005). Além disso, essa proteína também suprime a defesa basal do hospedeiro inibindo a SNF1 quinase, um regulador do metabolismo celular implicado na defesa antiviral inata (Hao *et al.*, 2003). Estudos demonstraram que a atividade da ADK é reduzida em plantas transgênicas expressando a proteína viral Trap ou em plantas infectadas com geminivírus (Wang *et al.*, 2003). Entretanto, a atividade dessa quinase foi aumentada a partir da inoculação com mutantes de geminivírus com a Trap não funcional. Estes resultados demonstram o importante papel da Trap na patogenicidade, causando o aumento na suscetibilidade da hospedeira.

A REn é a proteína codificada pela ORF C3/AC3, cuja função é intensificar a replicação do DNA viral, tornando-a mais eficiente. Ao contrário da Rep, a presença da REn não é essencial para que a replicação ocorra. Entretanto, a partir da interação de ambas proteínas, ocorre o aumento da acumulação do DNA viral no núcleo por meio de um mecanismo ainda desconhecido. Existe também a possibilidade da REn possuir a capacidade de direcionar a Rep para o domínio de ligação Rep/DNA de modo a acelerar a iniciação e o processo de replicação (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Settlage *et al.*, 2005; Pradhan *et al.*, 2017). Apesar de não ser uma proteína essencial, estudos envolvendo mutantes dessa proteína demonstraram que esses mantinham a capacidade de se replicar e infectar sistemicamente a planta, no entanto houve o retardamento dos

sintomas e uma diminuição significativa da acumulação do DNA viral (Eteessami *et al.*, 1991).

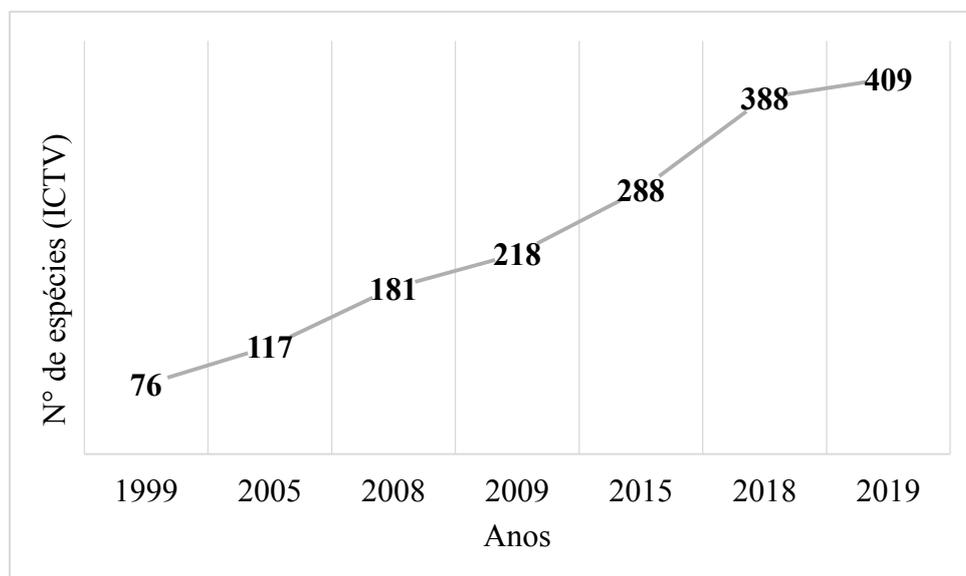
A ORF C4/AC4 está inserida dentro da ORF AC1, mas em uma fase de leitura diferente. Para algumas espécies de begomovírus esta ORF pode estar relacionada com a severidade dos sintomas e no movimento sistêmico do vírus na planta (Jupin *et al.*, 1994; Teng *et al.*, 2010). Entretanto, Fontenelle *et al.* (2007) demonstraram por meio de comparação de mutantes e não mutantes da ORF AC4 de ToCMoV que não há diferenças entre o desenvolvimento de sintomas e nem no processo de movimentação sistêmica viral na planta. A AC4 também assume a função de mais uma proteína envolvida na supressão de silenciamento, tanto em begomovírus monopartidos, quanto em begomovírus bipartidos. Em alguns casos a C4 pode interagir e inibir a NbSAMS2, uma proteína envolvida no silenciamento transcricional (TGS) e pós-transcricional (PTGS) contra geminivírus (Gopal *et al.*, 2007; Ismayil *et al.*, 2018).

O DNA-B dos begomovírus bipartidos contém apenas duas ORFs, uma no sentido viral (BV1) e outra no sentido complementar (BC1). As duas codificam proteínas responsáveis pelo movimento do vírus na planta (*nuclear shuttle protein* - NSP e *movement protein* - MP, respectivamente). A NSP, proteína de transporte nuclear, atua no tráfego intracelular do DNA viral do núcleo, local de replicação dos vírus, para o citoplasma (Ward & Lazarowitz, 1999). Estudos têm demonstrado que durante o processo de transporte intracelular várias proteínas da hospedeira podem interagir com NSP, incluindo acetiltransferases, GTPase citoplasmática e histonas H3. Essas interações formam complexos responsáveis por auxiliar no transporte nucleocitoplasmático do DNA viral (Carvalho *et al.*, 2004, 2008; Zhou *et al.*, 2011). A proteína de movimento (MP, *movement protein*) é codificada pela ORF BC1 em begomovírus bipartidos ou pela V2 em monopartidos (Zhang *et al.*, 2001; Priyadarshini

*et al.*, 2011). Esta proteína é responsável pelo movimento viral célula-a-célula, aumentando o limite de exclusão dos plasmodesmas. Ademais, a movimentação célula-a-célula de begomovírus pode estar associado a uma possível interação entre a MP e NSP (Diamos *et al.*, 2019)

Recentemente os critérios de classificação taxonômica definidos pelo ICTV foram revisados. Essa definição de novos critérios para demarcação de novas espécies foi estabelecida para suprir uma deficiência no mecanismo de demarcação de espécies anteriormente recomendado. Então, a partir daí, foi proposto um conjunto de diretrizes atualizadas para a classificação de novas espécies de begomovírus. A nova proposta baseia-se na identidade 91% e 94% como limiar de demarcação para begomovírus pertencentes a diferentes espécies e estirpes, respectivamente. Além disso, para evitar variação no cálculo da identidade das sequencias, foi padronizado o algoritmo SDT a ser utilizado para determinar a posição taxonomia dos begomovírus (Zerbini *et al.*, 2017).

O gênero *Begomovirus* sempre teve o maior número de espécies quando comparado aos outros gêneros da família *Geminiviridae*. Ao longo tempo, o desenvolvimento de novas ferramentas de detecção e sequenciamento de DNA tem proporcionado a descoberta de novos begomovírus, aumentando cada vez mais o número de espécies relatadas (Figura 2).



**Figura 2.** Histórico do número de espécies descritas no gênero *Begomovirus* segundo Comitê Interacional de Taxonomia de Vírus (ICTV).

Até 1997, a classificação dentro da família *Geminiviridae* era estabelecida em subgrupos. Antes da reclassificação, os begomovírus pertenciam ao subgrupo III. Em 1997 foi aceita a proposta de renomeação do subgrupo III para gênero *Begomovirus*. Poucos anos após a renomeação, em 1999 o gênero possuía 76 espécies (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Cerca de 6 anos depois, em 2005 esse número cresceu para 117. Até 2015, houve um número significativo de novos relatos passando de 117 espécies em 2005, para 288 (ICTV, 2015). Entretanto, em pouco tempo, já em 2019 o número de espécies saltou para 409 espécies. Esse número atualmente permanece o mesmo (ICTV, 2019). Nos últimos anos a explosão do número de espécies de begomovírus pode estar relacionada com a facilidade do acesso a técnica de sequenciamento em larga escala (Villamor *et al.*, 2019).

### 1.3. Mecanismo de replicação dos begomovírus

O processo de replicação do DNA dos begomovírus ocorre no núcleo das células hospedeiras por meio do mecanismo círculo rolante (“rolling circle replication” – RCR) (Saunders *et al.*, 1991). Após a introdução dos vírions dentro da célula com o auxílio do inseto vetor, o ssDNA é transportado até chegar ao interior do núcleo. Esse processo de

transporte do DNA viral possivelmente é auxiliado pela formação de um complexo entre a CP e proteínas de cadeias de transporte da hospedeira (Unsel *et al.*, 2001; Gafni & Epel, 2002; Priyadarshini *et al.*, 2011).

Uma vez o ssDNA viral presente no núcleo, com o auxílio da polimerase da hospedeira, o ssDNA é convertido em dsDNA intermediário, conhecido como forma replicativa (RF, replicative form) (Gutierrez, 2002). Além de atuar como molde para a replicação a RF também serve de molde para o processo de transcrição. O mecanismo de replicação é iniciado quando a Rep cliva uma das fitas DNA viral na origem de replicação iniciando o processo de RCR. Durante o início do processo de replicação dos geminivirus a proteína Rep liga-se covalentemente na extremidade 5' e a extremidade 3' é usada para a extensão. Quando o ciclo é terminado a Rep atua separando a fita nova da fita antiga. Assim, o novo ssDNA é produzido e circularizado usando a atividade de ligação da Rep (Pradhan *et al.*, 2017). Como novas fitas de ssDNA são sintetizadas, as fitas antigas são progressivamente liberadas até que, após um ou mais ciclos de replicação, formam-se monômeros circulares ou multímeros (Jeske *et al.*, 2001). As moléculas de ssDNA produzidas inicialmente podem ser convertidas novamente em dsDNA reiniciando o ciclo de replicação e/ou transcrição. Mais tardiamente, já quando os produtos dos genes CP e NSP estão presentes, estes se ligam ao ssDNA para encapsidá-lo ou transportá-lo para fora do núcleo (Jeske *et al.*, 2001). Uma vez no citoplasma, o vírus realiza o movimento a curta distância mediado pela proteína MP através dos plasmodesmas e finalmente para o floema, onde é transportado a longa distância (Diamos *et al.*, 2019).

Ambos os componentes DNA-A e DNA-B de begomovírus bipartidos são replicados usando os mesmos princípios supracitados. Embora esses componentes tenham baixa identidade de sequência, ambos compartilham uma região conservada de

~200 nucleotídeos, a RC. Dentro da RC de ambos os componentes há uma sequência de 30 nucleotídeos que forma uma estrutura em formato de grampo de cabelo (*stem loop*), contendo um nonanucleotídeo (TAATATT/AC) onde está inserido o sítio de iniciação da replicação. Na RC também há a presença de sequências repetidas conhecidas como “iterons” que são regiões reconhecidas pela Rep para ligação do complexo replicativo. Vale ressaltar que a ligação específica Rep-iterons é essencial para o processo de replicação dos componentes cognatos (DNA-A e DNA-B) que contêm as sequências repetidas de ligação da Rep.

#### **1.4. Histórico da diversidade de begomovírus infectando tomateiro no Brasil**

O tomateiro é uma das culturas de maior importância econômica do Brasil, estando entre as principais hortaliças cultivadas em várias regiões do país durante quase todo o ano. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2019 a estimativa de produção foi de 4,3 milhões de toneladas ocupando uma área de 66,2 mil hectares. Entretanto, os desafios enfrentados pelos tomaticultores são enormes. Isso ocorre devido à alta incidência de doenças, notadamente as begomoviroses destacam-se pela alta incidência e prejuízos econômicos causados (Inoue-Nagata *et al.*, 2016).

O primeiro relato de begomovírus em tomateiros no Brasil ocorreu em 1960, quando se registrou a ocorrência de plantas com sintomas de “mosaico dourado” e “clorose infecciosa” no estado de São Paulo (Flores *et al.*, 1960). Posteriormente a essa ocorrência, TGMV foi a espécie caracterizada como sendo o agente causal do “mosaico dourado” do tomateiro. Os sintomas causados por TGMV são visualizados por meio de manchas cloróticas e amarelecimento das nervuras (Matyis *et al.*, 1975). Experimentos com clones infecciosos demonstraram que, em contraste à severidade dos sintomas de outras espécies, a infecção por TGMV não demonstrou sintomas severos e no decorrer

da infecção e com o desenvolvimento da planta, os sintomas causados desapareceram (Wyant *et al.*, 2012). De acordo com observações atuais de estudos de detecção de begomovírus em amostras de tomateiros em todo o Brasil, pode-se assumir que TGMV foi um vírus pouco detectado em amostras de tomateiros. Assim sendo, esse begomovírus pode ser considerado um vírus de menor importância econômica no cenário da tomaticultura atual (Inoue-Nagata *et al.*, 2016).

Após o registro da ocorrência do primeiro begomovírus em tomateiro no Brasil passaram-se duas décadas sem novos relatos de detecção desse e de outros begomovírus em tomateiros no país. Esse fato pode ser explicado pela ocorrência única da espécie *New World* (NW) de *B. tabaci* (biótipo A) durante esse período. Sabe-se que o biótipo A, apesar de ser considerado vetor de begomovírus, este não colonizava eficientemente plantas de tomateiro (Lourenção & Nagai, 1994). Esse biótipo, tem a presença contínua no país até nos dias atuais (Figura 3), entretanto, tem preferência em colonizar culturas diferentes do tomateiro. Isso claramente prejudica a transmissão primária e secundária desse grupo de vírus, o que resulta na baixa disseminação de espécies de begomovírus para o tomateiro. Entretanto, apesar de o biótipo A não colonizar eficientemente tomateiros, a incidência de doenças causadas por begomovírus cresceu rapidamente a partir da década de 90.

O aumento da ocorrência de novas espécies pode ser justificado pela invasão da espécie *Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), anteriormente classificada como biótipo B (De Barro, *et al.*, 2011). Desde o primeiro relato da presença de moscas-brancas biótipo B no Brasil, mais de 20 espécies de begomovírus indígenas foram relatadas (Figura 3). Possivelmente esse alto número de novas espécies relatadas ocorreu porque, ao contrário do biótipo A, o biótipo B apresenta maior grau de adaptação ambiental, possui ampla gama de hospedeiras como solanáceas e diversas

espécies de plantas silvestres e daninhas (Khan *et al.*, 2011; Rodrigues & Silva, 2018; Trindade *et al.*, 2019). Essa capacidade de colonizar uma ampla variedade de espécies de plantas pode resultar na transferência de vírus nativos de plantas não cultivadas para o tomateiro e vice-versa (Silva *et al.*, 2010; Barreto *et al.*, 2013; García-Arenal & Zerbini, 2019).

A alta eficiência para vetorar vírus e colonizar uma grande amplitude de plantas pode ensejar interações entre diferentes espécies de begomovírus. Isso acaba resultando no aumento da variabilidade genética e em relações harmônicas ou desarmônicas como, competição intra e interespecífica, prevalência e surgimento de novas espécies (Paz-Carrasco *et al.*, 2014, García-Arenal & Zerbini, 2019). A alta eficiência de disseminação de begomovírus está entre os principais fatores que resultam na alta diversidade de espécies desse grupo de vírus encontradas em diversas culturas agronômicas (Morales *et al.*, 2001; Rodríguez-Pardina *et al.*, 2006; Polston & Capobianco, 2013). Por todas as características supracitadas, é possível assumir que a alta diversidade de espécies de begomovírus no Brasil está intimamente associada à capacidade do vetor em se alimentar em ampla gama de hospedeiras, reprodutibilidade elevada e alta eficiência de transmissão.

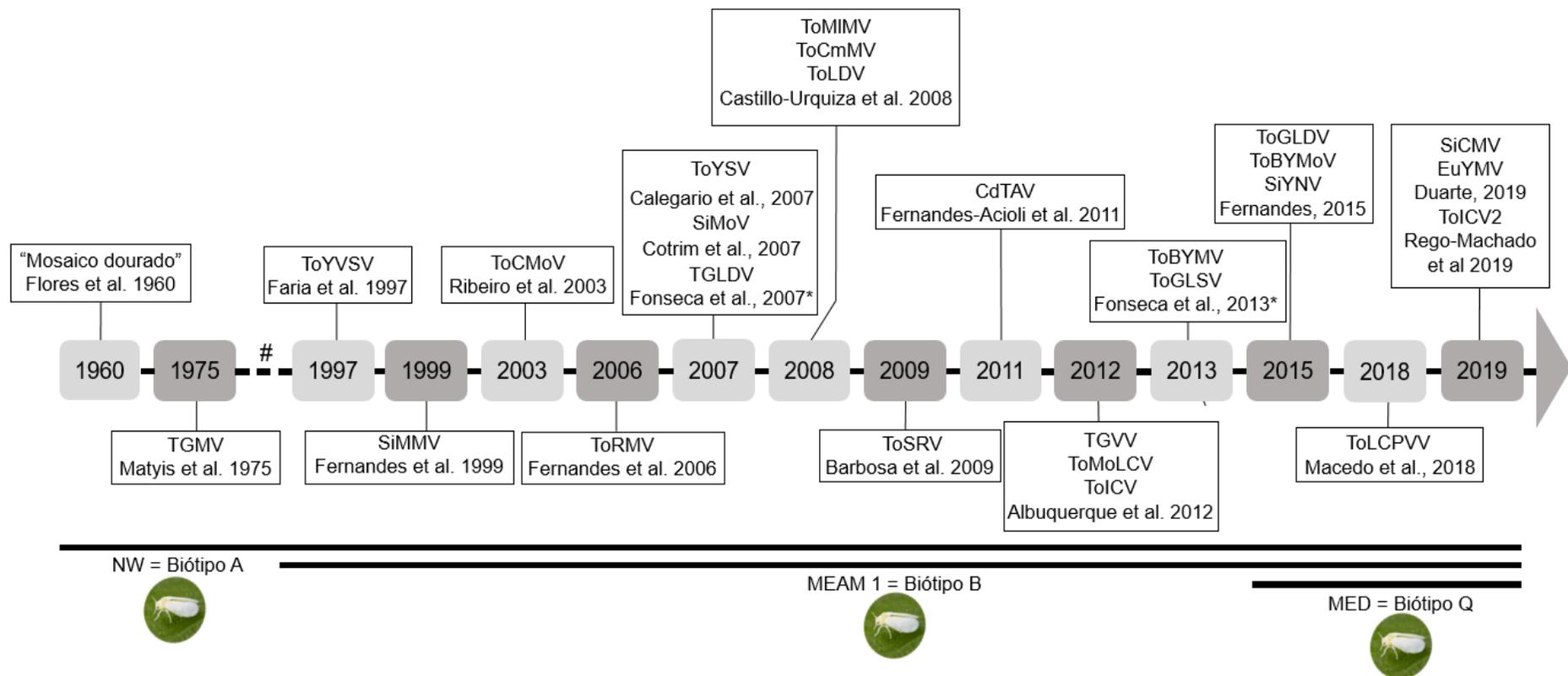
Existem diversos fatores que podem atuar no panorama da diversidade de begomovírus no Brasil, entre eles o ambiente, mudanças na hospedeira e, como enfatizado anteriormente, o tipo de inseto vetor. Recentemente, houve no Brasil a introdução da mosca-branca *Bemisia tabaci* Mediterranean (MED) (Barbosa *et al.*, 2015). A introdução dessa mosca-branca levanta muitas questões sobre os possíveis impactos na agricultura no país. Até o momento, sabe-se que o deslocamento da mosca-branca MED não ocorreu nas principais regiões agrícolas (de Moraes *et al.*, 2015). Entretanto, acredita-se que com a ocorrência desse descolamento, caso medidas de

controle preventivo não seja aplicadas para evitar a sua disseminação entre diferentes regiões produtoras de tomate, impactos econômicos significativos podem ocorrer. Além disso, assume-se que com a expansão das populações da mosca-branca MED no país, a diversidade de begomovírus pode ser gradualmente alterada ao longo dos anos.

A diversidade de begomovírus em tomateiro no Brasil é maior quando comparada a outros países como Argentina, Chile, Colômbia e Uruguai. Atualmente infectando tomateiros na Argentina são relatadas nove begomovírus (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Medina *et al.*, 2012), sendo esse o segundo país da América do Sul com maior número de espécies relatadas, seguido por Colômbia com cinco espécies, Chile e Uruguai com 2 espécies (Vaca-Vaca *et al.*, 2011; Arruabarrena *et al.*, 2016). A alta diversidade de espécies no Brasil, pode estar relacionado principalmente ao tamanho continental, ao número de virologistas dedicados ao estudo dos begomovírus e também ao clima tropical que favorece a reprodução e dispersão do vetor (Xiao *et al.*, 2016).

O histórico da diversidade de espécies tem mostrado a ampla gama de espécies capazes de infectar tomateiros no Brasil. Aqui, lista-se 25 espécies de begomovírus presentes em lavouras de tomateiros no país relatadas (Figura 3): *Chino del tomate Amazonas virus*, *Sida micrantha mosaic virus*, *Sida mottle virus*, *Sida yellow net virus*, *Sida common mosaic virus*, *Euphorbia yellow mosaic virus*, *Tomato bright yellow mosaic virus*, *Tomato bright yellow mottle virus*, *Tomato chlorotic mottle virus*, *Tomato common mosaic virus*, *Tomato golden leaf distortion virus*, *Tomato golden leaf spot virus*, *Tomato golden mosaic virus*, *Tomato golden vein virus*, *Tomato interveinal chlorosis virus*, *Tomato interveinal chlorosis-2*, *Tomato leaf curl purple vein virus*, *Tomato leaf distortion virus*, *Tomato mild mosaic virus*, *Tomato mottle leaf curl virus*, *Tomato rugose mosaic virus*, *Tomato rugose yellow leaf curl virus*, *Tomato severe rugose virus*, *Tomato yellow spot virus*, *Tomato yellow vein streak virus* (Matyis *et al.*,

1975; Faria *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2012; Fernandes, 2015; Fonseca *et al.*, 2016 dados não publicados; Macedo *et al.*, 2018; Duarte, 2019; Rego-Machado *et al.*, 2019).



**Figura 3.** Histórico de relatos e/ou caracterização das espécies de begomovírus descritas em tomateiro no Brasil a partir de 1960 até 2019. O início e o término das barras na parte de baixo da figura indicam a presença dos biótipos A, B e Q de mosca-branca. TGMV; tomato golden mosaic virus; ToYVSV: tomato yellow vein streak virus; SiMMV: sida micranta mosaic virus; ToCMoV: tomato chlorotic mottle virus; ToRMV: tomato rugose mosaic virus; ToYSV: tomato yellow spot virus; ToMIMV: tomato mild mosaic virus; ToCmMV: tomato common mosaic virus; ToLDV: tomato leaf distortion virus; ToSRV: tomato severe rugose virus; CdTAV: chino del tomato amazonas virus; TGVV: tomato golden vein virus; ToMoLCV: tomato mottle leaf curl virus; ToICV: tomato interveinal chlorosis virus; ToBYMV: tomato bright yellow mottle virus; ToGLSV: tomato golden leaf spot virus; SiYNV: sida yellow net virus; ToLCPVV: tomato leaf curl purple vein virus; SiCMV: Sida common mosaic virus; EuYMV: euphorbia yellow mosaic virus; ToICV2: tomato interveinal chlorosis virus 2. #: período sem relatos de begomovírus; \*: dados não publicados.

Apesar da alta diversidade de begomovírus encontrados infectando tomateiros, a maioria dos begomovírus citados anteriormente apresentam pouca importância econômica (Inoue-Nagata *et al.*, 2016). A detecção da maioria dessas espécies ocorre em baixa incidência ou é limitada regionalmente. Em alguns casos, vírus como o TGVV que antes eram detectados, atualmente não são detectados, são restritos em pequenas regiões ou estão em níveis não detectáveis em campo. Ao contrário, levantamentos recentes têm demonstrado que poucos begomovírus em tomateiro, como ToSRV e ToMoLCV, devido a severidade dos sintomas e alta incidência na maioria das regiões produtoras, são considerados importantes economicamente. Com exceção do TGMV, já descrito anteriormente, os principais begomovírus infectando tomateiro no Brasil serão descritos a seguir com maiores detalhes.

No final da década de 90, foi relatada por Faria *et al.* (1997) um vírus denominado risca amarela da nervura do tomateiro, ou tomato yellow vein streak virus (ToYVSV). Este vírus foi encontrado infectando tomateiro no estado de São Paulo. Durante este estudo, testes de transmissão, utilizando moscas-brancas (MEAM 1), foram realizados a fim de caracterizá-lo biologicamente. A partir desses ensaios, os autores comprovaram a transmissão por moscas-brancas de tomateiros infectados para tomateiros saudáveis. Além disso, eles determinaram a transmissão do ToYVSV de tomateiro para plantas de batata. Por fim, realizaram a caracterização molecular utilizando primers universais para amplificar e clonar o DNA-A e DNA-B do begomovírus. Após a obtenção das sequências de DNA, as análises de BLASTn de diferentes regiões do genoma clonados demonstraram baixa identidade com begomovírus presentes em bancos de dados, suficiente para caracterizá-lo como uma nova espécie. Mais de uma década depois, outro isolado de batata, proveniente do sul do Brasil, foi totalmente caracterizado (Albuquerque *et al.*, 2010). Os relatos dessa espécie encontram-se restritos em alguns estados do Brasil, como São Paulo, Bahia, Pernambuco, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (Faria *et al.*, 1997; Galvão *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 1996; Bezerra *et al.*,

1997; Albuquerque *et al.*, 2010). Além desses relatos, ToYVSV foi detectado em tomateiros na Argentina, Chile e Uruguai (Huanca-Mamani & Trejo-Saavedra, 2013, Arruabarrena *et al.*, 2016).

O primeiro relato do vírus SiMMV, em tomateiro, foi realizado por Fernandes *et al* (1999). Essa espécie indígena do Brasil é um típico exemplo de begomovírus bipartido do novo mundo (Tavares *et al.*, 2012). Apesar de ser uma espécie originalmente detectada em plantas daninhas (p. ex. *Sida micrantha*), esse vírus também é capaz de infectar culturas de grande importância econômica como feijão, soja, quiabo e tomate (Fernandes-Acioli *et al.*, 2011; Aranha *et al*, 2011). Esporadicamente detectado em lavouras de tomateiro, a infecção causada por SiMMV causa nenhum ou poucos sintomas. A presença desse begomovírus infectando tomateiros indica a importância do intercâmbio de vírus entre plantas daninhas e plantas cultivadas. Evolutivamente, esse intercâmbio de vírus, entre diferentes espécies de plantas hospedeiras, pode resultar no surgimento de novos isolados virais mais adaptados (McLaughlin *et al.*, 2008; García-Arenal *et al.*, 2019).

No estado de Minas Gerais, em 1996, foi observada a ocorrência de plantas com sintomas causados por begomovírus em lavouras de tomateiros (Rezende *et al.*, 1996; Zerbini *et al.*, 1996). A partir das amostras coletadas nessa região, mais especificamente em Uberlândia, a obtenção da sequência do DNA-A e DNA-B do isolado TGV-Ub1 comprovou se tratar de uma nova espécie denominada *Tomato rugose mosaic virus*. Esse begomovírus é caracterizado por ser transmitido tanto por moscas-brancas, quanto por inoculação mecânica (em condições experimentais) (Fernandes *et al.*, 2006). Atualmente, apesar dos avanços de ferramentas de detecção, esse vírus não tem sido naturalmente detectado (Inoue-Nagata *et al.*, 2016). Apesar disso, já houveram relatos de alta incidência de begomovirose causadas por esse vírus limitadas em algumas regiões. Durante um levantamento de espécies realizado em

2000 em três municípios de Minas Gerais, Fernandes (2001) demonstrou a prevalência de ToRMV, detectado em 73% das amostras de tomateiros coletadas.

O vírus ToSRV foi inicialmente caracterizado infectando tomateiro, por Barbosa *et al.* (2009). Essa espécie apresenta alta relevância epidemiológica e econômica no cenário da tomaticultura nacional. No geral, as perdas de produção causadas pela infecção por ToSRV podem chegar a 78% (Lemos *et al.*, 2010). Geralmente, em condições naturais, os sintomas causados por essa espécie são severos, prejudicando de forma significativa a planta infectada. Na região centro-sul, essa espécie é predominantemente encontrada em lavouras de tomateiros de crescimento determinado e indeterminado (Fernandes *et al.*, 2008; Mituti *et al.*, 2019). São comuns os relatos de alta incidência de ToSRV em lavouras, em alguns casos chegando até 100% de plantas infectadas. Como citado anteriormente, a relevância de ToSRV para a tomaticultura está relacionada a alta incidência, a severidade dos sintomas e aos danos econômicos causados. A alta incidência de ToSRV, possivelmente está relacionado a alta eficiência de transmissão e a sua ampla gama de hospedeira (Barbosa *et al.*, 2011; Macedo *et al.*, 2015).

O primeiro relato de infecção em tomateiros causados por TGVV e sua caracterização molecular foi realizado por Fernandes *et al.* (2008). Mais tarde Albuquerque *et al.* (2012) realizaram a caracterização molecular do genoma completo de TGVV. Fernandes *et al.* (2008) estudaram por meio de sequências parciais de espécies de begomovírus obtidos em diferentes regiões do Brasil. A partir das análises realizadas com amostras coletadas em 2002 e 2004, eles demonstraram a prevalência de begomovírus entre esses o TGVV. Atualmente, apesar dos constantes levantamentos de diversidade de espécies realizados, esse begomovírus não tem sido detectado infectando tomateiro no Brasil (Martins, 2017; Rego-Machado *et al.*, 2016; dados não publicados). Esse fato pode ser explicado por fatores relacionadas a eficiência de transmissão pelo vetor, já que Macedo *et al.* (2015) realizaram experimentos que

descrevem a baixa eficiência de transmissão dessa espécie, comparada o vírus ToSRV (predominante no Brasil).

O vírus ToMoLCV é o primeiro begomovírus monopartido relatado no Brasil (Vu, *et al.*, 2015). Essa espécie é considerada de alta importância econômica para o tomaticultura nacional, especialmente para a região Nordeste e centro-sul do Brasil (Fernandes *et al.*, 2008; Inoue-Nagata *et al.*, 2016; Ferro *et al.*, 2017). Os sintomas causados por esse vírus são mais severos comparados a outras espécies existentes no país (Macedo *et al.*, 2018). A predominância dessa espécie ocorre principalmente em regiões mais quentes. Entretanto, levantamentos epidemiológicos realizados no centro-oeste do Brasil têm mostrado a prevalência de ToMoLCV, juntamente com a espécie ToSRV (Fernandes *et al.*, 2008; Inoue-Nagata *et al.*, 2016; Mituti *et al.*, 2019).

A alta diversidade de begomovírus em tomateiro no Brasil tem sido o foco de vários estudos. Assim, tem-se observado a dinâmica na diversidade de espécies em todo o Brasil. Estudos realizados pelo nosso grupo para a identificação de vírus em tomateiro por meio de sequenciamento em larga escala têm demonstrado mudanças na composição de espécies de begomovírus em tomateiro, principalmente nas regiões de Goiás e Distrito Federal (dados não publicados). Além da rápida dinâmica de diversidade de begomovírus, tem-se observado a prevalência de algumas espécies em determinadas regiões do Brasil.

### **1.5. Variabilidade genética dos begomovírus**

Normalmente, a evolução dos seres vivos é visualizada ao longo de muitos anos. Por outro lado, a evolução de vírus, que são entidades submicroscópicas com alta capacidade reprodutiva, é detectada em curtos períodos de tempo (Roossinck, 1997). Os mecanismos responsáveis por causar a variabilidade genética, especificamente em vírus de plantas, são complexos e podem ser determinados por múltiplos fatores durante os processos de interação vírus-vetor (quando o vírus possui vetor) e vírus-hospedeira. Mutações pontuais ou ao longo

dos genomas estão entre as principais fontes de variação genética em vírus (Lima *et al.*, 2017). Além disso, recombinação genética também é uma importante fonte de variação genética, que juntamente com eventos de mutação e outras fontes de variabilidade pode mudar a composição genética das populações de vírus em grande velocidade (Fiallo-Olivé *et al.*, 2019).

Pesquisas relacionadas à evolução de vírus de RNA, demonstraram seu alto potencial de variação genética (Duffy, 2018). Os vírus compostos de RNA apresentam relativamente altas taxas de mutação, variando entre  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  substituições por sítio por ano (subs/sítio/ano) (Malpica *et al.*, 2002; Sanjuán *et al.*, 2010). O principal fator para a ocorrência de mutações em vírus de RNA ocorre durante o processo replicativo, altamente suscetível a erros, uma vez que a RNA polimerase dependente de RNA (RdRps) utilizada não possui a capacidade de corrigir erros de leitura durante a replicação (“*proof-reading*”) (Steinhauer *et al.*, 1992). A partir disso, é consistente a hipótese que a polimerase está entre os principais fatores responsáveis pela alta taxa de mutação em vírus de RNA (Duffy, 2018).

Apesar dos variados estudos envolvendo análises das taxas de evolução de vírus de DNA fita simples, como geminivírus, ainda não está claro quais mecanismos levam às elevadas taxas de substituição em vírus de ssDNA. Os estudos envolvendo esse tipo análise são baseados principalmente em propostas para tais acontecimentos. Assim, alguns aspectos citados na literatura serão descritos a seguir.

Os vírus de DNA se replicam usando polimerases de DNA dependentes de DNA (DdDps). Entretanto, a partir do repertório de polimerases presentes em organismos eucarióticos, não se conhece qual tipo de polimerase é convocada por vírus de DNA para integrar o processo de replicação (Bisaro, 1996). Contrariamente, aos vírus de RNA que usam suas próprias polimerases propensas a erros, os vírus de DNA realizam a replicação e transcrição no núcleo da hospedeira, e por isso, não codificam uma polimerase viral, pois

normalmente utilizam polimerases da hospedeira. Essas enzimas possuem atividade necessária de revisão de erros durante o processo de replicação e transcrição de longas sequências de DNA da hospedeira, o que implica que as polimerases possam ter a mesma fidelidade de replicação e transcrição do genoma viral. Curiosamente, apesar da capacidade das DdDps de corrigir erros, a taxa de mutação para alguns vírus de DNA fita simples não são menores que as taxas de mutação encontradas em vírus de RNA (Duffy & Holmes, 2009).

Vírus de DNA de fita simples pertencentes à família *Geminiviridae* mostram altos níveis de variação genética, em média  $2,88 \times 10^{-4}$  (subs/sítio/ano), similar a taxas de mutações encontradas em vírus de RNA (Duffy & Holmes, 2008). A razão disso pode estar principalmente associada a recrutamento de DNA polimerases de baixa fidelidade encontradas na hospedeira (Duffy & Holmes, 2009). No entanto, também é possível que esse processo de reparação dos genomas de geminivirus não ocorra, pois estes não possuem padrões adequados de metilação, o que aumenta as taxas de mutação durante a replicação do DNA viral. Além disso, outros mecanismos bioquímicos como desaminação, oxidação ou metilação de bases podem estar influenciando a variabilidade de vírus de ssDNA (Duffy *et al.*, 2008; van der Walt *et al.*, 2008; Duffy & Holmes, 2009). É importante ressaltar que a ocorrência desses processos bioquímicos é 100x maior em vírus de ssDNA do que em vírus de dsDNA (Frederico *et al.*, 1990).

A recombinação envolve a troca de fragmentos do material genético entre componentes genômicos de vírus distintos. Esse é outro importante mecanismo, fonte de variação genética, para manutenção e reparação de moléculas de DNA ou RNA (Klein *et al.*, 2019). A frequência desses eventos contribui para o aumento da diversidade genética de begomovírus, resultando no surgimento de novas espécies aumentando o seu potencial evolucionário e adaptação a novas condições ambientais (Díaz-Pendón *et al.*, 2019).

Para a ocorrência de recombinação, as infecções mistas são um pré-requisito para que esses eventos ocorram. Infecções mistas entre espécies de begomovírus são comumente relatadas, principalmente em reservatórios naturais de vírus como por exemplo, plantas daninhas presentes próximas a lavouras (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Marwal *et al.*, 2014). Isso acontece devido a ampla gama de hospedeiras do seu vetor, este capaz de colonizar e realizar o intercâmbio de begomovírus entre plantas daninhas e tomateiros. A maioria dos begomovírus identificados infectando tomateiros tem características genéticas parentais provindas de vírus que tem como hospedeira principal plantas daninhas (Rocha *et al.*, 2013).

O impacto de eventos de recombinação em populações de begomovírus pode ser visualizado pelo alto número de espécies pertencentes a esse grupo. Eventos de recombinação têm sido extensivamente documentados para begomovírus. Entretanto, ainda não se conhece os padrões bioquímicos que determinam esses processos e o que torna os genomas de begomovírus propensos a recombinação. A partir dos extensivos relatos de ocorrência desses eventos em genomas de begomovírus, foi proposto, para esse grupo, que a alta frequência de recombinação pode resultar de um mecanismo de replicação dependente de recombinação (Jeske *et al.*, 2001). O surgimento de várias espécies ou estirpes de begomovírus pode ser atribuída aos eventos de recombinação natural entre diferentes espécies (Padidam *et al.*, 1999; Accotto & Moriones, 2007, Rocha *et al.*, 2013).

A alta variabilidade genética em entidades biológicas como vírus resulta na geração de populações com um amplo espectro de mutantes, conhecido com quasispecies virais. A definição de quasispecies é estabelecida como a distribuição complexa de variantes intimamente relacionados, sujeitas a variação, competição e seleção (Domingo e Pereles, 2019). Esses mutantes surgem continuamente e mudam em frequência relativa conforme a replicação viral acontece (Cervera & Elena, 2016). A ocorrência de quasispecies em populações de begomovírus é abastecida pela alta taxa de variabilidade desse grupo de vírus

(Lima et al., 2017). O conceito de quasispecies pode ser aplicado a qualquer entidade biológica, porém seu impacto é mais evidente em genomas de tamanho reduzido e com taxas de mutações altas. Entre as principais abordagens na dinâmica de populações geneticamente heterogêneas está as implicações biológicas relacionadas a adaptabilidade dessas populações (Cervera & Elena, 2016).

Estudos envolvendo análises de estrutura genética e evolução das populações virais são cruciais para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na evolução de vírus, ao surgimento de novas espécies e sua epidemiologia na natureza. Além disso, os resultados obtidos a partir desses estudos podem facilitar o desenvolvimento e formulação de medidas mais eficientes e duráveis para o controle de doenças causadas por vírus de plantas (Díaz-Pendón *et al.*, 2019).

#### **1.6. Begomovírus em tomateiro, controle preventivo, químico e resistência genética**

Os begomovírus têm como vetor moscas-brancas, um inseto considerado entre as piores pragas do século XXI. Assim, um dos principais métodos para controlar os surtos de vírus transmitidos por moscas-brancas é a utilização de medidas que controlem a expansão da população do vetor. Os sistemas de cultivos de tomateiros no Brasil, geralmente realizados em campo aberto, dificulta a utilização de medidas alternativas de controle de moscas-brancas e promove cada vez mais a aplicação de produtos químicos como a principal medida de controle desses insetos (Diab, 2012; Perring *et al.*, 2018). Entretanto, a eficiência da utilização desses produtos pode variar de acordo com a fase de vida do inseto, da cultura, modo de aplicação e da resistência de populações aos princípios ativos (Dennehy *et al.*, 2005). O alto custo de aplicação de inseticidas e os riscos de contaminação ambiental são fatores preponderantes que dificultam ainda mais o controle químico de moscas-brancas.

A partir da utilização frequente de inseticidas, espera-se que esteja ocorrendo a seleção de populações de moscas-brancas resistentes (Dennehy *et al.*, 2005; Dângelo *et al.*, 2018).

Assim, a aplicação de produtos químicos entre regiões pode estar ocasionando diferenças nos níveis de resistência da mosca-branca aos princípios ativos. Dângelo *et al.*, 2018 relataram níveis distintos de resistência de populações de moscas-brancas aos principais princípios ativos disponíveis no mercado. Os resultados obtidos nesse trabalho refletem potenciais falhas de controle de moscas-brancas com a utilização de agroquímicos. Entretanto, medidas adicionais podem ser aplicadas para minimizar os efeitos negativos desses produtos. Entre essas medidas, o monitoramento de populações resistentes a princípios ativos específicos, rotação de inseticidas, controle cultural, físico e biológico, concomitantemente ao controle químico devem ser utilizados (Horowitz *et al.*, 2007; Chandel *et al.*, 2010).

Por todas as razões supracitadas, o uso de plantas resistentes tem sido a estratégia mais eficiente e prática para minimizar as perdas causadas pelos begomovírus (Kumar *et al.*, 2017). Devido aos surtos populacionais de moscas-brancas frequentemente relatados no Brasil e a crescente incidência de begomovírus em tomateiros, o plantio de cultivares resistentes é cada vez mais frequente ao longo dos anos. A maioria das cultivares disponíveis no mercado brasileiro apresentam algum nível de resistência a viroses, especialmente as begomoviroses. O desenvolvimento de cultivares resistentes a begomovírus tem sido uma demanda crescente por parte dos produtores de tomate.

Para o desenvolvimento de cultivares resistentes, os programas de melhoramento de tomateiro baseiam-se especialmente na busca por genes/alelos de resistência em espécies selvagens de *Solanum* (Yan *et al.*, 2018). Pesquisas destinadas à busca por fontes de resistência a begomovírus começaram por volta da década de 70 (Pilowsky & Cohen, 1974). Desde então, várias espécies selvagens de tomateiro foram estudadas como potenciais fontes de resistência, tais como: *S. pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. habrochaites* e *S. cheesmaniae*. Os estudos desenvolvidos com estas espécies demonstraram um amplo conjunto de genes/*loci* de resistência caracterizados e/ou mapeados (*Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4*, *Ty-5*, *Ty-6*,

*ty-5*, *tcm-1* e *tgr-1*) (Zamir *et al.*, 1994; Giordano *et al.*, 2005b; Anbinder *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2009; Aguilera *et al.*, 2011; Hutton *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2018; Gill *et al.*, 2019).

O gene *Ty-1* é um dos mais estudados atualmente e tem se mostrado eficiente contra diferentes espécies de begomovírus monopartidos e bipartidos (Verlaan *et al.*, 2013). Este gene foi introgridido em espécies comerciais de tomateiros através de cruzamentos interespecíficos com *S. chilense*, conferindo resistência com dominância parcial (Zamir *et al.*, 1994). Além desse gene, muitos híbridos de tomates comerciais carregam concomitantemente o gene *Ty-3* (alélico ao *Ty-1*) (Verlaan *et al.*, 2013). Esses genes codificam uma RNA polimerase dependente de RNA do tipo RdRp, possivelmente envolvida na amplificação do processo de produção de pequenos RNAs de 21 a 24 nt (siRNAs), que são gerados durante o processo de silenciamento gênico (Verlaan *et al.*, 2013). Além do seu papel na regulação de genes, o silenciamento é um importante mecanismo de defesa antiviral nas plantas (Shou-wei e Voinnet, 2007). Essa resposta de resistência a vírus é desencadeada por RNA fita dupla (dsRNA) que é processado por proteínas Dicer-like (DCL) em pequenos siRNAs, que posteriormente são ligados a um complexo de silenciamento induzido por RNA (RNA-induced silencing complex - RISC). O complexo RISC associado a proteínas argonauta é direcionado então para RNAs com sequência complementar ao seu siRNA-guia, que serão alvos de degradação ou bloqueio para tradução. Esse processo é geralmente chamado de silenciamento gênico pós-transcricional (Post-transcriptional gene silencing in plant - PTGS). Quando a classe da proteína argonauta associada ao complexo RISC é a AGO4, ocorre a metilação da citosina nas moléculas de DNA complementares ao RNA-guia. Essa metilação leva ao silenciamento gênico transcricional (TGS) da sequência de DNA viral. Durante esse processo, os siRNAs resultantes do processamento pela proteína argonauta são reconhecidos pelas RdRp, produzindo então mais moléculas de dsRNA na sequência alvo, acarretando um

processo de amplificação dos siRNAs. O resultado é a potencialização da resposta do silenciamento antiviral (Butterbach *et al.*, 2014; Kumar, 2019).

O mecanismo de resistência a begomovírus é hipoteticamente considerado o silenciamento gênico transcricional (transcriptional gene silencing - TGS) associado com o aumento da metilação do genoma. Essa hipótese pôde ser confirmada a partir de plantas sem a capacidade de produzir a via de TGS, tornando-se desta forma suscetíveis a infecção por geminivírus (Raja *et al.*, 2008; Jackel *et al.*, 2016). O envolvimento dessa RdRp na amplificação do RNAi foi demonstrado por um aumento da produção de siRNA e uma taxa elevada de metilação da citosina em tomateiros carregando o gene *Ty-1* desafiado por tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) (Butterbach *et al.*, 2014). Evolutivamente há a tendência que os vírus desenvolvam mecanismos para neutralizar as ações de silenciamento da hospedeira (Ramesh *et al.*, 2017), mas a resposta de RNAi contra os geminivírus não parece ser afetada pelo silenciamento de RdRps específicas (Raja *et al.*, 2008). Isso demonstra o possível envolvimento de outros tipos de RdRps na resposta antiviral contra geminivírus.

## **2. Aplicação de HTS para estudos metagenômicos de vírus em tomateiros**

O sequenciamento de alto desempenho ou de próxima geração, também denominado de sequenciamento em larga escala (*High-Throughput Sequencing* – HTS), é uma potente ferramenta desenvolvida principalmente para as análises genômicas de populações virais. A partir da técnica de sequenciamento em larga escala, novos vírus foram descobertos, classificações taxonômicas foram propostas, além de fornecer uma compreensão profunda e ampla da diversidade de populações e sua estrutura genética (Maree *et al.*, 2018; Rodríguez-Negrete *et al.*, 2019). Essa nova tecnologia de sequenciamento começou a ser desenvolvida no final da década de 90 para superar limitações do método sequenciamento Sanger. As principais vantagens das técnicas de sequenciamento em larga escala são: não requerem clonagem de fragmentos de DNA, podem executar milhões em vez de centenas de reações

concomitantemente e os produtos sequenciados são diretamente detectados (Ari & Arikan, 2016). Consequentemente, as tecnologias de sequenciamento de próxima geração são capazes de gerar mais informações a partir de uma única amostra, comparado aos sequenciamentos realizados pelo método Sanger a um custo mais baixo por nucleotídeo (Reuter *et al.*, 2015).

A aplicação de HTS para o estudo de genomas virais vem com algumas especificidades experimentais que precisam ser analisadas antes do sequenciamento. É necessário considerar a fragilidade e a consequente degradação dos genomas virais, que a proporção do material genômico da planta em relação ao vírus é alta e que a baixa carga viral da maioria dos vírus é menor do que o exigido pelas tecnologias de sequenciamento disponíveis (Maree *et al.*, 2018). Entretanto, para suprir algumas falhas dos métodos de sequenciamentos disponíveis, a utilização de técnicas como a rolling circle amplification (RCA), para amplificar a população de DNA presente na amostra, é um exemplo dentre diversas técnicas que podem ser utilizadas (Idris *et al.*, 2014).

Diversas plataformas com diferentes tecnologias para preparação da amostra, sequenciamento e obtenção de dados estão disponíveis comercialmente (Barzon *et al.*, 2013). Cada tecnologia distingue-se a partir da sua combinação de protocolos específicos, tal combinação determina a quantidade de dados que serão produzidos em cada plataforma. Esses detalhes técnicos podem acarretar consequências importantes na escolha e aplicabilidade dessas técnicas em estudos envolvendo sequenciamento de genomas virais. Por possuir a maioria dos requisitos necessários para um bom sequenciamento, a plataforma Illumina domina o mercado de plataformas para sequenciamento de alto desempenho (Metzker *et al.*, 2010; Bansal & Boucher, 2019).

Atualmente, a plataforma Illumina possui um conjunto de sequenciadores (e.g., MiSeq, NextSeq 500, HiSeq 2500 e NovaSeq 6000) preparados para uma variedade de taxas de transferência de dados e rapidez. As plataformas MiSeq e o HiSeqs são as plataformas

mais estabelecidas no mercado. A plataforma MiSeq foi projetada para ser um sequenciador rápido e de bancada, destinado ao sequenciamento de pequenos genomas. Entretanto, a plataforma HiSeq 2500 foi desenvolvida para aplicações de alto rendimento. Essa plataforma pode gerar até 1 Tb de dados em 6 dias. Ao contrário dos modelos HiSeq anteriores, o HiSeq 2500 também pode ser executada de modo rápido, o que é menos econômico, mas, por exemplo, pode produzir um genoma humano 30x em 27 horas. A NovaSeq é o mais recente sequenciador de larga escala da plataforma Illumina. Um dos principais avanços dessa tecnologia é o tempo de processamento de dados ainda mais rápido. Isso se dá pelo fato desse sequenciador utilizar a síntese química de dois canais (leitura de apenas duas cores por ciclo) em “*flow cells*” padronizadas e organizadas, em vez da química de quatro canais em “*flow cells*” não padronizados com a formação de *clusters* aleatórios e dispersos no seu antecessor, o HiSeq2500. Essa detecção simplificada de nucleotídeos reduz a geração de imagens e acelera o tempo de processamento de dados com a mesma qualidade do sistema de quatro canais. O sistema NovaSeq 6000 oferece o processamento de 20B até 6Tb em 2 dias. Isso mostra a flexibilidade que essa tecnologia oferece para acomodar diversos tipos de projetos.

O processo realizado na plataforma Illumina/Solexa inicia-se com a fragmentação do DNA ou cDNA e a ligação de adaptadores às extremidades desses fragmentos (Goodwin *et al.*, 2016). Os fragmentos são ligados a uma superfície (*flowcell*) com *primers* complementares aos adaptadores e múltiplas amplificações por PCR geram aglomerados de cada fragmento (*clusters*) (Metzker *et al.*, 2010). O sequenciamento ocorre posteriormente através da incorporação de um nucleotídeo fluorescente, a lavagem para retirada de nucleotídeos não incorporados, a obtenção da imagem de quatro cores para detecção do resultado e clivagem para a remoção do corante fluorescente e do grupo de inibição (Metzker *et al.*, 2010; Goodwin *et al.*, 2016).

A bioinformática é a ferramenta utilizada para as análises de dados provenientes de sequenciamentos de alto desempenho. Aplicam-se técnicas de informática, de modelagem matemática e computacional, e de modelagem probabilística visando o entendimento de aspectos moleculares e genéticos de organismos (Magi *et al.*, 2010). Com as tecnologias de sequenciamento cada vez mais modernas e a maior quantidade de dados gerados para a pesquisa, a bioinformática tornou-se essencial para organização e disponibilização dos resultados gerados de uma forma que possibilite sua interpretação.

### **3. Aptidão replicativa de vírus**

A capacidade replicativa de vírus contribui significativamente para a prevalência de populações virais. A aptidão viral está associada a emergência de diversas doenças em campo (Elena & Froissart 2010; Péréfarres *et al.*, 2014). Esta pode ser definida como a capacidade de um vírus produzir progênie infecciosas em um determinado ambiente (Barbour & Grant, 2004; Wargo & Kurath, 2012). Entretanto, esta definição está se ampliando à medida que os estudos possibilitam a compreensão e as implicações evolutivas em nível de condicionamento das populações virais. Os poucos estudos iniciais voltados para o campo da aptidão viral foram primeiramente realizados utilizando vírus modelos como, bacteriófagos, vírus animais e vegetais. Entretanto, com o reconhecimento da importância da aptidão viral, ao longo dos anos é observada uma grande variedade de estudos desenvolvidos para o tema. Apesar da quantidade considerável de estudos para vírus de DNA, a maioria dos estudos de aptidão viral são baseados em vírus de RNA (Cervera & Elena, 2016; Sánchez-Campos *et al.*, 2018). Além disso, o maior número de publicações nos últimos anos envolve patógenos humanos como, Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e o vírus da Dengue.

Vários são os aspectos para estudo associados as análises da aptidão viral, entre os principais estão o tropismo tecidual, evasão do sistema de defesa do hospedeiro, e capacidade de replicação viral (Wargo & Kurath, 2012). Diversos sistemas de pesquisa e ferramentas

usados para investigar diferentes aspectos da aptidão viral estão disponíveis. Em muitos casos, para obter inferências precisas sobre a aptidão viral há a necessidade de abordagem integrativa entre esses diferentes sistemas. Assim, a escolha desses sistemas é fundamental para a confiabilidade dos resultados obtidos. Geralmente, a depender do objetivo, essa escolha pode ser baseada entre a avaliação da capacidade replicativa *In vivo* ou *In vitro* (Wargo & Kurath, 2012). Essa escolha é dependente do patossistema ou, além disso, podem ser utilizadas de forma integrada. A avaliação *In vivo* é difícil devido a diferentes variáveis experimentais que devem ser levadas em consideração. O trabalho *In vitro* apresenta inúmeras vantagens, entre elas, está o controle das variáveis experimentais. Entretanto, a desvantagem é que, em muitos casos, os resultados não refletem a veracidade dos sistemas *In vivo*.

Existem vários métodos para avaliar a aptidão replicativa de vírus. Especialmente, as técnicas moleculares são essenciais para examinar os níveis de DNA, RNA ou proteínas virais. Ferramentas como PCR quantitativo, ELISA, marcação do componente genômico com sondas e sequenciamento de alto desempenho (HTS) estão entre as ferramentas disponíveis para avaliação. Da mesma forma, estudos de mutagênese têm sido utilizados para determinar interações moleculares que regulam a aptidão (Novela et al., 2010; Luring & Andino, 2011; Martinez et al., 2011). Por meio do uso de ferramentas quantitativas é possível determinar valores absoluto de aptidão em termos de número médios de cópias virais por mg de tecido da hospedeira, para cada variante ou vírus avaliado (Warg & Kurath, 2011). As ferramentas moleculares que estimam a carga viral, possuem alta sensibilidade e podem ser usadas para distinguir genótipos virais em infecções mistas.

A aptidão viral pode ser avaliada comparando a replicação viral em hospedeiros paralelos ou em culturas de células infectadas com diferentes espécies ou variantes virais. A avaliação realizada por meio de infecções mistas é a medida mais sensível e válida para avaliar diferenças na capacidade replicativa em um ambiente competitivo. Desse modo, são

frequentes os estudos onde essa metodologia é aplicada. Para vírus, a aptidão competitiva pode ser avaliada de diversas formas, entre elas, a capacidade replicativa é a forma mais frequentemente examinada (Wargo & Kurath, 2012; Cervera & Elena, 2016). As variáveis iniciais desses ensaios incluem, o uso de diferentes quantidades de inóculo, estabelecimento de vantagens adaptativas onde a infecção do vírus é estabelecida antes da exposição do segundo vírus, modificações genômicas e a utilização de tempo variável para as análises. Por exemplo, a aptidão viral em alguns casos é examinada em um único tempo após a infecção, mas são frequentes os estudos onde a avaliação é realizada em vários momentos durante o ciclo de infecção (Cervera & Elena, 2016).

Estudos voltados para a avaliação da aptidão viral de vírus de planta têm sido cada vez mais frequentes devido a importância do tema. Vale ressaltar que em seus hospedeiros, as populações virais podem se comportar com um conjunto de genomas mutantes. Assim esse fator deve ser levado em consideração para a condução de estudos de aptidão. Como relatado por Cervera & Elena (2016) diferenças na aptidão viral podem ser observadas em mistura de genótipos (quasisespécies) de uma mesma população. Os autores demonstraram, *In vivo*, diferenças na aptidão entre os componentes subclonais de uma população clonal do potyvírus tobacco etch virus (TEV). Como resultado, observou-se que nos primeiros dias após as inoculações a aptidão média dos subclones era significativamente menor que a aptidão da população clona. Além disso, eles observaram que com o desenvolver da infecção, com o aumento da população são produzidos genótipos com mutações mais benéficas e compensatórias desaparecendo as diferenças de aptidão entre os subclones e a população clonal. Outro estudo conduzido por Sánchez-Campos *et al.* (2018) demonstram a diferença de aptidão entre um recombinante de TYLCV quando compara aos seus parentais.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABHARY, M.; PATIL, B.L. & FAUQUET, C.M. 2007. Molecular biodiversity, taxonomy, and nomenclature of tomato yellow leaf curl-like viruses. *In: Czosnek, H. (eds). Tomato yellow leaf curl virus disease.* Dordrecht, Springer. p.85-118.
- AGUILERA, J.G.; HURTADO, F.D.; XAVIER, C.A.D.; LAURINDO, B.S.; NICK, C.; GIL, M.A. & ZERBINI, F.M. 2011. Identificação dos genes *Ty-2* e *Ty-3* de resistência a begomovírus em genótipos de tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46: 772-775.
- ALBUQUERQUE, L.C.; MARTIN, D.P.; AVILA, A.C. & INOUE-NAGATA, A.K. 2010. Characterization of tomato yellow vein streak virus, a begomovirus from Brazil. *Virus Genes* 40:140-147.
- ALBUQUERQUE, L.C.; VARSANI, A.; FERNANDES, F.R.; PINHEIRO, B.; MARTIN, D.P.; FERREIRA, P.T.O.; LEMOS, T.O. & INOUE-NAGATA, A.K. 2012. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 157: 747-752.
- ALMÁSI, A.; HARSÁNYI, A. & GÁBORJÁNYI, R. 2001. Photosynthetic alterations of virus infected plants. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 36: 15-29.
- AMBROZEVICIUS, L. P.; CALEGARIO, R. F.; FONTES, E. P.; CARVALHO, M. G. & ZERBINI, F. M. 2002. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 27: 372-377.
- ANBINDER, I.; REUVENI, M.; AZARI, R.; PARAN, I.; NAHON, S.; SHLOMO, H. & LEVIN, I. 2009. Molecular dissection of *Tomato leaf curl virus* resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics* 119:519-530.
- ARANHA, S.D.A.; ALBUQUERQUE, L.C.D.; BOITEUX, L. S. & INOUE-NAGATA, A. K. 2011. Detection and complete genome characterization of a begomovirus infecting okra (*Abelmoschus esculentus*) in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 36: 14-20.
- ARI, S. & ARIKAN, M. 2016. Next-generation sequencing: advantages, disadvantages, and future. *In: K.R. Hakeem, K.R. Plant omics: Trends and applications.* Cham, Springer. p 109-135.
- ARRUABARRENA, A.; RUBIO, L.; GONZÁLEZ-ARCOS, M.; MAESO, D.; FIALLO-OLIVÉ, E. & MORIONES, E. 2016. First Report of the Begomovirus Tomato yellow vein streak virus Infecting Tomato in Uruguay. *Plant Disease* 100: 231-231.

- BAHDER, B.W.; ZALOM, F.G.; JAYANTH, M. & SUDARSHANA, M.R. 2016. Phylogeny of geminivirus coat protein sequences and digital PCR aid in identifying *Spissistilus festinus* as a vector of grapevine red blotch-associated virus. *Phytopathology* 106: 1223-1230.
- BAI, Y.; YAN, Z.; PÉREZ-DE-CASTRO, A.; DÍEZ, M.J.; HUTTON, S.F.; VISSER, R.G.F. & LI, J. 2018. Resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* in Tomato Germplasm. *Frontiers in Plant Science* 9: 1198.
- BANSAL, V. & BOUCHER, C. 2019. Sequencing Technologies and Analyses: Where Have We Been and Where Are We Going? *iScience* 18:37-41.
- BARBOSA, J.C.; BARRETO, S.D.S.; INOUE- NAGATA, A.K. & REZENDE, J.A. M. 2011. Characterization and experimental host range of a Brazilian tomato isolate of Tomato severe rugose virus. *Journal of Phytopathology* 159: 644-646.
- BARBOSA, L.D.F.; YUKI, V.A.; MARUBAYASHI, J.M.; DE MARCHI, B.R.; PERINI, F.L.; PAVAN, M.A. & KRAUSE-SAKATE, R. 2015. First report of *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. *Pest Management Science* 71: 501-504.
- BARBOUR, J.D. & GRANT, R.M. 2004. The clinical implications of reduced viral fitness. *Current infectious disease reports* 6: 151-158.
- BARRETO, S.S.; HALLWASS, M.; AQUINO, O. M. & INOUE-NAGATA, A.K. 2013. A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato-infecting begomovirus in central Brazil. *Phytopathology* 103: 436-444.
- BARZON, L.; LAVEZZO, E.; COSTANZI, G.; FRANCHIN, E.; TOPPO, S. & PALÙ, G. 2013. Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology. *Journal of Clinical Virology* 58: 346-350.
- BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; ROSELL, R.C. & MARKHAM, P.G. 1994. Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Annals of Applied Biology* 125: 311-325.
- BEZERRA, I.C.; RIBEIRO, S.G.; GIORDANO, L.B.; ZERBINI, F.M. & DE ÁVILA, A.C. 1997. Occurrence of geminivirus in tomato producing areas in Submédio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira* 22:331
- BISARO, D.M. 1996 Geminivirus DNA replication. *In*: DePamphilis, M.L. (eds) DNA replication in eukaryotic cells. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. p. 833–854

- BÖTTCHER, B.; UNSELD, S.; CEULEMANS, H.; RUSSELL, R. B. & JESKE, H. 2004. Geminate structures of African cassava mosaic virus. *Journal of virology* 78: 6758-6765.
- BOWDEN, R.; DAVIES, R.W.; HEGER, A.; PAGNAMENTA, A.T.; DE CESARE, M.; OIKKONEN, L.E. & POPITSCH, N. 2019. Sequencing of human genomes with nanopore technology. *Nature communications* 10: 1-9.
- BRIDDON, R.W.; BEDFORD, I.D.; TSAI, J.H. & MARKHAM, P.G. 1996. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology* 219: 387-394.
- BRIDDON, R.W.; PINNER, M.S.; STANLEY, J. & MARKHAM, P.G. 1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177:85-94.
- BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; ZERBINI, M.; MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2011. Family Geminiviridae. *In*: Andrew M.Q.K.; Elliot L.; Michael J.A.; Eric B.C. (eds). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, San Diego. p. 351-373.
- BROWN, J.K.; ZERBINI, F. M.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; RAMOS-SOBRINHO, R.; SILVA, J.C. & MALATHI, V.G. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of virology* 160: 1593-1619.
- BUTTERBACH, P.; VERLAAN, M.G.; DULLEMANS, A.; LOHUIS, D.; VISSER, R. G.; BAI, Y. & KORMELINK, R. 2014. *Tomato yellow leaf curl* virus resistance by *Ty-1* involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by *cucumber mosaic virus* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 12942-12947.
- CALEGÁRIO, R.F. 2004. Caracterização de um isolado do begomovírus *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa Viçosa, Brasil.
- CALEGARIO, R.F.; FERREIRA, S.D.S.; ANDRADE, E.C.D. & ZERBINI, F.M. 2007. Characterization of Tomato yellow spot virus, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Pesquisa agropecuária brasileira* 42: 1335-1343.
- CAO, M.; LAN, P.; LI, F.; ABAD, J.; ZHOU, C. & LI, R. 2017. Genome characterization of sweet potato symptomless virus 1: a mastrevirus with an unusual nonanucleotide sequence. *Arch Virol* 162:1-4

- CARVALHO, C.M.; MACHADO, J.P.B.; ZERBINI, F.M. & FONTES, E.P. 2008. NSP-interacting GTPase: a cytosolic protein as cofactor for nuclear shuttle proteins. *Plant signaling & behavior* 3: 752-754.
- CARVALHO, M.F. & LAZAROWITZ, S.G. 2004. Interaction of the movement protein NSP and the Arabidopsis acetyltransferase AtNSI is necessary for cabbage leaf curl geminivirus infection and pathogenicity. *Journal of virology* 78: 11161-11171.
- CASTILLO-URQUIZA, G.P.; BESERRA JUNIOR, J.E.A.; BRUCKNER, F.P.; LIMA, A.T.M.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P. & ZERBINI, F. 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology* 153: 1985-1989.
- CERVERA, H. & ELENA, S.F. 2016. Genetic variation in fitness within a clonal population of a plant RNA virus. *Virus evolution* 2.
- CHANDEL, R.S.; BANYAL, D.K.; SINGH, B.P.; MALIK, K. & LAKRA, B.S. 2010. Integrated management of whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) and potato apical leaf curl virus in India. *Potato research* 53: 129-139.
- CHIKOTI, P.C.; MULENGA, R.M.; TEMBO, M. & SSERUWAGI, P. 2019. Cassava mosaic disease: a review of a threat to cassava production in Zambia. *Journal of Plant Pathology* 1: 11.
- COSTA, A.S. 1965. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. *FAO Plant Protection Bulletin* 13: 3-12.
- COTRIM, M.A.D.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; NARITA, N.; ZERBINI, F.M. & PAVAN, M.A. 2007. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica* 33: 300-303.
- CZOSNEK, H.; HARITON-SHALEV, A.; SOBOL, I.; GOROVITS, R. & GHANIM, M. 2017. The incredible journey of begomoviruses in their whitefly vector. *Viruses* 9: 273.
- DÂNGELO, R.A.C.; MICHEREFF- FILHO, M.; CAMPOS, M.R.; DA SILVA, P.S. & GUEDES, R.N.C. 2018. Insecticide resistance and control failure likelihood of the whitefly *Bemisia tabaci* (MEAM1; B biotype): a Neotropical scenario. *Annals of Applied Biology* 172: 88-99.
- DE BARRO, P.J.; LIU, S.S.; BOYKIN, L.M. & DINSDALE, A.B. 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual review of entomology* 56: 1-19.
- DE MORAES, L.A.; MULLER, C.; DE FREITAS BUENO, R.C.O.; SANTOS, A.; BELLO, V.H.; DE MARCHI, B.R. & TAKADA, H.M. (2018). Distribution and phylogenetics

- of whiteflies and their endosymbiont relationships after the Mediterranean species invasion in Brazil. *Scientific reports* 8: 1-13.
- DENNEHY, T.J.; DEGAIN, B.A.; HARPOLD, V.S.; BROWN, J.K.; MORIN, S.; FABRICK, J.A. & NICHOLS, R.L. 2005. New challenges to management of whitefly resistance to insecticides in Arizona.
- DIAB, H. 2012. Insecticide mixtures for controlling whitefly. *J Plant Prot Path* 3: 13-22.
- DIAMOS, A.G.; CRAWFORD, J.M. & MASON, H.S. 2019. Fine-tuning expression of begomoviral movement and nuclear shuttle proteins confers cell-to-cell movement to mastreviral replicons in *Nicotiana benthamiana* leaves. *Journal of General Virology* 100: 1038-1051.
- DÍAZ-PENDÓN, J.A.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; FORTES, I.M. & MORIONES, E. 2019. Tomato yellow leaf curl sardinia virus, a begomovirus species evolving by mutation and recombination: A challenge for virus control. *Viruses* 11: 45.
- DOMINGO, E. & PERALES, C. 2019. Viral quasispecies. *PLoS Genetics* 15:10.
- DUARTE, M.F. 2019. Diversidade espaço-temporal de espécies de Begomovirus em regiões produtoras de tomateiro no Bioma Mata Atlântica. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- DUFFY, S. & HOLMES, E.C. 2008. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus tomato yellow leaf curl virus. *Journal of virology* 82: 957-965.
- DUFFY, S. & HOLMES, E.C. 2009. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *The Journal of general virology* 90: 1539.
- DUFFY, S. 2018. Why are RNA virus mutation rates so damn high?. *PLoS biology* 16:8.
- DUFFY, S.; SHACKELTON, L.A. & HOLMES, E.C. 2008. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics* 9: 267-276.
- ELENA, S.F. & FROISSART, R. 2010. New experimental and theoretical approaches towards the understanding of the emergence of viral infections.
- ETESSAMI, P.; SAUNDERS, K.; WATTS, J. & STANLEY, J. 1991. Mutational analysis of complementary-sense genes of African cassava mosaic virus DNA-A. *Journal of General Virology* 72:1005-1012.
- FARIA, J.C.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; SLACK, S.A. & MAXWELL, D.P. 1997. A new geminivirus associated with tomato in the state of São Paulo, Brazil. *Plant Disease* 81: 423-423.

- FAROOQ, J.; FAROOQ, A.; RIAZ, M.; SHAHID, M.R.; SAEED, F.; IQBAL, M.S. & MAHMOOD, A. 2014. Cotton leaf curl virus disease a principle cause of decline in cotton productivity in Pakistan (a mini review). *Can J Plant Prot* 2: 9-16.
- FERNANDES, A.V.; GALVAO, R.M.; MACHADO, J.J.; ZERBINI, F.M. & FONTES, E.P.B. 1999. Cloning and molecular characterization of A components of two new *Sida rhombifolia*-infecting geminiviruses. *Virus Rev Res* 4:148
- FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUE, L.C.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; ÁVILA, A.C. & INOUE-NAGATA, A.K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36: 251-258.
- FERNANDES, F.R.; CRUZ, A.R.; FARIA, J.C.; ZERBINI, F.M. & ARAGAO, F.J. 2009. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. *Archives of Virology* 154:1567-1570.
- FERNANDES, J.J. 2001. Caracterização e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro na região do Triângulo Mineiro. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais.
- FERNANDES, J.J.; CARVALHO, M.G.; ANDRADE, E.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B. & ZERBINI, F.M. 2006. Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato- infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology* 55: 513-522.
- FERNANDES, N.A.N. 2015. Begomoviroses no cultivo do tomateiro no brasil: variabilidade e caracterização de novas espécies virais e diversidade do vetor *Bemisia tabaci*. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.
- FERNANDES-ACIOLI, N.A.N.; PEREIRA-CARVALHO, R.C.; FONTENELE, R.S.; LACORTE, C.; RIBEIRO, S.G.; FONSECA, M.E.N. & BOITEUX LS. 2011. First report of *Sida micrantha mosaic virus* in *Phaseolus vulgaris* in Brazil. *Plant Disease* 95:1196.
- FERRO, M.M.; RAMOS-SOBRINHO, R.; SILVA, J.T.; ASSUNÇÃO, I.P. & LIMA, G.S. 2017. Genetic structure of populations of the begomoviruses *Tomato mottle leaf curl virus* and *Sida mottle Alagoas virus* infecting tomato (*Solanum lycopersicum*) and *Sida* spp., respectively. *Tropical Plant Pathology* 42: 39-45.
- FIALLO-OLIVÉ, E.; TRENADO, H.P.; LOURO, D. & NAVAS-CASTILLO, J. 2019. Recurrent speciation of a tomato yellow leaf curl geminivirus in Portugal by recombination. *Scientific reports* 9: 1-8.

- FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K. & KRAMER, M. 1960. Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico* 26: 65-69.
- FONDONG, V.N. 2013. Geminivirus protein structure and function. *Molecular plant pathology* 14: 635-649.
- FONTENELE, R.S.; ALVES-FREITAS, D.M.; SILVA, P.I.; FORESTI, J.; SILVA, P.R.; GODINHO, M.T. & RIBEIRO, S.G. 2018. Discovery of the first maize-infecting mastrevirus in the Americas using a vector-enabled metagenomics approach. *Archives of virology* 163: 263-267.
- FONTENELLE, M.R.; LUZ, D.F.; GOMES, A.P.S.; FLORENTINO, L.H.; ZERBINI, F.M. & FONTES, E.P. 2007. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus *Tomato chlorotic mottle virus*. *Virus research*: 126: 262-267.
- FRANÇA, F.H.; VILAS-BOAS, G.L. & CASTELO-BRANCO, M. 1996. Occurrence of *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) in the Federal District. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil* 25:369-372.
- FREDERICO, L.A.; KUNKEL, T.A. & SHAW, B.R. 1990. A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry* 29: 2532-2537.
- GAFNI, Y. & EPEL, B.L. 2002. The role of host and viral proteins in intra-and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiological and molecular plant pathology* 60: 231-241.
- GARCÍA-ANDRÉS, S.; ACCOTTO, G.P.; NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. 2007. Founder effect, plant host, and recombination shape the emergent population of begomoviruses that cause the tomato yellow leaf curl disease in the Mediterranean basin. *Virology* 359: 302-312.
- GARCÍA-ARENAL, F. & ZERBINI, F.M. 2019. Life on the edge: geminiviruses at the interface between crops and wild plant hosts. *Annual review of virology* 6: 411-433.
- GARDINER, W.E.; SUNTER, G.; BRAND, L.; ELMER, J.S.; ROGERS, S.G. & BISARO, D.M. 1988. Genetic analysis of *Tomato golden mosaic virus* the coat protein is not required for systemic spread or symptom development. *EMBO Journal* 7:899-904
- GHANIM, M. 2014. A review of the mechanisms and components that determine the transmission efficiency of *Tomato yellow leaf curl virus* (*Geminiviridae; Begomovirus*) by its whitefly vector. *Virus research* 186: 47-54.
- GILL, U.; SCOTT, J.W.; SHEKASTEBAND, R.; OGUNDIWIN, E.; SCHUIT, C.; FRANCIS, D.M.; HUTTON, S.F. 2019. *Ty-6*, a major begomovirus resistance gene on

- chromosome 10, is effective against *Tomato yellow leaf curl virus* and *Tomato mottle virus*. *Theoretical and Applied Genetics* 132: 1543-1554.
- GIORDANO, L.B.; SILVA-LOBO, V.L.; SANTANA, F.M.; FONSECA, M.E.N. & BOITEUX, L.S. 2005b. Inheritance of resistance to the bipartite *Tomato chlorotic mottle* begomovirus derived from *Lycopersicon esculentum* cv. 'Tyking'. *Euphytica* 143: 27-33.
- GIORDANO, L.D.B.; FONSECA, M.E.D.N.; DA SILVA, J.B.; INOUE-NAGATA, A. K. & BOITEUX, L.S. 2005a. Efeito da infecção precoce por Begomovirus com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. *Horticultura Brasileira* 23: 815-818.
- GOODWIN, S.; MCPHERSON, J.D. & MCCOMBIE, W.R. 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics* 17: 333.
- GOPAL, P.; KUMAR, P.P.; SINILAL, B.; JOSE, J.; YADUNANDAM, A.K. & USHA, R. 2007. Differential roles of C4 and  $\beta$ C1 in mediating suppression of post-transcriptional gene silencing: evidence for transactivation by the C2 of *Bhendi yellow vein mosaic virus*, a monopartite begomovirus. *Virus research* 123: 9-18.
- GUERRA-PERAZA, O.; KIRK, D.; SELTZER, V.; VELUTHAMBI, K.; SCHMIT, A.C.; HOHN, T. & HERZOG, E. 2005. Coat proteins of *Rice tungro bacilliform virus* and *Mungbean yellow mosaic virus* contain multiple nuclear-localization signals and interact with importin  $\alpha$ . *Journal of general virology* 86: 1815-1826.
- GUTIERREZ, C. 2002. Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiological and molecular plant pathology* 60: 219-230.
- HAMILTON, W.D.; STEIN, V.E.; COUTTS, R.H. & BUCK, K.W. 1984. Complete nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of tomato golden mosaic virus: potential coding regions and regulatory sequences. *EMBO Journal* 3: 2197-205
- HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR, S. & ROBERTSON, D. 1999. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 71-106.
- HAO, L.; WANG, H.; SUNTER, G. & BISARO, D.M. 2003. Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *The Plant Cell* 15: 1034-1048.
- HARRISON, B.D. 1985. Advances in geminivirus research. *Annual review of phytopathology* 23: 55-82.

- HERNÁNDEZ-ZEPEDA, C.; VARSANI, A. & BROWN, J.K. 2013. Intergeneric recombination between a new, spinach-infecting curtovirus and a new geminivirus belonging to the genus *Becurtovirus*: first New World exemplar. *Archives of virology* 158: 2245-2254.
- HEYDARNEJAD, J.; KEYVANI, N.; RAZAVINEJAD, S.; MASSUMI, H. & VARSANI, A. 2013. Fulfilling Koch's postulates for beet curly top Iran virus and proposal for consideration of new genus in the family *Geminiviridae*. *Archives of virology* 158: 435-443.
- HOROWITZ, A.R., DENHOLM, I. & NICHOLS, R.L. 2007. Managing Insecticide Resistance in Whiteflies and Aphids in Cotton Fields. In *Sticky Cotton—Cause, Impacts, and Prevention*. USDA-ARS Tech Bull.
- HUANCA-MAMANI, W. & TREJO-SAAVEDRA, D. 2013. Identificación molecular del virus ToYVSV asociado al cultivo del tomate en el valle de Azapa (Arica, Chile). *Idesia (Arica)* 31: 103-106.
- HUTTON, S.F.; SCOTT, J.W.; SCHUSTER, D.J. 2012. 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* 47: 324-327.
- IBGE. 2019. Levantamento sistemático da produção agrícola - Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas (Mês/2019). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro-RJ.
- IDRIS, A.; AL-SALEH, M.; PIATEK, M.J.; AL-SHAHWAN, I.; ALI, S. & BROWN, J.K. 2014. Viral metagenomics: Analysis of begomoviruses by illumina high-throughput sequencing. *Viruses* 6: 1219-1236.
- INOUE-NAGATA, A.K.; LIMA, M.F. & GILBERTSON, R.L. 2016. A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Horticultura Brasileira* 34: 8-18.
- ISMAYIL, A.; HAXIM, Y.; WANG, Y.; LI, H.; QIAN, L.; HAN, T. & DENG, H. 2018. *Cotton Leaf Curl Multan virus* C4 protein suppresses both transcriptional and post-transcriptional gene silencing by interacting with SAM synthetase. *PLoS pathogens* 14.
- JACKEL, J.N.; STORER, J.M.; COURSEY, T. & BISARO, D.M. 2016. Arabidopsis RNA polymerases IV and V are required to establish H3K9 methylation, but not cytosine methylation, on geminivirus chromatin. *Journal of virology* 90: 7529-7540.

- JESKE, H.; LÜTGEMEIER, M. & PREI, W. 2001. DNA forms indicate rolling circle and recombination- dependent replication of *Abutilon mosaic virus*. The EMBO journal: 20: 6158-6167.
- JI, Y.; SCOTT, J.W.; SCHUSTER, D.J.; MAXWELL, D.P. 2009. 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 Horticultural Science 134: 281-288.
- JUPIN, I.; DE KOUCHKOVSKY, F.; JOUANNEAU, F. & GRONENBORN, B. 1994. Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): involvement of the protein encoded by ORF C4. Virology 204: 82-90.
- KARDANI, S.G.; HEYDARNEJAD, J.; ZAKIAGHL, M.; MEHRVAR, M.; KRABERGER, S. & VARSANI, A. 2013. Diversity of *Beet curly top Iran virus* isolated from different hosts in Iran. Virus Genes 46: 571-575.
- KHAN, M.R.; GHANI, I.A.; GHAFFAR, A. & TAMKEEN, A. 2011. Host plant selection and oviposition behaviour of whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) in a mono and simulated polyculture crop habitat. African Journal of Biotechnology 10: 1467-1472.
- KLEIN, H.L.; BACINSKAJA, G.; CHE, J.; CHEBLAL, A.; ELANGO, R.; EPSHTEIN, A. & LELAND, B.A. 2019. Guidelines for DNA recombination and repair studies: Cellular assays of DNA repair pathways. Microbial Cell 6: 1.
- KLIOT, A.; CILIA, M.; CZOSNEK, H.; & GHANIM, M. 2014. Implication of the bacterial endosymbiont *Rickettsia* spp. in interactions of the whitefly *Bemisia tabaci* with tomato yellow leaf curl virus. Journal of virology 88: 5652-5660.
- KREUZE, J.F.; PEREZ, A.; UNTIVEROS, M.; QUISPE, D.; FUENTES, S.; BARKER, I. & SIMON R. 2009). Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. Virology 388:1-7.
- KUMAR, J.; KUMAR, J.; SINGH, S.P. & TULI, R. 2014. Association of satellites with a mastrevirus in natural infection: complexity of wheat dwarf india virus disease. J Virol 88:7093–7104.
- KUMAR, R.V. 2019. Plant antiviral immunity against geminiviruses and viral counter-defense for survival. Frontiers in microbiology 10.
- KUMAR, S.; SRIVASTAVA, A.; KUMARI, A.; RAJ, R.; JAIDI, M. & RAJ, S.K. 2017. Begomovirus Disease Management Measures, Now and Then. In: Saxena, S.; Tiwari, A. (eds). *Begomoviruses: Occurrence and Management in Asia and Africa*. Singapore, Springer. p. 71-92.

- LAURING, A.S. ANDINO R. 2011. Exploring the fitness landscape of anRNA virus by using a universal barcode microarray. *Journal of Virology* 85:3780-3791
- LEMOS, P.P.F.; ALMEIDA, M.M.S.; MOITA, A.W. & INOUE-NAGATA, A.K. 2010. Avaliação do efeito da begomovirose na qualidade do fruto de tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira* 28: 1142-1147.
- LETT, J.M.; GRANIER, M.; HIPPOLYTE, I.; GRONDIN, M.; ROYER, M.; BLANC, S. & PETERSCHMITT, M. 2002. Spatial and temporal distribution of geminiviruses in leafhoppers of the genus *Cicadulina* monitored by conventional and quantitative polymerase chain reaction. *Phytopathology* 92: 65-74.
- LIMA, A.; SILVA, J.C.; SILVA, F.N.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; SILVA, F.F.; SEAH, Y.M. & ZERBINI, F.M. 2017. The diversification of begomovirus populations is predominantly driven by mutational dynamics. *Virus evolution* 3.
- LOURENÇÃO, A.L. & NAGAI, H. 1994. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. *Bragantia* 53: 53-59.
- LÜ, Z.C., GAO, Q.L., WAN, F.H., YU, H. & GUO, J.Y. 2014. Increased survival and prolonged longevity mainly contribute to the temperature-adaptive evolutionary strategy in invasive *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Middle East Asia Minor 1. *Journal of insect science* 14.
- MACEDO, M.A.; ALBUQUERQUE, L.C.; MALIANO, M.R.; SOUZA, J.O.; ROJAS, M.R.; INOUE-NAGATA, A.K. & GILBERTSON, R.L. 2018. Characterization of tomato leaf curl purple vein virus, a new monopartite New World begomovirus infecting tomato in Northeast Brazil. *Archives of virology* 163: 737-743.
- MACEDO, M.A.; MICHEREFF FILHO, M.; NAVAS-CASTILLO, J.; INOUE-NAGATA, A.K. 2015. Host range and whitefly transmission efficiency of Tomato severe rugose virus and Tomato golden vein virus in tomato plants. *Tropical Plant Pathology* 40: 405-409.
- MAGI, A.; BENELLI, M.; GOZZINI, A.; GIROLAMI, F.; TORRICELLI, F. & BRANDI, M.L. 2010. Bioinformatics for next generation sequencing data. *Genes* 1: 294-307.
- MALPICA, J.M.; FRAILE, A.; MORENO, I.; OBIES, C.I.; DRAKE, J.W. & GARCIAARENAL, F. 2002. The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. *Genetics* 162: 1505-1511
- MAREE, H.J.; FOX, A.; AL RWAHNIH, M.; BOONHAM, N. & CANDRESSE, T. 2018. Application of HTS for routine plant virus diagnostics: state of the art and challenges. *Frontiers in plant science* 9: 1082.

- MARTINEZ, J.P.; BOCHAROV, G, IGNATOVICH, A, REITER, J, DITTMAR, M.T.; WAIN-HOBSON, S. MEYERHANS, A. 2011. Fitness ranking of individual mutants drives patterns of epistatic interactions in HIV-1. *PLoS ONE* 6:9.
- MARTINS, T.P. 2016. Identificação de vírus em tomateiro através de análise por sequenciamento de alto desempenho. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.
- MARWAL, A.; SAHU, A.K. & GAUR, R.K. 2014. Transmission and host interaction of Geminivirus in weeds. In Gaur, R.K.; Hohn T.; Sharma P. (eds). *Plant Virus-Host Interaction*. Academic Press. p. 143-161.
- MATYIS, J.C.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R. & COSTA, A.S. 1975. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica* 1: 267-275.
- MCLAUGHLIN, P.D.; MCLAUGHLIN, W.A.; MAXWELL, D.P. & ROYE, M.E. 2008. Identification of begomoviruses infecting crops and weeds in Belize. *Plant viruses* 2: 58.
- MEDINA, C.V. & LAMBERTINI, P.L. 2012. *Tomato dwarf leaf virus*, a New World begomovirus infecting tomato in Argentina. *Archives of virology* 157: 1975-1980.
- MELGAREJO, T.A.; KON, T.; ROJAS, M.R.; PAZ-CARRASCO, L.; ZERBINI, F.M. & GILBERTSON, R.L. 2013. 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* 87: 5397-5413.
- METZKER, M.L. 2010. Sequencing Technologies-the next generation. *Nature reviews genetics* 11: 31-46.
- MITUTI, T.; MOURA, M.F.; MACEDO, M.A.; SILVA, T.N.; PINTO, L.R.; COSTA, H. & REZENDE, J.A. 2019. Survey of begomoviruses and the crinivirus, tomato chlorosis virus, in solanaceous in Southeast/Midwest of Brazil. *Tropical Plant Pathology* 44: 468-472.
- MORALES, F.J. & ANDERSON, P.K. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of virology* 146: 415-441.
- MORIN, S.; GHANIM, M.; ZEIDAN, M.; CZOSNEK, H.; VERBEEK, M. & VAN DEN HEUVEL, J.F. 1999. A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology* 256: 75-84.

- NAHID, N.; AMIN, I.; MANSOOR, S.; RYBICKI, E.P.; VAN DER WALT, E. & BRIDDON, R.W. 2008. Two dicot-infecting mastreviruses (family Geminiviridae) occur in Pakistan. *Arch Virol* 153:1441–1451
- NOVELLA, I.S.; PRESLOID, J.B.; ZHOU, T.; SMITH-TSURKAN, S.D.; EBENDICK-CORPUS, B.E.; DUTTA, R.N.; LUST, K.L. WILKE, C.O. 2010. Genomic evolution of vesicular stomatitis virus strains with differences in adaptability. *Journal of Virology* 84:4960-4968.
- PADIDAM, M.; BEACHY, R.N. & FAUQUET, C. M. 1996. The Role of AV2 (“Precoat”) and Coat Protein in Viral Replication and Movement in Tomato Leaf Curl Geminivirus. *Virology* 224: 390-404.
- PADIDAM, M.; SAWYER, S. & FAUQUET, C.M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265: 218–25
- PAKKIANATHAN, B.C.; KONTSEDALOV, S.; LEBEDEV, G.; MAHADAV, A.; ZEIDAN, M.; CZOSNEK, H. & GHANIM, M. 2015. Replication of *Tomato yellow leaf curl virus* in its whitefly vector, *Bemisia tabaci*. *Journal of virology* 89: 9791-9803.
- PAZ-CARRASCO, L.C.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; LIMA, A.T.; XAVIER, C.A.; VIVAS-VIVAS, L.M.; MIZUBUTI, E.S. & ZERBINI, F.M. 2014. Begomovirus diversity in tomato crops and weeds in Ecuador and the detection of a recombinant isolate of rhynchosia golden mosaic Yucatan virus infecting tomato. *Archives of virology* 159: 2127-2132.
- PÉRÉFARRES, F.; THÉBAUD, G.; LEFEUVRE, P.; CHIROLEU, F.; RIMBAUD, L.; HOAREAU, M. & LETT, J.M. 2014. Frequency-dependent assistance as a way out of competitive exclusion between two strains of an emerging virus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281.
- PERRING, T.M.; STANSLY, P.A.; LIU, T.X.; SMITH, H.A. & ANDREASON, S.A. 2018. Whiteflies: biology, ecology, and management. *In: Wakil, W.; Brust G.; Perring, T. Sustainable Management of Arthropod Pests of Tomato*. Academic Press. p. 73-110.
- PILOWSKY, M. & COHEN, S. 1974. Inheritance of resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology* 64: 632-635.
- POLSTON, J.E. & CAPOBIANCO, H. 2013. Transmitting plant viruses using whiteflies. *JoVE Journal of Visualized Experiments* 81.

- PRADHAN, B.; VAN TIEN, V.; DEY, N. & MUKHERJEE, S.K. 2017. Molecular Biology of Geminivirus DNA Replication. *Avid Science* 2-31.
- PRIYADARSHINI, C.P.; AMBIKA, M.V.; TIPPESWAMY, R. & SAVITHRI, H.S. 2011. Functional characterization of coat protein and V2 involved in cell to cell movement of *Cotton leaf curl Kokhran virus-Dabawali*. *PloS one* 6.
- RAJA P.; SANVILLE B.C.; BUCHMANN R.C. AND BISARO D.M. 2008. Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *J. Virol.* 82: 8997–9007
- RAMESH, S.V.; SAHU, P.P.; PRASAD, M.; PRAVEEN, S. & PAPPU, H.R. 2017. Geminiviruses and plant hosts: a closer examination of the molecular arms race. *Viruses* 9: 256.
- RANA, V.S.; POPLI, S.; SAURAV, G.K.; RAINA, H.S.; CHAUBEY, R.; RAMAMURTHY, V.V. & RAJAGOPAL, R. 2016. A *Bemisia tabaci* midgut protein interacts with begomoviruses and plays a role in virus transmission. *Cellular microbiology* 18: 663-678.
- REGO-MACHADO, C.M.; NAKASU, E.Y.; BLAWID, R.; NAGATA, T. & INOUE-NAGATA, A.K. 2019. Complete genome sequence of a new bipartite begomovirus infecting tomato in Brazil. *Archives of virology* 164: 2873-2875.
- REUTER, J.A.; SPACEK, D.V. & SNYDER, M.P. 2015. High-throughput sequencing technologies. *Molecular cell* 58: 586-597.
- REYNAUD, B. & PETERSCHMITT, M. 1992. A study of the mode of transmission of maize streak virus by *Cicadulina mbila* using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Annals of applied biology* 121: 85-94.
- REZENDE, E. A.; FILGUEIRA, F.A.R.; ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; FERNANDES, J.J. & GILBERTSON, R.L. 1996. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. *Fitopatologia brasileira* 21: 424.
- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVÍCIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H. & ZERBINI, F.M. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 148: 281-295.
- RIBEIRO, S.G.; BEZERRA, I.C.; LIMA, M.F.; ÁVILA, A.C. & GIORDANO, L.B. 1996. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. VIII Encontro Nacional de Virologia (Resumos). São Lourenço, MG: SBV.
- RIBEIRO, S.G.; MARTIN, D.P.; LACORTE, C.; SIMOES, I.C.; ORLANDINI, D.R. & INOUE-NAGATA, A.K. 2007. Molecular and biological characterization of Tomato

- chlorotic mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology* 97: 702-711.
- RIZVI, I.; CHOUDHURY, N. R. & TUTEJA, N. 2015. Insights into the functional characteristics of geminivirus rolling-circle replication initiator protein and its interaction with host factors affecting viral DNA replication. *Archives of virology* 160: 375-387.
- ROCHA, C.S.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; LIMA, A.T.; SILVA, F.N.; XAVIER, C. A.; HORA-JÚNIOR, B.T. & ALFENAS-ZERBINI, P. 2013. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. *Journal of Virology* 87: 5784-5799.
- RODRIGUES, S. & SILVA, A.F. 2018. Weeds associated with cotton crop and hosting whitefly. *Arquivos do Instituto Biológico* 85.
- RODRÍGUEZ-NEGRETE, E.A.; CARRILLO-TRIPP, J. & RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. 2009. RNA silencing against geminivirus: complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *Journal of virology* 83: 1332-1340.
- RODRÍGUEZ-NEGRETE, E.A.; MORALES-AGUILAR, J.J.; DOMÍNGUEZ-DURAN, G.; TORRES-DEVORA, G.; CAMACHO-BELTRÁN, E.; LEYVA-LÓPEZ, N. E. & MÉNDEZ-LOZANO, J. 2019. High-Throughput Sequencing Reveals Differential Begomovirus Species Diversity in Non-Cultivated Plants in Northern-Pacific Mexico. *Viruses* 11: 594.
- RODRÍGUEZ-PARDINA, P.E.; ZERBINI, F.M. & DUCASSE, D.A. 2006. Genetic diversity of begomoviruses infecting soybean, bean and associated weeds in Northwestern Argentina. *Fitopatologia Brasileira* 31: 342-348.
- ROJAS, M.R.; HAGEN, C.; LUCAS, W.J. & GILBERTSON, R.L. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* 43:361-394.
- ROOSSINCK, M.J. 1997. Mechanisms of plant virus evolution. *Annual review of phytopathology* 35: 191-209.
- ROSEN, R.; KANAKALA, S.; KLIOT, A.; PAKKIANATHAN, B.C.; FARICH, B.A.; SANTANA-MAGAL, N. & GHANIM, M. 2015. Persistent, circulative transmission of begomoviruses by whitefly vectors. *Current opinion in virology* 15: 1-8.

- ROSHAN, P.; KULSHRESHTHA, A.; KUMAR, S.; PUROHIT, R. & HALLAN, V. 2018. AV2 protein of tomato leaf curl Palampur virus promotes systemic necrosis in *Nicotiana benthamiana* and interacts with host Catalase2. *Scientific reports* 8: 1-15.
- ROUMAGNAC, P.; GRANIER, M.; BERNARDO, P.; DESHOUX, M.; FERDINAND, R.; GALZI, S. & MESLÉARD, F. 2015. *Alfalfa leaf curl virus*: An aphid-transmitted geminivirus. *Journal of virology* 89: 9683-9688.
- RUHEL, R. & CHAKRABORTY, S. 2019. Multifunctional roles of geminivirus encoded replication initiator protein. *Virus Disease* 30: 66-73.
- RYBICKI, E.P. 1994. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Archives of Virology* 139:49-77.
- SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; DOMÍNGUEZ-HUERTA, G.; DÍAZ-MARTÍNEZ, L.; TOMÁS, D.M., NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. & GRANDE-PÉREZ, A. 2018. Differential shape of geminivirus mutant spectra across cultivated and wild hosts with invariant viral consensus sequences. *Frontiers in Plant Science* 9:932.
- SANDERFOOT, A.A. & INGHAM, J. 1996. A Viral Movement Protein as a Nuclear Shuttle'. *Plant Physiol* 110: 23-33.
- SANJUÁN, R.; NEBOT, M.R.; CHIRICO, N.; MANSKY, L.M. & BELSHAW, R. 2010. Viral mutation rates. *Journal of virology* 84: 9733-9748.
- SANTOS, C.D.; ÁVILA, A.C.D. & RESENDE, R.D.O. 2003. Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca. *Fitopatologia Brasileira* 28: 664-673.
- SAUNDERS, K.; LUCY, A. & STANLEY, J. 1991. DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus consistent with a rolling circle mechanism of replication. *Nucleic acids research* 19: 2325-2330.
- SETTLAGE, S.B.; SEE, R.G. & HANLEY-BOWDOIN, L. 2005. Geminivirus C3 protein: replication enhancement and protein interactions. *Journal of virology* 79: 9885-9895.
- SHEPHERD, D.N.; MARTIN, D.P.; VAN DER WALT, E.; DENT, K.; VARSANI, A. & RYBICKI, E.P. 2010. *Maize streak virus*: an old and complex 'emerging' pathogen. *Molecular plant pathology* 11: 1-12.
- SILVA, A.K.F.; SANTOS, C.D.G. & NASCIMENTO, A.K.Q. 2010. Transmissão de begomovirus de plantas daninhas para tomateiros pela mosca-branca. *Planta daninha* 28: 507-514.
- SIMONS, J.N. & COE, D.M. 1958. Transmission of pseudo-curly top virus in Florida by a treehopper. *Virology* 6: 43-48.

- SOTO, M.J.; CHEN, L.F.; SEO, Y.S. & GILBERTSON, R.L. 2005. Identification of regions of the *Beet mild curly top virus* (family *Geminiviridae*) capsid protein involved in systemic infection, virion formation and leafhopper transmission. *Virology* 341: 257-270.
- STEINHAUER, D.A.; DOMINGO, E. & HOLLAND, J.J. 1992. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* 122: 281-288.
- STRAUSBAUGH, C.A.; WINTERMANTEL, W.M.; GILLEN, A.M. & EUJAYL, I.A. 2008. Curly top survey in the western United States. *Phytopathology* 98: 1212-1217.
- SUNTER, G. & BISARO, D.M. 1991. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology* 180: 416-419
- SUNTER, G.; HARTITZ, M.D.; HORMUZDI, S.G.; BROUGH, C.L. & BISARO, D.M. 1990. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology* 179: 69-77.
- TAVARES, S.S.; RAMOS-SOBRINHO, R.; GONZÁLEZ-AGUILERA, J.; LIMA, G.S.A.; ASSUNÇÃO, I.P. & ZERBINI, F.M. 2012. Further molecular characterization of weed-associated begomoviruses in Brazil with an emphasis on *Sida* spp. *Planta Daninha* 30: 305-315.
- TENG, K.; CHEN, H.; LAI, J.; ZHANG, Z.; FANG, Y.; XIA, R. & XIE, Q. 2010. Involvement of C4 protein of beet severe curly top virus (family *Geminiviridae*) in virus movement. *PloS one* 5.
- TRINDADE, T.D.; TREVISAN, H. & CARVALHO, A.G.D. 2019. Incidence of *Bemisia tabaci* Gennadius (Aleyrodidae, Aleyrodinae) in four Atlantic Forest fragments. *Arquivos do Instituto Biológico* 86.
- UNSELD, S.; HÖHNLE, M.; RINGEL, M. & FRISCHMUTH, T. 2001. Subcellular targeting of the coat protein of African cassava mosaic geminivirus. *Virology* 286: 373-383.
- VACA-VACA, J.C.; BETANCURT-PÉREZ, J.F. & LÓPEZ-LÓPEZ, K. 2011. Detection, identification and geographical localization of tomato-infecting Begomovirus in Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología* 13: 115-122.
- VAN DER WALT, E.; MARTIN, D.P.; VARSANI, A.; POLSTON, J.E. & RYBICKI, E.P. 2008. Experimental observations of rapid Maize streak virus evolution reveal a strand-specific nucleotide substitution bias. *Virology Journal* 5:104.

- VAN REGENMORTEL, H.V.; FAUQUET, C.M. & BISHOP, D.H.L. 2000. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press.
- VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J.S. & FAUQUET, C.M. 2004. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal of virology* 78: 9487-9498.
- VARSANI, A.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; HERNÁNDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.; BROWN, J. K. & MARTIN, D.P. 2014. Establishment of three new genera in the family *Geminiviridae*: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. *Archives of virology* 159: 2193-2203.
- VARSANI, A.; ROUMAGNAC, P.; FUCHS, M.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; IDRIS, A. & MARTIN, D.P. 2017. *Capulavirus* and *Grablovirus*: two new genera in the family *Geminiviridae*. *Archives of Virology* 162: 1819-1831.
- VARSANI, A.; SHEPHERD, D. N.; DENT, K.; MONJANE, A. L.; RYBICKI, E. P. & MARTIN, D.P. 2009. A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. *Virology journal*: 6: 36.
- VELÁSQUEZ-VALLE, R.; MEDINA-AGUILAR, M. M. & CREAMER, R. 2008. First report of *Beet mild curly top virus* infection of chile pepper in north-central Mexico. *Plant disease* 92: 650-650.
- VERLAAN, M.G.; HUTTON, S.F.; IBRAHEM, R.M.; KORMELINK, R.; VISSER, R.G.; SCOTT, J.W. & BAI, Y. 2013. *The tomato yellow leaf curl virus* resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. *PLoS genetics* 9.
- VILLAMOR, D.E.V.; HO, T.; AL RWAHNIH, M.; MARTIN, R.R. & TZANETAKIS, I.E. 2019. High throughput sequencing for plant virus detection and discovery. *Phytopathology* 109: 716-725.
- VU, S.; MELGAREJO, T.A.; CHEN, L.; SOUZA, J.O, MACEDO, M.A.; INOUE-NAGATA, A.K. & GILBERTSON, R.L. 2015. Evidence that tomato mottle leaf curl virus from Northeastern Brazil is an indigenous New World monopartite begomovirus. *Phytopathology* 105: 143.
- WANG, H.; BUCKLEY, K.J.; YANG, X.; BUCHMANN, R.C. & BISARO, D.M. 2005. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Journal of virology* 79: 7410-7418.

- WANG, H.; HAO, L.; SHUNG, C.Y.; SUNTER, G. & BISARO, D.M. 2003. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *The Plant Cell* 15: 3020-3032.
- WANG, K.; MA, Q.; JIANG, L.; LAI, S.; LU, X.; HOU, Y. & RUAN, J. 2016. Ultra-precise detection of mutations by droplet-based amplification of circularized DNA. *BMC genomics* 17: 214.
- WARD, B.M. & LAZAROWITZ, S.G. 1999. Nuclear export in plants: use of geminivirus movement proteins for a cell-based export assay. *The Plant Cell* 11: 1267-1276.
- WARGO, A.R. & KURATH, G. 2012. Viral fitness: definitions, measurement, and current insights. *Current opinion in virology* 2: 538-545.
- WARGO, A.R. & KURATH, G. 2011. In vivo fitness associated with highvirulence in a vertebrate virus is a complex trait regulated by host entry, replication, and shedding. *Journal of Virology* 85:3959-3967.
- WRIGHT, E.A.; HECKEL, T.; GROENENDIJK, J.; DAVIES, J.W. & BOULTON, M.I. 1997. Splicing features in maize streak virus virion and complementary sense gene expression. *The plant journal* 12: 1285-1297.
- WYANT, P.S.; KOBER, S.; SCHWIERZOK, A.; KOCHER, C.; SCHÄFER, B.; JESKE, H. & WEGE, C. 2012. Cloned tomato golden mosaic virus back in tomatoes. *Virus research* 167: 397-403.
- XIAO, N.; PAN, L.L.; ZHANG, C.R.; SHAN, H.W. & LIU, S.S. 2016. Differential tolerance capacity to unfavourable low and high temperatures between two invasive whiteflies. *Scientific reports* 6: 1-10.
- YAN, Z.; PÉREZ-DE-CASTRO, A.; DÍEZ, M.J.; HUTTON, S.F.; VISSER, R.G.; WOLTERS, A.M.A. & LI, J. 2018. Resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* in Tomato Germplasm. *Frontiers in plant science* 9: 1198.
- YAZDI, H.B.; HEYDARNEJAD, J. & MASSUMI, H. 2008. Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus genes* 36: 539-545.
- ZAMIR, D.; EKSTEIN-MICHELSON, I.; ZAKAY, Y.; NAVOT, N.; ZEIDAN, M.; SARFATTI, N. 1994. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-1*. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 141-146.
- ZERBINI, F.M.; BRIDDON, R.W.; IDRIS, A.; MARTIN, D.P.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. & CONSORTIUM, I.R. 2017. ICTV virus taxonomy profile: Geminiviridae. *The Journal of general virology* 98: 131.

ZHANG, S.C.; WEGE, C. & JESKE, H. 2001. Movement proteins (BC1 and BV1) of Abutilon mosaic geminivirus are cotransported in and between cells of sink but not of source leaves as detected by green fluorescent protein tagging. *Virology* 290: 249-260.

ZHOU, Y.; ROJAS, M.R.; PARK, M.R.; SEO, Y.S.; LUCAS, W.J. & GILBERTSON, R.L. 2011. Histone H3 interacts and colocalizes with the nuclear shuttle protein and the movement protein of a geminivirus. *Journal of virology* 85: 11821-11832.

## **CAPÍTULO 2**

---

---

**A TEMPORAL DIVERSITY ANALYSIS OF BRAZILIAN BEGOMOVIRUSES IN TOMATO BY HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING REVEALS DECREASE IN SPECIES RICHNESS**

## **Chapter 2: A TEMPORAL DIVERSITY ANALYSIS OF BRAZILIAN BEGOMOVIRUSES IN TOMATO BY HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING REVEALS A DECREASE IN SPECIES RICHNESS**

### **RESUMO**

Compreender a evolução molecular e as mudanças de diversidade dos begomovírus é crucial para prever futuros surtos em tomateiro. Assim, foi realizado um estudo de diversidade viral molecular utilizando sequenciamento de alto desempenho (HTS) em amostras de folhas de tomateiro infectadas coletadas entre 2003 e 2016 no Brasil Central. As amostras de DNA foram submetidas a amplificação por círculo rolante e agrupadas em três lotes, G1 (2003–2005, N = 107), G2 (2009–2011, N = 118) e G3 (2014–2016, N = 129) antes do HTS. Observou-se uma diminuição na riqueza de espécies de begomovírus, seis espécies foram detectadas nas bibliotecas G1 (tomato severe rugose virus (ToSRV), tomato mottle leaf curl vírus (ToMoLCV), sida micrantha mosaic vírus (SiMMV), tomato golden vein vírus (TGVV), tomato chlorotic mottle vírus (ToCMoV), and tomato apical leaf curl vírus (ToALCV)) e três nas bibliotecas G2 (ToSRV, ToMoLCV e SiMMV) e G3 (ToSRV, ToMoLCV e Bean golden mosaic vírus (BGMV)). O vírus tomato severe rugose virus (ToSRV) e o vírus monopartido tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV) foram considerados os begomovírus mais prevalentes nesta pesquisa. Nossas análises revelaram um aumento significativo na abundância relativa e na diversidade genética do ToMoLCV de G1 para G3 e ToSRV de G1 para G2; no entanto, ambos os índices diminuíram de G2 para G3. Isso sugere que ToMoLCV e ToSRV superaram outros begomovírus de G1 para G2 e que ToSRV estava sendo superado por ToMoLCV de G2 para G3. São discutidos os possíveis antecedentes evolutivos de begomovírus que provavelmente foram transferidos de plantas selvagens nativas e plantas daninhas para as culturas do tomateiro após a introdução da mosca-branca espécie *Bemisia tabaci* MEAM1 e o amplo uso de cultivares portadoras do gene de resistência *Ty-1*.

**Palavras-chaves:** begomovírus, evolução, gene de resistência, metagenômica

## ABSTRACT

Understanding the molecular evolution and diversity changes of begomoviruses is crucial for predicting future outbreaks in tomato crops. Thus, a molecular diversity study using high-throughput sequencing (HTS) was carried out on samples of infected tomato leaves collected between 2003 and 2016 from Central Brazil. DNA samples were subjected to rolling circle amplification and pooled in three batches, G1 (2003–2005, N = 107), G2 (2009–2011, N = 118), and G3 (2014–2016, N = 129) prior to HTS. A decrease in begomovirus richness was observed, six species were detected in the G1 (tomato severe rugose virus (ToSRV), tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV), sida micrantha mosaic virus (SiMMV), tomato golden vein virus (TGVV), tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV), and tomato apical leaf curl virus (ToALCV)) and three in the G2 (ToSRV, ToMoLCV and SiMMV) and G3 (ToSRV, ToMoLCV and Bean golden mosaic virus (BGMV)) libraries. The bipartite ToSRV and the monopartite ToMoLCV were found to be the most prevalent begomoviruses in this survey. Our analyses revealed a significant increase in both relative abundance and genetic diversity of ToMoLCV from G1 to G3 and ToSRV from G1 to G2; however, both decreased from G2 to G3. This suggests that ToMoLCV and ToSRV outcompeted other begomoviruses from G1 to G2 and that ToSRV was being outcompeted by ToMoLCV from G2 to G3. The possible evolutionary history of begomoviruses that were likely transferred from wild native plants and weeds to tomato crops after the introduction of the polyphagous vector *Bemisia tabaci* MEAM1 and the wide use of cultivars carrying the *Ty-1* resistance gene are discussed.

**Key words:** begomovirus, evolution, resistance gene, metagenomics

Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados na revista *Frontiers in Plant Science* com uma versão ligeiramente modificada. **Souza, T. A., Silva, J. M. F., Nagata, T., Martins, T. P., Nakasu, E. Y. T., & Inoue-Nagata, A. K. (2020).** A Temporal Diversity Analysis of Brazilian Begomoviruses in Tomato Reveals a Decrease in Species Richness between 2003 and 2016. *Frontiers in Plant Science*, **11**, 1201

## 1. INTRODUCTION

The cultivation of tomato (*Solanum lycopersicum*) is challenging due to its susceptibility to several pathogens, including begomoviruses (family *Geminiviridae*; genus *Begomovirus*), a major group of plant pathogens found in tropical and subtropical regions (Mahatma *et al.*, 2016). Begomoviruses present small, circular, single-stranded (ss), DNA genomes and are transmitted by whiteflies of the *Bemisia tabaci* cryptic species complex. The genome is composed of either a single component (monopartite) of ~2.8 kb or two components (bipartite) DNA-A and DNA-B each comprising ~2.6 kb (Fauquet *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2012).

Begomoviruses exhibit high mutation rates and recombination frequencies, both within and among species, resulting in the rapid adaptive evolution and emergence of new variants and species (Duffy *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2017). Historically, the first reported begomovirus disease in tomatoes in Brazil was caused by the tomato golden mosaic virus (TGMV), a New World (NW) bipartite begomovirus, in the 1960s (Costa, 1976). The disease is characterized by distorted growth and yellow to light green mosaic in leaves and is transmitted by whiteflies (Matyis *et al.*, 1975). Thereafter, the disease was either not reported or was at an undetectable level in the country. It is speculated that this low occurrence of begomoviruses in tomato plants was due to the host preference of the *B. tabaci* populations present in Brazil at that time, presumably of the cryptic species *B. tabaci* NW, also known as biotype A. However, after the introduction of *B. tabaci* Middle East Asia Minor 1 (MEAM1, biotype B) in the early 1990s the situation changed. MEAM1 is readily attracted to tomatoes; this has resulted in a fast and wide spread of begomoviral diseases in Brazil (Faria *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2006; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). Unlike whiteflies of the NW, those of MEAM1 have a broad range of hosts and are believed to have transferred native viruses from weeds and wild plants to

cultivated tomato plants (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Barreto *et al.*, 2013). Currently, 25 species of begomovirus-infecting tomatoes have been described in Brazil (Flores *et al.*, 1960; Matyis *et al.*, 1975; Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2008; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2013; Batista *et al.*, 2019). Bipartite begomoviruses, especially ToSRV (Inoue-Nagata *et al.*, 2016; Rojas *et al.*, 2018; Mituti *et al.*, 2019), are the most predominant in tomato plants. The monopartite tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV) (Vu *et al.*, 2015) has also been largely reported in tomato plants (Inoue-Nagata *et al.*, 2018) and causes severe symptoms such as chlorotic spots, interveinal chlorosis, mottling, mosaic, leaf distortion, and stunting (Inoue-Nagata *et al.*, 2016).

Traditionally, the most common preventive measures for begomovirus disease control are the application of insecticides and the use of resistant cultivars (Lapidot and Friedmann, 2002; Hurtado *et al.*, 2012). To date, a few resistance genes, such as *Ty-1* to *Ty-6*, have been described in the wild relatives of tomato; some have been successfully introgressed into tomato lines in breeding programs (Zamir *et al.*, 1994; Anbinder *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2009; Aguilera *et al.*, 2011; Hutton *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2018; Gill *et al.*, 2019). Of those, many commercial tomato hybrids carrying the *Ty-1/Ty-3* (allelic) genes (Verlaan *et al.*, 2013) are largely in use (Pereira-Carvalho *et al.*, 2015). *Ty-1/Ty-3* encode a plant RNA-dependent RNA polymerase, which activates transcriptional gene silencing with an increase in viral genome methylation (Verlaan *et al.*, 2013; Butterbach *et al.*, 2014). In plants that carry resistance alleles, viral accumulation continues, although at lower levels than in susceptible plants (Zamir *et al.*, 1994; Belabess *et al.*, 2016).

Based on our knowledge of the overwhelming diversity of begomoviruses in tomato plants in Brazil and the prevalence of only two begomovirus species (Inoue-Nagata *et al.*, 2018; Rojas *et al.*, 2018; Mituti *et al.*, 2019), we hypothesize that several native

begomoviruses were introduced from wild and weed plants to tomato and that their diversity decreased over time after intensive interactions between viruses, vectors, hosts, and environmental factors. Furthermore, the broad use of resistant tomato cultivars carrying *Ty* genes may also have influenced the begomovirus population dynamics in the field, as reported earlier for tomato yellow leaf curl disease (García-Andrés *et al.*, 2009). This hypothesis assumes that selective pressure existed, limiting species diversity over the years in a local environment. In this study, we estimated genetic diversity changes in begomoviruses that infect tomato plants in an important tomato-growing region in Central Brazil through ~14 years. For temporal analysis, begomovirus-infected plant samples were divided into three groups, and all begomovirus sequences were identified using HTS data. Subsequently, species-specific PCR and Sanger sequencing were done to confirm the sequence.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Collection of tomato samples and detection of begomovirus

Symptomatic tomato leaves (with chlorotic spots, interveinal chlorosis, and leaf curling; (Figure 1) were collected from 2003 to 2016 in a ~70 Km<sup>2</sup> area comprising Taquara (15° 39' 31.11" S, 47° 33' 12.8" W) and Pipiripau (15° 37' 06.4" S, 47° 40' 11.4" W), at the major tomato production area in the greenbelt of the Federal District. In this area, tomatoes are grown for the fresh market. Begomovirus infections were previously confirmed by total DNA extraction using the CTAB method (Doyle and Doyle 1990) and PCR amplification using universal primers (PAR1c496 and PAL1v1978; Rojas *et al.*, 1993). To analyze temporal population change in the genetic variants of begomovirus, we divided the samples into three groups according to the collection year: G1 (2003, 2004, 2005; N = 107), G2 (2009, 2010, 2011; N = 118), and G3 (2014, 2015, 2016; N = 129).



**Figure 1.** Examples of tomato plants collected for the diversity study. (A) A typical tomato field for fresh market consumption. (B) and (C) Tomato plants infected by a begomovirus showing symptoms of interveinal chlorosis and leaf curling.

## **2.2. Diversity analysis of begomoviruses by rolling circle amplification and RFLP**

Circular viral DNA was amplified in individual samples by rolling circle amplification (RCA) using the Illustra TempliPhi DNA Amplification Kit (GE Healthcare, Milwaukee, USA), following the manufacturer's instructions. The use of random hexamer primers for amplification during RCA efficiently amplifies circular DNA molecules at random. Each RCA product was digested with MspI and the digestion profile was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis.

## **2.3. HTS of RCA products from each group and identification of begomoviruses**

Libraries were prepared in three groups, each containing a pool of RCA products from samples collected during 2003–2005 (G1 library), 2009–2011 (G2), and 2014–2016 (G3). The libraries were prepared using the TruSeq DNA sample preparation v.2 kit and sequenced using 100 bp paired-end reads on the Illumina HiSeq 2000 platform (Macrogen Inc., Seoul, South Korea). The HTS reads were trimmed using Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), and the contigs were *de novo* assembled using Velvet and MEGAHIT v1.1.3 (Phred = 34, 71 k-mer) (Zerbino and Birney, 2008; Li *et al.*, 2015). The sequences assembled by these two assemblers were transferred to Geneious 8.1.9 (Biomatters, Auckland, New Zealand) and subjected to a BLAST search against the virus reference database (downloaded from NCBI on 28/01/2019). Furthermore, consensus sequences were obtained with the mapping tool using reference sequences from each virus. Pairwise comparisons of the full genome were performed using Sequence Demarcation Tool (SDT) (Muhire *et al.*, 2014). To confirm the presence of various begomoviruses detected in the pooled samples by HTS analyses, PCR with specific primers for each virus (Table 1) was performed using pooled samples, and the amplicons were sequenced by the Sanger method.

**Table 1.** Specific primer sets used for detection of begomovirus components DNA-A and DNA-B

Component	Name	Sequence (5'-3')	Amplicon (kbp)	Reference
DNA-A	TGVV1Fo	AAAGCSTTGGATAGATTTTC	0.5	Fernandes <i>et al.</i> , 2008
	TGVV6Re	GAGCTATCGGGTCTCATC		
	SiMA1563Fo	AGTGTCCAGCCTCTCAATGC	0.6	This study
	SiMA2356Re	GACCTGGTCTCCCAACAAG		
	ToMoLCV Fo	TCCAGAAGCTGTCGTTGAC	0.8	
	ToMoLCV Re	CGGAGGAGATGCAAGAGTGG		
	ToSRV-1Fo	GCTAAACATTCGGTTGATATACC	0.9	
	ToSRV-2Re	CGTGTTGTTTAAGCGTTTCTGCG		
	ToCMoV1Fo	AGTGCTTCCATGACTGATCC	0.6	
	ToCMoV4Re	ATGTGAAGGCCCAAAAAGAATCG		
	ToALCV340Pst U2Fo <sup>2</sup>	ACGCATTTCTGCAGACTTGCGCGGATCGA	2.9	
	ToALCV363Pst U1Re <sup>2</sup>	CCGCGCAAGTCTGCAGAAATGCGTTGTAAC		
	BGMU1 Fo <sup>2</sup>	ATGGTGGAGCACGACACTCGTTCAAAGTCTCTATGAATCGG	2.9	
	BGMU12528 Re <sup>2</sup>	TTTTGAACGAGAGCTCAATCGGGGTACACC		
	ToRMV1367Fo	ATATGTCCTCGACGTTGTAC	2.9	
ToRMV1387Re	ATCCCCTYTATTTCAAGATGT			
DNA-B	ToSRV38F	GCGAAATCGTGTACGTTGCC	0.3	
	ToSRV329R	ACCCACACGAAAGCAGAGTT		
	SiMMV46F	GTGCCCGTTGGATACCTCTT	0,9	
	SiMMV923R	TCCTTCGACCTTTGGGGTGG		

## **2.4. Estimation of intraspecies diversity**

Genetic diversity and population dynamics of begomoviruses through time were estimated using the HTS data. In this analysis, the reads were mapped to three reference databases comprising all ToMoLCVs, ToSRVs, and begomovirus sequences available in GenBank using BWA MEM v.0.7.17 (Li, 2013) with a seed length (-k) of 55 nucleotides. This strategy was adopted to mitigate cross alignments between different species, which should be common considering the 91% nucleotide identity thresholds for species demarcation. Twenty-seven mers were extracted and counted from the reads that aligned to each database using SAMtools v1.9 (Li *et al.*, 2009) and Jellyfish v.2.2.3 (Marçais *et al.*, 2011). Shannon entropy (Shannon, 1948) was calculated for each dataset based on the frequency of each unique 27-mer. The number of reads aligned to each database was used to calculate the relative abundance of ToSRV and ToMoLCV for each sample group. To investigate whether the diversity of ToSRV and ToMoLCV significantly increased or decreased over time, we aligned previously extracted reads to the genomes of these viruses to annotate single nucleotide polymorphisms (SNP) with LoFreq (Wilm *et al.*, 2012). Thereafter, the entropy of each SNP was calculated and the cumulative sum of the entropy was used to perform the Wilcoxon signed-rank tests between two time points.

## **2.5. *Ty-1* detection in individual total DNA samples**

Considering that *Ty-1* is the most common resistance gene introgressed in commercial cultivars in Brazil, PCR was performed to confirm the presence of the gene in individual total DNA samples with specific primers, as described by Prasanna *et al.* (2015). The amplicons were digested with HinfI and polymorphism was evaluated. The DNA profile from cultivars carrying *Ty-1* showed the presence of a unique ~1 kb DNA fragment, in contrast to the ~0.6 kb fragment in those not carrying the gene.

## **2.6. Detection of the major begomoviruses in individual samples**

The four most epidemiologically relevant begomoviruses in the datasets were selected: ToSRV, ToMoLCV, TGVV, and SiMMV. Thereafter, PCR was performed to evaluate their presence in individual total DNA samples within groups G1, G2, and G3 (primers listed in Table 1).

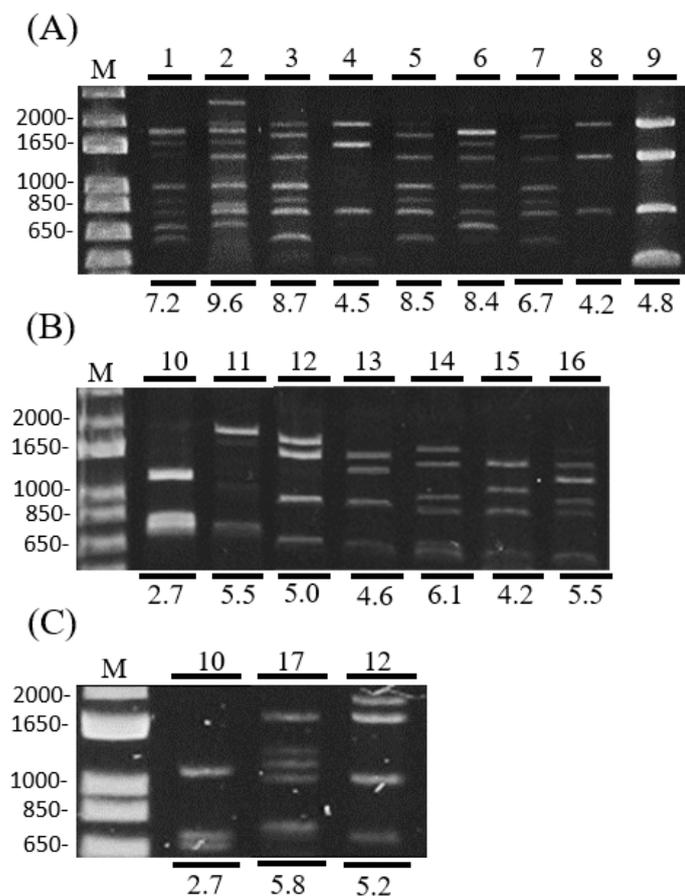
## **2.7. Phylogenetic analysis**

Two phylogenetic analyses were performed; the first with the complete set of DNA-A sequences of TGVV and tomato yellow vein streak virus (ToYVSV), and the second with the DNA-A sequences of SiMMV. All sequences related to these viruses were retrieved from GenBank and aligned using MUSCLE. The phylogenetic tree was constructed using the Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993) and the maximum likelihood statistical method with 3000 repetitions included in the MEGA7 program (Kumar *et al.*, 2016).

### 3. RESULTS

#### 3.1. Diversity analysis by RCA-RFLP

A collection of begomoviruses sampled in the Taquara and Pípiripau regions was used for begomovirus diversity analysis. A subset of these samples was divided into three groups according to the collection year: G1 (2003–2005), G2 (2009–2011), and G3 (2014–2016). The viral DNAs of individual samples from each group were amplified by RCA and digested with MspI for a preliminary evaluation of the diversity of begomoviruses present in the samples. Viruses of the same species share a similar digestion profile. Summing the length of each fragment showed the genome size of the begomovirus to be ~2.8 kb for the monopartite virus and ~5.2 kb for the bipartite virus. The digestion profiles were analyzed individually and grouped into 17 distinct pattern profiles (representative profiles shown in Figure 2).



**Figure 2.** Restriction enzyme digestion profiles of begomoviruses amplified by RCA and digested with MspI on 1% agarose gel, observed in representative samples of G1 (A), G2 (B) and G3 (C). The estimated sum of each genome fragments (in kbp) is indicated below the restriction profile. M - 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific).

The size of potential begomovirus genomes was estimated to range from 2.7–9.6 kb (numbers below the electrophoresis image, Figure 2), suggesting the presence of a monopartite begomovirus in some samples and mixed infection in others. In the G1 group, most of the profiles were mixed infection types, as the sum exceeded 7 kb (Figure 2A). In contrast, samples of the G2 and G3 groups likely contained either a monopartite or bipartite begomovirus (Figure 2B, 2C). Compared to the nine digestion profiles observed in G1, seven were observed in G2 and only three in G3 (Figure 2). This suggested a local decrease in begomovirus diversity over time. Two identical profiles were observed in G2 and G3 (profiles 10 and 12, Figure 2B, 2C), indicating that the same viruses were potentially present in these groups, whereas those observed in G1 were not found in the other groups. From these results, we concluded that a substantial change in the diversity of begomovirus species occurred in the evaluated time.

### 3.2. Metagenomic study confirms a gradual decrease in begomovirus diversity from 2003 to 2016

Illumina sequencing generated a total of 25,522,962 reads from G1 (2003–2005), 21,442,638 reads from G2 (2009–2011), and 19,960,206 reads from G3 (2014–2016) (Table 2). Removal of adapter residues and low-quality sequences yielded > 18,000,000 final reads each (Table 2).

**Table 2.** High-Throughput Sequencing (HTS) data summary of reads and contigs mapping to geminivirus sequences dataset.

Samples	Total reads	Trimmed	Reads Q20 (%) <sup>1</sup>	Reads Q30 (%) <sup>2</sup>	Velvet	MEGAHIT
2003-2005	25,522,962	23,894,300	95.5	92.8	1570	430
2009-2011	21,442,638	20,105,579	95.7	93.1	1522	1205
2014-2016	19,960,206	18,869,564	96.1	93.6	1436	1139

<sup>1</sup> Q20 (%): ratio of reads with Phred Quality Score greater than 20.

<sup>2</sup> Q30 (%): ratio of reads with Phred Quality Score greater than 30.

Two assembling programs, Velvet and MEGAHIT, were evaluated for the number and size of the contigs. The number of contigs was higher for Velvet (Table 3); however, they were shorter (141 to 1,089 bp) than those from the MEGAHIT assembler (406 to 2,620) (Table 4). The BLAST results of contigs by both assemblers were highly similar, with contigs sharing high identities with seven viruses in G1, three in G2, and three in G3 (Tables 3 and 4). Only one complete genome sequence containing 2,620 bp and sharing 92.14% identity to an isolate of ToMoLCV (Table 4) was assembled. The remaining contigs were partial sequences of either DNA-A or DNA-B components. After all reads were fine mapped using the obtained contigs (contig-extension processing by Geneious), 17 genome-sized (~2.6 kb) sequences were assembled with full coverage (Table 5). The genome of ToRMoV was not assembled. In the G1 group, six begomoviruses were identified from nine segments: (1) SiMMV (DNA-A), (2, 3) tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV; DNA-A and DNA-B), (4, 5) TGVV; (DNA-A and DNA-B), (6) tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV; monopartite), (7, 8) ToSRV; (DNA-A and DNA-B), and (9) tomato apical leaf curl virus (ToALCV, monopartite) (Table 5). ToALCV shares the highest identity with members of the genus *Capulavirus* within the family *Geminiviridae* (Vaghi Medina *et al.*, 2018); however, it was included in this analysis as a begomovirus-like virus for the sake of simplification. Although SiMMV is a bipartite begomovirus, its DNA-B sequence could not be detected, suggesting that it either uses the DNA-B sequence of another virus or behaves as a monopartite virus.

**Table 3.** BLAST analysis of DNA-A and DNA-B contigs assembled by Velvet from G1, G2 and G3 libraries.

Group	Contig/ Genomic component	Contig length (bp)	BLASTn	Percentage Identity (%)	E-value	Accession	
1	1	SiMMV DNA-A	581	SiMMV DNA-A	94.15	0	JX415194
	2	ToCMoV DNA-A	146	ToCMoV DNA-A	95.89	3e -56	KC706556
	3	ToCMoV DNA-B	152	ToCMoV DNA-B	86.18	6e-46	KC706567
	4	TGVV/A DNA-A	159	TGVV/A DNA-A	96.23	3e -69	JF803259
	5	TGVV/B DNA-B	223	TGVV/B DNA-B	97.76	9e-106	JF803265
	6	ToMoLCV	601	ToMoLCV	97.84	0.0	KX896403
	7	ToRMV DNA-A	223	ToRMV DNA-A	95.07	4e -99	AF291705
	8	ToSRV DNA-A	156	ToSRV DNA-A	92.31	6e -61	KY524458
	9	ToSRV DNA-B	224	ToSRV DNA-B	95.09	1e -99	KC706627
	10	ToALCV	213	ToALCV	94.37	2e-92	MG491197
2	1	SiMMV DNA-A	1089	SiMMV DNA-A	96.51	0.0	KU852503
	2	ToMoLCV	208	ToMoLCV	97.12	2e -96	AY049211
	3	ToSRV DNA-A	142	ToSRV DNA-A	94.37	1e -56	AY029750
	4	ToSRV DNA-B	265	ToSRV DNA-B	96.23	2e -123	EF534708
3	1	BGMV	745	BGMV DNA-A	99.87	0.0	MG334552
	2	ToMoLCV	193	ToMoLCV	94.30	2e -82	JF803249
	3	ToSRV DNA-A	141	ToSRV DNA-A	99.29	7e -65	KX828624
	4	ToSRV DNA-B	142	ToSRV DNA-B	96.48	5e - 61	EF534708

**Table 4.** BLAST analysis of DNA-A and DNA-B contigs assembled by MEGAHIT from G1, G2 and G3 libraries.

Group	Contig/ Genomic component	Contig length (bp)	BLASTn	Percentage Identity (%)	E-value	Accession	
1	1	SiMMV DNA-A	1807	SiMMV DNA-A	94.19	0.0	AJ557450
	2	ToCMoV DNA-A	588	ToCMoV DNA-A	89.97	0.0	AF490004
	3	ToCMoV DNA-B	903	ToCMoV DNA-B	87.94	0.0	AF491306
	4	TGVV/A DNA-A	1132	TGVV/A DNA-A	98.23	0.0	JF803254
	5	TGVV/B DNA-B	2230	TGVV/B DNA-B	98.79	0.0	JF803265
	6	ToMoLCV	2620	ToMoLCV	92.14	0.0	KX896398
	7	ToRMV DNA-A	827	ToRMV DNA-A	96.25	0.0	AF291705
	8	ToSRV DNA-A	1204	ToSRV DNA-A	99.50	0.0	DQ207749
	9	ToSRV DNA-B	619	ToSRV DNA-B	97.25	0.0	EF534708
	10	ToALCV	2228	ToALCV	96.01	0.0	MG491197
2	1	SiMMV DNA-A	953	SiMMV DNA-A	91.61	0.0	AJ557451
	2	ToMoLCV	926	ToMoLCV	86.93	0.0	KX896409
	3	ToSRV DNA-A	630	ToSRV DNA-A	98.42	0.0	DQ207749
	4	ToSRV DNA-B	770	ToSRV DNA-B	96.88	0.0	EF534708
3	1	BGMV	923	BGMV DNA-A	93.50	0.0	M88686
	2	ToMoLCV	639	ToMoLCV	91.86	0.0	KX896405
	3	ToSRV DNA-A	585	ToSRV DNA-A	94.87	0.0	JX415198
	4	ToSRV DNA-B	406	ToSRV DNA-B	98.28	0.0	EF534708

**Table 5.** Mapping and BLAST analysis of consensus viral sequences identified by High-Throughput Sequencing in individual libraries G1, G2 and G3.

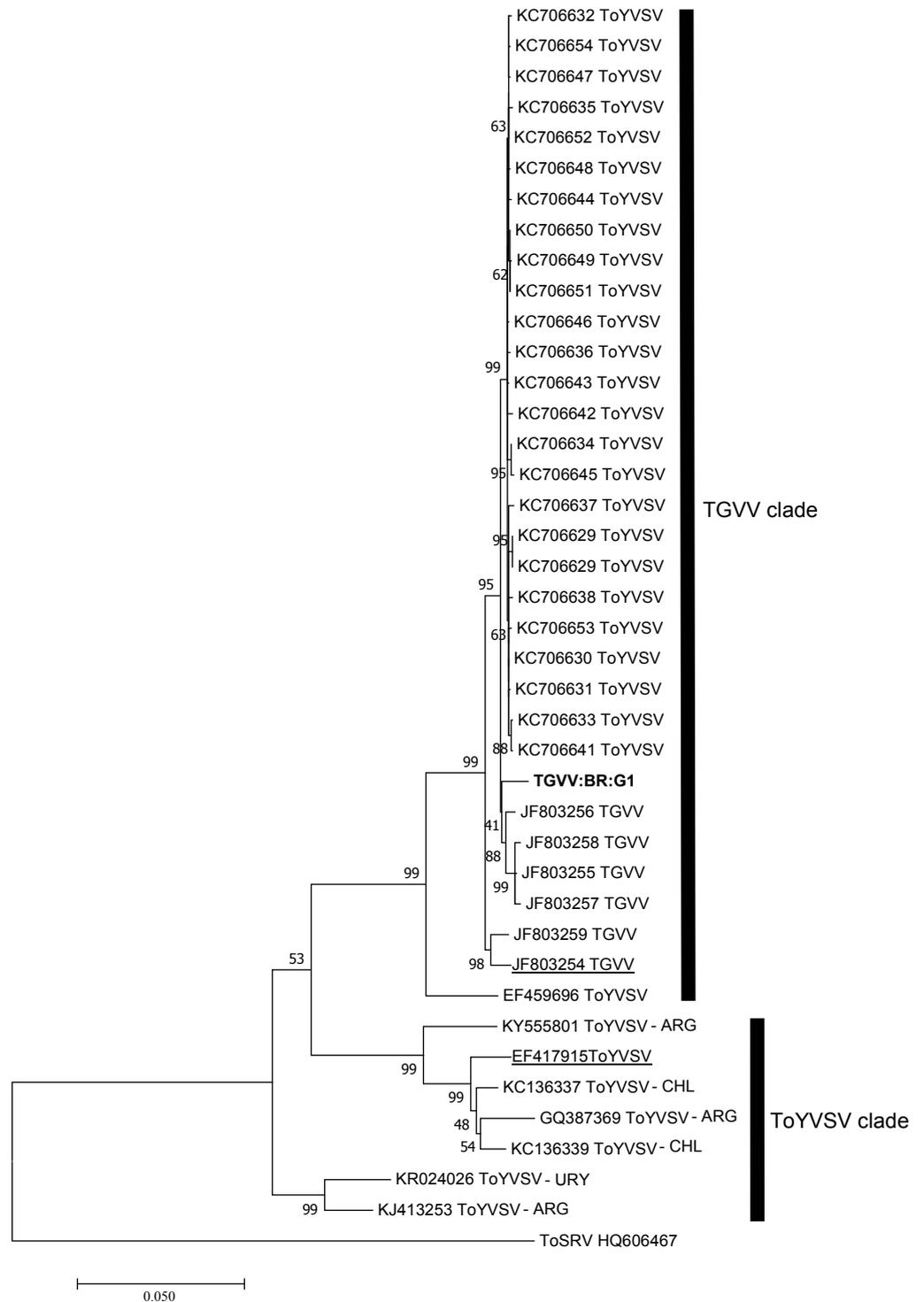
Group	Identification/ Genomic component	Consensus length	Coverage	Reads	BLASTn <sup>1</sup>	E-value	Percentage Identity (%)	Accession	
1	1	SiMMV:BR:G1 DNA-A	2691	100	2 610 718	SiMMV DNA-A	0.0	94.10	JX415187
	2	ToCMoV:BR:G1 DNA-A	2622	100	4 503 800	ToCMoV DNA-A	0.0	94.63	KC706561
	3	ToCMoV:BR:G1 DNA-B	2577	100	1 566 484	ToCMoV DNA-B	0.0	93.54	KC706562
	4	TGVV:BR:G1 DNA-A	2563	100	2 628 102	TGVV DNA-A	0.0	98.75	JF803256
	5	TGVV:BR:G1 DNA-B	2530	100	736 932	TGVV DNA-B	0.0	98.93	JF803256
	6	ToMoLCV:BR:G1	2631	100	2 137 458	ToMoLCV	0.0	98.59	KC706615
	7	ToSRV:BR:G1 DNA-A	2592	100	8 275 251	ToSRV DNA-A	0.0	99.42	JX415196
	8	ToSRV:BR:G1 DNA-B	2572	100	4 349 407	ToSRV DNA-B	0.0	99.49	EF534708
	9	ToALCV:BR:G1	2875	100	32 211	ToALCV	0.0	96.45	MH539677
2	1	SiMMV:BR:G2 DNA-A	2693	100	2 507 684	SiMMV DNA-A	0.0	92.73	JX415194
	2	ToMoLCV:BR:G2	2631	100	3 485 577	ToMoLCV	0.0	97.76	KC706616
	3	ToSRV:BR:G2 DNA-A	2593	100	7 891 080	ToSRV DNA-A	0.0	99.54	JX415196
	4	ToSRV:BR:G2 DNA-B	2572	100	4 838 835	ToSRV DNA-B	0.0	99.14	EF534708
3	1	ToMoLCV:BR:G3	2633	100	6 739 860	ToMoLCV	0.0	98.29	KC706615
	2	ToSRV:BR:G3 DNA-A	2593	100	3 498 480	ToSRV DNA-A	0.0	98.57	JX415196
	3	ToSRV:BR:G3 DNA-B	2570	100	4 739 156	ToSRV DNA-B	0.0	97.71	EF534708
	4	BGMV:BR:G3 DNA-A	2617	100	2 067 809	BGMV	0.0	90.54	KJ939806

<sup>1</sup>Blastn results displayed by acronym and accession with the highest identity.

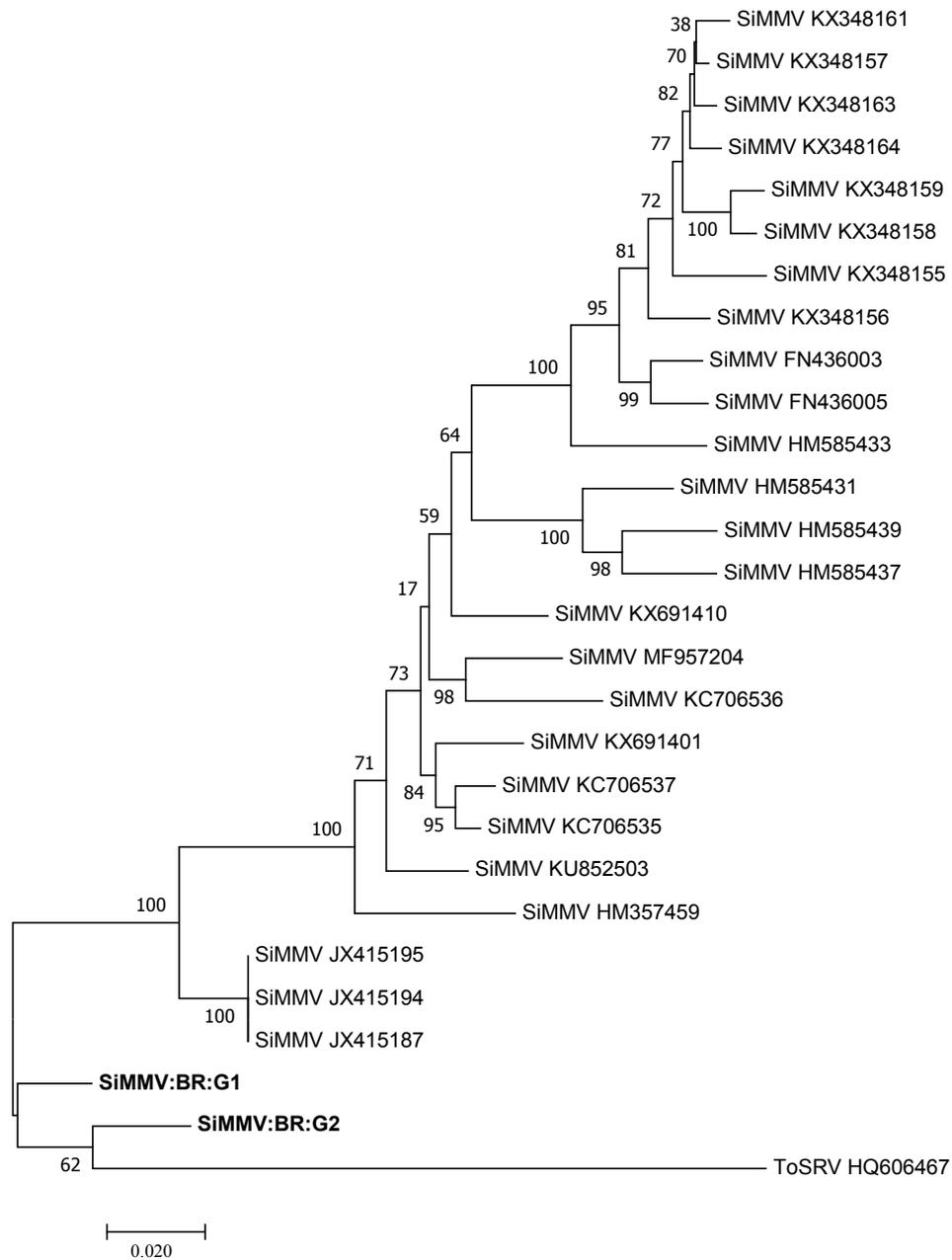
Although not shown in the tables (Tables 3 and 4), many reads mapped to ToYVSV sequences. ToYVSV is closely related to TGVV, but as it shares < 91% sequence identity with ToYVSV it is considered a distinct virus. However, we observed that some ToYVSV nucleotide accessions in the data bank are misclassified and should be classified as TGVV sequences, according to the ICTV species demarcation criteria (Zerbini *et al.*, 2017; Brown *et al.*, 2015). Based on this correction, all ToYVSV-like sequences from the G1 library were grouped as TGVV sequences; thus, all reads mapped to ToYVSV were added to the TGVV sequence. This was further confirmed by a phylogenetic analysis of all TGVV and ToYVSV-like sequences, where the two viruses are phylogenetically separated, and some accessions identified as ToYVSV are grouped within the TGVV clade (Figure 3). The HTS-assembled TGVV:BR:G1 sequence from G1 was accommodated in the TGVV clade. The typical Brazilian ToYVSV isolate (EF417915, reference sequence of ToYVSV; isolated from potato in the south of Brazil) grouped with those described in Argentina (ARG), Chile (CHL), and Uruguay (URY) (Figure 3).

From the G2 group, three viral sequences were assembled (Table 5): SiMMV (DNA-A), ToMoLCV (monopartite), and ToSRV (DNA-A and DNA-B). These three viruses were also detected in G1, suggesting that they are well-adapted to the tomato crop and remained in the evaluated region. The SiMMV sequences from G1 and G2 shared 95.13% nucleotide identity, indicating that they belonged to the same strain (i.e., > 94% nucleotide identity). In contrast, the closest matches for both isolates on NCBI share only 94.10% identity with SiMMV accession JX415187 (from *Sida* sp.) and 92.73% with JX415194 (from *Sida santaremnensis*) with G1 and G2 isolates, respectively, that is, they belong to a different strain in the latter case (Table 5). The HTS-assembled SiMMV sequences from G1 and G2 were separated from the cluster of SiMMV sequences in the phylogenetic tree (Figure 4), indicating that these tomato isolates were under a distinct selection pressure from those

evolving in *Sida*-like plants. Similar to the results for G1, DNA-B of SiMMV was undetected. This suggests that SiMMV DNA-A and ToSRV DNA-B are cognate components if SiMMV needs DNA-B for infection, as the three viruses SiMMV, ToSRV, and the monopartite ToMoLCV were detected in G2 samples.



**Figure 3.** Phylogenetic tree of full DNA-A sequences of TGVV and ToYVSV. The tree was constructed using the Maximum Likelihood method with 3000 bootstrap replicates applying the Tamura-Nei model. The TGVV clade contained all TGVV sequences, including the TGVV: BR: G1 (in bold, this study), and many ToYVSV sequences, but was clearly separated from the ToYVSV clade. The reference sequence of TGVV and ToYVSV is underlined. The viruses were originated from Brazil except when the country is indicated: Argetina (ARG), Chile (CHL), and Uruguay (URY). Bar: substitutions per site. ToSRV was used as outgroup.



**Figure 4.** Phylogenetic tree of full DNA-A sequences SiMMV. The tree was constructed using the Maximum Likelihood method with 3000 bootstrap replicates applying the Tamura-Nei model. Bootstrap values >50% are shown. Sequences determined in this work SiMMV:BR:G1 and SiMMV:BR:G2 (in bold) were not grouped with typical SiMMV sequences. Bar: substitutions per site. ToSRV was used as outgroup.

In G3, three viruses were identified: ToMoLCV, ToSRV (DNA-A and DNA-B), and bean golden mosaic virus (BGMV; DNA-A) (Table 5). The BGMV DNA-B sequence was not found in the HTS reads. This result implies that ToMoLCV and ToSRV are highly competitive viruses and persisted in the area for over 14 years, whereas the other four viruses detected in G1 were not detected in the last samplings (G2 and G3). By comparing the sequences of ToSRV, ToMoLCV, and SiMMV from the three groups, nucleotide identities ranging from 95.13%–99.80% were obtained, indicating genomic alterations. A phylogenetic tree constructed for ToMoLCV sequences tightly grouped the assembled sequences from G1 to G3, suggesting a close relationship among them (data not shown). The same was observed for the ToSRV sequences. Furthermore, a thorough search for begomovirus-related satellites yielded no results for the three HTS datasets.

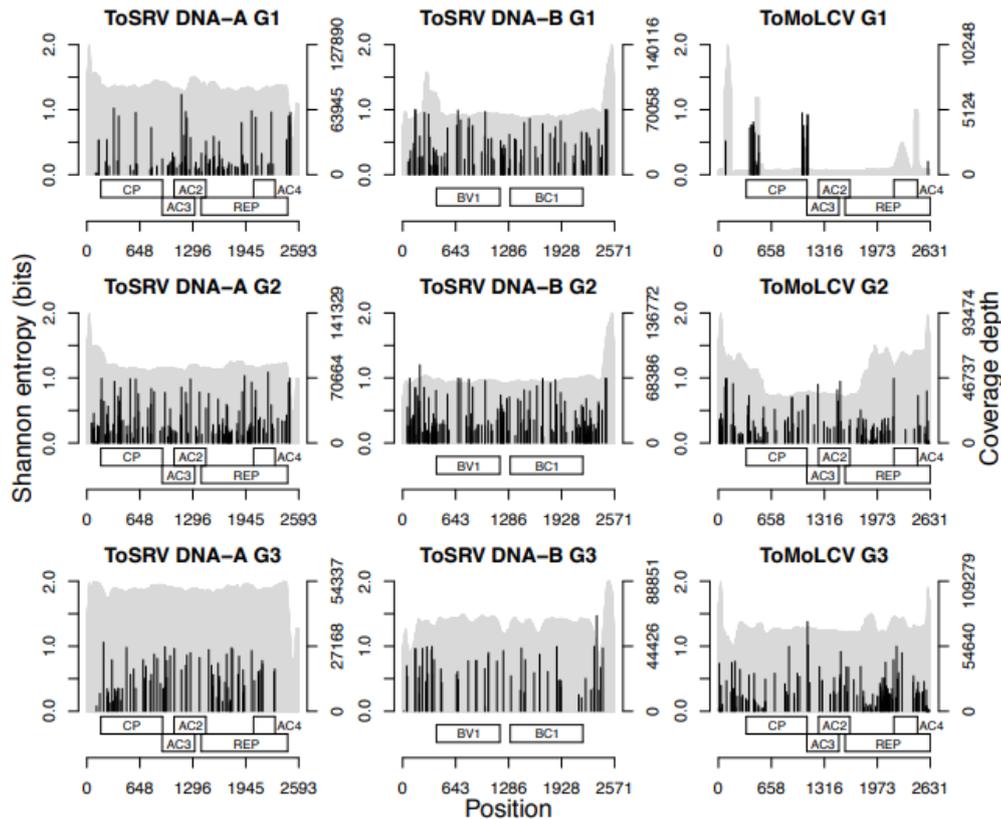
### **3.3. Intraspecies diversity analysis**

Two parameters, unique k-mer count and Shannon entropy of unique k-mers, were used to estimate intraspecies diversity of ToMoLCV and ToSRV and of all begomoviruses for the G1, G2, and G3 datasets (Table 6). Additionally, total Shannon entropy, based on the frequency of each SNP of ToMoLCV and ToSRV, was calculated and the cumulative sum was used to test for a significant increase or decrease in diversity based on the Wilcoxon signed-rank test (Figure 5). The number of unique 27-mers of ToSRV and ToMoLCV compared to that of all begomoviruses suggests that these two species share several 27-mers. The overall diversity of begomoviruses decreased from 2003 to 2016 (G1–G3); conversely, the diversity of ToMoLCV increased from G1 to G3 and that of ToSRV increased from G1 to G2 but decreased from G2 to G3. As expected, the genetic diversity of ToSRV and ToMoLCV varied according to their relative abundance, although the diversity of ToSRV DNA-B alone decreased from G2 to G3 and its relative abundance increased. Based on total Shannon entropy, the diversity of SNPs followed a similar trend (Table 6), although in this

case the diversity of DNA-B of ToSRV at G3 was smaller than that at G1. Importantly, in the latter diversity analysis, indels and epistasis are not accounted for. All Wilcoxon signed-rank tests of the cumulative SNP entropy between two time points were significant ( $P < 1e-16$ ). Although SNPs appear to be concentrated in two regions of the ToMoLCV genome at G1, this result should be looked at with caution. These polymorphisms are located at the beginning or at the end of Open Read Frames (ORFs) and likely represent cross alignment of reads from closely related species.

**Table 6:** Genetic diversity and relative abundance of ToSRV, ToMoLCV and all begomoviruses detected from 2003 to 2016.

Group		Virus	Unique 27-mers	27-mer Shannon entropy	Total SNP Shannon entropy	Total number of reads	Relative abundance
1	1	ToMoLCV	248458	11.24	13.39	428057	0.02
	2	ToSRV	3493062	14.07	72.31	11606934	0.67
	3	ToSRV DNA-A	2099063	13.12	29.77	7718716	0.45
	4	ToSRV DNA-B	1448480	13.24	42.53	3888218	0.22
	5	Begomovirus	6555088	15.20	NA	17136500	1
2	1	ToMoLCV	1240059	13.13	38.77	2584634	0.18
	2	ToSRV	4369323	14.59	112.57	11714792	0.81
	3	ToSRV DNA-A	2446504	13.58	51.52	7531010	0.52
	4	ToSRV DNA-B	2002928	13.91	61.04	4183782	0.29
	5	Begomovirus	5611647	15.02	NA	14349739	1
3	1	ToMoLCV	1762003	13.38	42.84	5833049	0.45
	2	ToSRV	2340172	14.25	73.73	6867494	0.53
	3	ToSRV DNA-A	1159760	13.37	39.67	2943937	0.23
	4	ToSRV DNA-B	1222633	13.29	34.05	3923557	0.30
	5	Begomovirus	4079349	14.84	NA	12771519	1



**Figure 5.** Nucleotide diversity analysis of ToSRV and ToMoLCV showing the coverage depth (grey) and Shannon entropy of the SNPs (black) along with a representation of the genome organization.

### 3.4. Validation of begomovirus sequences identified by HTS using PCR

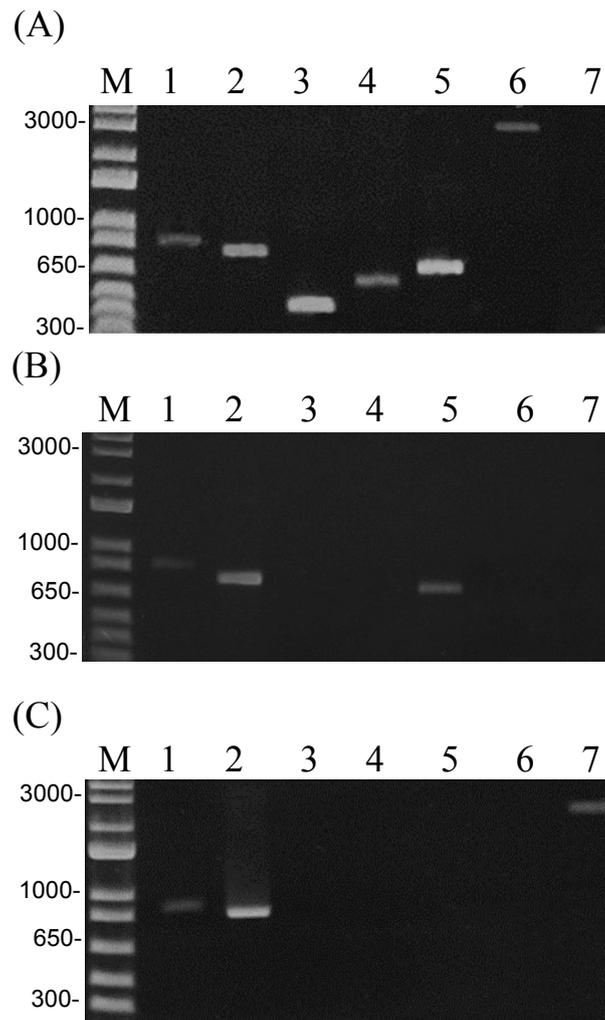
To demonstrate that the begomovirus sequences were not artifacts of the assembly programs, we performed PCR using species-specific primers (Table 1). Based on the assembled, complete sequences, primers were designed to amplify the entire or partial DNA-A of TGVV, BGMV, SiMMV, ToMoLCV, ToSRV, ToCMoV, ToRMV, and ToALCV, producing amplicons of ~0.5 to ~2.9 kbp (Table 1). The presence of all viruses was confirmed by a positive amplification of the expected-size fragments, except for ToRMV and sequencing by the Sanger method followed by Blastn analysis (Figure 6, Table 7). Indeed, SiMMV detection was confirmed in G1 and G2, TGVV in G1, and ToMoLCV and ToSRV in pooled samples of G1, G2, and G3 (Figure 6). Furthermore, PCR-specific to the DNA-B sequence (Table 1) of ToSRV and SiMMV (designed to be universal for SiMMV DNA-B)

confirmed the presence of DNA-B of ToSRV but not of DNA-B of SiMMV in the three groups (data not shown). These results confirmed the begomovirus identification by analyzing the HTS datasets of G1, G2, and G3. Tests for detecting DNA-B of other bipartite species were not performed.

**Table 7.** BLAST analysis of the sequence PCR amplicon obtained by begomovirus species-specific primers to detect DNA-A component in pooled samples.

Group	Begomovirus primers	Sequence size (pb)	BLASTn <sup>1</sup>	Query cover (%)	E- value	Identity (%)
1	1 SiMMV	600	SiMMV (JX415194)	100	0.0	97.50
	2 ToCMoV	440	ToCMoV (KC706561)	100	0.0	98.29
	3 TGVV	400	TGVV (JF803256)	100	0.0	98.75
	4 ToMoLCV	420	ToMoLCV (KC706615)	100	0.0	99.52
	5 ToALCV	700	ToALCV (MG491195)	100	0.0	96.71
	6 ToSRV	420	ToSRV (JF803263)	100	0.0	99.52
2	1 SiMMV	620	SiMMV (KU852503)	100	0.0	97.42
	2 ToMoLCV	600	ToMoLCV (KC706616)	100	0.0	99.33
	3 ToSRV	470	ToSRV (JF803260)	100	0.0	100
3	1 ToMoLCV	520	ToMoLCV (KC706616)	100	0.0	99.23
	2 ToSRV	250	ToSRV (MG837738)	100	3e-123	100
	3 BGMV	650	BGMV (MG334552)	100	0.0	95.85

<sup>1</sup>Blastn results displayed by acronym and accession with the highest identity.

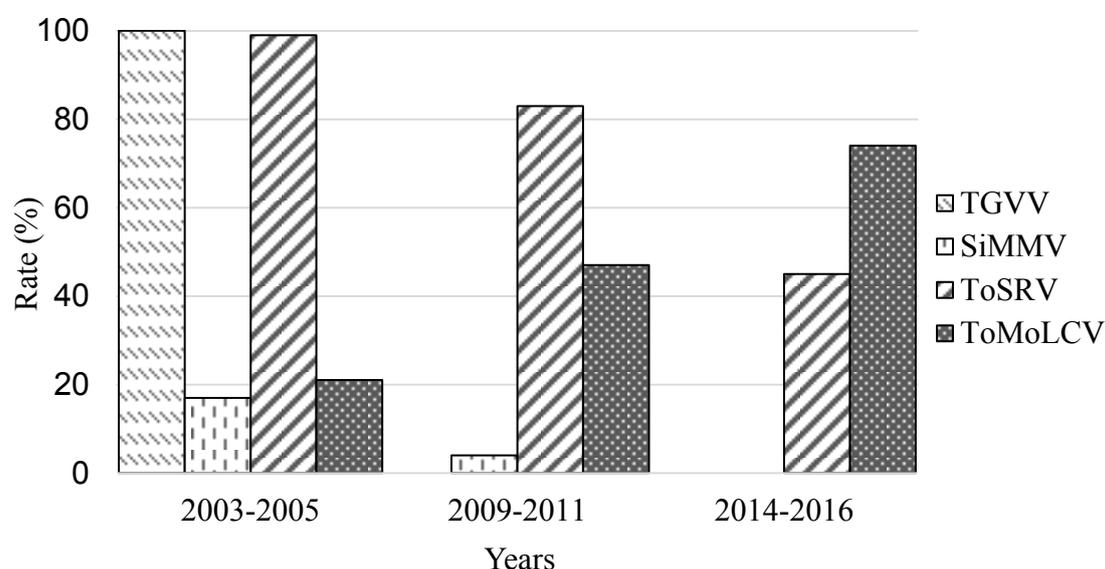


**Figure 6.** Electrophoretic analysis on 1% agarose gel showing specific PCR amplicons from pooled RCA samples of G1 (A), G2 (B) and G3 (C) groups. PCR was performed using specific primers (Table 1) for ToSRV (1), ToMoLCV (2), TGVV (3), ToCMoV (4), SiMMV (5), ToALCV (6), and BGMV (7). M-1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific).

### 3.5. Detection of selected begomoviruses in individual total DNA samples

It became clear that the begomovirus diversity varied through time as did the prevalence of the viruses in each group. Four epidemiologically relevant begomoviruses were recognized: (1) SiMMV, (2) TGVV, (3) ToMoLCV, and (4) ToSRV. Consequently, to understand the frequency of each virus over time in the groups, we performed species-specific PCR to detect each of the four viruses in individual samples (Figure 7). In the G1 samples, a high detection rate of TGVV (100%) and ToSRV (99%) was observed, clearly indicating

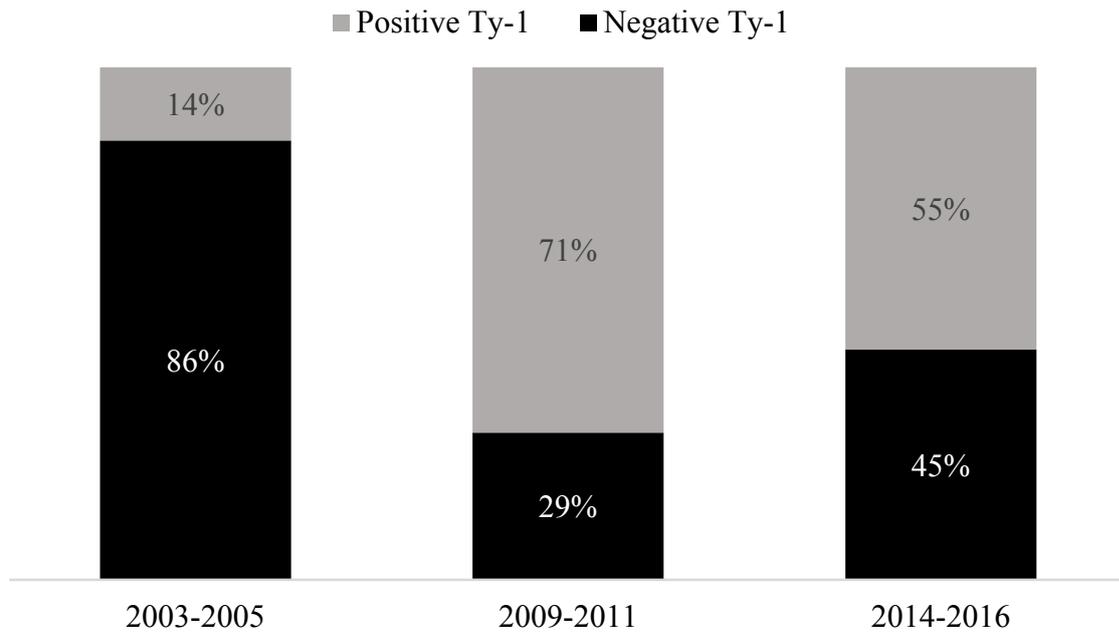
mixed infections. Approximately, 21% plants were infected with ToMoLCV and 17% with SiMMV. In plants from G2 and G3, TGVV was not detected in any sample. SiMMV was detected in 4% samples in G2 and absent in G3. The rate of plants infected with ToSRV decreased from 99% in 2003–2005 to 83% in 2009–2011, and to 45% in 2014–2016. In contrast, ToMoLCV detection rate increased over time, from 21% in 2003–2005 to 47% in 2009–2011, and to 74% in 2014–2016. This result indicates that ToSRV and ToMoLCV are the most predominant viruses in this region.



**Figure 7.** Detection rate of ToSRV, ToMoLCV, TGVV, and SiMMV by PCR in individual total DNA from the G1 (2003–2005), G2 (2009–2011), and G3 (2014–2016) groups.

### 3.6. Detection of the resistance gene *Ty-1* in the samples

The variation in begomovirus species composition and the shift in the predominant virus from samples collected between 2003 and 2016 were striking. Several factors may have contributed to this variation, but an increase in the use of resistant cultivars may have been one of the most important factors. Assuming *Ty-1* to be the major resistance gene in Brazilian commercial hybrids, PCR was performed to detect this gene in individual samples of the three groups (Figure 8).



**Figure 8.** Detection rate of Ty-1 gene in individual total DNA from G1 (2003-2005), G2 (2009-2011) and G3 (2014-2016) sample groups.

*Ty-1* was detected in 14% of G1 samples, suggesting that 86% plants were susceptible to begomovirus infection. In G2 and G3, the rate of *Ty-1* positive samples increased dramatically to 71% and 55%, respectively, indicating its importance as the preferred trait for the growers.

#### 4. DISCUSSION

HTS provides an easy and fast means for sequencing of viruses present in infected plant samples at a large scale (Idris *et al.*, 2014; Rodríguez-Negrete *et al.*, 2019). Although viral DNA could be directly sequenced, we enriched the circular DNA using RCA prior to library preparation for targeting begomoviruses (Idris *et al.*, 2014). Two *de novo* assembling programs, Velvet (Zerbino and Birney, 2008) and MEGAHIT (Li *et al.*, 2015) were used. Although Velvet produced a high number of contigs, they were shorter than those from MEGAHIT, as reported by Jo *et al.* (2017) (Tables 3 and 4). The final list of viruses was the same for both assemblers (Tables 3, 4 and 5), indicating that the results were robust.

Analysis of ToSRV and ToMoLCV reads in the three libraries (Figure 5) showed that the coverage depth along the genome was uniform, with more reads concentrated at the ends, which is due to the common region shared by DNA-A and DNA-B of ToSRV. This suggests that the amplification steps introduced by RCA and HTS were not biased and the entire genome was evenly covered. Exceptions were observed for ToMoLCV reads in G1 and G2, possibly correlating with highly conserved genomic regions among begomoviral species, and thus sharing many identical or near identical reads. We do not discard the possibility that an amplification bias was produced during the RCA step that could have introduced some artifacts.

We observed dramatic population changes in begomoviruses that infect tomatoes in the Federal District, Brazil, from 2003 to 2016. This study focused on samplings done within ~14 years, collected in an area of approximately 70 Km<sup>2</sup>. This region is an important tomato-growing area of the Brasilia greenbelt, where tomato is intensively planted throughout the year. In the G1 sample set (2003–2005), containing isolates collected approximately ten years after the introduction of *B. tabaci* MEAM1 and after the first report of begomovirus in tomatoes in this region (Ribeiro *et al.*, 1994), we detected six species (including one capula-

like virus). A sharp decrease in species richness was observed between 2007–2016, with only three species detected in each group. The high rate of mixed infection in G1 suggests that the incidence of begomovirus was high in the area and the plants were susceptible to begomovirus infection. Thereafter, a decrease in the number of begomovirus species and intraspecies diversity was observed (Table 6). Although no decrease in diversity was observed for tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in China (5-year survey; Yang *et al.*, 2014) or tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV) in Spain (8-year survey; Sánchez-Campos *et al.*, 2002). Font *et al.* (2007) reported that the number of haplotypes of TYLCV and TYLCSV reduced with the prevalence of one haplotype with low genetic diversity in four years. Furthermore, in a study on begomovirus diversity, focused on PepGMV and PHYVV, on chiltepin in Mexico, Rodelo-Urrego *et al.* (2013) reported a reduction in coat protein sequence diversity within a 4-year (2007–2010) sampling period and attributed it to the level of landscape heterogeneity and not the effect on virus-host co-evolution. We speculate that after the invasion of MEAM1, which colonized myriad plants (crops and wild and weed hosts) in the early 90s, the vectors transferred indigenous begomovirus populations from these plants to tomatoes (Castillho-Urquiza *et al.*, 2008; García-Arenal and Zerbini, 2019), thereby resulting in an explosion of begomoviruses in the highly permissive tomato plants. Later, intense anthropic actions, such as cultivation on a commercial-scale, host uniformity, and lower crop diversity, contributed to a high degree of viral competition, and thus the selection of the most fit, and on the decrease in the diversity of these begomoviruses, as also proposed by Pang *et al.* (2012) and Rodelo-Urrego *et al.* (2013).

In this survey, six viruses, including the newly reported capula-like virus ToALCV with ~32000 reads, were identified by HTS. ToALCV is a monopartite virus, and was recently described in Argentina (Vaghi Medina *et al.*, 2018) and in the Federal District of Brazil (Batista *et al.*, 2019). Thus, despite being recently described, the virus had been present

in samples collected between 2003 and 2005. Remarkably, satellite-like molecules were not detected in our libraries, although alpha satellites have been reported in Brazil in association with begomoviruses (Paprotka *et al.*, 2010, Mar *et al.*, 2017).

Notably, the DNA-A sequence of SiMMV was detected only in the G1 and G2 libraries, although at a low rate (Figure 7). SiMMV is usually associated with *Sida* spp., an important malvaceous weed, and is an example of a virus that transferred from weeds to cultivated plants (Barreto *et al.*, 2013) and evolved in tomatoes separately from typical SiMMV isolates found in malvaceous plants (Figure 4). However, SiMMV DNA-B could not be detected by either HTS or PCR. As SiMMV DNA-A was found in G2 with ToSRV, it is possible that they share DNA-B. These two viruses are closely related and their DNA-A sequences share ~87% nucleotide identity. Common regions of DNA-A and DNA-B sequences of ToSRV (ToSRV:BR:G2) and DNA-A of SiMMV (SiMMV:BR:G2) were similar, with identical core-iterated sequences (data not shown). Thus, ToSRV DNA-B may act as the cognate segment of SiMMV DNA-A. Infectious clones prepared from a bipartite isolate of SiMMV, ToSRV, and G1 and G2 SiMMV DNA-A, tested in all possible combinations by inoculation in plants would clarify this relationship, and this study is underway. Analogous relationships were predicted for ToSRV and ToRMV because they were supposed to share DNA-B (Silva *et al.*, 2014). ToRMV-specific DNA-B was not found and their DNA-A sequences shared > 88% identity. Furthermore, a BGMV isolate is expected to be a bipartite virus, but attempts to detect the DNA-B of a BGMV-like virus failed (data not shown). It means that it may also share the DNA-B of ToSRV or it behaves as a monopartite virus. Another hypothesis is that when SiMMV or BGMV DNA-A coinfect a plant with a monopartite begomovirus, the viral derived proteins of the monopartite virus complement the DNA-A of SiMMV or BGMV. However, this needs to be further tested.

Due to the epidemic of begomovirus disease in the major tomato-growing regions soon after the outbreak of MEAM1, (moderately) resistant cultivars became available and were largely used in the G2 group (Figure 8). Other resistance genes may be present in Brazilian cultivars but only the most prevalent gene, *Ty-1* (Pereira-Carvalho *et al.*, 2015), was tested. We demonstrated that *Ty-1* was present in 55%–71% plants collected at later time points (Figure 8). This produced a bottleneck effect during 2006–2008 and resulted in SiMMV, ToMoLCV and ToSRV to be filtered and survive the selection pressure. Even though the use of resistant cultivars is an effective strategy for disease control, it depends on the preference of growers. In many cases, susceptible cultivars have desired traits such as higher yield, resistance to other pathogens, and bigger fruit size and fruit quality (Boiteux *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2010).

We estimated the rate of plants infected with the four prevalent viruses—ToSRV, ToMoLCV, TGVV, and SiMMV by DNA-A-specific PCR. Only ToSRV and ToMoLCV were detected in all three groups (G1, G2, and G3). Although the number of plants infected with ToSRV decreased over time, the rate of ToMoLCV infection increased, probably to outcompete ToSRV (Figure 7). Whether ToMoLCV performs better during infection than ToSRV in resistant cultivars or if it is transmitted more efficiently by the MEAM1 population present in the area remains to be elucidated. The rate of mixed infection decreased over time, from 100% to almost 0%, after 13 years. The rate of mixed infection of two begomoviruses, pepper golden mosaic virus and pepper huasteco yellow vein virus, also decreased from one year to another in cultivated chiltepin fields, which can be attributed to a decrease in host heterogeneity and an increase in host density (Pagan *et al.*, 2012; Rodelo-Urrego *et al.*, 2013). It suggests that after their establishment in a specific crop, under a certain vector population in an intensively cultivated area, the co-existence of two begomoviruses in the same plant is not a common phenomenon. In fact, some regions may have reached this stage with the

predominance of ToSRV in the major tomato-growing areas of the country (States of Goiás, São Paulo, and Minas Gerais, Mituti *et al.*, 2019), ToMoLCV in the North-East region (Fernandes *et al.*, 2008; Inoue-Nagata *et al.*, 2018; Rojas *et al.*, 2018), and tomato common mosaic virus (ToCmMV) in the states of Espírito Santo and Rio de Janeiro (Barbosa *et al.*, 2016).

Interestingly, in the G1 library, ToSRV-specific 27-mer reads corresponded to a relative abundance of 0.67, implying that this virus was more prevalent than the others (Table 6). The increase in relative abundance to 0.81 in the G2 library confirms that it is most fit in this environment. However, this rate decreased in the G3 library, whereas that for ToMoLCV showed a substantial increase, similar to the tendency seen in G1–G2 (Table 6). Taken together, this result and the detection of these viruses in most individual samples (Figure 7) demonstrate that ToSRV and ToMoLCV were the most successful tomato plant viruses in the area. Obviously, this result must be carefully analyzed since an amplification step by RCA was added prior to HTS, which may influence population profiles in the samples. Notably, the number of tomato samples was similar in all three groups and RCA was performed from individual samples before pooling them to reduce the bias introduced by the amplification step. In the field of virus genome analysis, Shannon entropy (Table 6) measures diversity, based on haplotype frequencies (Gregori *et al.*, 2016), and demonstrates the abundance of unique sequences. An increase in Shannon entropy index was observed in ToMoLCV (G1 to G3), but the decrease in ToSRV (G2 to G3) confirmed that ToMoLCV became more diverse (and more frequent) much more gradually than ToSRV isolates.

ToSRV and ToMoLCV are considered successful begomoviruses in this production system. Future studies may reveal that only one ToMoLCV predominates, based on the tendency. This scenario may change dramatically as new resistant genes are being used for introgression into commercial tomato hybrids. During the surveyed period, only *B. tabaci*

MEAM1 was detected in the area (data not shown). The first report of *B. tabaci* Mediterranean (Med) in Brazil occurred in 2015 (Barbosa *et al.*, 2015). To date, it has not been reported in the central region, although it is rapidly spreading in the country (Moraes *et al.*, 2018). We speculate that the introduction of Med whiteflies can change the incidence, prevalence, and diversity of begomovirus in our crops in the coming years.

## 5. CONCLUSIONS

- The RCA/RFLP technique was efficient to preliminarily assess the decrease in species diversity over time;
- The high number of reads demonstrates the successful amplification of begomoviral components by RCA prior to high-throughput sequencing;
- The MEGAHIT program showed high efficiency for assembling the contigs;
- PCR with specific primers was useful to confirm the presence of all begomoviruses detected by HTS;
- The diversity of begomovirus species has decreased over time associated with the increased use of resistant cultivars;
- The begomoviruses ToSRV and ToMoLCV were predominant;
- TGVV is not currently detected in the study area;
- The genetic diversity of ToSRV varied over the years, ultimately was reduced proportionally to the amount of its reads. In contrast, the genetic diversity of ToMoLCV increased along the time period.
- ToMoLCV tends to outcompete ToSRV.

## 6. REFERENCES

- AGUILERA, J.G.; HURTADO, F.D.; XAVIER, C.A.D.; LAURINDO, B.S.; NICK, C., GIL; M.Á. & ZERBINI, F.M. 2011. Identificação dos genes Ty-2 e Ty-3 de resistência a begomovírus em genótipos de tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46: 772-775.
- ALBUQUERQUE, L.C.; VARSANI, A.; FERNANDES, F.R.; PINHEIRO, B.; MARTIN, D.P.; FERREIRA, P.D.T.O. & INOUE-NAGATA, A.K. 2012. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 157: 747-752.
- ANBINDER, I.; REUVENI, M.; AZARI, R.; PARAN, I.; NAHON, S.; SHLOMO, H. & LEVIN, I. 2009. Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 519-530.
- BAI, Y.; YAN, Z.; PÉREZ-DE-CASTRO, A.; DÍEZ, M.J.; HUTTON, S.F.; VISSER, R.G.F. & LI, J. 2018. Resistance to tomato yellow leaf curl virus in tomato germplasm. *Frontiers in Plant Science* 9: 1198.
- BARBOSA, J.C.; ALBUQUERQUE, L.C.; REZENDE, J.A.; INOUE-NAGATA, A.K.; BERGAMIN FILHO, A. & COSTA, H. 2016. Occurrence and molecular characterization of Tomato common mosaic virus (ToCmMV) in tomato fields in Espírito Santo state, Brazil. *Tropical Plant Pathology* 41: 62-66.
- BARBOSA, L.D.F.; YUKI, V.A.; MARUBAYASHI, J.M.; DE MARCHI, B.R.; PERINI, F.L.; PAVAN, M.A. & AKRAUSE-SAKATE, R. 2015. First report of *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. *Pest Management Science* 71: 501-504.
- BARRETO, S.S.; HALLWASS, M.; AQUINO, O.M. & INOUE-NAGATA, A.K. 2013. A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato-infecting begomovirus in central Brazil. *Phytopathology* 103: 436-444.
- BATISTA, J.G.; MELO, F.L.; PEREIRA-CARVALHO, R.C.; ALVES-FREITAS, D.M.T. & RIBEIRO, S.G. 2019. First report of tomato apical leaf curl virus infecting tomato in Brazil. *Plant Disease* 103: 1443.
- BELABESS, Z.; PETERSCHMITT, M.; GRANIER, M.; TAHIRI, A.; BLENZAR, A. & URBINO, C. 2016. The non-canonical tomato yellow leaf curl virus recombinant that displaced its parental viruses in southern Morocco exhibits a high selective advantage in experimental conditions. *Journal of General Virology* 97: 3433-3445.

- BOITEUX, L.S.; OLIVEIRA, V.R.; SILVA, C.H.; MAKISHIMA, N.; INOUE-NAGATA, A.K., FONSECA, M.E.D.N. & GIORDANO, L.D.B. 2007. Reaction of tomato hybrids carrying the *Ty-1* locus to Brazilian bipartite Begomovirus species. *Horticultura Brasileira* 25: 20-23.
- BOLGER, A.M.; LOHSE, M. & USADEL, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114–2120.
- BROWN, J.; ZERBINI, F.M.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; RAMOS-SOBRINHO, R.; SILVA, J.; FIALLO-OLIVE, E.; BRIDDON, R.; HERNANDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.; MALATHI, V.G.; MARTIN, D.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; UEDA, S.; & VARSANI, A. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch Virol* 160: 1593-1619.
- BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; ZERBINI, M.; MORIONES, E. & NAVAS- CASTILLO, J. 2012. “Geminiviridae,” in *Virus Taxonomy-Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, ed. A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens & E.J. Lefkowitz (San Diego, CA: Elsevier Academic Press), 351–373.
- BUTTERBACH, P.; VERLAAN, M.G.; DULLEMANS, A.; LOHUIS, D.; VISSER, R.G.; BAI, Y. & KORMELINK, R. 2014. Tomato yellow leaf curl virus resistance by *Ty-1* involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by cucumber mosaic virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 12942-12947.
- CASTILLO-URQUIZA, G.P.; BESERRA, J.E.A.; BRUCKNER, F.P.; LIMA, A.T.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P. & ZERBINI, F.M. 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology* 153: 1985-1989.
- COSTA, A.S. 1976. Whitefly-transmitted plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*. 14: 429-449.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:39-40.
- DUFFY, S.; SHACKELTON, L.A. & HOLMES, E.C. 2008. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics* 9: 267-276.
- FARIA, J.C.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; SLACK, S.A. & MAXWELL, D.P. 1997. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease* 81: 423.

- FAUQUET, C.M.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P.; STENGER, D.C. & STANLEY, J. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology* 148: 405-421.
- FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUE, L.C. & INOUE-NAGATA, A.K. 2010. Development of a species-specific detection method for three Brazilian tomato begomoviruses. *Tropical Plant Pathology* 35: 43-47.
- FERNANDES, F.R.; DE ALBUQUERQUE, L.C.; DE BRITTO GIORDANO, L.; BOITEUX, L.S.; DE AVILA, A.C. & INOUE-NAGATA, A.K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36: 251-258.
- FERNANDES, J.J.; CARVALHO, M.G.; ANDRADE, E.C.; BROMMONSCHENKEL S.H. FONTES, E.P.B. & ZERBINI F.M. 2006. Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology* 55: 513-522.
- FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K. & KRAMER, M. 1960. Observações de "clorose infecciosa" das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico* 26: 65-69.
- GARCÍA-ANDRÉS, S.; TOMÁS, D.M.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. 2009. Resistance-driven selection of begomoviruses associated with the tomato yellow leaf curl disease. *Virus Research* 146: 66-72.
- GARCÍA-ARENAL, F. & ZERBINI, F.M. 2019. Life on the edge: geminiviruses at the interface between crops and wild plant hosts. *Annual Review of Virology* 6: 411-433.
- GILL, U.; SCOTT, J.W.; SHEKASTEBAND, R.; OGUNDIWIN, E.; SCHUIT, C.; FRANCIS, D.M. & HUTTON, S.F. 2019. *Ty-6*, a major begomovirus resistance gene on chromosome 10, is effective against Tomato yellow leaf curl virus and Tomato mottle virus. *Theoretical and Applied Genetics* 132: 1543-1554.
- GREGORI, J.; PERALES, C.; RODRIGUES-FRIAS, F.; ESTEBAN, J.I.; QUER, J. & DOMINGO, E. 2016. Viral quasispecies complexity measures. *Virology* 493: 227-237.
- HURTADO, F.D.; GIL, M.A.; ZUBIAUR, Y.M.; AGUILERA, J.G.; XAVIER, C.A.D.; ZERBINI JUNIOR, F.M. & DA SILVA, D.J.H. 2012. Sources of resistance in tomato to bipartite begomoviruses Tomato yellow spot virus and Tomato severe rugose virus. *Horticultura Brasileira* 30, 639-644.

- HUTTON, S.F.; SCOTT, J.W. & SCHUSTER, D.J. 2012. 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* 47: 324-327.
- IDRIS, A.; AL-SALEH, M.; PIATEK, M.J.; AL-SHAHWAN, I.; ALI, S. & BROWN, J.K. 2014. Viral metagenomics: Analysis of begomoviruses by illumina high-throughput sequencing. *Viruses* 6: 1219-1236.
- INOUE-NAGATA, A.K.; LIMA, M.F. & GILBERTSON, R.L. 2016. A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Horticultura Brasileira* 34: 8-18.
- JI, Y.; SCOTT, J.W.; SCHUSTER, D.J. & MAXWELL, D.P. 2009. 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 Horticultural Science* 134: 281-288.
- JO, Y.; CHOI, H.; KIM, S.M.; KIM, S.L.; LEE, B.C. & CHO, W.K. 2017. The pepper virome: natural co-infection of diverse viruses and their quasispecies. *BMC Genomics* 18: 453.
- KUMAR, S.; STECHER, G. & TAMURA, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874.
- LAPIDOT, M. & FRIEDMANN, M. 2002. Breeding for resistance to whitefly transmitted geminiviruses. *Annals of Applied Biology* 140: 109-127.
- LI, D.; LIU, C.M.; LUO, R.; SADAKANE, K. & LAM, T.W. 2015, MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31: 1674-1676.
- LI, H. 2013. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv.org [Preprint]. Available at: <https://arxiv.org/abs/1303.3997> (Accessed April 23, 2020).
- LI, H.; HANDSAKER, B.; WYSOKER, A.; FENNELL, T.; RUAN, J.; HOMER, N.; MARTH, G.; ABECASIS, G. & DURBIN, R. 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078-2079.
- LIMA, A.; SILVA, J.C.; SILVA, F.N.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; SILVA, F.F.; SEAH, Y.M. & ZERBINI, F.M. 2017. The diversification of begomovirus populations is predominantly driven by mutational dynamics. *Virus Evolution* 3.

- MAHATMA, L.; MAHATMA, M.K.; PANDYA, J.R.; SOLANKI, R.K.; SOLANKI, V.A. 2016. Epidemiology of begomoviruses: a global perspective. Springer, Singapore: 171-188.
- MAR, T.B.; MENDES, I.R.; LAU, D.; FIALLO-OLIVÉ, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; ALVES, M.S. & ZERBINI, F.M. 2017. Interaction between the New World begomovirus Euphorbia yellow mosaic virus and its associated alphasatellite: effects on infection and transmission by the whitefly *Bemisia tabaci*. Journal of General Virology 98: 1552-1562.
- MARÇAIS, G. & KINGSFORD, C. 2011. A fast, lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of k-mers. Bioinformatics 27: 764-770.
- MATYIS, J.C.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R. & COSTA, A.S. 1975. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. Summa Phytopathologica 1: 267-275.
- MITUTI, T.; MOURA, M.F.; MACEDO, M.A.; SILVA, T.N.; PINTO, L.R.; COSTA, H. & REZENDE, J.A. 2019. Survey of begomoviruses and the crinivirus, tomato chlorosis virus, in solanaceous in Southeast/Midwest of Brazil. Tropical Plant Pathology 44: 468-472.
- MUHIRE, B.M.; VARSANI, A. & MARTIN, D.P. 2014. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. PloS One 9.
- PAG, I.; GONZALEZ-JARA, P.; MORENO-LETELIER, A.; RODELO-URREGO, M.; FRAILE, A.; PIÑERO, D. & GARCÍA-ARENAL, F. 2012. Effect of biodiversity changes in disease risk: exploring disease emergence in a plant-virus system. PLoS Pathogens 8.
- PAPROTKA, T.; METZLER, V. & JESKE, H. 2010. The first DNA 1-like alpha satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. Virology 404: 148-157.
- PRASANNA, H.C.; SINHA, D.P.; RAI, G.K.; KRISHNA, R.; KASHYAP, S.P.; SINGH, N. K. & MALATHI, V.G. 2015. Pyramiding *Ty2* and *Ty3* genes for resistance to monopartite and bipartite tomato leaf curl viruses of India. Plant Pathology 64: 256-264.
- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVICIUS, L.P.; AVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J. & ZERBINI, F.M. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. Archives of Virology 148: 281-295.

- RIBEIRO, S.G.; MELO, L.V.; BOITEUX, L.S.; KITAJIMA, E.W. & FARIA, J.C. 1994. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 19: 330.
- ROCHA, C.S.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; LIMA, A.T.; SILVA, F.N.; XAVIER, C.A.; HORA-JÚNIOR, B.T. & ALFENAS-ZERBINI, P. 2013. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. *Journal of Virology* 87: 5784-5799.
- RODELO- URREGO, M.; PAGÁN, I.; GONZÁLEZ- JARA, P.; BETANCOURT, M.; MORENO- LETELIER, A.; AYLLÓN, M. A. & GARCÍA- ARENAL, F. 2013. Landscape heterogeneity shapes host- parasite interactions and results in apparent plant–virus codivergence. *Molecular Ecology* 22: 2325-2340.
- RODRÍGUEZ-NEGRETE, E.A.; MORALES-AGUILAR, J.J.; DOMÍNGUEZ-DURAN, G.; TORRES-DEVORA, G.; CAMACHO-BELTRÁN, E.; LEYVA-LÓPEZ, N.E. & MÉNDEZ-LOZANO, J. 2019. High-Throughput Sequencing reveals differential begomovirus species diversity in non-cultivated plants in northern-pacific Mexico. *Viruses* 11: 594.
- ROJAS, M.R., GILBERTSON, R.L., RUSSEL, D.R., MAXWELL, D.P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77, 340-347.
- ROJAS, M.R.; MACEDO, M.A.; MALIANO, M.R.; SOTO-AGUILAR, M.; SOUZA, J.O.; BRIDDON, R.W.; KENYON, L.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; ZERBINI, F.M.; ADKINS, S.; LEGG, J.O.; KVARNHEDEN. A.; WINTERMANTEL, W.M.; SUDARSHANA, M.R.; PETERSCHMITT, M.; LAPIDOT. M.; MARTIN, D.P.; MORIONES, E.; INOUE-NAGATA, A.K. & GILBERTSON, R.L. 2018. World Management of Geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* 56: 637-677.
- RUBIO, F.; GARCÍA-MARTÍNEZ, S.; ALONSO, A.; GRAU, A.; VALERO, M. & RUIZ, J.J. 2010. Introgressing resistance genes into traditional tomato cultivars: effects on yield and quality. *Acta Horticulturae* 935: 29-33.
- SHANNON, C.E. 1948. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* 27: 379-423.
- SILVA, F.N.; LIMA, A.T.; ROCHA, C.S.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; ALVES-JÚNIOR, M. & ZERBINI, F.M. 2014. Recombination and pseudorecombination driving the evolution of the begomoviruses Tomato severe rugose virus (ToSRV) and Tomato

- rugose mosaic virus (ToRMV): two recombinant DNA-A components sharing the same DNA-B. *Virology Journal* 11: 66.
- TAMURA, K. & NEI, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512–526.
- VAGHI MEDINA, C.G.; TEPPA, E.; BORNANCINI, V.A.; FLORES, C.R.; MARINO-BUSLJE, C. & LÓPEZ LAMBERTINI, P.M. 2018. Tomato apical leaf curl virus: a novel, monopartite geminivirus detected in tomatoes in Argentina. *Frontiers in Microbiology* 8: 2665.
- VERLAAN, M.G.; HUTTON, S.F.; IBRAHEM, R.M.; KORMELINK, R.; VISSER, R.G.; SCOTT, J.W. & BAI, Y. 2013. The tomato yellow leaf curl virus resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. *PLoS Genetics* 9.
- VU, S.; MELGAREJO, T.A.; CHEN, L.; SOUZA, J.O.; MACEDO, M.A.; INOUE-NAGATA, A.K. & GILBERTSON, R.L. 2015. Evidence that tomato mottle leaf curl virus from Northeastern Brazil is an indigenous New World monopartite begomovirus. *Phytopathology* 105: 143.
- WILM, A.; AW, P.P.K.; BERTRAND, D.; YEO, G.H.T.; ONG, S.H.; WONG, C.H.; KHOR, C.C.; PETRIC, R.; HIBBERD, M.L. & NAGARAJAN, N. 2012. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic acids research* 40: 11189-11201.
- ZAMIR, D.; EKSTEIN-MICHELSON, I.; ZAKAY, Y.; NAVOT, N.; ZEIDAN, M.; SARFATTI, & KEDAR., N. 1994. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-1*. *Theoretical and Applied Genetics*. 88: 141-146.
- ZERBINI, F.M.; BRIDDON, R.W.; IDRIS, A.; MARTIN, D.P.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. & CONSORTIUM, I.R. 2017. ICTV virus taxonomy profile: Geminiviridae. *The Journal of General Virology*. 98: 131.
- ZERBINO, D.R. & BIRNEY, E. 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research* 18: 821-829.

## **CAPÍTULO 3**

---

---

**ANÁLISE DA PROGRESSÃO DO ACÚMULO DO DNA VIRAL EM TOMATEIROS  
COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA INFECTADOS COM TRÊS  
BEGOMOVÍRUS EM INFECÇÕES SIMPLES E MISTAS**

### **Capítulo 3: ANÁLISE DA PROGRESSÃO DO ACÚMULO DO DNA VIRAL EM TOMATEIROS COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA INFECTADOS COM TRÊS BEGOMOVÍRUS EM INFECÇÕES SIMPLES E MISTAS**

#### **RESUMO**

O grupo dos begomovírus atualmente é o maior e mais importante grupo de vírus responsáveis por perdas econômicas na cultura do tomateiro. Como forma de manejo, atualmente a principal medida para controlar os begomovírus é a utilização de cultivares moderadamente resistentes. No Brasil, observa-se a alta diversidade de espécies de begomovírus demonstrada pelo número crescente de relatos de novos vírus ao longo dos anos. Atualmente, os begomovírus tomato severe rugose virus (ToSRV) e tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV) predominam no país. Os resultados obtidos no capítulo 2 desta tese corroboram essa informação. Nesse mesmo capítulo, observou-se que o begomovírus tomato golden vein virus (TGVV) predominantemente encontrado em amostras coletadas entre 2003 e 2005, atualmente não é mais detectado. A partir desses resultados, levantou-se que hipótese de que a predominância dos begomovírus ToSRV e ToMoLCV e o desaparecimento de TGVV está relacionado à capacidade replicativa desses begomovírus associada a mudanças ocorridas no sistema de plantio, por exemplo a troca de cultivares suscetíveis para resistentes a begomovirus. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar, ao longo do tempo de infecção, a aptidão replicativa de clones infecciosos dos begomovírus ToSRV, ToMoLCV e TGVV por meio da análise da progressão do acúmulo do DNA viral em tomateiro suscetíveis e resistente. Foram estabelecidos tratamentos com infecção simples de cada vírus, infecção mista com inoculação simultânea e não simultânea. Com base nos resultados obtidos com os tratamentos em inoculação simultânea, foi demonstrado a capacidade replicativa semelhante entre os begomovírus ToSRV e ToMoLCV em cultivares suscetíveis e maior capacidade replicativa de ToMoLCV em relação a ToSRV na cultivar resistente. Além disso, determinou-se baixa capacidade replicativa de TGVV em relação aos dois begomovírus

independentemente da cultivar. Paralelamente, foi avaliado o efeito das infecções simples e mistas na sintomatologia. Os sintomas causados por ToMoLCV em tomateiros suscetíveis apresentaram os maiores índices de severidade da doença, seguido por ToSRV e TGVV. Além disso, observou-se sinergismo em plantas dos tratamentos com infecção mista, com exceção de plantas inoculadas simultaneamente com ToSRV e TGVV. Finalmente, verificou-se que em cultivares suscetíveis, a frequência de infecção mista é maior que na cultivar resistente avaliada. Os resultados aqui obtidos são essenciais para a compreensão das diferenças na capacidade replicativa dos begomovírus, com implicações para o gerenciamento de doenças no futuro.

**Palavras-chaves:** aptidão replicativa, clones infecciosos, cultivar resistente, cultivar suscetível

## **ABSTRACT**

The begomovirus group is currently the largest and most important group of viruses responsible for causing huge economic losses in the tomato crop. The use of resistant cultivars is currently the main measure to control the begomovirus disease. The high diversity of begomovirus species in Brazil is demonstrated by the growing number of new viruses over the years. Currently, the begomovirus tomato severe rugose virus (ToSRV) and tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV) predominate in the country. The results obtained in chapter 2 of this thesis corroborate this information. In this chapter, it was observed that the tomato golden vein virus (TGVV), begomovirus predominantly found in samples collected between 2003 and 2005, is currently undetected. From these results, we hypothesized that the predominance of ToSRV and ToMoLCV, and the disappearance of TGVV might be associated to the replicative capacity of these begomoviruses associated with changes in the cropping system, for example, the exchange of susceptible cultivars for begomovirus resistant ones. Therefore, the aim of this study was to evaluate, over the time of infection, the replicative ability of infectious clones of the begomoviruses ToSRV, ToMoLCV and TGVV by analyzing the progress of viral DNA accumulation in susceptible and resistant tomato plants. Treatments were established with single infection of each virus, and mixed infection with simultaneous and non-simultaneous inoculation. Based on the results obtained after simultaneous inoculations, it is suggested that ToSRV and ToMoLCV express a similar replicative capacity in susceptible cultivars, and also a greater replicative capacity of ToMoLCV in relation to ToSRV in the resistant cultivar. In addition, a low replicative capacity of TGVV was observed when compared to the two begomoviruses in both susceptible and resistance cultivars. Furthermore, the effect of single and mixed infections on symptoms was evaluated. ToMoLCV caused the most severe symptoms in susceptible tomatoes, followed by ToSRV and TGVV. In addition, synergism was observed in plants from treatments with mixed

infection, with the exception of plants inoculated simultaneously with ToSRV and TGVV. Finally, we found that in susceptible cultivars, the frequency of mixed infection is higher than in the resistant cultivar. The results obtained here are essential for understanding differences in the replicative capacity of begomoviruses, with implications for future disease management.

**Key words:** infectious clones, replicative fitness, resistant cultivar, susceptible cultivar

## 1. INTRODUÇÃO

O complexo de espécies do gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) associados ao tomateiro no Brasil destaca-se entre os principais vírus causadores de danos econômicos em tomateiro no país. Mundialmente, os begomovírus, transmitidos por moscas-brancas, causam danos significativos principalmente em culturas como feijão, mandioca, algodão e tomate (Zubair *et al.*, 2017; Inoue-Nagata *et al.*, 2016; Chikoti *et al.*, 2019). Geralmente, em tomateiro, os sintomas como clareamento de nervuras, clorose internerval, deformação foliar e nanismo estão associados à infecção por begomovírus.

O primeiro relato de begomovírus infectando tomateiro no Brasil foi em 1960 (Flores *et al.*, 1960). A partir deste primeiro relato, poucos begomovírus infectando tomateiro foram descritas até meados da década de 90. Entretanto, logo após esse período, com a introdução da espécie de mosca branca *Bemisia tabaci* MEAM1 (biótipo B) no Brasil, houve uma explosão no número de espécies novas de begomovírus (Lourenção & Nagai, 1994).

A alta diversidade genética dos begomovírus deve-se principalmente à alta taxa de mutação e recombinação (Duffy, 2008; Lima *et al.*, 2017; Fiallo-Olivé *et al.*, 2019). Essa alta diversidade resulta na especiação e, assim, novas espécies são continuamente relatadas. Atualmente, o gênero *Begomovirus* é o maior entre os vírus que infectam plantas, com um total de 409 espécies aceitas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV). No Brasil, são descritos inúmeros begomovírus, um total de 25 espécies em tomateiro (Matyis *et al.*, 1975; Faria *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2012; Fernandes, 2015; Fonseca *et al.*, 2016; Macedo *et al.*, 2018; Duarte, 2019; Rego-Machado *et al.*, 2019).

A partir dos resultados observados no capítulo 2 desta tese, onde foi avaliada a diversidade de espécies de begomovírus ao longo do tempo, observou-se a prevalência dos

begomovírus tomato severe rugose virus (ToSRV) e tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV) em todos os três grupos de amostras avaliados, grupo 1 (composto por amostras entre os anos de 2003 a 2005), grupo 2 (2009 a 2011) e grupo 3 (2014 a 2016). Além disso, o begomovírus tomato golden vein virus (TGVV) foi detectado exclusivamente no primeiro período de avaliação em praticamente todas as plantas. Pode-se observar a partir dos resultados da taxa de detecção específica das três espécies em amostras individuais que, ao longo do tempo, ocorreu e possivelmente está ocorrendo novas mudanças na prevalência de espécies. Dessa forma, TGVV em amostras do grupo 1 predominava juntamente com ToSRV. Nesse mesmo período ToMoLCV encontrava-se presente porém ainda em baixa taxa de infecção. Entretanto esse panorama foi modificado já a partir das amostras de 2009 a 2011, onde TGVV não foi mais detectado (vírus possivelmente desapareceu na área estudada) e os begomovírus ToMoLCV e ToSRV passaram a ser os vírus predominantes. Curiosamente, no grupo 3, observou-se a diminuição da taxa de detecção de ToSRV enquanto foi observado o aumento da taxa de ToMoLCV.

A capacidade replicativa de um vírus contribui significativamente para a prevalência de certas populações virais em campo. A aptidão viral, de acordo com Domingo & Holland (1997), pode ser definida como a capacidade de um vírus produzir progênies infecciosas em um determinado ambiente. Assim, segundo esses autores, diferenças no nível de replicação viral, geralmente avaliada pela acumulação do material genômico, está associada à capacidade replicativa e a adaptabilidade a hospedeira. Por exemplo, um vírus que se replica em altos níveis em uma planta, possui alta adaptabilidade a este ambiente. Vários são os aspectos para estudos associados à aptidão viral, entre os principais estão tropismo tecidual, evasão do sistema de defesa do hospedeiro e capacidade de replicação viral.

Com base nos resultados do capítulo 2 e partindo da pressuposta diferença na aptidão viral vislumbra-se que o resultado da convivência desses vírus em um mesmo ambiente pode

levar a alteração da dinâmica de espécies predominantes e atuando até mesmo no desaparecimento de begomovírus como o TGVV. Assim, optou-se escolher os três begomovírus acima citados, considerados os mais epidemiologicamente relevantes, para avaliar experimentalmente o desempenho de cada vírus em situação de infecção mista. Por conseguinte, o objetivo desse estudo foi avaliar, ao longo do tempo de infecção, a aptidão replicativa dos begomovírus ToSRV, ToMoLCV e TGVV por meio da análise do progresso do acúmulo do DNA viral em tomateiro suscetíveis e resistente aos begomovírus. Além disso, o efeito da infecção de cada espécie nas plantas, em infecção simples e mista, foi avaliado por meio de análises de sintomas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Extração de DNA total**

A extração do DNA total das amostras de tomateiros foi realizada pelo método CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) conforme Doyle & Doyle (1991), com algumas adaptações. Aproximadamente 100 mg de tecido foliar foi amostrado individualmente e macerado em microtubos de 2 mL (Figura 1F) contendo cinco esferas metálicas de 1 mm de diâmetro e 750 µL do tampão CTAB (2% CTAB, 100 mM de Tris-HCl/pH 8, 20 mM de EDTA e 50 mM de NaCl), com adição de 0,2% de β-mercaptoetanol. As amostras foram maceradas em agitador (Precellys - Bertin Technologies) programado para dois ciclos de 30 seg a 1.500 rpm e, posteriormente, incubadas a 65°C por 15 min. Em seguida, adicionou-se 750 µL de clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico - 24:1) aos tubos, os quais foram vigorosamente agitados e centrifugados por 10 min a 10.000 rpm. Aproximadamente 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL contendo 400 µL de isopropanol. Os tubos foram agitados levemente, mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos para precipitação do DNA e, então, centrifugados por 10 min a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 400 µL de etanol 70% gelado e novamente centrifugado a 12.000 rpm por 5 min. Após a lavagem, o pellet foi seco em temperatura ambiente por aproximadamente 30 min e ressuscitado em 300 µL de água Milli-Q autoclavada. Os tubos, contendo o DNA total extraído, foram armazenados a -20°C para as análises posteriores.



**Figura 1** - Etapas de preparação e realização do ensaio de progressão da acumulação do DNA de begomovírus em tomateiro. Três begomovírus foram avaliados: tomate severe rugose virus (ToSRV), tomate mottle leaf curl virus (ToMoLCV) e tomate golden vein virus (TGVV). (A) Mudanças de tomateiros transplantadas em vasos de 500 mL no ponto de inoculação. (B) Solução bacteriana pronta para inoculação. (C) Agroinfiltração da solução bacteriana na parte abaxial da folha da cultivar Lanai. (D e E) Tomateiros agroinoculados mantidos em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16h:8h. (F) Coleta de amostras e acondicionamento em tubos de 2ml para extração de DNA total. (G) Etapa de extração de DNA. (H) microtubos com as reações de RCA utilizadas para posterior digestão do DNA amplificado. (I) Análise dos perfis de restrição em gel de agarose 1%.

## **2.2. Amplificação do DNA por círculo rolante e avaliação do comprimento de fragmentos de restrição (RCA/RFLP)**

A análise do progresso do acúmulo dos begomovírus em hospedeiras com e sem resistência foi avaliado utilizando a técnica de RCA/RFLP como descrito a seguir (Figura 1G, 1H). O DNA extraído foi utilizado como molde para amplificação por meio da técnica de RCA. Esta técnica possibilita a amplificação de genomas circulares, como o DNA-A e DNA-B dos begomovírus (Inoue-Nagata *et al.*, 2004). Apesar de não ser uma técnica quantitativa parte-se do pressuposto que a amplificação da população de DNA na amostra avaliada ocorra de modo aleatório e uniforme. Assim, para os tratamentos com infecção de um único begomovírus (infecção simples), deverá ser produzido durante os períodos de avaliação apenas o perfil de restrição de cada vírus inoculado.

Cada reação de RCA foi realizada com 1 µL de DNA total, 1 µL de tampão da enzima *Phi-29* DNA polimerase (10X, NEB), 1 µL de BSA (100X, NEB), 1 µL de dNTP's (10 mM, GE Healthcare, local), 2,5 µL de primer hexanucleotídeo randômico (10 µM), 0,15 µL da enzima *Phi-29* DNA polimerase (10.000 U/mL, NEB) e 3,35 µL de água Milli-Q. A reação foi incubada a 30°C por um período de 48h. Após este período, a enzima foi inativada a 65°C por 10 min.

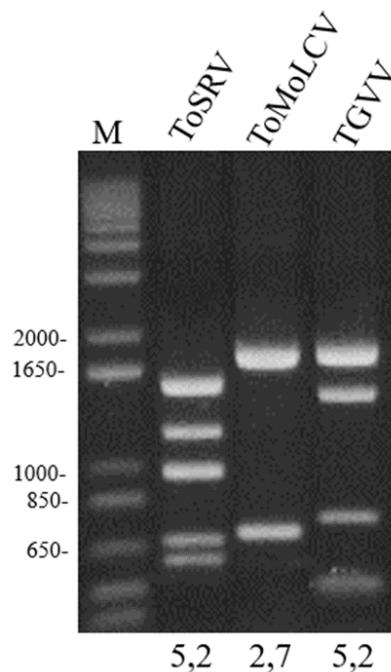
Para analisar os perfis de restrição dos begomovírus, o DNA amplificado por RCA foi digerido utilizando a enzima de restrição *MspI*. Cada reação de digestão, cujo volume final foi de 10 µL, consistiu de 1 µL de DNA viral amplificado (concentração de aproximadamente 100 ng/µL), 1 µL de tampão da enzima (10X, NEB), 0,2 µL da enzima (20.000 U/mL, NEB) e 7,8 µL de água Milli-Q. As reações foram incubadas a 37°C por 12 h. Os fragmentos de DNA resultantes da digestão foram separados em gel

de agarose a 1% preparado com TBE 0,5X. O marcador molecular utilizado foi 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA).

### **2.3. Análise dos perfis de restrição e aptidão replicativa**

As análises dos resultados, visualizados a partir dos géis de agarose, basearam-se nos tipos de perfis de restrição já caracterizados para os begomovírus avaliados nesse experimento (Figura 2). A digestão do RCA do DNA-A de ToSRV mostra um perfil com 6 fragmentos (1,6 kb, 1,2, 1,0, 0,7, 0,6, 0,1 - esta última não visível) que resulta no somatório de 5,2 kb, enquanto que a digestão de ToMoLCV com perfil esperado de 4 fragmentos (1,8 kb, 0,7, 0,06, 0,05 - as duas últimas não visíveis) apresentou apenas dois fragmentos, que somados resultaram em 2,5 kb. O somatório do perfil de fragmentos de TGVV (1,8 kb, 1,6, 1,0, 0,7, 0,1 - a última não visível) resultou em 5,1 kb (Figura 2).

A aptidão dos begomovírus avaliados foi classificada em superior (aptidão AP1), igual (AP2) e inferior (AP3). Naqueles tratamentos com dois ou mais vírus, a amplificação seguida da digestão mostrará o perfil do DNA presente e proporcionalmente ao título viral. Assume-se que nos tratamentos de infecção mista, a acumulação dos respectivos DNAs genômicos será uniforme se a taxa de multiplicação genômica é semelhante, nesse caso os vírus serão classificados com aptidão AP2. Caso apenas um perfil seja observado, será concluído que um dos vírus tornou-se predominante na planta, então classificado com aptidão AP1 e o DNA genômico sobreposto (perfil viral não detectado) classificado com aptidão AP3.



**Figura 2** - Gel de agarose com perfis de restrição de DNA viral amplificado por RCA e digerido por MspI para os begomovírus tomate severe rugose virus (ToSRV, 5,2 kb), tomate mottle leaf curl virus (ToMoLCV, 2,7 kb) e tomate golden vein virus (TGVV, 5,2 kb). (M) marcador 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).

#### 2.4. Método de inoculação

As inoculações foram realizadas por meio de agroinfiltrações usando clones infecciosos dos begomovírus ToSRV (Macedo *et al.*, 2015), ToMoLCV (Souza *et al.*, não publicado) e TGVV (Ferreira *et al.*, 2008) em duas cultivares suscetíveis, a cultivar comercial de crescimento determinado Heinz 9553 (H9553) e a cultivar de ciclo curto Lanai (Rajabu *et al.*, 2018). Além dessas, foi utilizada a cultivar moderadamente resistente de crescimento determinado BRS Sena (Quezado *et al.*, 2014). Para garantir o mínimo possível de escapes, as inoculações foram realizadas duas vezes em um período de 24h entre uma inoculação e a outra, em plântulas com 3-4 folhas verdadeiras (Figura 1A). Os clones infecciosos, transformados em *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV 3101, foram mantidos a -80°C. Essas foram incubadas em 3 mL de meio LB líquido contendo canamicina a 28°C sob agitação (180 rpm) por 2 dias. Em tubos de 50 mL, 1 mL do pré-inoculo de cada clone foi adicionado em 25 mL de meio LB líquido +

acetoseringona (20  $\mu\text{M}$ ) e incubado sob agitação por aproximadamente 24h. Após esse período, a solução bacteriana foi centrifugada (para os bipartidos ToSRV e TGVV, a solução bacteriana contendo DNA-A e DNA-B foram misturados proporcionalmente antes da centrifugação) a 5 000 g por 15 minutos e o pellet foi ressuspensionado em 10 mL de tampão de ressuspensão (10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM MES-K, pH 5,6). Após a ressuspensão, foi adicionado acetoseringona (100  $\mu\text{M}$ ) e incubado a temperatura ambiente em tubos de 15 mL, no escuro, por 24h, antes da agroinfiltração (Figura 1B). Para as inoculações de mais de dois vírus, o inóculo final de cada vírus foi misturado proporcionalmente imediatamente antes da infiltração. Aproximadamente 0,1 mL de solução bacteriana foi agroinfiltrado por planta na parte abaxial de todas as folhas com o auxílio de seringa de 1 mL (Figura 1C). Após a inoculação, as plantas foram transferidas para uma câmara de crescimento livre de moscas-brancas com fotoperíodo de 16h:8h (Figura 1D e 1E).

## 2.5. Estratégia experimental

As etapas de preparação, agroinfiltração, manutenção das plantas, amostragem, extração de DNA total e avaliação dos experimentos até aqui descritas são ilustradas na figura 1.

O ensaio consistiu de 11 tratamentos divididos em dois grupos. O primeiro grupo foi constituído de inoculações simples ou mistas (begomovírus inoculados simultaneamente): (1) simples de ToSRV; (2) simples de ToMoLCV; (3) simples de TGVV; (4) mista de ToSRV+ToMoLCV; (5) mista de ToSRV+TGVV; (6) mista de ToMoLCV+TGVV; (7) mista de ToSRV+ToMoLCV+TGVV. O segundo grupo foi constituído de inoculações mistas, porém, não simultâneas, com tempo 1 (T1) em plantas com 3-4 folhas verdadeiras, objetivando obter infecção simples, e o tempo 2 (T2) 10 dias após a primeira inoculação: (8) mista com TGVV (T1) + ToSRV (T2); (9)

mista com TGVV (T1) + ToMoLCV (T2); (10) ToSRV (T1) + ToMoLCV (T2); (11) controle sem inoculação (Figura 3). As inoculações do tempo 2 foram realizadas com o intuito de obter infecções mistas. Esse experimento foi realizado com duas repetições independentes, cada um com até quinze plantas por tratamento. Os controles positivos do experimento (tratamento 1, 2 e 3) foram utilizados de 4 a 6 plantas, a depender da repetição do experimento.

O mesmo método de avaliação foi realizado para os tratamentos com inoculações realizadas em tempos diferentes (tempo 1 e tempo 2). Primeiramente, avaliou-se a amostra inoculada com o primeiro vírus em infecção simples (tempo 1). Logo após a essa avaliação, o segundo vírus foi inoculado viabilizando a infecção mista. Avaliações do perfil de RCA-RFLP foram feitas no tempo 2 (composto por avaliações em períodos de 20, 40 e 60 dias pós inoculação - dpi) a partir da inoculação do segundo vírus. Portanto, a avaliação do *fitness* foi baseada na quantidade de DNA genômico representada pelo DNA amplificado e digerido.

Nos tratamentos com infecção mista (dois ou mais begomovírus inoculados simultaneamente), a amplificação seguida da digestão mostrará o perfil do DNA proporcionalmente ao título de cada vírus presente na amostra. Assim, para os tratamentos com infecção de dois begomovírus a primeira opção é o aparecimento de apenas o perfil de um dos begomovírus. Caso isso ocorra, será concluído que esse vírus predominou e por isso possui aptidão AP1. O vírus cujo perfil não foi visualizado será classificado com aptidão AP3. Outro possível resultado é o aparecimento simultâneo de ambos perfis de cada vírus. Esse resultado mostrará que o acúmulo do DNA dos dois vírus foi uniforme e classificado assim em aptidão AP2. Vale ressaltar que a avaliação foi realizada ao longo do tempo e no decorrer das avaliações pode-se observar, em

alguns casos, a alternância da acumulação do DNA viral e conseqüentemente a mudança do perfil de restrição viral entre os períodos avaliados que compõem o tempo 2.

Para o tratamento com três begomovírus inoculados simultaneamente, o resultado poderá variar entre o aparecimento de apenas um, dois ou três perfis virais, a depender do tratamento. Caso apareça um perfil, este será considerado com aptidão AP1 e outros vírus com perfil não detectado serão classificados como aptidão AP3. Entretanto, se o resultado mostrar dois perfis estes serão classificados com aptidão AP1 e o outro vírus classificado com aptidão AP3. Além disso, se a amostra apresentar o perfil dos três begomovírus estes serão classificados com AP2.

O mesmo método de avaliação foi realizado para os tratamentos com inoculação mista realizada em tempos diferentes (inoculações não simultâneas, T1 e T2). Primeiramente, avaliou-se o perfil da planta inoculada com o primeiro vírus já estabelecido em infecção simples (T1), onde foi observado apenas o perfil do primeiro vírus inoculado. Logo após, o segundo vírus foi inoculado viabilizando a infecção mista (T2). A partir do T2, terminado cada período de avaliação estabelecido (20, 40 e 60 dpi), foi realizada a amplificação e a digestão do DNA para determinar, ao longo do tempo, o perfil de restrição. Primeiramente, os resultados a partir do tempo 2 poderão mostrar o perfil do vírus inoculado ainda no T1 em todos os períodos de avaliação. Caso isso ocorra este será classificado com aptidão AP1 e os outros vírus com perfil não detectado com aptidão AP3. Por conseguinte, se o perfil de restrição no T2 for característico de infecção mista, resultante do vírus inoculado no T1 e do vírus inoculado no T2 estes serão considerados aptidão AP2. Entretanto, se na avaliação durante o T2 aparecer apenas o perfil do vírus inoculado nesse período este será classificado com aptidão AP1 e o outro vírus inoculado no T1 com perfil não detectado será classificado com aptidão AP3.

Além da avaliação da aptidão dos begomovírus por meio do progresso da acumulação do DNA viral, foi estudada a sintomatologia das inoculações mistas e simples. Avaliou-se a ocorrência ou não ocorrência de sinergismo, o tipo e tempo de surgimento dos sintomas.

<b>Tratamento 1</b> ToSRV	<b>Tratamento 2</b> ToMoLCV	<b>Tratamento 3</b> TGVV	<b>Tratamento 4</b> ToSRV+ToMoLCV	<b>Tratamento 5</b> ToSRV+TGVV
<b>Tratamento 6</b> ToMoLCV+TGVV	<b>Tratamento 7</b> ToSRV+ToMoLCV+TGVV		<b>Tratamento 8</b> Tempo 1 (T1)-TGVV-10dpi- Tempo 2 (T2)-ToSRV	
<b>Tratamento 9</b> T1-TGVV-10dpi-T2-ToMoLCV	<b>Tratamento 10</b> T1-ToSRV-10dpi-T2-ToMoLCV		<b>Tratamento 11</b> Controle negativo	

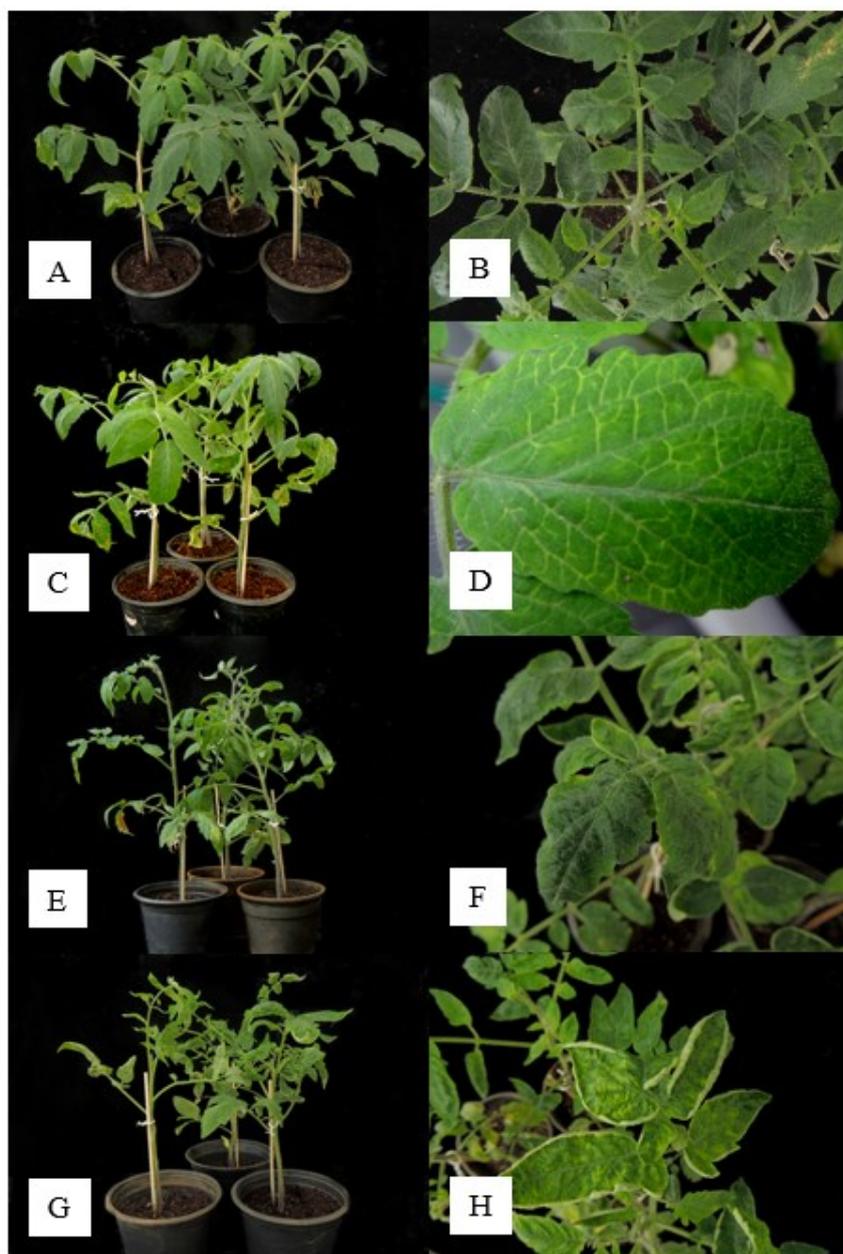
**Figura 3.** Representação dos tratamentos avaliados no ensaio de competição dos begomovírus tomato severe rugose virus (ToSRV), tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV) e tomato golden vein virus (TGVV) em infecção simples (tratamentos 1, 2 e 3) e mista em inoculações simultâneas (tratamentos 4, 5, 6 e 7) e inoculações não simultâneas realizadas em tempos diferentes (tempo 1 e tempo 2) (tratamentos 8, 9, 10). O tratamento 11 é o controle negativo do experimento, com plantas não inoculadas. As inoculações foram realizadas em cultivares de tomateiros resistentes (Sena) e suscetíveis (H9553 e Lanai). dpi: dias depois da inoculação.

## **2.6. Avaliação do efeito das infecções na sintomatologia**

Avaliação dos sintomas foi realizada, somente em cultivares suscetíveis (H9553 e Lanai), baseado no tipo e tempo de surgimento dos sintomas, para todos os tratamentos com exceção dos tratamentos de inoculação em tempos diferentes 8, 9 e 10. De modo a facilitar as análises, os sintomas foram avaliados de acordo com o índice de severidade adaptado da escala visual de notas proposta por Lapidot *et al.* (2006) como descrito a seguir. Nota 0: plantas assintomáticas, folhas sem sintomas e sem prejuízo para o desenvolvimento da planta (Figura 4A e 4B). Nota 1: clareamento das nervuras, manchas cloróticas suaves, deformação foliar leve e baixo efeito no desenvolvimento da planta (Figura 4C e 4D). Nota 2: manchas cloróticas, epinastia, bolhosidade, e prejuízo significativo no desenvolvimento da planta (Figura 4E e 4F). Nota 3: clorose, enrolamento dos bordos foliares, enfezamento, folíolos deformados e alto prejuízo no desenvolvimento da planta (Figura 4G e 4H). Cada nota foi estabelecida para planta que demonstrou pelo menos um dos sintomas estabelecidos.

## **2.7. Avaliação da frutificação na cultivar Lanai em infecção simples**

A avaliação da frutificação foi realizada em um grupo de 10 plantas por tratamento (tratamentos 1, 2 e 3) em um único experimento. Foi examinado o efeito da severidade dos sintomas na frutificação em plantas da cultivar Lanai em infecção simples de ToSRV, ToMoLCV e TGVV. A frutificação nesse experimento foi caracterizada pelo surgimento de um ou mais frutos ou do não surgimento de frutos nas plantas avaliadas.



**Figura 4.** Índice de severidade da doença. Nota 0 (A e B): plantas assintomáticas, folhas sem sintomas e sem prejuízo para o desenvolvimento da planta. Nota 1 (C e D): clareamento das nervuras, manchas cloróticas suaves, deformação foliar leve e baixo efeito no desenvolvimento da planta. Nota 2 (E e F): manchas cloróticas, epinastia, bolhosidade, e prejuízo significativo no desenvolvimento da planta. Nota 3 (G e H): clorose, enrolamento dos bordos foliares, enfezamento, folíolos deformados e alto prejuízo no desenvolvimento da planta.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Avaliação sintomatológica das infecções simples de begomovírus em tomateiro**

Inicialmente, a avaliação foi realizada a partir de plantas infectadas com os begomovírus ToSRV, ToMoLCV e TGVV inoculados em cultivares de tomateiro suscetíveis H9553 e Lanai e na cultivar resistente BRS Sena (tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente, Figura 3). As avaliações sintomatológicas foram baseadas no índice de severidade adaptado da escala visual de notas proposta por Lapidot *et al.* (2006). Nas duas cultivares suscetíveis, o índice de severidade dos sintomas variou principalmente de 1 a 3, dependendo do tratamento (Tabela 1). Em contraste, nas condições experimentais desse trabalho, apesar de sistemicamente infectada, a cultivar Sena em todos os tratamentos não demonstrou visualmente qualquer tipo de sintoma e por isso apresentou índice de severidade nota 0 em todas as avaliações (Tabela 1). Desse modo, a seguir foram descritos apenas os resultados das avaliações das cultivares H9553 e Lanai.

De modo geral, os sintomas visualizados em infecção simples de ToMoLCV (Tratamento 2) foram consideravelmente mais severos quando comparados aos sintomas de ToSRV (Tratamento 1) e TGVV (Tratamento 3) em ambas cultivares suscetíveis (Figura 5A e 5B e 6). As plantas inoculadas apenas com ToMoLCV mostraram índice de severidade nota entre 2 e 3 (Tabela 1). Os sintomas causados pela infecção por ToMoLCV em H9553 e Lanai foram caracterizados por epinastia enfezamento da planta, bolhosidade, manchas cloróticas e enrolamento das bordas foliares (Figura 5A, 5B, 6, 7A,7B,7C, 7D.).

**Tabela 1.** Índice de severidade da infecção causada por begomovírus em infecções simples e mistas em três cultivares de tomateiro.

Tratamentos	H9553 (S) <sup>1</sup>	Lanai (S) <sup>1</sup>	BRS Sena (R) <sup>1</sup>
T1-ToSRV	1 <sup>2</sup>	0-1	0
T2-ToMoLCV	2-3	2-3	0
T3-TGVV	0-1	0-1	0
T4-ToSRV+ToMoLCV	2-3	2-3	0
T5-ToSRV + TGVV	1	1	0
T6-ToMoLCV + TGVV	2-3	2-3	0
T7-ToSRV+ToMoLCV+TGVV	3	3	0

<sup>1</sup>Cultivar suscetível (S) ou com resistência (R)

<sup>2</sup>Intervalo entre a menor e maior nota de severidade nas plantas infectadas (10 plantas) aos 20 dias após a inoculação. Escala de severidade crescente entre 0 (sem sintomas) e 3 (clorose, enrolamento dos bordos foliares, enfezamento, folíolos deformados e alto prejuízo no desenvolvimento da planta).

As cultivares suscetíveis infectadas com ToSRV foram caracterizadas com sintomas de clareamento de nervuras, manchas cloróticas e deformação foliar leve (Figura 7E e 7F). O resultado do índice de severidade foi uniforme com nota 1 para todas as plantas da cultivar H9553 e entre 0 e 1 para a cultivar Lanai (Tabela 1). As plantas infectadas com ToSRV (T1) (Figura 5B e 6), ao contrário das plantas infectadas com ToMoLCV (T2) (Figura 5B e 6), apresentaram baixo prejuízo no desenvolvimento quando comparadas as plantas não inoculadas (T11) (Figura 5D e 6).

As plantas infectadas com TGVV mostraram sintomas leves de clareamento de nervura, durante a fase inicial da infecção (Figura 7G). Ambas cultivares suscetíveis infectadas com TGVV apresentaram índice de severidade entre 0 e 1 (Tabela 1). Curiosamente, os sintomas causados por TGVV desapareceram totalmente cerca de 20 dpi. O desenvolvimento das plantas infectadas com TGVV (T3) foi visualmente similar

ao desenvolvimento das plantas não inoculadas (T11) (controle negativo) (Figura 5A, 5C, 5D e 6).

Nas condições experimentais aqui realizadas, o tempo de surgimento dos sintomas após as inoculações dos begomovírus variou entre 10 e 12 dpi para os vírus ToSRV e TGVV. De modo geral, apesar de visualmente mais severos, os sintomas iniciais de ToMoLCV foram mais tardios em relação à infecção causada pelas outras duas espécies, iniciando o surgimento a partir do 14º dia depois de inoculado.

### **3.2. Avaliação sintomatológica da infecção de begomovírus em infecção mista em tomateiro**

Na infecção mista com os vírus ToMoLCV e ToSRV (T4), as plantas apresentaram um maior crescimento (em altura), porém com folíolos menores quando comparado aos tratamentos em infecção simples com ToSRV (T1) e com ToMoLCV (T2). O índice de severidade de sintomas no tratamento T4 foi considerado entre 2 e 3, enquanto os tratamentos individuais T1 e T2 foi considerado 1 e 2-3, respectivamente (Tabela 1). O índice de notas do tratamento T4 foi similar ao de T2, sugerindo que a infecção por ToMoLCV pode ter dominado nessas plantas.

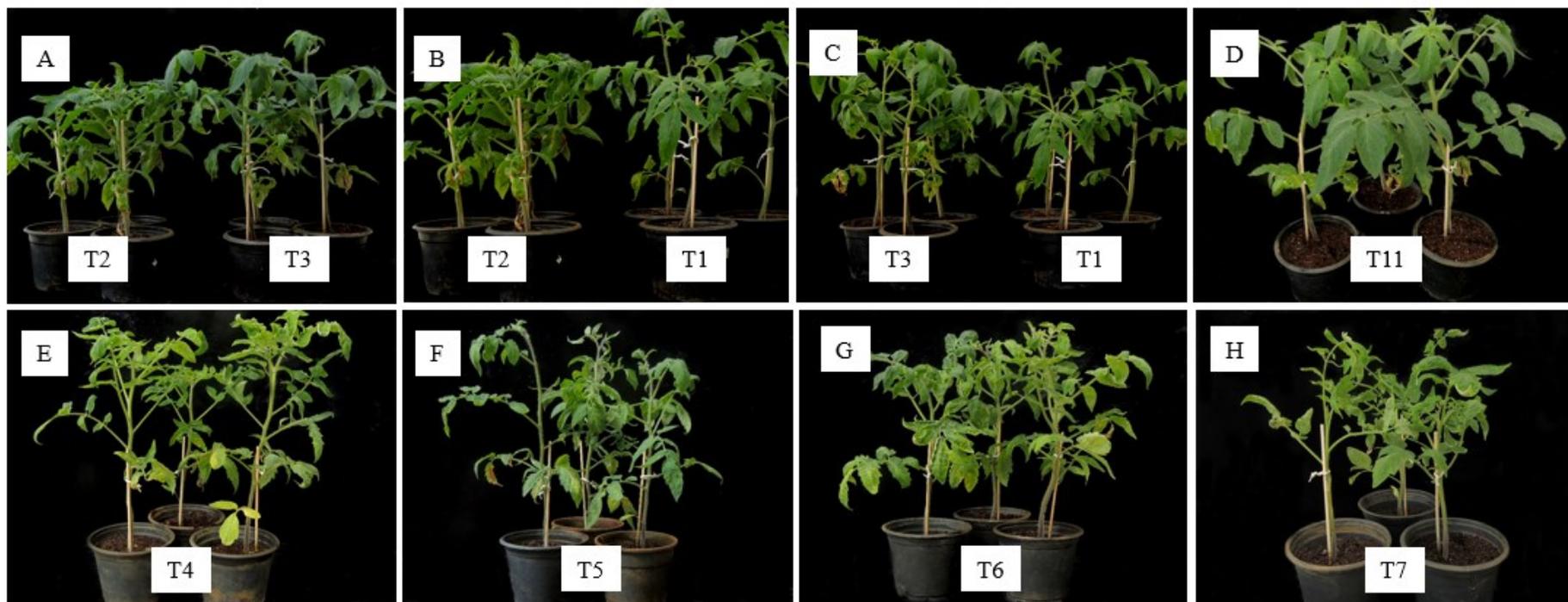
As plantas com inoculação simultânea de ToSRV e TGVV (T5), em ambas cultivares suscetíveis, apresentaram índice de severidade 1, mesmo índice atribuído aos sintomas causados pela infecção simples de ToSRV (T1) e TGVV (T3) (Tabela 1). Esse resultado sugere a não ocorrência de sinergismo pela infecção mista desses dois begomovírus.

Plantas infectadas com ToMoLCV e TGVV (T6) foram classificadas com índice de severidade entre 2 e 3, semelhante aos tratamentos T2 e T4. As plantas infectadas pelos três vírus, ToSRV, ToMoLCV e TGVV (T7) mostraram maior severidade dos

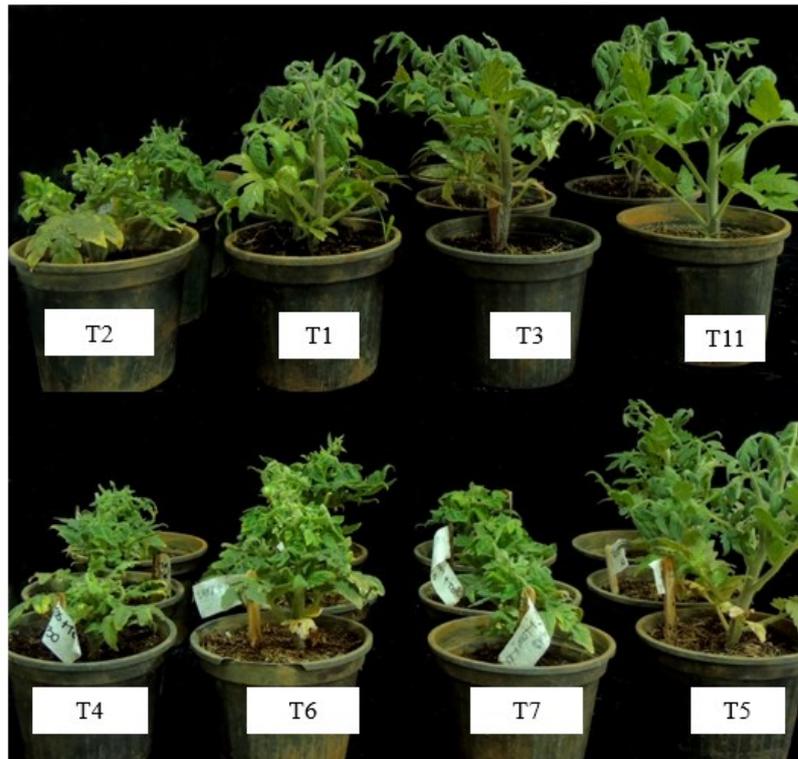
sintomas quando comparadas com os tratamentos de infecções simples (T1, T2 e T3). O índice de severidade para esse tratamento foi nota 3, em todas as plantas avaliadas para ambas cultivares suscetíveis, enquanto que para as infecções simples de ToMoLCV foi nota 2-3 e nota 1 ou 0-1 para ToSRV (dependendo da cultivar) e entre 0-1 para TGVV (Tabela 1). Apesar de apresentar arquitetura e características biológicas diferentes, plantas da cultivar Lanai, infectadas com ToMoLCV isoladamente ou em combinação com outro vírus, foram visualmente mais afetadas pela infecção dos begomovírus (Figura 5 e 6).

### **3.3. Efeito de infecções simples na frutificação da Cultivar Lanai.**

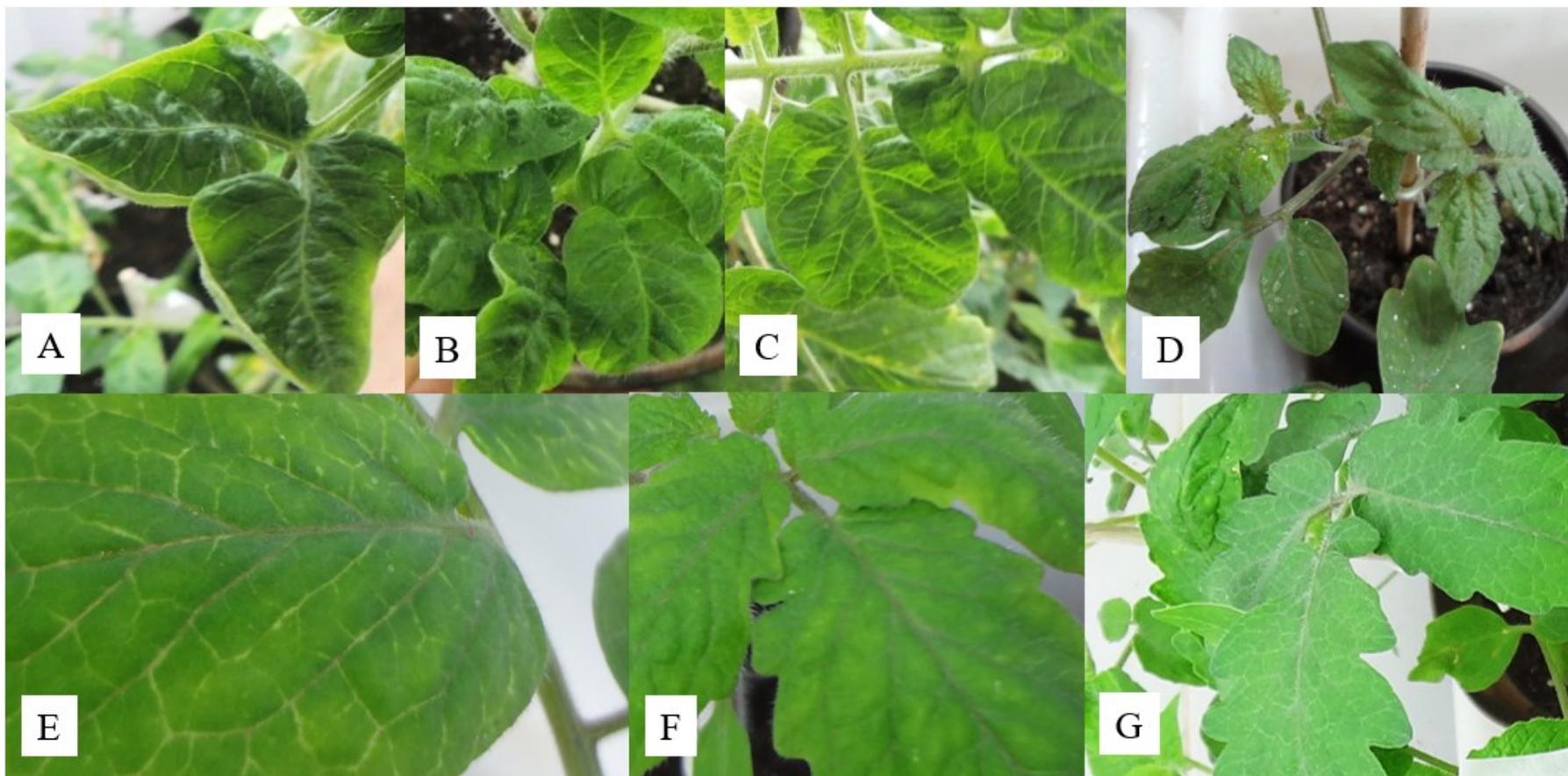
Conhecida pela sua precocidade e tamanho reduzido, a frutificação de plantas da cultivar Lanai infectadas individualmente com cada um dos três begomovírus (tratamentos 1, 2 e 3) foi avaliada. A partir dessa análise foi possível relacionar o índice de severidade dos sintomas em plantas individualmente infectadas com os três begomovírus, e o seu rendimento. Como resultado dessa avaliação, 100% (10/10) das plantas infectadas com ToSRV e TGVV produziram frutos aproximadamente aos 110 dpi, semelhante ao ocorrido com o controle negativo. Os índices de severidade obtidos para esses tratamentos foram entre 0-1 (plantas com pouco ou nenhum sintoma). Entretanto, em plantas infectadas por ToMoLCV, o alto grau de severidade dos sintomas impossibilitou a formação de frutos (Figura 8).



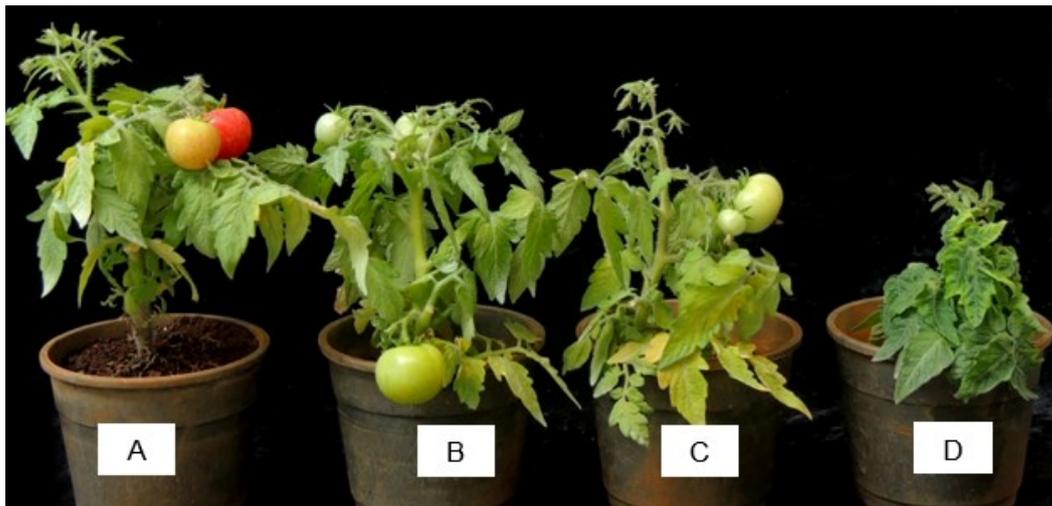
**Figura 5.** Plantas de tomateiro H9553 aos 60 dias após inoculação com ToSRV (T1), ToMoLCV (T2), TGVV (T3), ToSRV + ToMoLCV (T4), ToSRV + TGVV (T5), ToMoLCV + TGVV (T6) e ToSRV + ToMoLCV + TGVV (T7). Duplas de tratamentos são apresentadas para comparação.



**Figura 6;** Plantas de tomateiro Lanai aos 60 dias após inoculação com ToSRV (T1), ToMoLCV (T2), TGVV (T3), ToSRV + ToMoLCV (T4). ToSRV + TGVV (T5), ToMoLCV + TGVV (T6) e ToSRV + ToMoLCV + TGVV (T7).



**Figura 7.** Folhas de tomateiro H9553 com sintomas de infecções causados por ToMoLCV (A, B, C, D), ToSRV (E, F) e TGVV (G) 20 dias após inoculação. Sintomas: (A) Enrolamento das bordas foliares; (B) Bolhosidade e epinastia; (C) Manchas cloróticas; (D) Enfezamento; (E) Clareamento das nervuras; (F) Manchas cloróticas e leve deformação foliar; (G) Leve clareamento das nervuras.



**Figura 8.** Comparação do desenvolvimento de tomateiro da cultivar Lanai aos 110 dias em período de frutificação. Planta sem inoculação (A) e inoculadas com TGVV (B), ToSRV (C) e ToMoLCV (D).

### 3.4. Detecção do DNA dos begomovírus em infecção simples

Para avaliar a aptidão replicativa dos begomovírus ToSRV, ToMoLCV e TGVV, o progresso do acúmulo do DNA viral foi acompanhado ao longo do tempo (20, 40 e 60 dpi) no tratamento 1 ao tratamento 11, descritos na figura 3. Para realizar a avaliação, a técnica de RCA/RFLP foi utilizada. As análises dos resultados foram baseadas nos tipos de perfis de restrição já caracterizados para os begomovírus avaliados (Figura 2). Em cada repetição, todas as plantas foram inoculadas nos tratamentos com a mesma preparação do inóculo, permitindo a comparação dentro da repetição.

Os tratamentos 1, 2 e 3 (Figura 3) foram utilizados como referência do experimento. Esses tratamentos foram realizados por meio da inoculação individual de cada vírus com o intuito de obter infecções simples para servir de comparação com os demais tratamentos em infecção mista com inoculações simultâneas e não simultâneas. A depender da repetição do experimento, 4 a 6 plantas foram utilizadas. Diferentemente do número de plantas utilizadas para os demais tratamentos, nestes tratamentos os

ensaios foram realizados com um baixo número de plantas de modo a reduzir o número de amostras e facilitar as avaliações.

Em toda a condução do experimento, 100% das plantas inoculadas com cada begomovírus foram infectadas (Tabela 2). Esses resultados demonstram a eficiência dos clones infecciosos e do método de inoculação utilizado. Realizou-se duas inoculações, com um período de 24h entre elas, de modo a maximizar a taxa de infecção.

**Tabela 2.** Número de plantas inoculadas e infectadas em inoculação simples dos três begomovírus avaliados.

Tratamento (dpi)	H9553 <sup>1</sup>		Lanai		Sena	
	1x	2x	1x	2x	1x	2x
1						
ToSRV (20) <sup>2</sup>	6/6	5/5	5/5	6/6	5/5	6/6
ToSRV (40)	6/6	5/5	5/5	6/6	5/5	6/6
ToSRV (60)	6/6	5/5	5/5	6/6	5/5	6/6
2						
TGVV (20)	4/4	5/5	4/4	6/6	6/6	6/6
TGVV (40)	4/4	5/5	4/4	6/6	6/6	6/6
TGVV (60)	4/4	5/5	4/4	6/6	6/6	6/6
3						
ToMoLCV (20)	6/6	6/6	4/4	6/6	5/5	6/6
ToMoLCV (40)	6/6	6/6	4/4	6/6	5/5	6/6
ToMoLCV (60)	6/6	6/6	4/4	6/6	5/5	6/6

<sup>1</sup>Inoculação em duas cultivares suscetíveis (H9553 e Lanai) e uma cultivar resistente (Sena).

<sup>2</sup>Os begomovírus ToSRV (tratamento 1), TGVV (tratamento 2) e ToMoLCV (tratamento 3) foram inoculados e a infecção avaliada aos 20, 40 e 60 dias pós-inoculação (dpi).

### 3.5. Tratamentos em infecção mista com os begomovírus inoculados simultaneamente

#### 3.5.1 Tratamento 4 (ToSRV+ToMoLCV) – cultivar H9553

Quando avaliada a aptidão replicativa dos begomovírus na cultivar H9553, para o tratamento 4, no primeiro experimento, aos 20 dpi, 20% (3/15) das amostras apresentaram perfil de infecção simples de ToSRV, enquanto 46,6% (7/15) com perfil

de infecção simples de ToMoLCV e 33,3% (5/15) com perfil de infecção mista com ambos begomovírus (Tabela 3). O resultado foi idêntico na avaliação aos 40 dpi. Entretanto, aos 60 dpi, houve uma sutil diminuição da porcentagem de amostras com perfil simples de ToSRV de 20% para 13,3% (2/15). Conseqüentemente, a porcentagem de amostras com perfil de infecção mista aumentou de 33,3% para 40% (6/15). A porcentagem de amostras com perfil com infecção simples de ToMoLCV permaneceu a mesma. Na primeira repetição do experimento, houve uma maior porcentagem de amostras com infecção simples de ToMoLCV em relação a porcentagem de amostras em infecção simples de ToSRV. Nessas amostras, a acumulação de ToMoLCV predominou na planta, sendo a aptidão de ToMoLCV classificada em AP1 e ToSRV AP3. Apesar disso, observou-se um número expressivo de amostras em infecção mista, o que demonstra a ocorrência de acumulação dos dois begomovírus, classificando-os assim em AP2.

Na segunda repetição do experimento, 20% (3/15) das amostras, aos 20 dpi, apresentaram perfis de infecção simples de ToSRV e ToMoLCV. Além disso, 60% (9/15) das amostras apresentaram perfis de infecção mista. Aos 40 dpi houve uma diminuição da porcentagem de amostras com perfil simples de ToSRV de 20% para 6,6% (1/15), enquanto o número de amostras com perfil de ToMoLCV permaneceu o mesmo do período anterior. A frequência de amostras apresentando perfis de infecção mista aumentou em relação ao período anterior, passando de 60% para 73,3% (11/15). Aos 60 dpi a porcentagem de perfis de infecção simples de ToSRV permaneceu a mesma obtida aos 40 dpi. Enquanto isso, observou-se a diminuição de amostras com perfil simples de ToMoLCV para 13,3% (2/15). Novamente, ocorreu o aumento progressivo da porcentagem de amostras em infecção mista de 73,3% para 80% (12/15). Na segunda repetição do experimento, observou-se alta porcentagem de amostras em

infecção mista, com aumento da porcentagem no decorrer da infecção. Apesar de diferir do padrão de resultados do primeiro experimento, classificou-se a aptidão de ToMoLCV e ToSRV como AP2, pois não obteve-se a clara diferença na aptidão entre os dois begomovírus.

Para esse tratamento na repetição 1, o desempenho de ToMoLCV poderia ser classificado como AP1 e AP2 e de ToSRV como AP3 e AP2. Na repetição 2, foi dominante a AP2. Além disso, foi verificado aumento da porcentagem de infecção mista ao longo do tempo.

### **3.5.2 Tratamento 4 (ToSRV+ToMoLCV) – cultivar Lanai**

Quando avaliado o tratamento 4 utilizando a cultivar Lanai, no primeiro experimento, aos 20 dpi, observou-se que 60% (9/15) das amostras apresentaram perfil de infecção simples de ToSRV, enquanto que 13,3% (2/15) apresentaram perfil simples de ToMoLCV e 26,6% (4/15) de amostras com perfis de ambos begomovírus (Tabela 3). Nos períodos de avaliação com 40 e 60 dpi houve uma sutil diminuição da quantidade de amostras com perfil simples de ToSRV de 60% para 46,6% (7/15). Não foi observado nenhum perfil de infecção simples de ToMoLCV em ambos períodos. Nas análises de infecção mista, houve um aumento do número de amostras de 26% para 53,3% (8/15) entre 20 e 60 dpi. Na segunda repetição experimental, de modo geral, observou-se um maior número de amostras com perfil de infecção mista quando comparado ao primeiro experimento. No período, aos 20 dpi, 6,6% (1/15) das amostras apresentaram perfil de infecção simples de ToSRV e ToMoLCV e 86,6% (13/15) das amostras apresentaram perfis de infecção mista. Análogo ao que ocorreu com ToMoLCV na primeira repetição do experimento, aos 40 e 60 dpi não houve nenhuma amostra com perfil simples de ToSRV. A porcentagem de amostras com perfil simples de ToMoLCV permaneceu a mesma em todos os três períodos de avaliação. A

porcentagem de amostras em infecção mista foi maior quando comparado a avaliação aos 20 dpi passando de 86,6% para 93,3% (14/15) das amostras.

A partir dos resultados obtidos na cultivar Lanai observou-se que na primeira repetição do experimento ToSRV foi classificado como AP1 para ToSRV e AP3 para ToMoLCV. Houve uma diminuição da porcentagem de amostras com perfil simples de ToSRV entre 20 e 60 dpi, e um consequente aumento da porcentagem de amostras de 26,6% para 53,3% das amostras com perfil de infecção mista. Nesse caso, a aptidão entre os begomovírus foi classificada em AP2. A partir da primeira repetição, observou-se uma porcentagem semelhante de amostras em infecção simples de ToSRV e infecção mista. Para ToSRV, na segunda repetição do experimento, houve uma expressiva mudança na porcentagem de amostras detectadas com perfil simples. Como ocorreu com ToMoLCV na primeira repetição do experimento, perfil simples de ToSRV foi detectado apenas aos 20 dpi, enquanto que a porcentagem de amostras com perfil simples de ToMoLCV, apesar de baixa porcentagem, se manteve constante nos três períodos de avaliação. Nessa repetição do experimento, observou-se uma maior porcentagem de amostras em infecção mista, o que classifica a aptidão replicativa de ambos begomovírus em AP2.

### **3.5.3 Tratamento 4 (ToSRV+ToMoLCV) – cultivar BRS Sena**

O tratamento 4, quando avaliado na cultivar Sena, na primeira repetição do experimento, aos 20 e 40 dpi, 33,3% (2/6) das amostras apresentam perfil de infecção simples de ToSRV, seguido de 16,6% (1/6) de amostras com perfil simples de ToMoLCV e 50% (3/6) de amostras apresentando perfil de infecção mista. Aos 60 dpi, a porcentagem de amostras com perfil de ToSRV permaneceu a mesma, entretanto, houve o aumento da porcentagem de amostras com perfil simples de ToMoLCV 16,6 % para 50% (3/6) e a diminuição da porcentagem de amostra em infecção mista para

16,6% (1/6). No segundo experimento, o número de amostras apresentando perfil de infecção simples de ToSRV permaneceu constante aos 20 e 40 dpi, apresentando 33,3% (5/15) das amostras com perfil de infecção simples. O mesmo ocorreu com a detecção de perfis de infecção simples de ToMoLCV aos 20, 40 e 60 dpi, com uma percentagem de 53,3% (8/15). A taxa de amostras em infecção mista, foi de 13,3% (2/15) aos 20 e 40 dpi, e 20% (3/15) aos 60 dpi.

Em geral, na cultivar Sena, a percentagem de amostras com perfis simples de cada begomovírus foi maior quando comparada a percentagem de amostras com perfis de infecção mista. Em contraste, quando o mesmo tratamento foi avaliado em cultivares suscetíveis, obteve-se uma maior percentagem de amostras com perfis de infecção mista em relação a amostras com perfis de infecção simples. A partir dos resultados obtidos, especula-se que na cultivar Sena esteja ocorrendo uma competição interespecífica o que resulta na maior acumulação de um ou de outro vírus, visualizada pela maior percentagem de amostras com perfil de infecção simples de ToSRV ou ToMoLCV. Além disso, pode-se concluir que o maior número de amostras em infecção simples foi de ToMoLCV, aos 60 dpi, na primeira repetição do experimento, e em todos os períodos de avaliação na segunda repetição do experimento. A partir desses resultados, é possível concluir que, na cultivar Sena, a aptidão de ToMoLCV pode ser classificada em AP1 e ToSRV em AP3.

#### **3.5.4 Tratamento 5 (ToSRV+TGVV) – cultivar H9553**

No tratamento 5, na primeira repetição do experimento, utilizando a cultivar H9553, observou-se que aos 20 dpi 73,3% (11/15) das amostras apresentaram perfil simples de ToSRV, enquanto que 26,6% (4/15) apresentaram perfil simples de TGVV. Nenhuma amostra com perfil de infecção mista foi detectada nesse período de avaliação. Aos 40 e 60 dpi, houve uma diminuição na percentagem de amostras

detectadas com perfil simples de ToSRV de 73,3% para 53,3% (8/15). Além disso, nesses dois períodos observou-se a detecção de amostras com perfis de infecção mista em 46,7% (7/15) das amostras, anteriormente não detectadas aos 20 dpi. Na segunda repetição do experimento 53,8% (7/13) das amostras apresentaram perfil simples de ToSRV e nenhum perfil simples de TGVV. Em contraste, a primeira repetição do experimento, que não apresentou nenhuma amostra com perfil de infecção mista, na segunda repetição 46,1% (6/13) das amostras apresentaram perfil de infecção mista aos 20 dpi. Aos 40 dpi, a porcentagem de amostras com perfil simples de ToSRV permaneceu a mesma que o período anterior. O perfil simples de TGVV foi detectado em uma amostra, relativo a 7,6% (1/13). A taxa de amostras em infecção mista diminuiu de 46,1 para 38,4% (5/13). Aos 60 dpi, a frequência de amostras com perfil simples de ToSRV diminuiu de 46,1% para 38,4% (5/13). Curiosamente, a única amostra detectada com perfil simples de TGVV aos 40 dpi, na avaliação aos 60 dpi não foi detectada. Isso se deu pelo aumento da acumulação do DNA de ToSRV na amostra, resultando em acumulação semelhante a TGVV, assim a amostra passou a constituir o grupo de amostras com perfil de infecção mista com perfis de ToSRV e TGVV. Aos 60 dpi, houve o aumento da porcentagem de amostras em infecção mista de 38,4% para 61,5% (8/13).

O maior número de amostras em infecção simples de ToSRV na primeira repetição do experimento possivelmente está relacionada com a alta capacidade replicativa de ToSRV em relação ao TGVV que, mesmo presente na amostra, a acumulação do DNA não ocorreu a níveis detectáveis. Apesar disso, a alta porcentagem de amostras com perfis de infecção mista, a partir dos 40 dpi sugere que em co-infecção esses dois begomovírus podem possuir capacidade replicativa semelhante (AP2). Entretanto, pode-se observar que um baixo número de amostras com infecção simples

de TGVV foi detectada apenas aos 20 dpi na primeira repetição do experimento e aos 40 dpi na segunda repetição do experimento. Esses resultados apontam que na maioria dos casos, ToSRV possui AP1, enquanto que TGVV, quando presente, perfis aparecem apenas em amostras em infecção mista geralmente nos estádios mais tardios da infecção. Além disso, os casos em que TGVV predominou, resultado visualizado por amostras com perfil simples, ocorreram geralmente no início da infecção. Isso demonstra, que com o passar do tempo de infecção a acumulação de TGVV diminuiu, sendo alcançada ou predominada pela acumulação de ToSRV. A partir desses resultados pode-se caracterizar a aptidão replicativa de TGVV em AP3.

### **3.5.5 Tratamento 5 (ToSRV+TGVV) – cultivar Lanai**

No geral, para o tratamento 5, resultados diferentes aos obtidos para a cultivar H9553 foram observados quando utilizada a cultivar Lanai em ambas repetições do experimento. Aos 20 dpi, 84,6% (11/13) das amostras apresentaram perfis simples de ToSRV, enquanto que apenas 7,6% (1/13) das amostras apresentaram perfil simples de TGVV em todos os períodos de avaliação. A mesma porcentagem de amostras desse último, aos 20 dpi, foi observada em perfil de infecção mista. Aos 40 e 60 dpi, houve uma sutil diminuição de amostras com perfil simples de ToSRV de 84% para 76,9% (10/13). A porcentagem de amostras com perfil de infecção mista aumentou ao longo do tempo, passando de 7,6% aos 20 dpi para 15,3% (2/13) aos 40 e 60 dpi. Na segunda repetição do experimento, aos 20 dpi 60% (9/15) das amostras apresentaram perfis de infecção simples de ToSRV, 66,6% (10/15) aos 40 dpi e novamente obteve-se 60% (9/15) das amostras com perfil simples de ToSRV aos 60 dpi. Além disso, nenhuma amostra com perfil simples de TGVV foi detectada em todos os três períodos avaliados. A porcentagem de amostras em infecção mista ao longo do tempo de avaliação permaneceu praticamente constante. Aos 20 dpi, 40% (6/15) das amostras apresentaram

perfil de infecção mista, passando para 33,3% (5/15) aos 40 dpi e novamente 40% (6/15) aos 60 dpi.

Na primeira repetição do experimento, a alta porcentagem de amostras em infecção simples de ToSRV apresentada reflete uma maior aptidão replicativa (AP1) em relação a TGVV, classificado em AP3. Além disso, quando presente o perfil de TGVV, observou-se a ocorrência deste apenas em infecção mista com ToSRV e não isoladamente, corroborando com os resultados obtidos com o mesmo tratamento na cultivar H9553. Outro fato que corrobora esse resultado é a aumento progressivo de amostras em infecção mista ao longo do tempo, como ocorreu na primeira repetição do experimento. Isso demonstra, em algumas amostras avaliadas, uma acumulação tardia do TGVV. Em contraste com os resultados obtidos na cultivar H9553, na cultivar Lanai foi observada a maior porcentagem de amostras em infecção simples de ToSRV em todos os três períodos de avaliação em ambas repetições experimentais. Esse resultado foi observado na cultivar H9553 apenas aos 20 dpi.

### **3.5.6 Tratamento 5 (ToSRV+TGVV) – cultivar BRS Sena**

O tratamento 5 quando submetido a avaliação utilizando a cultivar Sena, na primeira repetição do experimento apresentou 83,3% (5/6) das plantas com perfil simples de ToSRV aos 20 e 40 dpi e 50% (3/6) aos 60 dpi. Quanto a detecção de perfil simples de TGVV, aos 20 dpi, 16,6% (1/6) das amostras apresentou esse perfil. Entretanto, aos 40 e 60 dpi nenhuma amostra com perfil simples de TGVV foi detectada. Aos 20 dpi, nenhuma das amostras apresentou perfil de infecção mista, porém, aos 40 dpi 16,6% (1/6) e 60 dpi 50% (3/6) mostraram perfil de infecção mista entre ToSRV e TGVV. No segundo experimento, 73,3% (11/15) das amostras apresentaram perfil simples de ToSRV em todos os períodos avaliados. Perfis simples de TGVV foram detectados em 13,3% (2/15) apenas aos 20 dpi. O número de amostras

em infecção mista aumentou de 13,3% (2/15) dos 20 dpi, para 26,6% (4/15) aos 40 e 60 dpi.

Conclui-se que, na primeira repetição do experimento, nas fases iniciais do processo de infecção (aos 20 e 40 dpi), a porcentagem de amostras apresentando perfil simples de ToSRV predominou, o que o classifica como AP1 e TGVV como AP3. Essa conclusão é confirmada na segunda repetição do experimento, onde se obteve, em todos os três períodos de avaliação, uma maior porcentagem de amostras em infecção simples de ToSRV e a baixa porcentagem de amostras com perfis de infecção mista. Nas duas repetições do experimento, ao longo do tempo, houve o aumento da porcentagem de perfis de infecção mista devido a amostras anteriormente agrupadas com perfis simples em que ambos vírus passaram a ter uma acumulação uniforme, demonstrando assim a acumulação tardia do vírus. No geral, os resultados obtidos, quando avaliado o experimento onde utilizou-se a cultivar Sena, demonstra alta semelhança com os resultados obtidos quando utilizadas as cultivares suscetíveis. Entretanto, um fato notório observado, quando utilizado a cultivar resistente, observou-se a menor porcentagem de amostras em infecção mista em relação as duas outras cultivares suscetíveis.

### **3.5.7 Tratamento 6 (ToMoLCV+TGVV) – cultivar H9553**

Na cultivar H9553, a partir das inoculações simultâneas dos begomovírus ToMoLCV e TGVV, observou-se, no primeiro experimento, aos 20 dpi, 100% (14/14) das plantas apresentaram apenas o perfil de ToMoLCV. Nesse período, o perfil de TGVV ou infecção mista de ambos begomovírus não foi observado. Nas avaliações aos 40 e 60 dpi a quantidade dos perfis simples de ToMoLCV diminuiu de 100% para 85,7% (12/14). Assim, duas amostras, anteriormente com perfil simples de ToMoLCV passaram a apresentar infecção mista, pois a acumulação do DNA de TGVV passou a

ser detectável. Em seguida, nenhum perfil simples de TGVV foi também observado aos 40 e 60 dpi. O mesmo padrão de resultados foi observado na segunda repetição do experimento. Aos 20 e 40 dpi, observou-se que 73,3% (11/15) das amostras apresentaram perfil simples de ToMoLCV. Em contraste, houve baixo número de amostras em infecção mista 26,6% (4/15). Aos 60 dpi, 66,6% (10/15) das amostras apresentaram perfil simples de ToMoLCV, enquanto que 33,3% (5/15) apresentaram perfil de infecção mista. Análogo à primeira repetição do experimento, nenhum perfil simples de TGVV foi observado em todos os três períodos na segunda repetição do experimento.

Ambas repetições do experimento mostraram a maior porcentagem de amostras com perfis de infecção simples de ToMoLCV em relação a perfis simples de TGVV e infecção mista. Com base nesses resultados, pode-se sugerir que o maior número de perfis simples de ToMoLCV está relacionado com a maior capacidade replicativa do DNA viral em todos os períodos avaliados na cultivar suscetível H9553, classificando-o em AP1 enquanto que TGVV foi classificado em AP3. Além disso, como demonstrado na maioria dos tratamentos até o momento, a maior frequência de amostras com perfis de infecção mista ocorreu em avaliações mais tardias, geralmente aos 40 e 60 dpi. Nesses casos, estes isolados virais apresentaram igual capacidade replicativa, AP2.

**Tabela 3.** Identificação do número de plantas apresentando perfis de restrição por MspI discriminantes de cada vírus a partir de DNA viral amplificado por RCA em plantas inoculadas com três begomovírus em infecções mistas, duplas ou triplas.

Tratamento/(dpi) <sup>1</sup>		H9553 <sup>2</sup>		Lanai		Sena	
4		1x	2x	1x	2x	1x	2x
ToSRV+ToMoLCV (20)	ToSRV	3/15	3/15	9/15	1/15	2/6	5/15
	ToMoLCV	7/15	3/15	2/15	1/15	1/6	8/15
	Mista	5/15	9/15	4/15	13/15	3/6	2/15
ToSRV+ToMoLCV (40)	ToSRV	3/15	1/15	7/15	0/15	2/6	5/15
	ToMoLCV	7/15	3/15	0/15	1/15	1/6	8/15
	Mista	5/15	11/15	8/15	14/15	3/6	2/15
ToSRV+ToMoLCV (60)	ToSRV	2/15	1/15	7/15	0/15	2/6	4/15
	ToMoLCV	7/15	2/15	0/15	1/15	3/6	8/15
	Mista	6/15	12/15	8/15	14/15	1/6	3/15
5		1x	2x	1x	2x	1x	2x
ToSRV+TGVV (20)	ToSRV	11/15	7/13	11/13	9/15	5/6	11/15
	TGVV	4/15	0/13	1/13	0/15	1/6	2/15
	Mista	0/15	6/13	1/13	6/15	0/6	2/15
ToSRV+TGVV (40)	ToSRV	8/15	7/13	10/13	10/15	5/6	11/15
	TGVV	0/15	1/13	1/13	0/15	0/6	0/15
	Mista	7/15	5/13	2/13	5/15	1/6	4/15
ToSRV+TGVV (60)	ToSRV	8/15	5/13	10/13	9/15	3/6	11/15
	TGVV	0/15	0/13	1/13	0/15	0/6	0/15
	Mista	7/15	8/13	2/13	6/15	3/6	4/15
6		1x	2x	1x	2x	1x	2x
ToMoLCV+TGVV (20)	ToMoLCV	14/14	11/15	7/10	12/14	3/3	12/15
	TGVV	0/14	0/15	0/10	0/14	0/3	1/15
	Mista	0/14	4/15	3/10	2/14	0/3	2/15
ToMoLCV+TGVV (40)	ToMoLCV	12/14	11/15	7/10	12/14	3/3	10/15
	TGVV	0/14	0/15	0/10	0/14	0/3	0/15
	Mista	2/14	4/15	3/10	2/14	0/3	5/15
ToMoLCV+TGVV (60)	ToMoLCV	12/14	10/15	9/10	10/14	2/3	10/15
	TGVV	0/14	0/15	0/10	0/14	0/3	0/15
	Mista	2/14	5/15	1/10	4/14	1/3	5/15
7		1x	2x	1x	2x	1x	2x
ToSRV+ToMoLCV+TGVV (20)	ToSRV	3/15	2/11	1/5	3/15	6/15	5/15
	ToMoLCV	4/15	2/11	1/5	2/15	8/15	7/15
	TGVV	0/15	1/11	0/5	0/15	0/15	0/15
	Mista	8/15	6/11	3/5	10/15	1/15	3/15
ToSRV+ToMoLCV+TGVV (40)	ToSRV	3/15	2/11	1/5	2/15	6/15	5/15
	ToMoLCV	4/15	2/11	1/5	2/15	8/15	6/15
	TGVV	0/15	1/11	0/5	0/15	0/15	0/15
	Mista	8/15	6/11	3/5	11/15	1/15	4/15
ToSRV+ToMoLCV+TGVV (60)	ToSRV	3/15	2/11	0/5	2/15	4/15	5/15
	ToMoLCV	3/15	2/11	1/5	2/15	9/15	6/15
	TGVV	0/15	1/11	0/5	0/15	0/15	0/15
	Mista	9/15	6/11	4/5	11/15	2/15	4/15

<sup>1</sup>Tratamentos de inoculação mistas simultâneas de ToSRV+ToMoLCV (tratamento 4), ToSRV+TGVV (tratamento 5), ToMoLCV+TGVV (tratamento 6) e ToSRV+ToMoLCV (tratamento 7) avaliados aos 20, 40 e 60 dias pós-inoculação (dpi)

<sup>2</sup>Inoculações foram realizadas nas cultivares H9553 e Lanai, suscetíveis, e na cultivar Sena, resistente.

### **3.5.8 Tratamento 6 (ToMoLCV+TGVV) – cultivar Lanai**

O mesmo tratamento, quando avaliado na cultivar Lanai, resultou no mesmo padrão de perfis obtidos para a cultivar H9553. No primeiro ensaio, aos 20 e 40 dpi 70% (7/10) amostras apresentaram perfil de infecção simples de ToMoLCV, enquanto nenhum perfil simples de TGVV foi visualizado em todos os três períodos. Além disso, apenas 30% (3/10) das amostras apresentaram perfil de infecção mista com ToMoLCV e TGVV. Aos, 60 dpi houve aumento do número de amostras com perfil simples de ToMoLCV de 70% para 90% (9/10) e diminuição da frequência de amostras com perfil de infecção mista para de 30% para 10% (1/10) aos 60 dpi. Na segunda repetição do experimento, os resultados aos 20 e 40 dpi foram uniformes. Assim, obteve-se 85,7% (12/14) amostras apresentando perfil simples de ToMoLCV, nenhuma amostra apresentou perfil de TGVV e 14,2% (2/14) das amostras com perfis de infecção mista detectados. Aos 60 dpi, houve uma leve diminuição da porcentagem de amostras com perfil simples de ToMoLCV de 85% para 71% (10/14) e o aumento da porcentagem de amostras com perfil de infecção mista de 14,2% para 28,5% (4/14).

O progresso do acúmulo dos DNAs virais avaliado por meio da análise de perfis de restrição até o momento mostrou resultados semelhantes entre as duas cultivares suscetíveis, sugerindo novamente que ToMoLCV possui uma maior capacidade replicativa em relação ao TGVV, classificando ToMoLCV em AP1 e TGVV em AP3. Isto foi demonstrado pelo maior número de amostras com perfis simples de ToMoLCV detectadas, o que indica a predominância desse vírus nas plantas. Além disso, em casos que houve o aumento da porcentagem de amostras apresentando perfis de infecção

mista ao longo do tempo sugere que, em algumas condições, o acúmulo de TGVV ao longo do tempo é tardio quando comparado ao ToMoLCV.

### **3.5.9 Tratamento 6 (ToMoLCV+TGVV) – cultivar BRS Sena**

Na cultivar Sena, no primeiro experimento aos 20 e 40 dpi 100% (3/3) das plantas apresentaram perfis de infecção simples de ToMoLCV e 66,6% (2/3) de amostras mostraram perfil de ToMoLCV aos 60 dpi. Novamente, nenhum perfil simples de TGVV foi detectado em todos os períodos avaliados. Perfil de infecção mista foi observado apenas aos 60 dpi em 33,3% (1/3). No segundo experimento, foram observados consideravelmente um maior número de amostras em infecção simples de ToMoLCV em todos os períodos de avaliação. Aos 20 dpi, 80% (12/15) mostraram perfis de infecção simples por ToMoLCV, 6,6% (1/15) de perfil de TGVV e 13,3% (2/15) de amostras infectadas apresentando perfis de infecção mista. Aos 40 e 60 dpi, obteve-se 66,6% (10/15) de amostras apresentando perfis simples de ToMoLCV, nenhuma amostra com perfil simples de TGVV e 33,3% (5/15) amostras exibindo perfil de infecção mista.

Estes resultados sugerem a maior capacidade replicativa de ToMoLCV em relação a capacidade replicativa de TGVV em todas três cultivares avaliadas nesse experimento. Como ocorrido nos experimentos anteriores, em cultivares suscetíveis, observou-se a maior frequência de amostras com infecções mistas ao longo do tempo de infecção, o que demonstra novamente o acúmulo tardio de TGVV em algumas amostras.

### **3.5.10 Tratamento 7 (ToSRV+ToMoLCV+TGVV) – cultivar H9553**

Na primeira repetição do experimento, na cultivar H9553, obteve-se aos 20 e 40 dpi 20% (3/15) das amostras apresentando perfil simples de ToSRV, 26,6% (4/15) com perfil simples de ToMoLCV e 53,3% (8/15) com perfil de infecção mista. Aos 60 dpi,

obteve-se perfis de ToSRV e ToMoLCV em 20% (3/15) das amostras. Além disso, nesse mesmo período, 60% (9/15) das amostras apresentaram perfil de infecção mista. Nenhuma amostra apresentou perfil de infecção simples de TGVV. Na segunda repetição do experimento, a frequência de amostras em infecção simples seguiu a mesma tendência que a primeira repetição do experimento. Entretanto, houve uma menor porcentagem de amostras em infecção mista quando comparada a primeira repetição do experimento. Curiosamente, os resultados obtidos aos 20 dpi se manteve constante aos 40 e 60 dpi. Assim, 18,1% (2/11) das amostras apresentaram perfil simples de ToSRV e ToMoLCV, apenas 9% (1/11) das amostras com perfil simples de TGVV e 54,4% (6/11) apresentaram perfil de infecção mista.

Na primeira repetição do experimento, amostras com perfis simples de cada begomovírus, com exceção de TGVV foram observadas. Na segunda repetição, pelo menos uma amostra com todos os perfis dos vírus avaliados foi detectada. Nesses casos, pode-se se observar o acúmulo individual de cada vírus o que possivelmente está relacionado a competição e aptidão replicativa. Porém, a partir desses resultados, individualmente, foi possível determinar a aptidão replicativa individual apenas do begomovírus TGVV, classificado como AP3. Assim, observou-se a maior porcentagem de amostras em perfis de infecção mista predominantemente entre ToSRV e ToMoLCV, classificando-os como AP2.

#### **3.5.11 Tratamento 7 (ToSRV+ToMoLCV+TGVV) – cultivar Lanai**

A partir das análises dos resultados da primeira repetição do tratamento 7, na cultivar Lanai, onde foram inoculados simultaneamente os begomovírus ToSRV, ToMoLCV e TGVV, aos 20 e 40 dpi 20% (1/5) das amostras apresentaram perfil simples de ToSRV ou ToMoLCV, enquanto que 60% (3/5) apresentaram perfil de infecção mista. Aos 60 dpi, nenhuma amostra com perfil de ToSRV foi detectada,

elevando-se a taxa para infecção mista, passando de 60% para 80% (4/5). Nenhuma amostra com perfil simples de TGVV foi detectada em todos os períodos avaliados. Conduzido com um maior número de plantas, os resultados obtidos na segunda repetição do experimento corroboram os dados obtidos na primeira repetição do experimento. Aos 20 dpi, 20% (3/15) das amostras apresentaram perfil de infecção simples de ToSRV, 13,3% (2/15) perfil de ToMoLCV e 66,6% (10/15) das amostras apresentaram perfil de infecção mista. Aos 40 e 60 dpi, houve uma leve diminuição de amostras com perfil simples de ToSRV de 20% para 13,3% (2/15), e o aumento da porcentagem de amostras com infecção mista de 66,6% para 73,3% (11/15). Enquanto isso, a porcentagem de amostras apresentando perfil simples de ToMoLCV permaneceu constante em todos os períodos avaliados. No geral, amostras com perfil de infecção mista ocorreram predominantemente com perfil misto de ToMoLCV e ToSRV.

Esses resultados corroboram aqueles obtidos quando avaliados na cultivar H9553. No geral, observou-se que TGVV apresenta acúmulo de DNA não detectável, demonstrados pela não detecção de perfis individuais ou em infecção mista. Até o momento, os resultados obtidos em todos os tratamentos com TGVV demonstram claramente uma baixa capacidade replicativa de TGVV em relação a ToSRV e ToMoLCV. A alta porcentagem de amostras em infecção mista, predominantemente entre ToMoLCV e ToSRV, classifica-os com AP2 quando avaliado na cultivar Lanai.

#### **3.5.12 Tratamento 7 (ToSRV+ToMoLCV+TGVV) – cultivar BRS Sena**

Quando avaliado o tratamento 7 na cultivar Sena, a partir dos resultados da primeira repetição do experimento, pode-se observar que 40% (6/15) das amostras apresentaram perfil simples de ToSRV, 53,3% (8/15) com perfil de ToMoLCV e 6,6% (1/15) das amostras foram identificados como perfil de infecção mista. Nenhum perfil simples de TGVV foi detectado em todos os períodos avaliados. Na segunda repetição

do experimento, observou-se o mesmo padrão de resultado da repetição anterior desse experimento. Aos 20 dpi, 33,3% (5/15) das amostras apresentaram perfil de ToSRV, 46,7% (7/15) com perfil de ToMoLCV e (3/15) das amostras com perfil de infecção mista. Novamente, nenhuma amostra apresentou perfil simples de TGVV.

Em contraste com os resultados obtidos para o mesmo tratamento nas cultivares suscetíveis, na cultivar Sena observou-se uma menor porcentagem de amostras apresentando perfis de infecção mista, quando comparada as cultivares suscetíveis e conseqüentemente uma maior porcentagem de amostras em infecção simples de ToSRV e ToMoLCV. Essa ocorrência possivelmente está relacionada com a alta competitividade entre ToSRV e ToMoLCV. Assim, os resultados obtidos quando avaliados na cultivar Sena contrastam com os resultados obtidos nas cultivares suscetíveis, onde obteve-se uma maior porcentagem de amostras em infecção mista.

### **3.6. Tratamentos em infecção mista com os begomovírus inoculados não simultaneamente**

Baseado nos resultados do capítulo 2 e partindo do pressuposto da existência de diferenças na aptidão viral podem estar resultando na dinâmica de espécies predominante, principalmente entre ToSRV e ToMoLCV e atuando até mesmo no desaparecimento de begomovírus, antes prevalentes como o TGVV, foram estabelecidos os tratamentos 8, 9 e 10 (Figura 3). Para esses tratamentos, optou-se realizar primeiramente a inoculação do vírus que possivelmente possuía uma aptidão replicativa inferior. Assim, no tratamento 8 foi inoculado TGVV previamente, de modo que esse obtivesse uma vantagem competitiva sobre ToSRV, inoculado 10 dpi. No tratamento 9, novamente o TGVV foi inoculado previamente, e 10 dpi foi inoculado o ToMoLCV. Por fim, para o tratamento 10 foi inoculado previamente ToSRV e posteriormente (10 dpi) inoculado o ToMoLCV. A prévia inoculação dos begomovírus

TGVV e ToSRV foi realizada com o intuito de permitir a ampla infecção e distribuição do vírus na planta e avaliar se mesmo com essa vantagem eles mostrariam uma capacidade replicativa inferior aos vírus inoculados posteriormente.

Para esses tratamentos, a avaliação foi realizada em quatro tempos diferentes. Primeiramente, foi inoculado os begomovírus ToSRV ou TGVV, de acordo com o tratamento. No tempo 1 (10 dpi) foi realizada a avaliação, onde se obteve apenas perfis de infecção simples. Após essa avaliação, inoculou-se o segundo vírus (tempo 2). A partir daí, as avaliações foram realizadas aos 20, 40 e 60 dpi.

### **3.6.1 Tratamento 8 (T1-TGVV-10dpi, T2-ToSRV) – Cultivar H9553**

Na primeira repetição do experimento a avaliação no tempo 1 apresentou 100% (15/15) das amostras com perfil simples de TGVV. A partir do tempo 2, aos 20 dpi 33,3% (5/15) das amostras apresentaram perfil simples de TGVV, 13,3% (2/15) perfil de ToSRV e 53,3% (8/15) perfis de infecção mista. Aos 40 e 60 dpi, houve uma diminuição da porcentagem de amostras com perfil simples de TGVV de 33,3% para 13,3% (2/15), enquanto que a porcentagem de amostras com perfil de ToSRV se manteve constante. A porcentagem de amostras em infecção mista aumentou de 53,3% para 73,3% (11/15) aos 60 dpi. Na segunda repetição do experimento, 100% das plantas apresentaram perfis de infecção de TGVV no tempo 1. No tempo 2, aos 20 dpi, 46,6% (7/15) das amostras apresentaram perfil simples de TGVV e perfil de infecção mista, enquanto que 6,6% (1/15) apresentaram perfil simples de ToSRV. Aos 40 dpi, o número de amostras com perfil simples de TGVV diminuiu de 46,4% aos 20 dpi, para 33,3% (5/15), enquanto a porcentagem de amostras em infecção mista aumentou de 46,6% para 60% (9/15). Progressivamente, a porcentagem de amostras apresentando perfil de infecção simples de TGVV continuou a cair, enquanto que a porcentagem de amostras em infecção mista aumentou. Assim, a porcentagem de amostras em infecção simples

de TGVV diminuiu de 33,3% para 13,3% (2/15) e a porcentagem de amostras em infecção mista passou de 60%, aos 40 dpi, para 80% (12/15) aos 60 dpi.

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar uma maior porcentagem de amostras em infecção mista, sendo crescente ao longo do tempo, e a consequente diminuição da porcentagem de amostras com perfil simples de TGVV. Isso demonstra que, apesar da vantagem conferida com a pré-inoculação de TGVV, a acumulação de ToSRV ocorre e em algumas plantas suplanta a acumulação do DNA de TGVV no decorrer da infecção.

### **3.6.2 Tratamento 8 (T1-TGVV-10DPI, T2-ToSRV) – Cultivar Sena**

Na primeira repetição do experimento, no tempo 1, 100% das amostras apresentam perfil de infecção simples de TGVV. No tempo 2, aos 20 dpi, 80% (12/15) das amostras apresentaram perfil simples de TGVV, nenhuma amostra com perfil simples de ToSRV e 20% (3/15) das amostras com perfil de infecção mista. Aos 40 e 60 dpi, observou-se a diminuição de amostras com perfil simples de TGVV de 80% para 40% (6/15), 13,3% de amostras com perfil simples de ToSRV e o aumento da porcentagem de amostras em infecção mista de 20% para 46,6% (7/15). Na segunda repetição do experimento, no tempo 1, 100% das amostras foram infectadas com TGVV, apresentando perfil de infecção simples. No tempo 2, aos 20 dpi, 66,6% (10/15) das amostras apresentaram perfil simples de TGVV, nenhuma amostra com perfil simples de ToSRV e 33,3% (5/15) com perfil de infecção mista. Aos 40 e 60 dpi, a porcentagem de amostras apresentando perfil simples de TGVV se manteve constante a observada aos 20 dpi. Além disso, houve a detecção de 6,6% (1/15) das amostras com perfil simples de ToSRV. Houve também uma sutil redução da porcentagem de amostras com perfil de infecção mista, em relação aos 20 dpi, de 33,3% para 26,6% (4/15) das amostras.

No geral, os resultados obtidos para o tratamento 8 na cultivar Sena, na primeira repetição do experimento, se assemelham aos obtidos na cultivar H9553. Entretanto, na cultivar H9553, observou-se uma maior porcentagem de amostras em infecção mista, em relação a amostras com perfil de infecção simples, desde o primeiro período de avaliação. Esses resultados demonstram que apesar da vantagem conferida a TGVV, o acúmulo do DNA de ToSRV alcançou o de TGVV na maioria das amostras quando avaliado na cultivar H9553. Entretanto, na cultivar Sena, na primeira repetição do experimento, a maior porcentagem de amostras em infecção mista ocorreu a partir dos 40 dpi. Isso sugeriu uma limitação na acumulação do ToSRV. Na segunda repetição do experimento, observou-se que o acúmulo de ToSRV não conseguiu se igualar ao acúmulo do DNA de TGVV na maioria das amostras resultando em menor número de plantas com infecção simples com ToSRV e também de infecção mista. Isso sugere que existe uma diferença na taxa de multiplicação de TGVV e ToSRV nos diferentes materiais e que há uma vantagem para o vírus infectar primeiro uma planta, antes de um segundo vírus, mesmo que o segundo seja mais competitivo que o primeiro.

**Tabela 4.** Identificação do número de plantas apresentando perfis de restrição por MspI discriminantes de cada vírus a partir de DNA viral amplificado por RCA em plantas inoculadas inicialmente com um vírus e após 10 dias com um segundo vírus.

Tratamento <sup>1</sup>			H9553 <sup>2</sup>		Sena			
8		Tempo/(dpi)	Perfil Viral	1x	2x	1x	2x	
T1-TGVV-10DPI-T2-ToSTV		1 (10)	TGVV	15/15	15/15	15/15	15/15	
		2 (20)	TGVV	5/15	7/15	12/15	10/15	
			ToSRV	2/15	1/15	0/15	0/15	
			Misto	8/15	7/15	3/15	5/15	
		3 (40)	TGVV	2/15	5/15	6/15	10/15	
			ToSRV	2/15	1/15	2/15	1/15	
			Misto	11/15	9/15	7/15	4/15	
		4 (60)	TGVV	2/15	2/15	6/15	10/15	
			ToSRV	2/15	1/15	2/15	1/15	
			Misto	11/15	12/15	7/15	4/15	
		Tratamento			H9553		Sena	
		9		Tempo/(dpi)	Perfil Viral	1x	2x	1x
T1-TGVV-10DPI-T2-ToMoLCV		1 (10)	TGVV	15/15	15/15	15/15	13/13	
		2 (20)	TGVV	8/15	2/15	3/15	5/13	
			ToMoLCV	0/15	10/15	10/15	7/13	
			Misto	7/15	3/15	2/15	1/13	
		3 (40)	TGVV	0/15	2/15	3/15	1/13	
			ToMoLCV	11/15	10/15	10/15	10/13	
			Misto	4/15	3/15	2/15	2/13	
		4 (60)	TGVV	0/15	2/15	3/15	1/13	
			ToMoLCV	10/15	11/15	12/15	11/13	

		Misto	5/15	2/15	0/15	1/13
Tratamento			H9553		Sena	
10	Tempo/(dpi)	Perfil Viral	1x	2x	1x	2x
T1-ToSRV-10DPI-T2-ToMoLCV	1 (10)	ToSRV	15/15	15/15	15/15	10/10
	2 (20)	ToSRV	3/15	10/15	12/15	7/10
		ToMoLCV	0/15	3/15	0/15	0/10
		Misto	12/15	2/15	3/15	3/10
	3 (40)	ToSRV	2/15	4/15	12/15	7/10
		ToMoLCV	0/15	1/15	0/15	1/10
		Misto	13/15	10/15	3/15	2/10
	4 (60)	ToSRV	2/15	3/15	10/15	7/10
		ToMoLCV	0/15	2/15	0/15	1/10
		Misto	13/15	10/15	5/15	2/10

<sup>1</sup>Tratamentos de inoculação mistas não simultâneas de ToSRV+ToMoLCV (tratamento 4), ToSRV+TGVV (tratamento 5), ToMoLCV+TGVV (tratamento 6) e ToSRV+ToMoLCV (tratamento 7) avaliados no tempo 1 aos 10 dpi e no tempo 2 aos 20, 40 e 60 dias pós-inoculação (dpi)

<sup>2</sup>Inoculações foram realizadas nas cultivares H9553 (suscetível), e na cultivar Sena (resistente)

### **3.6.3 Tratamento 9 (T1-TGVV-10DPI, T2-ToMoLCV) – Cultivar H9553**

No tempo 1, 100% (15/15) das amostras apresentaram perfil simples de TGVV na primeira repetição do tratamento. No tempo 2, aos 20 dpi, 53,3% (8/15) das amostras continuaram a apresentar perfil simples de TGVV. Nesse período nenhuma amostra com perfil simples de ToMoLCV foi detectada. Além disso, 46,6% (7/15) das amostras apresentaram perfil de infecção mista. Curiosamente, aos 40 dpi, houve uma mudança brusca na porcentagem de amostras apresentando perfil simples de TGVV de 53,3% das amostras para 0%; aumentando da porcentagem de amostras com perfil de ToMoLCV, anteriormente não detectado, para 73,3% (11/15) e a consequente redução da porcentagem de amostras em infecção mista de 46,6% para 26,6% (4/15). Aos 60 dpi, novamente nenhuma amostra com perfil simples de TGVV foi detectada. A porcentagem de amostras com perfil simples de ToMoLCV passou de 73,3% para 66,6% (10/15), predominando assim, o número de amostras com esse perfil. Por fim, a porcentagem de amostras com perfil de infecção mista aumentou sutilmente de 26,6% para 33,3% (5/15). Na segunda repetição do experimento, no primeiro período de infecção avaliado, aos 20 dpi, observou-se a predominância da acumulação do DNA de ToMoLCV em relação a acumulação de TGVV. Assim, aos 20 e 40 dpi 13,3% (2/15) das amostras apresentaram perfil simples de TGVV, 66,6% (10/15) amostras com perfil simples de ToMoLCV e 20% (3/15) das amostras apresentaram perfil de infecção mista. Aos 60 dpi, a porcentagem de amostra apresentando perfil simples de TGVV se manteve constante aos períodos anteriores, enquanto houve o aumento da porcentagem de amostras com perfil simples de ToMoLCV passando de 66,6% para 73% (11/15).

Os resultados da primeira repetição do experimento sugerem que, aos 20 dpi, na maioria das amostras, a acumulação de ToMoLCV alcançou a acumulação de TGVV. Neste período, nas amostras que apresentaram perfil simples de TGVV, o DNA de ToMoLCV ainda não acumulou o suficiente para ser detectado. Aos 40 e 60 dpi, nenhum perfil simples de

TGVV foi detectado nas amostras. Quando presente, o perfil de TGVV foi detectado em infecção mista o que demonstra semelhante acumulação com o DNA de ToMoLCV. Predominantemente, amostras com perfil simples de ToMoLCV foram maioria a partir dos 40 dpi, o que indica que a acumulação de ToMoLCV predominou em relação a acumulação de TGVV. Em contraste com a segunda repetição do experimento, a maior porcentagem de amostras com perfil simples de ToMoLCV ocorreu a partir do início da infecção, aos 20 dpi. A partir desses resultados sugere-se que a aptidão replicativa de ToMoLCV é maior que de TGVV.

#### **3.6.4 Tratamento 9 (T1-TGVV-10DPI, T2-ToMoLCV) – Cultivar Sena**

No tempo 1, 100% (15/15) das plantas foram infectadas apresentando assim apenas perfis simples de TGVV. No tempo 2, aos 20 dpi 80% (12/15) das amostras apresentavam perfil de infecção simples por TGVV, enquanto 0% com perfil de infecção por ToMoLCV e 20% (3/15) com infecção mista. Aos 40 e 60 dpi, 40% (6/15) das amostras ainda apresentavam perfil simples de TGVV, sugerindo que até esse período, nessas amostras, a acumulação de TGVV permanecia maior que ToMoLCV. Infecção simples por ToMoLCV foi detectado em 13,3% (2/15) e a taxa de infecção mista aumentou para 46,7% (7/15). Na segunda repetição do experimento, todas as plantas inoculadas 100% (13/13) foram infectadas apresentando perfil simples de TGVV. No tempo 2, aos 20 dpi obteve-se 38,4% (5/13) amostras apresentando perfil simples de TGVV, 53,8% (7/13) com perfil simples de ToMoLCV e 7,6% (1/13) das amostras com perfil de infecção mista. Aos 40 dpi, a porcentagem de amostras em infecção simples de TGVV diminuiu de 38,4% para 7,9% (1/13), enquanto que houve o aumento da porcentagem de amostras com perfil simples de ToMoLCV de 53,8% para 76,9% (10/13) e 15,3% (2/13) em amostras com perfil de infecção mista. Aos 60 dpi a porcentagem de amostras apresentando perfil simples de TGVV continuou o mesmo que o período anterior. Além disso, houve o aumento da porcentagem de

amostras com perfil simples de ToMoLCV de 76,9% para 84,6% (11/13) e a diminuição da porcentagem de amostras em infecção mista, passando de 15,3% para 7,6% (1/13).

Na primeira repetição, no tempo 2, aos 20 dpi, ainda houve uma alta porcentagem de amostras que permaneciam com um alto acúmulo de DNA de TGVV apresentando perfil simples desse vírus, o que demonstra que o acúmulo de DNA de ToMoLCV não se igualou ou ultrapassou o de TGVV. Porém, nesse mesmo período, a mesma porcentagem de amostras apresentou perfil simples de ToMoLCV, demonstrando que nessas amostras a acumulação de ToMoLCV superou a de TGVV. Além disso, houve uma baixa porcentagem de amostras com perfil de infecção mista. Por fim, com o decorrer da infecção a porcentagem de amostras com perfil simples de ToMoLCV aumentou claramente. No geral, a partir dos resultados obtidos na segunda repetição do experimento observou-se que desde a primeira avaliação do tempo 2, aos 20 dpi na maioria das amostras a acumulação de ToMoLCV ultrapassou a acumulação de TGVV, o que não aconteceu na primeira repetição do experimento. Porém, uma porcentagem considerável de amostras com perfil simples de TGVV foi detectada. A maior porcentagem de amostras com perfis de ToMoLCV aumentou ao longo do tempo, aos 40 e 60 dpi, demonstrando que com o decorrer da infecção, o acúmulo de ToMoLCV aumentou, comparada a TGVV. Esses resultados sugerem fortemente que ToMoLCV apresenta uma aptidão replicativa maior que TGVV.

### **3.6.5 Tratamento 10 (T1-ToSRV-10DPI, T2-ToMoLCV) – Cultivar H9553**

No tratamento 10, 100% (15/15) das plantas inoculadas com ToSRV foram infectadas. No tempo 2, aos 20 dpi 20% (3/15) amostras continuaram apresentando perfil simples de ToSRV, enquanto que nenhuma amostra apresentou perfil simples de ToMoLCV. Interessantemente, já no primeiro período de avaliação no tempo 2, alta porcentagem de amostras em infecção mista foi detectada em 80% (12/15) das amostras. No decorrer da infecção, houve um sutil aumento da porcentagem de amostras em infecção mista aos 40 e 60

dpi de 80% para 86,6% (13/15) e diminuição de amostras com perfil simples de ToSRV de 20% para 13,3% (2/15). Novamente, nenhuma amostra com perfil simples de ToMoLCV foi detectada. Ao contrário do que aconteceu no tempo 2, na segunda repetição do experimento, aos 20dpi, uma porcentagem de amostras com perfil simples de ToSRV foi observada em 66,6% (10/15) das amostras. Além disso, 20% (3/15) das amostras com perfil simples de ToMoLCV foram observadas e 13,3% (2/15) apresentaram perfil de infecção mista. Aos 40 dpi a porcentagem de amostras em infecção simples de ToSRV diminuiu drasticamente de 66,6% para 26,6% (4/15). Além disso, observou-se o aumento da porcentagem de amostras em infecção mista de 13,3% para 66,6% (10/15) das amostras e uma diminuição de amostras apresentando perfil simples de ToMoLCV de 20% para 6,6% (1/15). Aos 60 dpi, 20% (3/15) das amostras apresentaram perfil simples de ToSRV, 13,3% (2/15) com perfil simples de ToMoLCV e 66,6% (10/15) das amostras apresentam perfil de infecção mista.

Baseado nos resultados obtidos a partir da primeira repetição do experimento, observou-se que desde o primeiro ao último período avaliado, houve a uniformidade do acúmulo de ToSRV e ToMoLCV, demonstrando pela alta porcentagem de amostras em infecção mista. Na segunda repetição do experimento, o mesmo foi observado. Entretanto, a maior porcentagem de amostras em infecção simples de ToSRV, aos 20 dpi, demonstra a sua predominância e o retardamento do acúmulo de ToMoLCV. No decorrer da infecção, observou-se a uniformidade do acúmulo de ToSRV e ToMoLCV demonstrando novamente pelo aumento da porcentagem de amostras em infecção mista aos 40 e 60 dpi. Assim, pode-se inferir que ToMoLCV apresentou uma alta capacidade replicativa e se equiparou ao ToSRV que tinha a vantagem da infecção prévia sistêmica.

### **3.6.6 Tratamento 10 (T1-ToSRV-10DPI, T2-ToMoLCV) – Cultivar Sena**

No tempo 1, 100% (15/15) das plantas foram infectadas apresentando perfil simples de ToSRV quando avaliado aos 10 dpi. No tempo 2, aos 20 e 40 dpi, 80% (12/15) das amostras

apresentaram perfil simples de ToSRV, nenhuma amostra apresentou perfil simples de ToMoLCV e 20% (3/15) das amostras apresentaram perfil de infecção mista. Aos 60 dpi, houve a diminuição da porcentagem de amostras em infecção simples de ToSRV de 80% para 66,6% (10/15) e o consequente aumento da porcentagem de amostras apresentando perfil de infecção mista de 20% para 33,3% (5/15). Novamente, nenhuma amostra apresentando perfil simples de ToMoLCV foi detectada. Na segunda repetição do experimento, o mesmo padrão de resultado foi observado. No tempo 1, aos 10dpi, 100% das plantas inoculadas foram infectadas. No tempo 2, aos 20 dpi, 70% (7/10) das amostras apresentaram perfil simples de ToSRV, nenhuma amostra com perfil simples de ToMoLCV e 30% (3/10) com perfil de infecção mista. Aos 40 e 60 dpi, a mesma porcentagem de amostras com perfil simples de ToSRV no período dos 20 dpi foi observada. Além disso, 10% (1/10) das amostras que anteriormente apresentava perfil de infecção mista, passou a apresentar perfil simples de ToMoLCV e consequentemente, houve uma diminuição da porcentagem de amostras em infecção mista de 30% para 20% (2/10).

Os resultados obtidos no tratamento 10 quando avaliado na cultivar Sena, demonstram que, a vantagem da infecção sistêmica prévia oferecida ao ToSRV, foi necessária para a manutenção da predominância da acumulação do seu DNA em relação ao DNA de ToMoLCV, inoculado posteriormente. Isso foi demonstrado pela alta porcentagem de amostras que mantiveram a acumulação uniforme de ToSRV ao longo do tempo de avaliação.

#### 4. DISCUSSÃO

Os begomovírus atualmente constituem o maior grupo dos vírus que infectam plantas. No Brasil, neste grupo encontram-se importantes patógenos responsáveis por causar perdas econômicas em diversas culturas agrônomicas, sendo que o tomateiro é uma das principais culturas afetadas pelo complexo de espécies de begomovírus. Desde a introdução da mosca-branca MEAM1 (Lourenção & Nagai, 1994; França *et al.*, 1996), os danos econômicos causados pelos begomovírus têm se agravado. A alta incidência de begomovírus em tomateiro tem impossibilitado o uso de cultivares suscetíveis de tomateiro para consumo *in natura* nas principais regiões produtoras do país (Inoue-Nagata *et al.*, 2016). Entretanto, mesmo com o uso de cultivares moderadamente resistentes a begomovírus, relatos de alta incidência de begomovírus em cultivos de tomate são frequentes (Macedo *et al.*, 2014).

Os experimentos conduzidos nesse estudo foram realizados para avaliar a capacidade replicativa de clones de três espécies de begomovírus, espécies prevalentes ou epidemiologicamente importantes e que poderão ser relacionados com a predominância da espécie de begomovírus no País. Foram selecionadas as espécies de begomovírus com base em estudos de diversidade de espécies e em resultados observados no capítulo 2 desta tese. Esses resultados indicaram a prevalência dos begomovírus ToSRV e ToMoLCV. Além disso, o begomovírus TGVV, vírus predominante no passado, atualmente não é mais detectado na área de estudo onde foi conduzido este trabalho. Pode-se observar, a partir dos resultados obtidos, que ocorre uma alternância de prevalência de espécies, demonstrada pela diferença na taxa de detecção ao longo do tempo. Entre os fatores responsáveis pela alta diversidade de espécies de begomovírus supracitados, acredita-se que o panorama de espécies prevalentes e o desaparecimento de alguns begomovírus são resultantes principalmente de diferenças na capacidade replicativa (*fitness*) desses vírus associada a mudanças no meio ambiente como por exemplo a troca de tomateiros suscetíveis para tomateiros resistentes. Assim, baseado

nessas duas hipóteses optou-se escolher os três begomovírus, acima citados, para avaliar, experimentalmente, o desempenho de cada vírus em cultivares de tomateiros suscetíveis e resistente.

A predominância de ToSRV e ToMoLCV é corroborada por estudos de diversidade de begomovírus em diversas regiões do Brasil (e.g., Fernandes *et al.*, 2008; Mituti *et al.*, 2019). Entretanto, o desaparecimento do begomovírus TGVV foi algo intrigante e outras possíveis causas desta suposta não detecção de TGVV devem ser levadas em consideração isoladamente ou em conjunto para se compreender a fundo a distribuição desses begomovírus no ambiente agrícola. Considerando os fatores: (i) experimentais; (ii) biológicos; e (iii) ambientais capazes de influenciar na análise da diversidade viral, é possível enumerar alguns possíveis pontos relevantes e que precisam ser levados em conta para uma análise criteriosa: i) falhas na amostragem e na ferramenta de sequenciamento utilizada neste trabalho. É possível que o esforço amostral foi pequeno e houve tendenciosidade no modo de coleta das amostras. No entanto, acredita-se que uma coleta de 107-129 amostras de pelo menos 10 lavouras por grupo em uma das principais regiões produtoras de tomate do Distrito Federal seja uma amostragem robusta e representativa. Os sintomas de infecção severa ou suave são bem conhecidos pela equipe e plantas com qualquer suspeita de infecção foram coletadas, incluindo aqueles típicos a distintos. Outro ponto importante, o sequenciamento de alto desempenho é uma técnica altamente sensível, com baixa chance de escape na detecção do DNA viral. (ii) Fatores biológicos além dos examinados aqui neste trabalho podem ser destacados, entre eles a eficiência de transmissão pelo vetor. A transmissão dos begomovírus é inteiramente dependente do vetor. Macedo *et al.* (2015) demonstraram a menor eficiência de transmissão de TGVV em relação a ToSRV. A diferença na eficiência de transmissão desses begomovírus pode ter resultado, ao longo dos anos, na seleção de ToSRV e no desaparecimento de TGVV na área de estudo. (iii) Mudanças em fatores climáticos podem

afetar significativamente populações virais. Frequentemente, essas mudanças resultam em favorecimento de epidemias virais, mas ocasionalmente podem causar efeito oposto, dependendo do tipo de patossistema e circunstância (Jones *et al.*, 2012). Partindo do pressuposto que as mudanças climáticas são uma realidade, existe a possibilidade de TGVV ter sido desfavorecido com as condições climáticas recentes. Essa questão não foi abordada neste estudo.

Para a realização do experimento de aptidão, foram selecionadas cultivares de crescimento determinado suscetíveis H9553 e Lanai (cultivar de ciclo curto) e a cultivar resistente BRS Sena. A cultivar H9553 representa a cultivar de maior área plantada para processamento do país. A cultivar Lanai apresenta algumas características importantes para a realização desse estudo por possuir um ciclo de vida curto e ter um porte pequeno, o que facilita o seu manuseio. Além disso, a cultivar Lanai é reconhecida como altamente suscetível a infecção por geminivírus, sendo considerada uma excelente planta modelo para o estudo desse grupo de vírus (Rajabu *et al.*, 2018). Finalmente, a cultivar BRS Sena representa uma cultivar típica com moderado nível de resistência a begomovírus (Quezado-Duval *et al.*, 2014). Até o momento não se sabe qual gene ou quais genes de resistências foram introgrididos nessa cultivar. Entretanto, acredita-se que o gene *Ty-1* esteja presente nessa cultivar. Ensaio para a caracterização dos genes de resistência presentes na cultivar Sena serão conduzidos no futuro.

A técnica de RCA tem sido utilizada com frequência para a clonagem e detecção de DNAs de geminivírus (Inoue-Nagata *et al.*, 2004). A combinação entre a RCA e RFLP resulta em uma ferramenta altamente reprodutível e útil para o diagnóstico de doenças causadas por geminivírus. O baixo custo e rapidez de execução, fácil avaliação dos resultados e a amplificação de todos os componentes circulares de DNA infectantes sem o conhecimento prévio são vantagens características (Haible *et al.*, 2006). A RCA amplifica o DNA presente

em uma amostra de modo aleatório e uniforme. Desde modo, em uma amostra com diferentes espécies virais, em concentração semelhantes, a amplificação ocorre de forma igual, entretanto em casos de diferentes concentrações virais, o DNA em maior concentração será amplificado predominantemente em relação ao DNA em baixa concentração. Por apresentar estas características, a combinação entre as técnicas de RCA/RFLP foi escolhida para avaliação da capacidade replicativa por meio da análise do progresso do acúmulo viral ao longo do tempo. Apesar das vantagens das técnicas supracitadas, um fator limitante é a impossibilidade de realizar a quantificação do DNA viral. A partir das análises dos resultados obtidos, foi possível inferir apenas a acumulação relativa do DNA dos três begomovírus avaliados.

No presente estudo, o experimento conduzido para avaliar a aptidão replicativa de três begomovírus contou com um total de 11 tratamentos (Figura 3). Os tratamentos 1 a 3 foram os controles positivos do experimento, estes foram compostos por plantas em infecção simples. Demonstrou-se a alta taxa de plantas infectadas individualmente com cada vírus, essencial para se conduzir este ensaio. Esse resultado foi alcançado devido a realização de duas inoculações em um período de 24h entre uma inoculação e a outra. A taxa máxima de infecção foi obtida também para o tratamento com a cultivar resistente. Esses resultados demonstram a eficiência do método de inoculação utilizado. Vale ressaltar que os tomateiros com resistência a begomovírus possuem graus diversos de resistência/tolerância, porém nenhuma cultivar até o momento foi desenvolvida a fim de proporcionar imunidade a planta.

Em tratamentos realizados com inoculações simultâneas, uma taxa replicativa semelhante foi obtida entre ToSRV e ToMoLCV (tratamento 4), considerados como AP2. Nas cultivares suscetíveis observou-se, na maioria dos casos, alta taxa de amostras com perfil de infecção mista, o que demonstra a capacidade de replicação semelhante entre esses dois begomovírus e uma permissividade do hospedeiro (Tabela 3). Esse mesmo tratamento quando

avaliado na cultivar Sena, observou-se uma menor porcentagem de amostras em infecção mista de ambos begomovírus, sugerindo uma maior competição interespecífica. Em casos de amostras apresentando perfil simples, ToMoLCV foi mais observado em H9553, enquanto ToSRV predominou em Lanai. Já em Sena, perfil simples de ToMoLCV foi mais numeroso partindo de 42,9% aos 20 dpi e alcançando 52,4% aos 60 dpi.

Os resultados citados acima sugerem que (i) existe alta variação de resposta a inoculação mista de planta para planta e de cultivar para cultivar; (ii) parece haver uma tendência de infecção mista em plantas suscetíveis e infecção simples na moderadamente resistente; (iii) no caso de inoculação de ToSRV e ToMoLCV, um maior número de plantas encontrava-se infectadas predominantemente por ToMoLCV. Quando as plantas foram infectadas sistemicamente por ToSRV com 10 dias de antecedência a ToMoLCV (Tabela 4), foi possível verificar que na cultivar suscetível H9553, a grande maioria das plantas apresentava perfil de infecção mista crescente ao longo do tempo de incubação e, em cultivar resistente, ToMoLCV não conseguiu suplantá-lo. A alta taxa de infecção mista comprova que o inóculo de ToMoLCV estava adequado para o ensaio. A aptidão replicativa semelhante de ToSRV e ToMoLCV e superior a outros begomovírus como, o TGVV pode estar entre os fatores que condicionam a dinâmica de distribuição e prevalência desses begomovírus. Além disso, outros fatores relacionados a esse panorama também serão discutidos.

Estudos de diversidade demonstram a predominância de ToSRV e ToMoLCV nas principais regiões produtoras de tomate do país. Observa-se a prevalência de ToSRV em regiões como Sudeste e Centro-Oeste, enquanto que ToMoLCV predominava em regiões mais quentes, como o Nordeste do país (Fernandes *et al.*, 2008; Inoue-Nagata *et al.*, 2016, Mituti *et al.*, 2019). A predominância de ToMoLCV em regiões de clima quente levanta a hipótese de que esse vírus é melhor adaptado a temperaturas altas. Entretanto, a partir dos

resultados do capítulo 2 desta tese demonstrou-se que a ~17 anos atrás ToMoLCV foi detectado em uma baixa taxa de amostras infectadas no Distrito Federal. Entretanto, com o passar dos anos, houve o aumento progressivo da taxa de detecção de amostras infectadas com este vírus. Esses resultados sugerem que além de sua ampla dispersão do Nordeste, onde a alta temperatura predomina, houve uma migração para a região Centro-Oeste, com temperaturas mais amenas. Atualmente, ToMoLCV predomina junto a ToSRV. Isso demonstra sua adaptabilidade a região Centro-Oeste do país.

Até o momento, não existem trabalhos relacionados a aptidão de transmissão de ToMoLCV comparada a outros begomovírus. Desse modo, não é possível relacionar a sua predominância em relação a eficiência de transmissão. Entretanto, para ToSRV a eficiência de transmissão já foi relatada como superior a outros begomovírus (*Macedo et al., 2015; Nogueira, 2018*). Acredita-se que em um possível ensaio de avaliação da eficiência de transmissão entre ToSRV e ToMoLCV resultará em taxas de transmissão semelhante entre os dois begomovírus.

É possível que variações de temperatura ambiental tenham impacto na predominância destas duas espécies. Para vírus de RNA, há trabalhos demonstrando a ocorrência de maior acumulação de DNA viral em temperaturas específicas. Por exemplo, *Obrepalska-Stepłowska et al. (2015)* relataram a maior capacidade replicativa de peanut stunt virus (PSV) em plantas submetidas a condições de temperatura a 21°C comparada a plantas submetidas a condições de temperatura a 27°C. Uma das hipóteses levantadas seria o efeito de temperaturas altas na eficiência de proteínas supressoras de silenciamento gênico. Entretanto, trabalhos têm demonstrado que a temperatura não afeta a eficiência de ação dessas proteínas (*Del Toro et al., 2015*). Apesar disso, é esperado que o efeito da temperatura em proteínas virais pode variar de um vírus para o outro.

Quando avaliada a aptidão replicativa entre TGVV e outro begomovírus (ToSRV, ToMoLCV ou os três juntos), observou-se invariavelmente uma menor aptidão replicativa de TGVV em todas as cultivares avaliadas (Tabela 3). Ao final de 60 dpi, houve uma taxa de plantas com infecção mista de 21,4% (para inoculações duplas), novamente mais frequentes em cultivares suscetíveis do que na cultivar resistente, exceto para a coinoculação de ToMoLCV e TGVV, em que houve predomínio de ToMoLCV. Apenas em duas plantas do total de 224 houve predomínio de TGVV. Esses resultados apontam para um menor *fitness* de TGVV em relação aos outros dois begomovírus. Então, para conferir uma vantagem ao TGVV, este vírus foi inoculado 10 dias antes do segundo begomovírus (Tabela 4). Em planta sistemicamente infectada por TGVV, ToSRV conseguiu estabelecer infecção e isso foi observado na alta taxa de infecção mista aos 60 dpi, particularmente na cultivar H9553. Em Sena, a maior parte das plantas continuou com perfil predominante de TGVV. Já para a interação de TGVV com ToMoLCV, o resultado foi totalmente diferente. ToMoLCV estabeleceu infecção e conseguiu ser mais eficiente que TGVV nas duas cultivares.

A partir dos resultados obtidos no capítulo 2 desta tese considerou-se o desaparecimento de TGVV na área de estudo avaliada. Esta consideração é corroborada por estudos metagenômicos conduzidos pelo nosso grupo, a partir de amostras coletadas em outras regiões produtoras do Distrito Federal. Entretanto, vale ressaltar que apenas amostras de tomateiro foram avaliadas, sendo assim um fator limitante. Apesar de não detectado em amostras de tomateiro, existe a possibilidade de TGVV estar presente em plantas daninhas, silvestres ou infectando outras culturas.

Sabe-se que as invasões biológicas estão entre as principais causas de doenças virais emergentes. Essas invasões podem favorecer a ocorrência de espécies em um mesmo ambiente. Essa informação se alinha às hipóteses até aqui discutidas relacionadas ao panorama de ToSRV, ToMoLCV e TGVV. Dependendo da interação a competição entre

esses vírus pode levar a exclusão ou a coexistência competitiva. Em amostras avaliadas coletadas em 2003 a 2005, TGVV coexistia juntamente com ToSRV. Entretanto, nesse mesmo período, ToMoLCV estava presente porém em baixa taxa. A baixa taxa de amostras infectadas com ToMoLCV pode ser decorrente da sua recente introdução na área de estudo. A partir de então, ToMoLCV passou a conviver com TGVV e ToSRV e levou à exclusão de TGVV enquanto coexistia com ToSRV. Fenômeno semelhante foi descrito por Péréfarres *et al.* (2014) nas Ilhas Reunião. Houve a introdução de tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) estirpe Mild (TYLCV-Mld), seguida da introdução da estirpe mais severa Israel (TYLCV-IL). Como resultado, eles observaram o deslocamento parcial do TYLCV-Mld pelo recém-chegado TYLCV-IL, com TYLCV-Mld permanecendo principalmente em plantas co-infectadas.

Alguns vírus desenvolvem vantagens adaptativas para maximizar sua replicação na hospedeira. Essas vantagens em ambientes competitivos com outras espécies virais podem resultar em diferenças de aptidão. Por exemplo, proteínas supressoras de silenciamento de alguns vírus demonstram alta eficiência contra a resposta de defesa. Nesse caso, vírus de diferentes espécies que infectam uma mesma célula, aquele que possuir uma proteína supressora de silenciamento gênico mais eficiente terá uma resposta maior a infecção, pois sua replicação será menos afetada por fatores de defesa da hospedeira. Outra vantagem adaptativa conhecida é a formação de agregados de proteínas virais. Geralmente os vírus induzem a remodelação celular resultando na formação desses agregados de proteínas virais estruturais (Moshe *et al.*, 2015). O papel dessas agregações protéicas é pouco compreendido. Acredita-se que esses agregados são utilizados para abrigar um grande complexo de proteínas para promover a replicação e transporte intra e intercelular do vírus. Além disso, essas estruturas podem proteger complexos funcionais da maquinaria de degradação celular (Moshe

& Gorovits, 2012). O desenvolvimento desses mecanismos são fatores essenciais para a sobrevivência e prevalências de espécies virais.

Diferenças na acumulação viral podem desempenhar um papel crucial na epidemiologia. A hipótese levantada é que a eficiência de transmissão dos begomovírus por mosca-branca é influenciada pela carga viral. Com base nos resultados aqui obtidos, isso poderia explicar a prevalência de ToSRV e ToMoLCV em relação a TGVV. Essa hipótese é corroborada por Lagarrea *et al.* (2015) baseado em um estudo onde foi avaliada a transmissão mediada por mosca-branca a partir de tomateiros suscetíveis e resistentes a TYLCV. Ensaios utilizando PCR quantitativa determinaram o menor acúmulo de TYLCV em tomateiros resistentes. A partir disso, eles observaram que a aquisição viral ao longo do tempo a partir de genótipos resistentes e suscetíveis foi consistente com o acúmulo do vírus na planta hospedeira.

Durante a avaliação do experimento, foram registradas diferenças na severidade dos sintomas entre os begomovírus avaliados. Em geral, em cultivares suscetíveis, os sintomas mais severos foram causados por ToMoLCV, seguido por ToSRV e TGVV. Plantas suscetíveis infectadas por ToMoLCV apresentaram maior índice de severidade da doença quando comparado aos outros begomovírus. Os sintomas observados em plantas infectadas com ToMoLCV foram caracterizados por epinastia, enfezamento da planta, bolhosidade, manchas cloróticas e enrolamento das bordas foliares. Curiosamente, os sintomas observados são semelhantes a outros begomovírus monopartidos descritos infectando tomateiro tanto no velho quando no novo mundo (Márquz-Martin *et al.*, 2011). A cultivar Sena, quando desafiada pelos três vírus individualmente ou em combinação, apresentou alta taxa de plantas sistemicamente infectadas, mas nenhum sintoma foi observado.

Em tratamentos com infecção mista com dois ou mais begomovírus observou-se efeito sinérgico dos sintomas visualizados, com exceção de plantas inoculadas simultaneamente

com ToSRV e TGVV. Efeito sinérgico dos sintomas quando em infecção mista de begomovírus é comumente relatado. Sufrin-Ringwald & Lapidot (2011) demonstraram a interação sinérgica pela indução de sintomas mais severos, entre os begomovírus squash leaf curl virus e watermelon chlorotic stunt virus co-infectados. Macedo *et al.* (2018) demonstraram também sinergismo de sintomas entre ToMoLCV, tomato leaf curl purple vein virus e ToSRV em todas as combinações de infecção avaliadas. Além disso, os autores reportaram uma maior severidade dos sintomas causados por ToMoLCV em relação aos outros dois begomovírus estudados, corroborando com os resultados aqui obtidos. Além da severidade dos sintomas, efeitos sinérgicos podem ser avaliados com a concentração do DNA viral. Rentería-Canett *et al.* (2011) demonstraram que a interação sinérgica entre pepper huasteco yellow vein virus e pepper golden mosaic virus durante infecções mistas deve-se principalmente a um aumento da concentração do DNA de ambos vírus.

A ocorrência de infecções mistas de begomovírus pode resultar no surgimento de vírus recombinantes e pseudo-recombinantes (García-Andrés *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2014; Esmielli *et al.*, 2015). Ambas desempenham um papel fundamental na evolução desse vírus. Apesar disso, avaliações para detecção de recombinantes e pseudo-recombinantes não foram realizadas durante a condução dos experimentos. Pela importância de se conhecer a ocorrência desse fenômeno, experimentos futuros serão conduzidos para avaliar a possível ocorrência de recombinação entre os três begomovírus. Será avaliada a frequência de genótipos recombinantes nas populações de progênies ao longo do tempo de infecção. A partir dessas análises, será possível determinar a região do genoma com maior ocorrência de recombinação e suas consequências biológicas.

Os experimentos foram conduzidos utilizando um clone infeccioso de cada begomovírus. Isso é um fator limitante desse trabalho, pois são clones altamente uniformes o que possivelmente não representam as condições reais. Sabe-se que em populações de

begomovírus a sua expansão ocorre de forma geneticamente heterogênea, apresentando assim diferentes genótipos, conhecidos como quasispecies (Cervera & Elena, 2016; Sánchez-Campos *et al.*, 2018). O processo de seleção e construção de clones infecciosos pode representar um gargalo, selecionando genótipos que apresentam uma baixa aptidão (Domingo & Perales, 2019). No geral, a partir das inoculações realizadas com os clones de cada vírus, obteve-se 100% de sucesso na infecção. A alta taxa de plantas infectadas, independentemente da cultivar, foi demonstrada nos ensaios de infecção simples de cada begomovírus, e pela alta taxa de amostras em infecção mista nos demais tratamentos. Além disso, ao usar plantas agroinoculadas, com cada begomovírus, como fonte de vírus para a transmissão por mosca-branca os vírus foram eficientemente adquiridos e transmitidos (dados não mostrados). Esses resultados demonstram que os clones infecciosos utilizados estavam totalmente biologicamente ativos.

Para firmar a confiabilidade desse estudo, além da utilização de um número representativo de clones, a aptidão replicativa deve ser comparada a vírus selvagens (Carrasco & Elena, 2007). Apesar disso, os resultados obtidos neste trabalho apresentam padrões já esperados e promissores. Até o momento, esse é o primeiro estudo envolvendo a avaliação da aptidão replicativa de begomovírus nativos do Brasil, o que demonstra a sua importância. Entretanto, é reforçada a necessidade de estudos adicionais para superar as limitações dos ensaios aqui realizados e confirmar as diferenças de aptidão entre os três begomovírus aqui levantadas.

Como perspectivas futuras, ensaios serão conduzidos para responder perguntas que foram geradas a partir dos resultados aqui obtidos. A análise dos tratamentos os quais a infecção dos vírus com menor aptidão foi estabelecida antes da exposição do segundo vírus reforçou os resultados obtidos em tratamentos onde os vírus foram inoculados simultaneamente. Entretanto, para confirmar esses resultados, ensaios onde serão avaliadas

diferentes quantidades de inóculo inicial de cada vírus poderão ser realizados. Além disso, experimentos com desenho experimental semelhante ao realizado aqui porém, com vírus selvagens serão conduzidos em paralelo. Amostras originais de DNA total comprovadamente em infecção simples com cada uma das espécies serão selecionadas e utilizadas para ensaios com inoculação por biobalística. Dessa forma, ao contrário dos ensaios com clones infecciosos, os resultados serão mais representativos às condições de competitividade encontrada em campo.

## 5. CONCLUSÕES

- As técnicas de RCA/RFLP proporcionaram a avaliação comparativa da aptidão viral dos três begomovírus;
- A metodologia de inoculação utilizada mostrou-se eficiente;
- A severidade dos sintomas em cultivares suscetíveis foi maior em plantas inoculadas com ToMoLCV, seguida de ToSRV e TGVV;
- A ocorrência de sinergismo de sintomas foi observada em todos os tratamentos, com exceção de plantas duplamente inoculadas com ToSRV e TGVV;
- Os begomovírus ToSRV e ToMoLCV possuem uma capacidade replicativa semelhante quando inoculados simultaneamente;
- A vantagem estabelecida a ToSRV foi necessária para que, na cultivar Sena, o ToMoLCV não conseguisse suplantar sua acumulação;
- A aptidão replicativa de TGVV em inoculações mistas simultâneas foi invariavelmente menor aos outros begomovírus em todas as cultivares avaliadas;
- A vantagem estabelecida a TGVV na cultivar H9553 não impediu que ToSRV estabelecesse a infecção. Entretanto, a acumulação de TGVV não foi superada. Na cultivar Sena, ToSRV não conseguiu estabelecer a infecção em relação a TGVV na maioria das amostras;
- Apesar da vantagem estabelecida a TGVV, ToMoLCV conseguiu ser mais eficiente nas duas cultivares;
- Parece haver uma tendência de infecção mista em plantas suscetíveis e infecção simples em plantas moderadamente resistentes;
- A menor permissividade de plantas moderadamente resistentes pode estar selecionando espécies de begomovírus.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Estudar a diversidade de begomovírus proporciona o conhecimento da amplitude de espécies, estirpes e variantes presentes nas plantas, bem como subsidiar o entendimento dos mecanismos evolutivos associados à dinâmica viral. No Brasil, apesar do considerável número de pesquisas publicadas relacionadas ao tema, esses trabalhos são escassos na atualidade. Além disso, a abordagem é frequentemente pontual e muitas vezes estes estudos não refletem a compreensão do todo. Outra limitação importante é que a maioria dos trabalhos não é conduzida de modo a avaliar mudanças de diversidade, mas apenas retrata a presença de distintos vírus no momento da amostragem. Dessa forma, devido à grande importância dos begomovírus e os prejuízos econômicos causados por estes vírus, sentiu-se a necessidade de realizar estudos aprofundados que visem examinar a diversidade de espécies ao longo da exploração agrícola. Apesar de conduzido em duas pequenas micro-regiões produtoras de tomate no Distrito Federal, o presente trabalho diferencia-se por realizar uma análise da diversidade de begomovírus ao longo do tempo. Assim, foi possível apresentar o panorama da diversidade de espécies mais abrangente relacionando-o com mudanças na diversidade de espécies ocorridas em uma escala de tempo. Ficou demonstrada a importância da manutenção de uma coleção viral para realização de estudos como este. De posse dessa coleção, foram selecionadas amostras que pudessem representar a diversidade dos begomovírus na área de estudo. Ressalta-se que a condução dos experimentos aqui reportados só foi possível devido a coleção de DNA total mantida pela Embrapa Hortaliças. Frequentemente, novas amostras são incorporadas a coleção, e isso possibilitará a realização de estudos como este no futuro.

Com base nos resultados deste estudo, conheceu-se um pouco mais sobre as mudanças que ocorrem na população de begomovírus ao longo do tempo e levantou-se alguns possíveis fatores relacionados com a seleção de vírus mais competitivos. Entre esses fatores, verificou-

se uma possível correlação entre o uso do gene de resistência *Ty-1* e o seu efeito na seleção de vírus e na redução de infecções mistas. Pode-se observar que a diminuição da diversidade de espécie ocorreu enquanto houve um aumento da utilização de tomateiros resistentes. Sabe-se que a utilização de híbridos de tomateiro parcialmente resistentes a begomovírus é uma prática frequente na área amostral nos últimos anos. Entretanto, a partir desse único estudo, é arriscado assumir como verdadeira a hipótese de que o uso de tomateiros com genes de resistência tenha resultado no deslocamento de isolados de TGVV e seleção de isolados de ToMoLCV, embora seja tentador propor esta conclusão. Deste modo, estudos abrangendo outras áreas com sistema de cultivo semelhante e diferentes da área de amostragem precisam ser realizadas e comparadas para uma conclusão mais robusta. Além disso, outros fatores como fatores biológicos relacionados a eficiência de transmissão e fatores climáticos como o efeito da temperatura nessas populações necessitam ser estudados.

No presente trabalho, uma estratégia simples de co-inoculação foi utilizada para se estudar a aptidão replicativa dos begomovírus e para avaliar se essa competição pode estar associada à predominância ou extinção de espécies de begomovírus. Os três begomovírus avaliados, TGVV, ToSRV e ToMoLCV, destacaram-se epidemiologicamente. Os resultados obtidos no estudo de diversidade temporal e co-inoculação artificial foram surpreendentemente similares. TGVV tem baixa aptidão replicativa e sucumbe-se na presença dos outros dois begomovírus, independente se a cultivar é suscetível ou resistente. Embora ToSRV e ToMoLCV apresentem aptidões replicativas similares, observou-se uma superioridade de ToMoLCV. Apesar dos resultados promissores, há limitações experimentais pelo uso de um clone infeccioso de cada espécie viral. Desse modo, para responder às perguntas geradas, será necessário a realização de ensaios que reflitam a real condição encontrada em campo, mais especificamente com populações virais selvagens.

Importantes informações foram geradas no presente estudo. Estes podem auxiliar os programas de melhorando genético, esclarecendo sobre a importância do conhecimento da população viral a ser avaliada para a seleção de materiais com resistência, que está diretamente ligada a características de efetividade, eficiência, especificidade e durabilidade dos genes de resistência.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALEGARIO, R.F.; FERREIRA, S.D.S.; ANDRADE, E.C.D. & ZERBINI, F.M. 2007. Characterization of Tomato yellow spot virus, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Pesquisa agropecuária brasileira* 42: 1335-1343.
- CARRASCO, P., DE LA IGLESIA, F. & ELENA, S. F. 2007. Distribution of fitness and virulence effects caused by single-nucleotide substitutions in Tobacco etch virus. *Journal of virology* 81: 12979-12984.
- CASTILLO-URQUIZA, G.P.; BESERRA, J.E.A.; BRUCKNER, F.P.; LIMA, A.T.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P. & ZERBINI, F.M. 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology* 153: 1985-1989.
- CERVERA, H. & ELENA, S.F. 2016. Genetic variation in fitness within a clonal population of a plant RNA virus. *Virus evolution*, 2.
- CHIKOTI, P.C.; MULENGA, R.M.; TEMBO, M. & SSERUWAGI, P. 2019. Cassava mosaic disease: a review of a threat to cassava production in Zambia. *Journal of Plant Pathology* 1: 11.
- COTRIM, M.A.D.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; NARITA, N.; ZERBINI, F.M. & PAVAN, M.A. 2007. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica* 33: 300-303.
- DEL TORO, F.J.; AGUILAR, E.; HERNÁNDEZ-WALIAS, F.J.; TENLLADO, F.; CHUNG, B.N. & CANTO, T. 2015. High temperature, high ambient CO<sub>2</sub> affect the interactions between three positive-sense RNA viruses and a compatible host differentially, but not their silencing suppression efficiencies. *PLoS One* 10.
- DOMINGO, E. & PERALES, C. (2019). Viral quasispecies. *PLoS Genetics*, 15:10.
- DOMINGO, E.J.J. H. & HOLLAND, J.J. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual review of microbiology* 51: 151-178.
- DUFFY, S. & HOLMES, E.C. 2008. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus tomato yellow leaf curl virus. *Journal of virology* 82: 957-965.
- ESMAEILI, M.; HEYDARNEJAD, J.; MASSUMI, H. & VARSANI, A. 2015. Analysis of watermelon chlorotic stunt virus and tomato leaf curl Palampur virus mixed and pseudo-recombination infections. *Virus genes* 51: 408-416.

- FARIA, J.C.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; SLACK, S.A. & MAXWELL, D.P. 1997. A new geminivirus associated with tomato in the state of São Paulo, Brazil. *Plant Disease* 81: 423-423.
- FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUE, L.C.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; ÁVILA, A.C. & INOUE-NAGATA, A.K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36: 251-258.
- FERNANDES, J.J.; CARVALHO, M.G.; ANDRADE, E.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B. & ZERBINI, F.M. 2006. Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato- infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology* 55: 513-522.
- FERREIRA, P.T.; LEMOS, T. O.; NAGATA, T. & INOUE-NAGATA, A.K. 2008. One-step cloning approach for construction of agroinfectious begomovirus clones. *Journal of virological methods*. 147: 351-354.
- FIALLO-OLIVÉ, E.; TRENADO, H.P.; LOURO, D. & NAVAS-CASTILLO, J. 2019. Recurrent speciation of a tomato yellow leaf curl geminivirus in Portugal by recombination. *Scientific reports* 9: 1-8.
- FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K. & KRAMER, M. 1960. Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico* 26: 65-69.
- FRANÇA, F.H.; VILAS-BOAS, G.L. & CASTELO-BRANCO, M. 1996. Occurrence of *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) in the Federal District. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 25: 369-372.
- GARCÍA-ANDRÉS, S.; TOMÁS, D. M.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. 2007. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. *Virology* 365(1), 210-219.
- GARCÍA-CANO, E., NAVAS-CASTILLO, J., MORIONES, E. & FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. 2010. Resistance to Tomato chlorosis virus in wild tomato species that impair virus accumulation and disease symptom expression. *Phytopathology* 100: 582-592.
- GILL, U., SCOTT, J.W., SHEKASTEBAND, R., OGUNDIWIN, E., SCHUIT, C., FRANCIS, D.M. & HUTTON, S.F. 2019. Ty-6, a major begomovirus resistance gene on chromosome 10, is effective against Tomato yellow leaf curl virus and Tomato mottle virus. *Theoretical and Applied Genetics*.132: 1543-1554.
- HAIBLE, D.; KOBER, S. & JESKE, H. 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of virological methods* 135: 9-16.

- INOUE-NAGATA, A.K.; ALBUQUERQUE, L. C.; ROCHA, W. B.; NAGATA, T. 2004. A simple method for cloning of the complete begomovirus using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods* 116: 209-211.
- INOUE-NAGATA, A.K.; LIMA, M.F.; GILBERTSON, R.L. 2016. A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Horticultura Brasileira* 34:8-18.
- JONES, R. A. & BARBETTI, M.J. 2012. Influence of climate change on plant disease infections and epidemics caused by viruses and bacteria. *Plant Sciences Reviews* 22: 1-31.
- LAPIDOT, M.R.; BEN JOSEPH, R.; COHEN, L.; MACHBASH, Z.; LEVY, D. 2006. Development of a scale for evaluation of Tomato yellow leaf curl virus resistance level in tomato plants. *Phytopathology* 96: 1404-1408.
- LEGARREA, S.; BARMAN, A.; MARCHANT, W.; DIFFIE, S. & SRINIVASAN, R. 2015. Temporal effects of a Begomovirus infection and host plant resistance on the preference and development of an insect vector, *Bemisia tabaci*, and implications for epidemics. *PLoS One* 10.
- LIMA, A.; SILVA, J.C.; SILVA, F.N.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; SILVA, F.F.; SEAH, Y.M. & ZERBINI, F.M. 2017. The diversification of begomovirus populations is predominantly driven by mutational dynamics. *Virus evolution* 3.
- LOURENÇÃO, A.L. & NAGAI, H. 1994. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. *Bragantia* 53: 53-59.
- MACEDO, M.A.; ALBUQUERQUE, L.C.; MALIANO, M.R.; SOUZA, J.O.; ROJAS, M.R.; INOUE-NAGATA, A. K. & GILBERTSON, R. L. 2018. Characterization of tomato leaf curl purple vein virus, a new monopartite New World begomovirus infecting tomato in Northeast Brazil. *Archives of virology* 163: 737-743.
- MACEDO, M.A.; BARRETO, S.S.; HALLWASS, M. & INOUE-NAGATA, A.K. 2014. High incidence of Tomato chlorosis virus alone and in mixed infection with begomoviruses in two tomato fields in the Federal District and Goiás state, Brazil. *Tropical plant pathology* 39: 449-452.
- MACEDO, M.A.; MICHEREFF FILHO, M.; NAVAS-CASTILLO, J.; INOUE-NAGATA, A.K. 2015. Host range and whitefly transmission efficiency of Tomato severe rugose virus and Tomato golden vein virus in tomato plants. *Tropical Plant Pathology* 40: 405-409.

- MÁRQUEZ-MARTÍN, B.; ARAGÓN-CABALLERO, L.; FIALLO-OLIVÉ, E.; NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. 2011. Tomato leaf deformation virus, a novel begomovirus associated with a severe disease of tomato in Peru. *European journal of plant pathology* 129: 1-7.
- MATYIS, J.C.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R. & COSTA, A.S. 1975. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica* 1: 267-275.
- MITUTI, T.; MOURA, M.F.; MACEDO, M.A.; SILVA, T.N.; PINTO, L.R.; COSTA, H. & REZENDE, J.A. 2019. Survey of begomoviruses and the crinivirus, tomato chlorosis virus, in solanaceous in Southeast/Midwest of Brazil. *Tropical Plant Pathology* 44: 468-472.
- MOSHE, A. & GOROVITS, R. 2012. Virus-induced aggregates in infected cells. *Viruses* 4: 2218-2232.
- MOSHE, A.; BELAUSOV, E.; NIEHL, A.; HEINLEIN, M.; CZOSNEK, H. & GOROVITS, R. 2015. The Tomato yellow leaf curl virus V2 protein forms aggregates depending on the cytoskeleton integrity and binds viral genomic DNA. *Scientific reports* 5: 1-13.
- NOGUEIRA, ANGÉLICA MARIA. 2018. Bipartite begomoviruses: replication, transmission and interaction with alphasatellites. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Brasil.
- OBREPALSKA-STĘPŁOWSKA, A.; RENAUT, J.; PLANCHON, S.; PRZYBYLSKA, A.; WIECZOREK, P.; BARYLSKI, J. & PALUKAITIS, P. 2015. Effect of temperature on the pathogenesis, accumulation of viral and satellite RNAs and on plant proteome in peanut stunt virus and satellite RNA-infected plants. *Frontiers in Plant Science* 6: 903.
- PÉRÉFARRES, F.; THÉBAUD, G.; LEFEUVRE, P.; CHIROLEU, F.; RIMBAUD, L.; HOAREAU, M. & LETT, J.M. 2014. Frequency-dependent assistance as a way out of competitive exclusion between two strains of an emerging virus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 28.
- QUEZADO-DUVAL, A., FURUMOTO, O. & BOAS, V. 2014. BRS Sena: do desenvolvimento á inserção na cadeia produtiva. Embrapa Hortaliças-Documents (INFOTECA-E).
- RAJABU, C.A., KENNEDY, G.G., NDUNGURU, J., ATEKA, E.M., TAIRO, F., HANLEY-BOWDOIN, L., & ASCENCIO-IBÁÑEZ, J. T. 2018. Lanai: A small, fast growing

- tomato variety is an excellent model system for studying geminiviruses. *Journal of virological methods*, 256, 89-99.
- RENTERÍA-CANETT, I.; XOCONOSTLE-CÁZARES, B.; RUIZ-MEDRANO, R. & RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. 2011. Geminivirus mixed infection on pepper plants: synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology journal* 8: 104.
- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVÍCIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H. & ZERBINI, F.M. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 148: 281-295.
- RIBEIRO, S.G.; MARTIN, D.P.; LACORTE, C.; SIMOES, I.C.; ORLANDINI, D.R. & INOUE-NAGATA, A.K. 2007. Molecular and biological characterization of Tomato chlorotic mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology* 97: 702-711.
- SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; DOMÍNGUEZ-HUERTA, G.; DÍAZ-MARTÍNEZ, L.; TOMÁS, D.M., NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. & GRANDE-PÉREZ, A. 2018. Differential shape of geminivirus mutant spectra across cultivated and wild hosts with invariant viral consensus sequences. *Frontiers in Plant Science* 9:932.
- SILVA, F.N.; LIMA, A.T.; ROCHA, C.S.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; ALVES-JÚNIOR, M. & ZERBINI, F.M. 2014. Recombination and pseudorecombination driving the evolution of the begomoviruses Tomato severe rugose virus (ToSRV) and Tomato rugose mosaic virus (ToRMV): two recombinant DNA-A components sharing the same DNA-B. *Virology journal* 11: 66.
- SUFRIN-RINGWALD, T. & LAPIDOT, M. 2011. Characterization of a synergistic interaction between two cucurbit-infecting begomoviruses: Squash leaf curl virus and Watermelon chlorotic stunt virus. *Phytopathology* 101: 281-289.
- URBINO, C., TROADEC, E., REGRAGUI, Z.F., GRANIER, M. & PETERSCHMITT, M. 2019. Generation and selection of TYLCV/TYLCSV recombinants exhibiting a competitive advantage in Ty-1 resistant tomato plants.