

OSVALDO FRANCISCO LINO SANDE

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DO BEGOMOVÍRUS

Tomato severe rugose virus (ToSRV)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia para obtenção do título de *Magister Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S214e
2014 Sande, Osvaldo Francisco Lino, 1980-
Estrutura genética de populações do Begomovírus *Tomato
severe rugose virus* (ToSRV) / Osvaldo Francisco Lino Sande. –
Viçosa, MG, 2014.
ix, 44f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.30-34.

1. Tomate - Doenças e pragas. 2. *Begomovírus* - genética.
3. *Begomovírus* - Variabilidade. 4. Filogenia. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de
Pós-graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 632.8

OSVALDO FRANCISCO LINO SANDE

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DO BEGOMOVÍRUS

Tomato severe rugose virus (ToSRV)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia para obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 03 de outubro de 2014.

Prof. Jesús Navas-Castillo

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Orientador)

“... Até aqui nos ajudou o senhor” 1ª Samuel 7:12

*A Cecília Utui, minha esposa
Osla da Exília Sande, minha filha
Ana Misca Chabuca, minha irmã*

Dedico esta conquista académica que simboliza uma vitória dividida entre nós.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Francisco Lino Sande e Albertina Zeca Cardoso, minha querida tia Rosa Lino Sande e ao meu avô Lino Sande que souberam traçar um mundo melhor na dimensão das suas capacidades, estarei sempre agradecido. Aos meus irmãos e sobrinhos: Ezequiel, Albano, Délio, Augusto, Chiquinho, M. Názia, Joana, José, Aldemiro e Tony que sempre se inspiraram em mim, agradeço pela força e carinho prestado mesmo a distância;

Aos mentores da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e do Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização deste curso de excelência;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e o Ministério de Ciências e Tecnologias de Moçambique (MCT), pela concessão da bolsa de estudos e ao Instituto Superior Politécnico de Manica (ISPM) pela confiança e apoio prestado durante esta trajetória acadêmica;

Ao professor Francisco Murilo Zerbini Júnior, vai o meu extensivo agradecimento, pois através dele, o sonho de frequência do mestrado se tornou realidade. Muito obrigado Professor;

Ao professor Eduardo S. G. Mizubuti, ao pesquisador PhD. Braz Hora-Júnior pelo apoio incondicional prestado durante análise dos dados, vão os sinceros agradecimentos. A Maola Monique Faria e ao Cleydson Silva vai o meu agradecimento pela colaboração prestada durante a elaboração dos mapas e processamento bioinformático dos dados;

Aos meus colegas do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular: Camila, Hermano, Marcos, Josiane, Talita, Larissa, César, Márcio, Roberto, João, Joaquim, Alisson, Glória e Vítor pela amizade, companheirismo e cumplicidade nas tarefas diárias do laboratório e principalmente pelos ensinamentos que sabiamente souberam transmitir;

Aos colegas da residência (república), Rufino, Hercílio, Galeta e Telmo por todo apoio prestado e amizade depositada. Aos amigos e compatriotas em Viçosa: Mário Tauzene, Manuel Talacuece, António Chamuene, Bruno Araújo, Angélica, Handina, Loides, Nancy e Daniel, estendo os meus sinceros agradecimentos;

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, vai o meu sincero agradecimento e que

Deus vos abençoe

BIOGRAFIA

OSVALDO FRANCISCO LINO SANDE, filho de Francisco Lino Sande e Albertina Zeca Cardoso, nasceu no Distrito de Marromeu, Província de Sofala-Moçambique no dia um de junho de 1980.

Residiu e concluiu o ensino fundamental e médio na cidade da Beira, Sofala em 1998. Em julho de 1999 iniciou o curso de Agronomia na Universidade Eduardo Mondlane em Maputo, graduando em março de 2005. Ingressou em Novembro de 2012 no curso de pós-graduação em Fitopatologia em nível de mestrado, submetendo-se à defesa de dissertação em outubro de 2014.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO | vi |
| ABSTRACT | viii |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 6 |
| Coleta de amostras..... | 6 |
| Clonagem de genomas completos de begomovírus..... | 7 |
| Análises de sequências..... | 8 |
| Análise de recombinação | 8 |
| Análise filogenética | 9 |
| Variabilidade e estrutura genética das populações..... | 9 |
| Testes de neutralidade..... | 10 |
| Análise de coalescência | 10 |
| RESULTADOS | 11 |
| Prevalência temporal e espacial de ToSRV na cultura do tomateiro | 11 |
| Recombinação intraespecífica entre isolados de ToSRV | 13 |
| Variabilidade genética e ocorrência de seleção em populações de ToSRV | 15 |
| Análise filogenética | 20 |
| Análise de coalescência | 23 |
| DISCUSSÃO | 26 |
| LITERATURA CITADA | 30 |
| APÊNDICES..... | 35 |

RESUMO

SANDE, Osvaldo Francisco Lino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2014. **Estrutura genética de populações do begomovírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV).** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior.

O gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) inclui vírus com genoma composto por uma ou duas moléculas circulares de DNA fita simples encapsuladas em partículas icosaédricas geminadas. A incidência de begomovírus no Brasil vem aumentando desde 1990 com a introdução do vetor *Bemisia tabaci* Middle East Asia Minor 1 (MEAM1, antigo Biótipo B). O objetivo deste trabalho foi avaliar a dinâmica espaço-temporal de populações do begomovírus *Tomato severe rugose virus*, que infecta naturalmente o tomateiro. Um total de 233 amostras de tomateiro e plantas não-cultivadas apresentando sintomas típicos de begomovírus foram coletadas nos municípios de Coimbra em 2013 e 2014 e Florestal em 2014. O DNA total das amostras foi extraído e utilizado como molde para a amplificação de genomas completos de begomovírus com auxílio da DNA polimerase do fago phi29. Os genomas virais foram clonados em plasmídeos e completamente sequenciados. Um total de 76 genomas completos (DNA-A) foram obtidos neste trabalho. Os isolados obtidos a partir de tomateiro revelaram a quase completa predominância do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em Florestal e Coimbra (nesta última região substituindo o *Tomato common mosaic virus*, ToCmMV). A análise filogenética, incluindo outras sequências de ToSRV previamente descritas a partir de diversos hospedeiros cultivados e não-cultivados e disponíveis no GenBank, evidencia a estruturação dos isolados de ToSRV em quatro clados: (i) Florestal/2008, (ii) São Paulo, Goiás e Distrito Federal, (iii) Florestal/2014 e (iv) Viçosa, Coimbra, Carandaí e Jaíba. Os isolados de Florestal/2008 representam o grupo mais divergente, com um tempo médio de divergência do ancestral comum mais recente de 15-20 anos. Contudo, os isolados coletados em Florestal em 2008 divergem em relação aos isolados coletados em 2014, sugerindo uma estruturação baseada no tempo. A rede filogenética

inferida revelou evidências de recombinação intraespecífica, e os isolados BR:Ube1:2000 e BR:Vic20:10, previamente descritos, foram identificados como possíveis recombinantes. A variabilidade genética da população de ToSRV não se encontra igualmente distribuída entre as subpopulações, com as subpopulações de Viçosa e Florestal/2008 apresentando maior contribuição para a variabilidade. Os resultados de testes de seleção indicam a ocorrência de seleção purificadora atuando no gene *CP* das subpopulações de Viçosa, Carandaí e Florestal/2014 e no gene *Rep* das subpopulações de Viçosa e Carandaí. A análise baseada em coalescência mapeou as mutações ao longo do genoma do ToSRV. Todas as mutações observadas em pimentão e plantas não-cultivadas são comuns para tomateiro e apresentam a mesma idade relativa, sugerindo que o ToSRV é uma espécie viral bem adaptada ao tomateiro, com transferência eventual para outros hospedeiros por meio do inseto vetor.

ABSTRACT

SANDE, Osvaldo Francisco Lino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, october 2014.
Genetic structure of populations of the begomovirus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). Adviser: Francisco Murilo Zerbini Júnior

The genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*) includes viruses with a genome composed of one or two molecules of circular single-stranded DNA encapsidated in twinned icosahedral particles. The incidence of begomoviruses in Brazil has increased since 1990 with the introduction of the invasive *Bemisia tabaci* Middle East Asia Minor 1 (MEAM1, previously known as biotype B). The objective of this work was to evaluate the spatio-temporal dynamics of populations of *Tomato severe rugose virus* infecting tomato crops. Foliar samples with begomovirus-like symptoms such as dwarfing, yellow mosaic and leaf curl were collected in tomato fields located in rural areas of the municipalities of Coimbra in 2013 and 2014 and Florestal in 2014. Total DNA was extracted and used as a template for the amplification of viral genomes using the phi29 DNA polymerase. Viral genomes were cloned in plasmid vectors and fully sequenced. A total of 76 full-length DNA-A clones were obtained. The isolates obtained from tomato samples indicate an almost absolute predominance of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) in Florestal and Coimbra (replacing *Tomato common mosaic virus*, ToCmMV, as the dominant begomovirus in Coimbra). Phylogenetic analysis, including additional ToSRV sequences from a number of cultivated and non-cultivated hosts available in GenBank, divided ToSRV isolates into four major clades: (i) Florestal/2008, (ii) São Paulo, Goiás and the Federal District, (iii) Florestal/2014 and (iv) Viçosa, Coimbra, Carandaí and Jaíba. Isolates from Florestal/2008 represent the most divergent group, with a time of divergence from the most recent common ancestor of 15-20 years. However, isolates obtained from Florestal in 2008 and 2014 form distinct clades, suggesting a time-based structuring. The inferred phylogenetic network showed evidence of intraspecific recombination, with the previously described isolates BR:Ube1:2000 and

BR:Vic20:10 identified as potential recombinants. The genetic variability of the ToSRV population is not equally distributed among subpopulations, with subpopulations from Viçosa and Florestal/2008 providing a greater contribution to the variability. Neutrality tests were applied to assess evidence of selection on coding regions. The results indicate the occurrence of purifying selection on the *CP* gene of the subpopulations from Viçosa, Carandaí and Florestal/2014 and on the *Rep* gene from the subpopulations from Viçosa and Carandaí. Coalescence analysis mapped the mutations occurring along the viral genome. All mutations observed in peppers and in non-cultivated hosts are common to tomatoes and show the same relative age, suggesting that ToSRV is well adapted to tomatoes, with occasional transfer to other hosts by the insect vector.

INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é considerado a segunda hortaliça mais importante do Brasil do ponto de vista sócio-econômico. A produção brasileira em 2013 foi de aproximadamente 3,97 milhões de toneladas em uma área de 60.000 hectares, com rendimento médio de 66,1 ton/ha. Os estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais são os maiores produtores (IBGE, 2014).

O cultivo do tomate no mundo e no Brasil tem enfrentado problemas de diversas naturezas que de forma direta ou indireta afetam a produção. Desde a década de 1980, perdas significativas foram relatadas em diversos países das Américas, incluindo EUA, México, países da América Central e do Caribe, devido à incidência de geminivírus (Polston & Anderson, 1997; Morales & Jones, 2004).

A família *Geminiviridae* é organizada em sete gêneros, *Begomovirus*, *Becurtovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*, definidos com base no relacionamento filogenético e organização genômica (Varsani *et al.*, 2014). Os membros dessa família possuem genomas compostos por uma ou duas moléculas de DNA circular de fitas simples, encapsidados por uma única proteína estrutural em partículas icosaédricas geminadas (Brown *et al.*, 2012). Os begomovírus, transmitidos pela mosca branca *Bemisia tabaci*, constituem um grupo de vírus de plantas de grande relevância econômica para a agricultura, devido à severidade das doenças por eles causadas em diversas culturas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Polston & Anderson, 1997; Morales & Anderson, 2001; Monci *et al.*, 2002; Briddon, 2003; Were *et al.*, 2004).

Os begomovírus podem ser divididos em dois grupos: Velho Mundo (Europa, África e Ásia) e Novo Mundo (Américas) (Rybicki, 1994; Padidam *et al.*, 1999; Paximadis *et al.*, 1999). A maioria dos begomovírus do Novo Mundo são bissegmentados, ou seja, possuem dois componentes genômicos, denominados DNA-A e DNA-B. Os dois componentes não

possuem identidade significativa de sequência, exceto em uma região com cerca de 200 nucleotídeos, denominada região comum, na qual a identidade nucleotídica entre o DNA-A e DNA-B é de aproximadamente 90%. Nesta região está localizada uma sequência capaz de formar uma estrutura em forma de grampo, contendo um nonanucleotídeo TAATATTAC, conservado em todos os begomovírus, que constitui a origem de replicação por círculo rolante.

O DNA-A dos begomovírus do Novo Mundo contém cinco genes: *Rep*, responsável por codificar a única proteína essencial à replicação, iniciadora do mecanismo de replicação por círculo rolante (Fontes *et al.*, 1992; Orozco *et al.*, 1997); *Trap*, que codifica um fator transcricional dos genes *CP* e *NSP* e que também atua como supressora do silenciamento gênico mediado por RNA de interferência (Voinnet *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005); *Ren*, que codifica um fator acessório (não essencial) à replicação viral (Sunter *et al.*, 1990; Pedersen & Hanley-Bowdoin, 1994); *AC4*, responsável por codificar uma proteína que também está envolvida na supressão de silenciamento gênico mediado por RNAi (Vanitharani *et al.*, 2004); e *CP*, que codifica a proteína capsidial, essencial também para a transmissão do vírus pelo inseto vetor (Bridson *et al.*, 1990; Hofer *et al.*, 1997). O DNA-B contém dois genes: *NSP*, que codifica a proteína responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear (núcleo-citoplasma) (Noueiry *et al.*, 1994; Sanderfoot & Lazarowitz, 1996), e *MP*, que codifica a proteína envolvida no movimento célula-a-célula do vírus através dos plasmodesma (Noueiry *et al.*, 1994).

Os begomovírus do Velho Mundo podem ser mono- ou bissegmentados. Os bissegmentados têm organização genômica semelhante à citada acima para os begomovírus do Novo Mundo, com a presença de um gene (*AV2*) adicional no DNA-A, responsável por codificar uma proteína que atua no movimento viral na planta. Os begomovírus monossegmentados possuem organização genômica análoga ao DNA-A dos vírus bissegmentados (Padidam *et al.*, 1996; Mansoor *et al.*, 2003). A maioria das espécies do

Velho Mundo estão associadas a DNAs satélites denominados alfassatélites (anteriormente denominados DNA1) e betassatélites (anteriormente denominados DNA-β) (Bridson & Stanley, 2006; Mansoor *et al.*, 2006).

Recentemente foi relatada a ocorrência do begomovírus monossegmentado *Tomato leaf deformation virus* (ToLDeV), infectando naturalmente tomateiro no Equador e no Peru (Melgarejo *et al.*, 2013). Este foi o primeiro relato da ocorrência de um begomovírus monossegmentado nativo do Novo Mundo, evidenciando uma possível emergência a partir de convergência e recombinação.

Os begomovírus são transmitidos naturalmente por *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae), vulgarmente conhecida como "mosca-branca", e sua distribuição está relacionada à disseminação do vetor (Jones, 2003). Populações de *B. tabaci* eram classificadas em biótipos, com base em características morfo-fisiológicas e moleculares (Brown, 2000). Recentemente, a sequência do gene mitocondrial que codifica a enzima citocromo oxidase I (mtCOI) passou a ser utilizada para definir uma separação genética a nível de espécie (Dinsdale *et al.*, 2010). Esses autores identificaram um "vale" na frequência da distribuição das identidades par-a-par da sequência nucleotídica do gene mtCOI no valor de 3,5% de divergência, e propuseram que este valor fosse utilizado para a separação das populações a nível de espécie. Com base nesse critério, *B. tabaci* passou a ser considerada um complexo de 24 espécies crípticas (sem diferenciação morfológica). O antigo biótipo B de *B. tabaci* foi reclassificado como a espécie críptica *B. tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1) (Dinsdale *et al.*, 2010). A espécie MEAM1 apresenta alta capacidade de transmissão de begomovírus e uma ampla gama de plantas hospedeiras, características que podem ter contribuído para emergência de diversos novos begomovírus (Jones, 2003; Navas-Castillo *et al.*, 2011). Essa espécie foi disseminada a partir do Mediterrâneo (seu provável centro de origem) para diversas regiões do mundo, tornando-se predominante em países como Austrália, Brasil, Estados Unidos e Venezuela. Simultaneamente, epidemias severas

associadas ao surgimento de novas espécies de begomovírus foram observadas em diversas culturas, destacando-se o tomateiro (Morales & Anderson, 2001). Apesar de MEAM1 predominar no Brasil, recentemente foram detectadas duas espécies nativas em São Paulo e Mato Grosso, *B. tabaci* New World (NW) e New World 2 (NW2), predominantemente em plantas não-cultivadas (Marubayashi *et al.*, 2013), e também a ocorrência de *B. tabaci* Mediterranean (MED, antigo biótipo Q) no Rio Grande do Sul, colonizando culturas de pimentão e batata-doce (Barbosa *et al.*, 2014).

Populações de begomovírus possuem elevada variabilidade genética, equivalente à de vírus com genoma composto de RNA (Ge *et al.*, 2007; Prasanna *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2013). As principais fontes de variabilidade genética de vírus de plantas são mutação, recombinação e pseudo-recombinação (Monci *et al.*, 2002; Garcia-Arenal *et al.*, 2003; Seal *et al.*, 2006). A ocorrência frequente de recombinação (Padidam *et al.*, 1999), a pseudo-recombinação entre vírus com genoma bissegmentado (Andrade *et al.*, 2006) e uma alta taxa de mutação e substituição (Duffy & Holmes, 2008; Duffy & Holmes, 2009) são fatores que promovem a variabilidade genética dos begomovírus.

A caracterização das espécies de begomovírus no Brasil tem indicado a presença de diversas novas espécies infectando tomateiro e plantas não-cultivadas (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2006; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2012). Algumas dessas espécies encontram-se amplamente distribuídas pelo país, enquanto outras estão restritas a certas regiões. Por exemplo, o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) já foi relatado em Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo, enquanto o *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) foi relatado apenas em Minas Gerais (Calegario *et al.*, 2007). Acredita-se que a emergência dos begomovírus que infectam tomateiro no Brasil seja resultado da transferência horizontal de vírus nativos que infectam plantas silvestres ou invasoras pela espécie MEAM1 da mosca-branca. Uma vez presentes no novo hospedeiro, esses vírus evoluíram rapidamente via

recombinação e pseudo-recombinação, dando origem às espécies atualmente detectadas no campo. A predominância de algumas espécies poderia ser devido a diferenças na adaptação ao tomateiro ou diferenças na eficiência de transmissão pelo vetor.

A análise comparativa de populações de begomovírus encontradas em plantas cultivadas e não-cultivadas indica que as populações virais em plantas não-cultivadas apresentam um grau de variabilidade mais elevado em comparação àquelas presentes em plantas cultivadas (Lima *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2013). Rocha *et al.* (2013) observaram que populações brasileiras de begomovírus em tomateiro são altamente recombinantes, possuem um elevado grau de variabilidade genética e uma rápida taxa de evolução molecular. Além disso, verificaram que uma população associada à planta não-cultivada *Blainvillea rhomboidea* possui maior variabilidade genética em relação a populações associadas ao tomateiro. Por fim, demonstraram que as populações são estruturadas com base na localização geográfica, o que explicaria a predominância de determinadas espécies virais nos diferentes estados brasileiros. Um estudo comparando populações dos begomovírus *Macrotidium yellow spot virus* (MaYSV) e ToSRV, provenientes de plantas não-cultivadas e cultivadas, respectivamente, concluiu que a recombinação, e não a seleção adaptativa, explica a maior variabilidade de begomovírus em hospedeiros não-cultivados (Lima *et al.*, 2013). A mesma conclusão foi obtida por Ramos-Sobrinho *et al.* (2014) comparando populações dos begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e MaYSV em *Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus* e *Macrotidium lathyroides*. Um estudo com o ToSRV no município de Viçosa, MG, indicou uma variabilidade genética que se assemelha à de outras populações de begomovírus descritos em tomateiro no Brasil, sendo detectados eventos de recombinação com begomovírus de *Sida micrantha* (González-Aguilera *et al.*, 2012).

A ampla distribuição de ToSRV no campo e a detecção de eventos de recombinação e pseudo-recombinação (Silva *et al.*, 2014) sugerem que um monitoramento contínuo de populações virais deve ser realizado para permitir a delimitação de uma estratégia eficiente de

controle. Informações sobre a distribuição e prevalência de ToSRV e suas formas recombinantes são importantes para orientar programas de melhoramento na busca de fontes de resistência estáveis e duráveis. Estudos relacionados a este vírus poderão melhorar a percepção sobre a dinâmica espaço-temporal de populações que podem condicionar a emergência de novas espécies virais. Diante disto, o objetivo deste estudo foi avaliar a dinâmica espaço-temporal de populações do begomovírus *Tomato severe rugose virus* que infectam naturalmente o tomateiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras

Amostras foliares foram coletadas nos municípios de Coimbra, MG, em julho e agosto de 2013 e em fevereiro de 2014, e Florestal, MG, em maio de 2014 (Figura 1). As amostras de plantas não-cultivadas foram coletadas de forma agregada, em sub-amostras, em pontos separados a uma distância de aproximadamente 500 metros. As amostras de tomateiro foram coletadas em diferentes estágios fenológicos da planta (frutificação, maturação e colheita), selecionadas mediante a observação de sintomas típicos de infecção por begomovírus, incluindo mosaico, encrespamento, nanismo e deformação foliar (Apêndice A1). Em cada ponto de amostragem foram registradas as coordenadas geográficas, imagens dos sintomas observados e o nome da variedade ou híbrido de tomateiro.

Um total de 233 amostras de tomateiro ($n_1=147$) e plantas não-cultivadas ($n_2=86$) foram coletadas, acondicionadas em sacos plásticos e conduzidas ao laboratório. Um disco foliar foi utilizado para extração de DNA total conforme descrito a seguir, e o restante das amostras foram herbarizadas. Para compor o conjunto de dados foram incluídas sequências de ToRSV determinadas por Nozaki *et al.* (2006), González-Aguilera *et al.* (2012), Albuquerque *et al.* (2012) e Rocha *et al.* (2013) disponíveis no GenBank. Os pontos de coleta dessas amostras abrangem os estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo e o Distrito Federal (Figura 1).

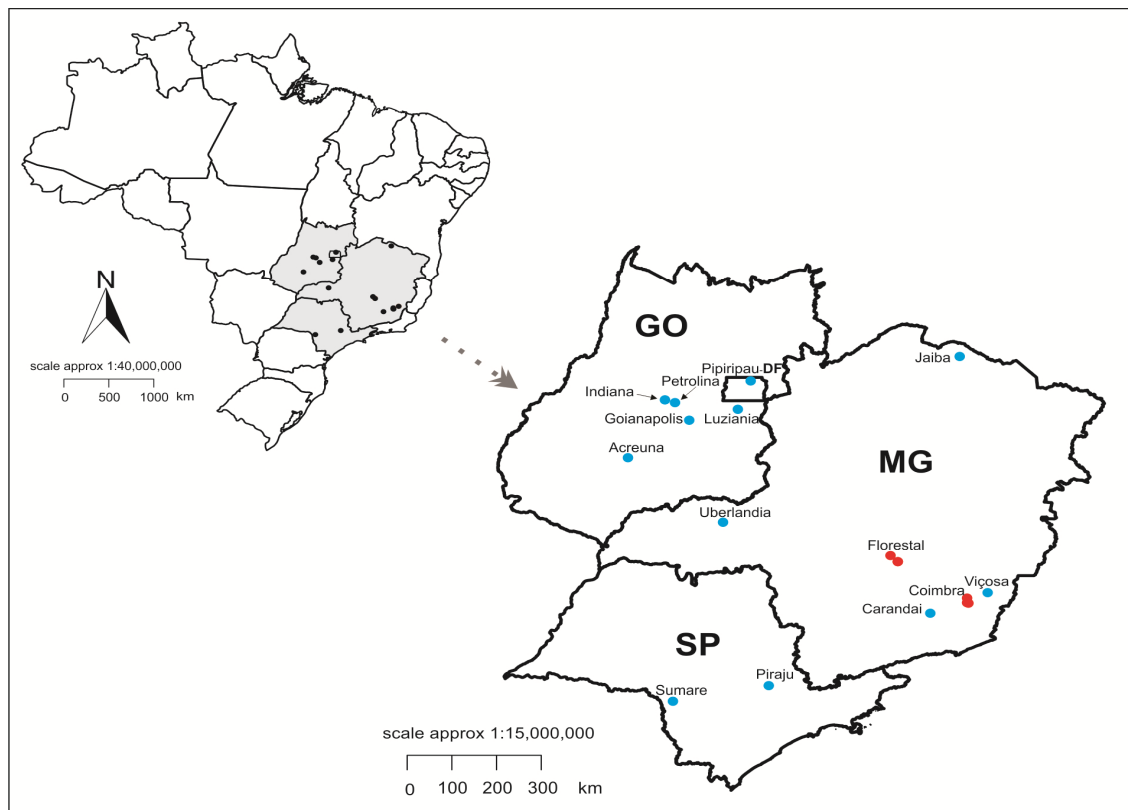


Figura 1 - Mapa indicando os locais referentes a amostras coletadas durante este trabalho (indicados em vermelho) e aqueles referentes a amostras coletadas por outros pesquisadores e cujas sequências foram obtidas do GenBank (indicados em azul).

Clonagem de genomas completos de begomovírus

A extração do DNA total das amostras foi realizada conforme descrito por Doyle & Doyle (1987). O DNA extraído foi preservado a -20°C . Em amostras de tomateiro, a confirmação da presença de begomovírus foi realizada via PCR utilizando-se os oligonucleotídeos PAL1v1978 e PAR1c496, que amplificam um fragmento correspondente ao DNA-A (Rojas *et al.*, 1993). As amostras positivas no PCR foram submetidas a reações de amplificação por círculo rolante (RCA) (Inoue-Nagata *et al.*, 2004). O DNA extraído das amostras de plantas não-cultivadas foi utilizado diretamente para as reações de RCA. O produto da reação de RCA foi avaliado por meio da clivagem com a enzima *MspI*. As amostras que apresentaram um padrão de restrição cuja soma dos fragmentos totalizava aproximadamente 5.200 nucleotídeos (nt) foram selecionadas para clivagem com outras

enzimas (*ApaI*, *BamHI*, *ClaI*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SacI*, *SacII*, *XbaI* e *XhoI*) a fim de identificar uma enzima que clivasse os componentes virais em um único ponto. Os fragmentos assim linearizados foram clonados no plasmídeo vetor pBLUESCRIPT-KS+ (pKS+; Stratagene) previamente clivado com a mesma enzima e desfosforilado. Os plasmídeos recombinantes foram transformados em *Escherichia coli* DH5 α pelo método de choque térmico (Sambrook & Russel, 2001). Os clones foram enviados para sequenciamento na Macrogen (Seul, Coreia do Sul).

Análises de sequências

As sequências dos genomas completos de begomovírus foram montadas com auxílio dos programas DNA Baser Sequence Assembler v. 3 (www.DnaBaser.com) e CodonCodeAligner v. 4.1.1 (www.codoncode.com), e organizadas de modo a iniciarem a partir do primeiro nucleotídeo após o sítio de clivagem da origem de replicação (TAATATT//AC). As sequências foram inicialmente analisadas por meio do algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) a fim de determinar a espécie viral com maior identidade nucleotídica. As sequências com maior identidade foram obtidas a partir do GenBank e utilizadas para determinação do posicionamento taxonômico dos isolados utilizando-se o programa Species Demarcation Tool v. 1.0 (Muhire *et al.*, 2013). A busca por ORFs foi efetuada com o programa ORF Finder (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/).

Análise de recombinação

Para análise dos eventos de recombinação foi utilizado um conjunto de dados composto de 130 sequências de DNA-A do ToSRV, sendo 51 obtidas neste trabalho (Apêndice A2) e 79 disponíveis no GenBank (Apêndice A3). As sequências foram alinhadas utilizando-se o algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) implementado no programa MEGA v. 5.2 (Tamura *et al.*, 2011). A busca por eventos de recombinação foi realizada com o programa RDP v. 4.18

(Martin *et al.*, 2010). Apenas eventos de recombinação detectados por ao menos quatro métodos dentre os sete disponíveis foram considerados confiáveis. A rede filogenética que ilustra as evidências de recombinação entre os isolados presentes no conjunto de dados foi construída pelo método Neighbor-Net implementado no programa SplitsTree4 (Huson & Bryant, 2006).

Análise filogenética

Para reconstrução das relações evolutivas entre os isolados virais foram construídas árvores filogenéticas a partir das sequências nucleotídicas dos genomas completos. Utilizou-se o mesmo conjunto de dados descrito acima, porém excluindo-se o bloco recombinante identificado da análise com o programa RDP e a sequência BR:Vic20:10. Foi considerado nesta análise o modelo *lognormal* relaxado e relógio molecular assumindo um tamanho populacional constante. As árvores filogenéticas foram construídas por inferência Bayesiana, com o programa BEAST v. 1.6.1 (Drummond & Rambaut, 2007). O modelo de substituição de nucleotídeos foi selecionado com o programa MrModeltest v. 2.2 (Nylander, 2004) baseado no Akaike Information Criterion (AIC). A estimativa do tempo de divergência dos isolados foi feita por meio do modelo evolutivo estruturado no tempo. A análise foi realizada baseada no algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC) de 250.000.000 gerações e as árvores geradas a cada 5.000 gerações, visualizadas com o programa FigTree.

Variabilidade e estrutura genética das populações

Análises de polimorfismo de nucleotídeos dentro e entre subpopulações foi realizada com auxílio do programa DnaSP v. 5 (Rozas *et al.*, 2003). A estimativa da variabilidade em cada subpopulação foi realizada com base no teste de permutação de Hudson, quantificando-se os principais descritores da variabilidade genética: número de sítios polimórficos (S); número médio da diferença de nucleotídeos (k); diversidade nucleotídica (π); frequência de

mutação; número de haplótipos (H); diversidade haplotípica (Hd); número total de mutações (Eta); taxa de mutação da população estimada com base no número total de sítios segregantes (θ -S); e taxa de mutação estimada com base no número total de mutações (θ -Eta).

O programa Structure v. 2.3.1 (Evanno *et al.*, 2005) foi utilizado para detectar evidências de estruturação genética da população de ToSRV de acordo com região geográfica e separação temporal. Para escolher o número de grupos que melhor representa a estruturação da população foi realizada uma simulação de 1 a 10 subpopulações (K) considerando-se uma cadeia MCMC 1.000.000 de gerações e *burn in* de 100.000 gerações. A melhor estimativa de probabilidade para cada subpopulação foi escolhida com base no logaritmo da probabilidade máxima que suporta cada valor de K (Pritchard *et al.*, 2000).

Testes de neutralidade

A hipótese de ocorrência da seleção atuando sobre os genes virais foi testada por meio de três métodos implementados no programa DnaSP (Rozas *et al.*, 2003): Tajima D, Fu & Li D* e Fu & Li F*. Diferentes conjuntos de dados foram analisados considerando-se populações únicas ou subpopulações agrupadas com base em região geográfica ou agrupamento temporal. Para determinar os códons na sequência de aminoácidos sob seleção positiva ou negativa foram utilizados quatro métodos implementados no programa HyPhy (Kosakovsky Pond *et al.*, 2005) e disponibilizados no servidor Datamonkey (www.datamonkey.org): SLAC (*single-likelihood ancestor counting*), REL (*random effects likelihood*), FEL (*fixed effects likelihood*) e IFEL (*internal fixed effects likelihood*) (Pond & Frost, 2005).

Análise de coalescência

A história das populações associadas a diferentes hospedeiros e regiões geográficas foi inferida por meio de árvores genealógicas baseadas em coalescência. Esta análise foi realizada

com diferentes programas integrados na plataforma Moby SNAP Workbench que integra e gere um conjunto de programas utilizados na análise da evolução de populações (Price & Carbone, 2005).

As diferentes sequências nucleotídicas foram inicialmente agrupadas em haplótipos com auxílio do programa SNAP MAP (Aylor *et al.*, 2006), pela remoção dos sítios com mais de uma mutação. Foram geradas matrizes de compatibilidade para haplótipos que compartilham o mesmo ancestral comum para testar a contribuição ou divergência dos sítios variáveis nas respectivas sequências analisadas. As simulações de genealogias do processo de coalescência foram realizadas utilizando-se o programa GENETREE (Bahlo & Griffiths, 2000), assumindo para todos os casos tamanhos de população constantes e selecionando-se a árvore com maior valor de probabilidade. Essas genealogias foram simuladas considerando-se uma cadeia MCMC de 1.000.000 de gerações e salvando as árvores a cada 5.000 gerações.

RESULTADOS

Prevalência temporal e espacial de ToSRV na cultura do tomateiro

Um total de 233 amostras foliares apresentando sintomas típicos de infecção por begomovírus foram coletadas: 147 provenientes de tomateiro, 28 de *Blainvillea rhomboidea*, uma de *Emilia fosbergii*, oito de *Sida acuta*, oito de *Sida rhombifolia*, duas de *Sida urens*, 37 de *Sida* sp. e duas de *Sidastrum micranthum*. A partir destas amostras foram clonados e sequenciados 78 DNAs-A completos, 55 obtidos a partir de tomateiro e 23 de plantas não-cultivadas (Tabela 1; Apêndice A2).

Tabela 1. Amostras de tomateiro e plantas não-cultivadas coletadas nos municípios de Coimbra e Florestal, MG, em 2013 e 2014, e número de clones (DNA-A) obtidos.

| Hospedeiro | Data de coleta ¹ | | | | | PCR(+) ² | MspI(+) ³ | Clones |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|---------------------|----------------------|-----------|
| | 7/2013 | 8/2013 | 02/2014 | 05/2014 | Total | | | |
| <i>Solanum lycopersicum</i> | - | 64 | 50 | 33 | 147 | 72 | 72 | 55 |
| <i>Blainvillea rhomboidea</i> | 7 | - | 21 | - | 28 | n.r. ⁴ | 14 | 14 |
| <i>Emilia fosbergii</i> | 1 | - | - | - | 1 | n.r. | - | - |
| <i>Sida acuta</i> | 8 | - | - | - | 8 | n.r. | 4 | 4 |
| <i>Sida rhombifolia</i> | 8 | - | - | - | 8 | n.r. | 1 | 1 |
| <i>Sida urens</i> | 2 | - | - | - | 2 | n.r. | 2 | 2 |
| <i>Sida</i> sp. | 26 | - | 11 | - | 37 | n.r. | 10 | 1 |
| <i>Sidastrum micranthum</i> | 2 | - | - | - | 2 | n.r. | 2 | 1 |
| Total | 54 | 64 | 82 | 33 | 233 | 72 | 105 | 78 |

¹7/2013, 8/2013 e 2/2014, amostras coletadas em Coimbra; 5/2014, amostras coletadas em Florestal.

²PCR(+): Amplificação do fragmento viral de 1100 pb via PCR.

³MspI(+): Digestão positiva com enzima de restrição MspI.

⁴n.r.: não realizado.

Com base no critério de demarcação de espécies de begomovírus estabelecido pelo Grupo de Estudos de *Geminiviridae* do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (Brown *et al.*, 2012), a comparação par-a-par de sequências de nucleotídeos permitiu classificar os 78 isolados nas seguintes espécies: *Sida common mosaic virus* (SiCmMV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em tomateiro, e *Blainvillea yellow spot virus* (BIYSV), *Sida acuta mosaic virus* (SAMV) e *Tomato mild mosaic virus* (ToMIMV) em plantas não-cultivadas (Apêndice A2). O ToSRV foi o vírus prevalente na cultura do tomateiro nas duas regiões amostradas, uma vez que foram obtidos 53 isolados de ToSRV, e apenas um isolado de ToCmMV e um de SiCmMV (Apêndice A2). Um isolado de ToSRV foi clonado de *Sidastrum micranthum*. Os 54 isolados de ToSRV apresentaram identidade nucleotídica de 97 a 100% com outros isolados de ToSRV cujas sequências encontram-se disponíveis no GeneBank (dados não mostrados). Estes resultados indicam uma situação distinta daquela relatada por Rocha *et al.* (2013), que indicava a prevalência do ToCmMV em Coimbra com base em amostras coletadas em 2007. Um estudo conduzido por Gonzáles-Aguilera *et al.* (2012) já indicava prevalência de 100%

do ToSRV em um plantio de tomateiro no município de Viçosa (bastante próximo de Coimbra) em 2008 e 2009. Levantamentos conduzidos em Morrinhos e Luziânia (GO) e em Ribeirão Preto (SP), sequenciando-se 104 genomas completos obtidos de 59 amostras de tomateiro, também indicaram prevalência de 100% do ToSRV, com identidade nucleotídica mínima de 97% com outros isolados da mesma espécie (Naito, 2012) com base em amostras coletadas em 2008. Em conjunto, esses resultados indicam uma prevalência do ToSRV em cultivos de tomateiro em três estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil.

Recombinação intraespecífica entre isolados de ToSRV

A análise de recombinação foi realizada com um conjunto de dados composto pelas sequências de DNA-A dos 54 isolados relatados no presente trabalho e 80 sequências disponíveis no GenBank. Desse total de 134 isolados, 125 foram obtidos de tomateiro, dois de pimentão, três de *Nicandra physaloides*, um de *Crotalaria juncea*, um de *Sidastrum micranthum*, um de *Sida* sp., e um de hospedeiro não identificado (Apêndice A3).

A rede filogenética inferida (Figura 2) sugeriu a existência de eventos de recombinação entre os isolados ($p=0,2724$, PHI test). Entretanto, o programa RDP detectou apenas dois eventos, envolvendo os isolados BR:Ube1:2000 e BR:Vic20:10, ambos obtidos de tomateiro em Minas Gerais (Tabela 2).

Tabela 2. Eventos de recombinação intraespecífica detectados entre os isolados de ToSRV.

| Recombinante | Breakpoint | | Parentais | | Programas ² | Valor <i>P</i> ³ |
|--------------|------------------|-------|----------------|--------------|------------------------|-----------------------------|
| | Inicial | Final | Maior | Menor | | |
| BR:Ube1:2000 | 984 ¹ | 516 | BR:Car236.1:08 | Desconhecido | RGBMCS ₃ | 2,65x10 ⁻¹⁰ |
| BR:Vic20:10 | 349 | 1299 | BR:Vic10:10 | Desconhecido | RGBMCS ₃ | 6,65x10 ⁻¹⁵ |

¹ A numeração inicia no primeiro nucleotídeo após o sítio de clivagem na origem de replicação, e aumenta em sentido horário.

² R=RDP; G=GeneConv; B=Bootscan; M=MaxChi; C=CHIMAERA; S=SisScan; 3=3SEQ.

³ O valor *P* informado se refere ao programa sublinhado, e é o menor valor *P* calculado para o evento de recombinação em questão.

Variabilidade genética e ocorrência de seleção em populações de ToSRV

A variabilidade genética do ToSRV não se encontra igualmente distribuída nas diferentes subpopulações amostradas (Tabela 3). A maior contribuição para a variabilidade na população de ToSRV provém das subpopulações de Coimbra (diversidade nucleotídica, $\pi = 0,00753$) e Florestal/2008 ($\pi = 0,00730$). A subpopulação de Florestal/2014 contribui com menor variabilidade ($\pi = 0,00315$). A diversidade nucleotídica total ($\pi = 0,00968$) é inferior à do ToCmMV ($\pi = 0,0143$), um vírus relatado nos municípios de Coimbra (MG) e Paty do Alferes (RJ) em 2008 infectando tomateiro. Estudos anteriores ressaltam que populações de vírus infectando plantas não-cultivadas apresentam maior variabilidade genética comparada com populações virais que infectam hospedeiros cultivados (Lima *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2013). A subpopulação de ToMIMV amostrada em *Sida urens* apresentou diversidade nucleotídica quatro vezes superior à da população de ToSRV (Tabela 3). A frequência de mutação calculada para a população de ToMIMV ($1,59 \times 10^{-2}$) foi a mais elevada entre todas as populações analisadas (Tabela 3). A frequência de mutação calculada para o ToSRV foi de $1,69 \times 10^{-3}$, e dentre as diferentes subpopulações de ToSRV amostradas, a frequência de mutação mais elevada ($2,85 \times 10^{-3}$) foi observada em Florestal/2008 (Tabela 3).

Testes de neutralidade foram realizados para avaliar o tipo de seleção atuando em cada gene do ToSRV. Os resultados dos testes Tajima D, Fu & Li D* e Fu & Li F* foram não significativos para a maioria dos genes (Tabela 4). Os valores obtidos para o gene *CP* das subpopulações de Viçosa, Carandaí e Florestal/2014, para os genes *Rep* e *Ren* das subpopulações de Viçosa e Carandaí e para o gene *AC4* da subpopulação de Carandaí sugerem ocorrência de seleção purificadora.

Análise com o programa HyPhy identificou aminoácidos sob seleção nos genes do ToSRV. Para o gene *CP*, somente aminoácidos sob seleção negativa foram identificados (Tabela 5). Para os genes *Rep* e *Ren*, seleção negativa foi identificada na maioria dos casos, com poucos aminoácidos sob seleção positiva (Tabela 5). Para o gene *Trap*, tanto o número de aminoácidos sob seleção positiva como sob seleção negativa foi pequeno (Tabela 5).

Tabela 3. Descritores da variabilidade genética de populações de begomovírus que ocorrem em plantas cultivadas (tomateiro e pimentão) e não-cultivadas nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Distrito Federal e Goiás. As análises foram realizadas com base no DNA-A. As subpopulações cujas sequências foram geradas neste trabalho estão destacadas em negrito.

| Espécie ¹ | Local | N ⁶ | L | H | Hd | S | Eta | K | π | f(Eta) | θ -Eta | θ -S |
|----------------------|------------------------------|----------------|------|-----|-------|-----|-----|--------|---------|---------|---------------|-------------|
| ToSRV | Viçosa ² | 36 | 2593 | 34 | 0,997 | 144 | 149 | 11,53 | 0,0045 | 0,0016 | 0,0134 | 0,0139 |
| | Coimbra | 37 | 2591 | 29 | 0,977 | 137 | 143 | 19,52 | 0,00753 | 0,00149 | 0,01322 | 0,01267 |
| | Florestal/2008 ³ | 5 | 2592 | 5 | 1,000 | 37 | 37 | 19,00 | 0,00730 | 0,00285 | 0,00680 | 0,00680 |
| | Florestal/2014 | 16 | 2591 | 13 | 0,967 | 39 | 40 | 8,16 | 0,00315 | 0,00096 | 0,00465 | 0,00454 |
| | Carandá ³ | 19 | 2589 | 18 | 0,994 | 73 | 74 | 10,5 | 0,004 | 0,0015 | 0,008 | 0,0081 |
| | Goiás ⁴ | 11 | 2591 | 8 | 0,945 | 49 | 50 | 11,82 | 0,00456 | 0,00175 | 0,00659 | 0,00646 |
| | Total ⁵ | 132 | 2579 | 113 | 0,997 | 448 | 510 | 24,96 | 0,00968 | 0,00169 | 0,03624 | 0,03184 |
| ToCmMV | Paty do Alferes ³ | 10 | 2560 | 8 | 0,933 | 11 | 11 | 2,2 | 0,0009 | 0,00043 | 0,0015 | 0,0015 |
| | Coimbra ³ | 12 | 2560 | 12 | 1 | 91 | 92 | 26,3 | 0,0103 | 0,0003 | 0,0312 | 0,0321 |
| | Total | 22 | 2560 | 15 | 0,997 | 103 | 104 | 36,6 | 0,0143 | 0,0018 | 0,011 | 0,0111 |
| ToCMoV | Florestal ³ | 20 | 2619 | 20 | 1 | 120 | 122 | 16,6 | 0,0063 | 0,00023 | 0,0129 | 0,0131 |
| ToMIMV | Coimbra | 6 | 2705 | 6 | 1 | 242 | 258 | 111,27 | 0,04177 | 0,0159 | 0,04177 | 0,03918 |
| ToYVSV | P. do Alferes ³ | 26 | 2562 | 25 | 0,997 | 49 | 49 | 5,4 | 0,0021 | 0,00074 | 0,005 | 0,005 |

¹ ToSRV: *Tomato severe rugose virus*; ToCmMV: *Tomato common mosaic virus*; ToCMoV: *Tomato chlorotic mottle virus*; ToMIMV: *Tomato mild mosaic virus*; ToYVSV: *Tomato yellow vein streak virus*.

² González-Aguilera *et al.*, 2012.

³ Rocha *et al.*, 2013.

⁴ Sequências obtidas do GeneBank.

⁵ Inclui dois isolados de Jaíba (MG), um de Uberlândia (MG), dois de Sumaré (SP) e três de Pípiripau (DF).

⁶ N, número de sequências analisadas; L, comprimento do alinhamento em nucleotídeos; H, número de haplótipos; Hd, diversidade haplotípica; S, número de sítios segregantes; Eta, número total de mutações; K, número médio de diferenças de nucleotídeos; π , diversidade nucleotídica; f(Eta), frequência de mutação; θ -Eta, taxa de mutação de Watterson estimada com base no número total de mutações; θ -S, taxa de mutação de Watterson estimada com base no número total de sítios segregantes.

Tabela 4. Resultados dos testes de neutralidade para cada gene do DNA-A dos isolados de ToSRV.

| Subpopulação | Gene | Testes | | |
|-----------------------------|-------------|----------|------------|------------|
| | | Tajima D | Fu & Li D* | Fu & Li F* |
| Viçosa ¹ | <i>CP</i> | -4,560* | -4,620* | -2,610** |
| | <i>Rep</i> | -3,160* | -3,390* | -2,290** |
| | <i>Trap</i> | -0,46 | -0,86 | -1,45 |
| | <i>Ren</i> | -3,330* | -3,350* | -2,370** |
| | <i>AC4</i> | -1,78 | -2,17 | -1,960* |
| Coimbra | <i>CP</i> | -1,605 | -2,116 | -2,304 |
| | <i>Rep</i> | -1,604 | -2,103 | -2,292 |
| | <i>Trap</i> | -1,761 | -2,399 | -2,583* |
| | <i>Ren</i> | -1,532 | -2,376 | -2,476 |
| | <i>AC4</i> | -0,695 | -0,346 | -0,538 |
| Carandaí ² | <i>CP</i> | -2,282** | -3,168* | -2,282* |
| | <i>Rep</i> | -2,302** | -2,282* | -2,282* |
| | <i>Trap</i> | -2,010* | -2,326 | -2,587* |
| | <i>Ren</i> | -2,059* | -2,456* | -2,712* |
| | <i>AC4</i> | -2,207** | -2,972** | -3,187** |
| Florestal/2008 ² | <i>CP</i> | 0,708 | 0,708 | 0,749 |
| | <i>Rep</i> | 0,812 | 0,812 | 0,865 |
| | <i>Trap</i> | 0,243 | 0,243 | 0,239 |
| | <i>Ren</i> | 1,459 | 1,459 | 1,431 |
| | <i>AC4</i> | 1,458 | 1,458 | 1,431 |
| Florestal/2014 | <i>CP</i> | -2,079* | -2,959** | -3,132** |
| | <i>Rep</i> | -1,177 | -1,162 | -1,343 |
| | <i>Trap</i> | -1,053 | -1,052 | -1,206 |
| | <i>Ren</i> | -1,03 | -0,633 | 0,847 |
| | <i>AC4</i> | -0,99 | -1,024 | -1,165 |
| Goiás ³ | <i>CP</i> | -1,360 | -1,411 | -1,586 |
| | <i>Rep</i> | -1,726 | -1,978 | -2,167 |
| | <i>Trap</i> | -1,438 | -1,855 | -1,977 |
| | <i>Ren</i> | -1,052 | -1,391 | -1,475 |
| | <i>AC4</i> | -1,029 | -1,211 | -1,312 |

*** $P < 0,001$; ** $P < 0,02$; * $P < 0,05$

¹ González-Aguilera *et al.*, 2012.

² Rocha *et al.*, 2013.

³ Sequências obtidas do GeneBank.

Tabela 5. Seleção positiva ou negativa em aminoácidos de cada gene do ToSRV, identificados pelos quatro métodos implementados no programa HyPhy e disponibilizados no servidor Datamonkey.

| Gene | Modelo evolutivo | Método | | | |
|-------------|------------------|---|--|--|--|
| | | SLAC | FEL | REL | IFEL |
| <i>CP</i> | GTR | Quatro sítios sob seleção negativa: 34, 94, 180, 205 | Doze sítios sob seleção negativa: 75, 94, 124, 149, 172, 180, 185, 191, 205, 209, 210, 219 | Nenhum sítio sob seleção detectado | Um sítio sob seleção negativa: 180 |
| <i>Rep</i> | GTR | Treze sítios sob seleção negativa: 12, 14, 42, 49, 80, 103, 147, 148, 188, 268, 303, 322, 351 | Vinte e três sítios sob seleção negativa: 12, 14, 40, 42, 43, 46, 49, 80, 84, 96, 103, 107, 115, 147, 148, 152, 188, 213, 265, 268, 303, 322, 351 | Nenhum sítio sob seleção detectado | Um sítio sob seleção positiva: 168 Quatro sítios sob seleção negativa: 12, 42, 103, 268 |
| <i>Ren</i> | GTR | Dois sítios sob seleção negativa: 40 e 111 | Um sítio sob seleção positiva: 84 Cinco sítios sob seleção negativa: 18, 27, 96, 98, 111 | Um sítio sob seleção positiva: 84 Vinte e cinco sítios sob seleção negativa: 13, 18, 22, 27, 33, 36, 40, 41, 43, 44, 52, 57, 66, 74, 89, 92, 93, 96, 98, 101, 107, 111, 114, 122, 125 | Um sítio sob seleção positiva: 84 Um sítio sob seleção negativa: 40 |
| <i>Trap</i> | HKY85 | Nenhum sítio sob seleção detectado | Três sítios sob seleção negativa: 21, 34, 57 | Dois sítios sob seleção positiva: 86, 129 | Nenhum sítio sob seleção detectado |

Análise filogenética

A análise filogenética demonstrou separação evidente dos isolados de ToSRV em quatro clados: (I) Florestal/2008; (II) São Paulo, Goiás e Distrito Federal; (III) Florestal/2014 e (IV) Viçosa, Coimbra, Carandaí e Jaíba (Figura 3). A grande divergência entre os clados I e III, formados por isolados do mesmo local obtidos em 2008 e 2014, respectivamente, indica elevada divergência temporal. O clado II é formado por isolados de São Paulo, Goiás e Distrito Federal, portanto, sem apresentar agrupamento de acordo com região geográfica. Neste clado, os isolados obtidos de plantas não-cultivadas (*Nicandra physaloides* e *Crotalaria juncea*) e de pimentão não se agruparam de acordo com o hospedeiro. O clado IV reúne o maior número de isolados. Dentro deste clado os isolados de Carandaí estão divididos em dois subgrupos distintos, um deles associado aos isolados de Coimbra. Os isolados de Coimbra se dividem em dois subgrupos, um deles formado por isolados coletados em 2013 (15 isolados) e o segundo por isolados coletados em 2013 e 2014 (oito isolados).

Os isolados do clado I (Florestal/2008) representam o grupo mais ancestral em relação aos isolados dos clados II, III e IV, com divergência do ancestral comum mais recente em 1991 (intervalo médio de credibilidade bayesiana de 1984 a 1999) (Figura 3). Os isolados coletados em Florestal em 2008 e 2014 coexistem no mesmo hospedeiro e região geográfica. Os mecanismos que mantêm essa profunda divergência mantêm-se desconhecidos.

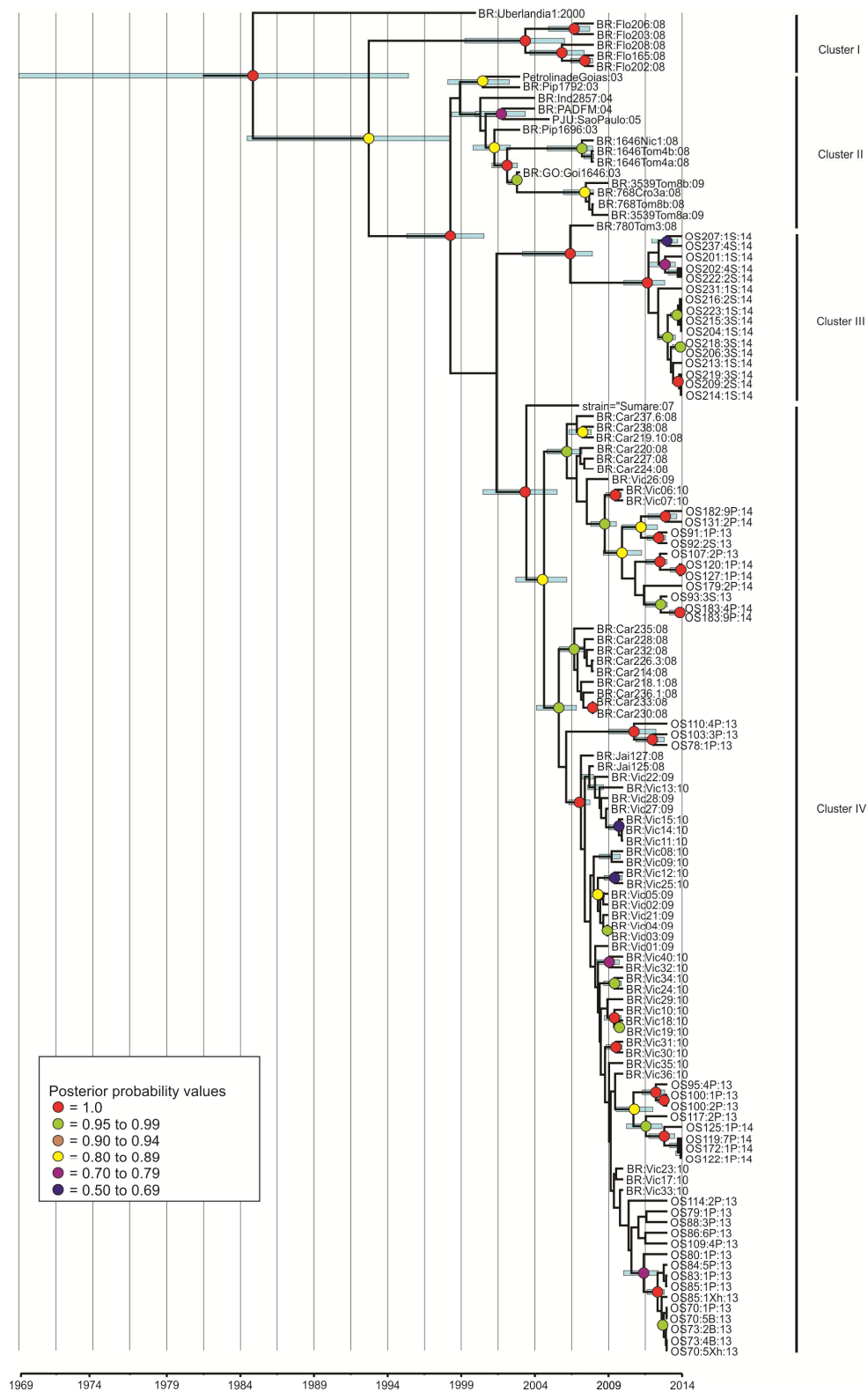


Figura 3. Análise filogenética por inferência Bayesiana dos isolados de ToSRV. Os círculos de diferentes cores representam a probabilidade posterior. O tempo de divergência entre os diferentes grupos populacionais está representado abaixo da árvore. As barras azuis representam o intervalo Bayesiano de período médio de divergência. A análise foi realizada com o programa BEAST v.1.6.1, sendo considerada uma cadeia MCMC de 250.000.000 gerações e *burn in* de 5.000 gerações.

A análise com o programa Structure sugere a estruturação da população de ToSRV. Os isolados agrupados filogeneticamente no clado IV (provenientes de Carandaí, Viçosa e Coimbra) podem ser subdivididos em duas subpopulações (Figura 4A). Os isolados de Carandaí são todos pertencentes a uma dessas duas subpopulações, enquanto em Viçosa e Coimbra co-existem isolados das duas subpopulações, sugerindo a ocorrência de migração de Viçosa/Coimbra para Carandaí. Os isolados dos clados I e III (Florestal/2008 e /2014, respectivamente) são claramente pertencentes a subpopulações distintas (Figura 4B). Este resultado é reforçado pelo valor de F_{st} calculado para essas duas subpopulações (0,77385; Apêndice A4), indicando uma forte estruturação baseada no tempo. O valor da estatística F_{st} para as subpopulações de Viçosa e Coimbra (0,166; Apêndice A4) indica ausência de estruturação baseada no tempo.

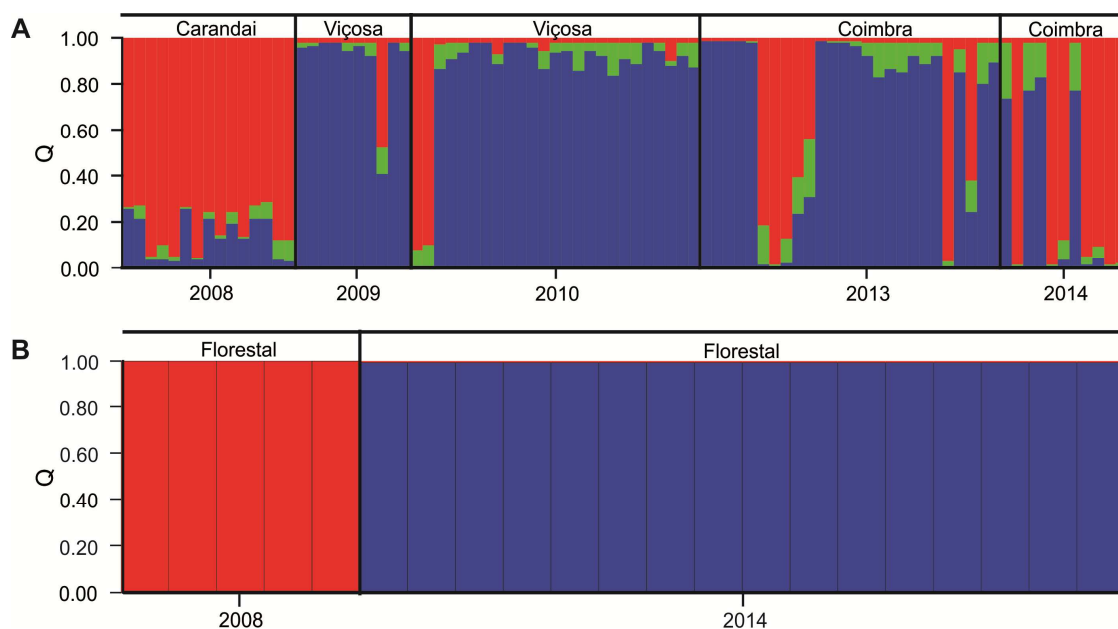


Figura 4. Análise de estruturação com o programa Structure. Cada indivíduo é representado por uma barra vertical e cada cor representa indivíduos da mesma subpopulação. **A.** Populações de Carandaí, Viçosa e Coimbra coletadas em 2008, 2009/2010 e 2013/2014, respectivamente. **B.** Populações de Florestal coletadas em 2008 e 2014.

Análise de coalescência

Na árvore genealógica foram considerados todos os sítios variáveis ao longo do genoma do ToSRV. Diferentes isolados foram considerados: 26 de tomateiro e sete de outros hospedeiros (*Capsicum annuum*, *Crotalaria juncea*, *Nicandra physaloides* e *Sida sp.*) totalizando 18 haplótipos. Nesses haplótipos foram mapeadas 71 mutações (Tabela 6), sendo 28 associadas aos haplótipos B (dois isolados) e G (dois isolados) obtidos em Florestal/2008. A maioria das mutações observadas ao longo do genoma do ToSRV são transições (46/71), com um reduzido número de transversões (25/71). Todas as mutações observadas em pimentão e em plantas não-cultivadas estão associadas também ao tomateiro, com um tempo para divergência da maioria dos haplótipos relativamente recente e estimado em 0,25 (Figura 5). Observou-se nos haplótipos de Florestal/2008 que 12 mutações são de ocorrência exclusiva para o haplótipo B (isolados BR:Flo203:08 e BR:Flo206:08) e apenas duas mutações são relativas ao haplótipo G (BR:Flo202:08 e BR:Flo208:08). A subpopulação de ToSRV obtida em Florestal/2014 não está associada à subpopulação de 2008. Esta constatação é fundamentada pela inexistência de compartilhamento das mutações mapeadas. A história evolutiva do ToSRV tanto pode ter sido originada de pimentão ou tomateiro, pois as mutações observadas apresentam a mesma idade relativa (25% do tempo de divergência). Pode-se também inferir que o ToSRV encontra-se bem adaptado ao tomateiro, e que esporadicamente é transmitido para plantas não-cultivadas.

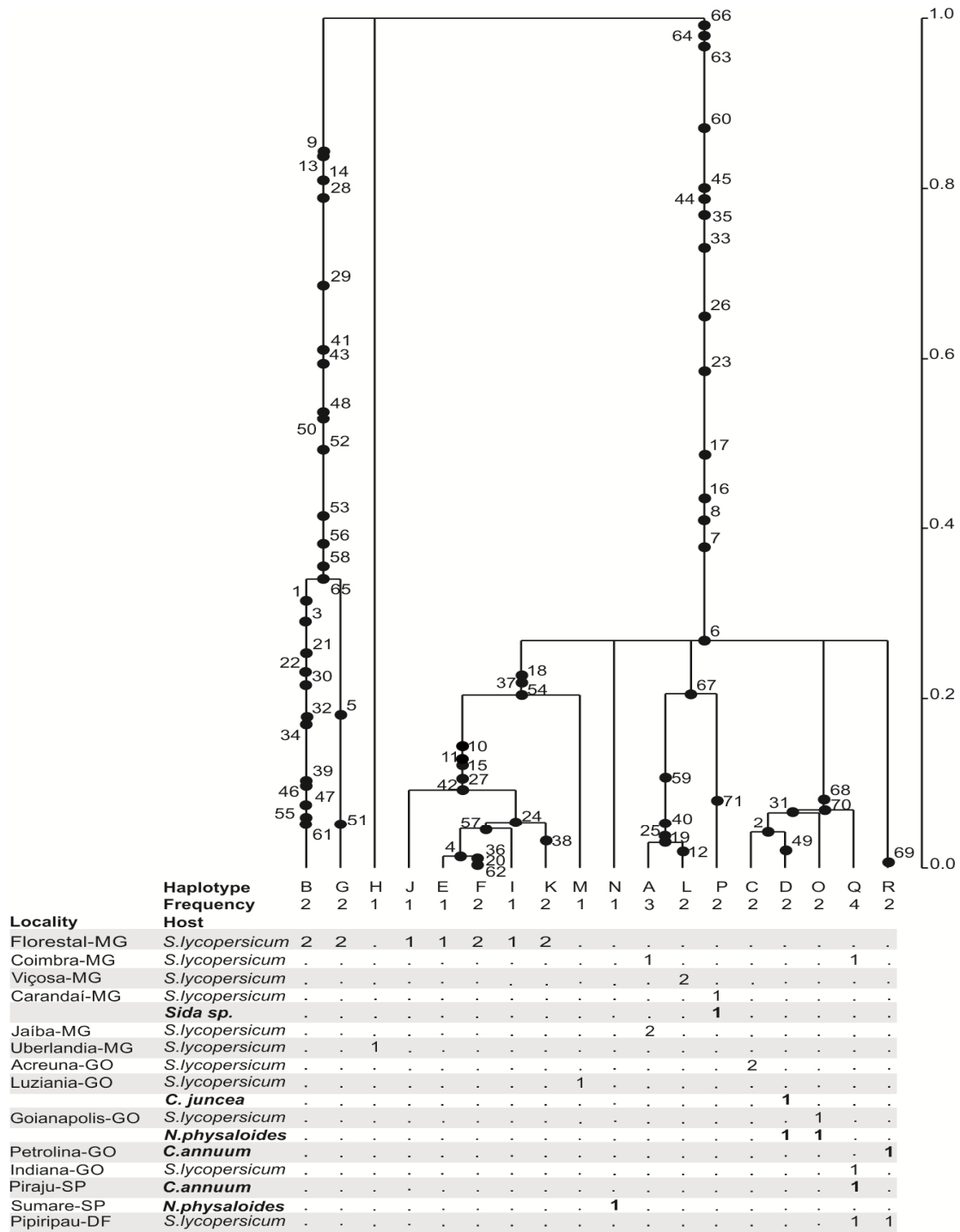


Figura 5. Análise de coalescência baseada em sítios variáveis mostrando a distribuição das mutações no genoma de ToSRV. A análise foi inferida pelo programa Genetree, considerando-se uma cadeia MCMC de 1.000.000 gerações e *burn in* de 100.000 gerações. A escala do tempo de coalescência está representada em unidade do tamanho efetivo da população. Os círculos em preto numerados representam as mutações mapeadas no genoma. Os nomes escritos em negrito representam isolados obtidos em outros hospedeiros.

DISCUSSÃO

Populações de begomovírus que infectam tomateiro e plantas não-cultivadas no Brasil tem sido amplamente estudadas em termos de estrutura e variabilidade genética (González-Aguilera *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2013) e essas análises indicam que as populações são altamente recombinantes, apresentam um elevado grau de variabilidade genética e uma rápida taxa evolutiva. Também foi demonstrado que populações de begomovírus são estruturadas com base em região geográfica, o que explica a emergência de diferentes espécies virais nos diferentes estados brasileiros (Ribeiro *et al.*, 2003). Entretanto, diversos levantamentos recentes indicam que o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) tornou-se predominante em cultivos de tomateiro. Outros trabalhos relatam que esse vírus possui uma gama de hospedeiros que inclui diversas espécies de plantas não-cultivadas, como *Nicandra physaloides* e *Sida* spp. (Nozaki *et al.*, 2006). Entretanto, até o presente, nenhum estudo fez uma abordagem sobre a análise evolutiva das populações de ToSRV e da relevância de sua ocorrência em hospedeiros não-cultivados. Nossos resultados ressaltam que populações de ToSRV que infectam tomateiro encontram-se estruturadas por região geográfica e também de acordo com o tempo. Esses resultados não esclarecem os motivos pelos quais o ToSRV se tornou o vírus predominante em tomateiro, mas indicam que o ToSRV é uma espécie bem adaptada a esse hospedeiro, a partir do qual pode ser eventualmente transferido para outros hospedeiros cultivados (como o pimentão) e não-cultivados.

O ToSRV foi o begomovírus detectado em praticamente todas as amostras de tomateiro coletadas em Coimbra e Florestal nos anos de 2013 e 2014. Rocha *et al.* (2013) haviam relatado a predominância do ToCmMV em Coimbra com base em amostras coletadas em 2007, e do ToCMoV em Florestal com base em amostras coletadas em 2008. Assim, nossos resultados indicam uma rápida substituição do ToCmMV e do ToCMoV pelo ToSRV nessas regiões. O mesmo fenômeno foi observado no estado de Goiás. Um levantamento

extensivo conduzido de 2003 a 2006 indicou a presença do ToSRV, mas também do *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Tomato golden vein virus* (TGVV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) (Fernandes *et al.*, 2008). Um novo levantamento realizado em 2008 nos municípios de Morrinhos e Luziânia detectou apenas o ToSRV (Naito *et al.*, 2012). Conjuntamente, esses resultados fornecem fortes evidências da grande adaptabilidade do ToSRV ao tomateiro. A crescente expansão do ToSRV pode ser explicada pela falta de observância das práticas culturais básicas como a remoção e destruição dos restos de cultura e o frequente hábito de cultivos sucessivos durante todo o ano. Essas práticas contribuem para um suprimento alimentar da mosca branca sem necessidade de migração para hospedeiros alternativos, e garantindo assim a sua fecundidade e capacidade de transmissão de begomovírus. Um fator que poderia explicar a prevalência do ToSRV em plantios de tomateiro seria uma maior eficiência da aquisição e transmissão do ToSRV por *Bemisia tabaci* MEAM1 em relação a outras espécies de begomovírus. Entretanto, não existem informações a esse respeito.

Vários estudos indicam que populações de begomovírus que ocorrem em plantas não-cultivadas apresentam maior taxa de recombinação comparado com populações que ocorrem em plantas cultivadas (García-Andrés *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2013) e sugerem que a recombinação é uma força evolutiva importante atuando significativamente na variabilidade genética (Galvão *et al.*, 2003; Inoue-Nagata *et al.*, 2006). Entretanto, poucos eventos de recombinação intraespecífica foram detectados em nosso estudo, estando restritos aos isolados BR:Ube1:2000 e BR:Vic20:10. González-Aguilera *et al.* (2012) constataram ocorrência da recombinação interespecífica envolvendo os isolados BR:Vic01:09, BR:Vic06:10, BR:Vic20:10, BR:Vic30:10, Petrolina de Goiás:03, PJ-São Paulo:05 e Pi-1:07, e o *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) como parental.

A variabilidade genética de populações de begomovírus é determinada principalmente por mutação e recombinação. Diversos trabalhos relatam que populações infectando

hospedeiros cultivados apresentam menor variabilidade genética em comparação com hospedeiros não-cultivados (Faria & Maxwell, 1999; González-Aguilera *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2013). Resultados idênticos foram alcançados em nosso estudo, tendo sido constatada menor variabilidade genética na população de ToSRV que infecta naturalmente tomateiro em comparação com uma população de ToMIMV obtida da planta não-cultivada *Sida urens*. No entanto, a variabilidade genética total de ToSRV é maior do que a variabilidade observada entre as subpopulações. Subpopulações de Coimbra e Florestal/2008 apresentam maior variabilidade, e o oposto foi observado para a subpopulação de Florestal/2014. A baixa variabilidade genética observada nas subpopulações de ToSRV em relação à variabilidade genética total e a estruturação dessas subpopulações sugere a ocorrência de migração com efeito fundador.

Begomovírus e outros vírus de DNA de fita simples apresentam altas taxas de mutação e substituição nucleotídica, que podem ser comparadas com as de vírus de RNA (Duffy & Holmes, 2008; 2009). Porém, as taxas de mutação e substituição não podem ser comparadas com a frequência pela qual ocorrem mutações ao longo do genoma. Rocha *et al.* (2013) demonstraram que as frequências de mutação determinadas para *Macrottilium yellow spot virus* (MaYSV) que infecta *Macrottilium lathyroides* e *Blainvillea yellow spot virus* (BIYSV) que infecta *Blainvillea rhomboidea*, ambos hospedeiros não-cultivados, são maiores do que as de populações de ToCMoV, ToCmMV e ToYVSV que infectam tomateiro. A frequência de mutação determinada nesse trabalho para o ToSRV em tomateiro ($1,69 \times 10^{-3}$) é baixa, concordando com os resultados de Rocha *et al.* (2013). A frequência de mutação calculada para o ToSRV pode refletir a baixa variabilidade genética do hospedeiro, uma vez que este vírus foi isolado principalmente em tomateiro.

Os resultados dos testes de neutralidade indicam ocorrência predominante de seleção purificadora atuando sobre os genes virais. Essa observação pode ser explicada pelo fato de que durante o ciclo de infecção viral ocorrem vários gargalos que impõem limites à população,

como a necessidade de interação entre a proteína capsial e o ácido nucleico para a formação de partículas, e a aquisição dessas partículas pelo inseto vetor. As diversas interações entre as proteínas virais e fatores do hospedeiro podem também condicionar o efeito gargalo.

Nossas análises filogenéticas demonstram evidente estruturação da população de ToSRV em quatro subpopulações de acordo com região geográfica e o tempo de coleta das amostras. Isolados de Florestal e Coimbra foram divididos em duas subpopulações de acordo com o ano de coleta das amostras (2008; julho de 2013 e fevereiro de 2014; maio de 2014). No entanto as subpopulações de Florestal se encontram fortemente estruturadas de acordo com o tempo, o que não acontece com a subpopulação de Coimbra. Resultados anteriores obtidos por González-Aguilera *et al.* (2012) analisando populações de ToSRV coletadas em Viçosa nos anos de 2009 e 2010 não indicaram estruturação dos isolados de acordo com o tempo.

Análise baseada em coalescência permitiu mapear as mutações que ocorrem ao longo do genoma do ToSRV. Todas as mutações observadas em pimentão e plantas não-cultivadas são comuns para tomateiro e apresentam a mesma idade relativa. As mutações mais antigas situam-se no gene *Rep*, seguida do gene *CP*. Estas observações sugerem que o ToSRV é uma espécie viral bem adaptada ao tomateiro, e que sua transferência para outros hospedeiros tem sido realizada esporadicamente pelo inseto vetor.

LITERATURA CITADA

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers e D. J. Lipman. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, p. 403-410. 1990.
- Ambrozevicius, L. P., R. F. Calegario, E. P. B. Fontes, M. G. Carvalho e F. M. Zerbini. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, p. 372-377. 2002.
- Andrade, E. C., G. G. Manhani, P. F. Alfenas, R. F. Calegario, E. P. B. Fontes e F. M. Zerbini. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology*, v. 87, p. 3687-3696. 2006.
- Aylor, D., E. Price e I. Carbone. SNAP: Combine and Map modules for multilocus population genetic analysis. *Bioinformatics*, v. 22, p. 1399-1401. 2006.
- Bahlo, M. e R. C. Griffiths. Inference from gene trees in a subdivided population. *Theoretical Population Biology*, v. 57, p. 79-95. 2000.
- Barbosa, L.D., V. A. Yuki, J. M. Marubayashi, B. R. De Marchi, F. L. Perini, M. A. Pavan, D. R. Barros, M. Ghanim, E. Moriones, J. Navas-Castillo e R. K. Sakate. First report of *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. *Pest Management Science*, 2014.
- Briddon, R. W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology*, v. 4, p. 427-434. 2003.
- Briddon, R. W., M. S. Pinner, J. Stanley e P. G. Markham. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*, v. 177, p. 85-94. 1990.
- Briddon, R. W. e J. Stanley. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology*, v. 344, p. 198-210. 2006.
- Brown, J. K. Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-Begomovirus complexes. *Virus Research*, v. 71, p. 233-260. 2000.
- Brown, J. K., C. M. Fauquet, R. W. Briddon, F. M. Zerbini, E. Moriones e J. Navas-Castillo. Family *Geminiviridae*. p. 351-373, *In*: A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens e E. J. Lefkowitz (Eds.). *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, UK: Elsevier Academic Press. 2012.
- Calegario, R. F., S. S. Ferreira, E. C. Andrade e F. M. Zerbini. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, p. 1335-1343. 2007.
- Castillo-Urquiza, G. P., J. E. A. Beserra Jr., F. P. Bruckner, A. T. M. Lima, A. Varsani, P. Alfenas-Zerbini e F. M. Zerbini. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology*, v. 153, p. 1985-1989. 2008.
- Dinsdale, A., L. Cook, C. Riginos, Y. M. Buckley e P. De Barro. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 103, p. 196-208. 2010.
- Drummond, A. J. e A. Rambaut. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, v. 7, p. 214. 2007.

- Duffy, S. e E. C. Holmes. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus*. *Journal of Virology*, v. 82, p. 957-965. 2008.
- Duffy, S. e E. C. Holmes. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: Phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *Journal of General Virology*, v. 90, p. 1539-1547. 2009.
- Edgar, R. C. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, v. 5, p. 1-19. 2004.
- Evanno, G., S. Regnaut e J. Goudet. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, v. 14, p. 2611-2620. 2005.
- Fernandes, F. R., L. C. Albuquerque, L. B. Giordano, L. S. Boiteux, A. C. Ávila e A. K. Inoue-Nagata. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes*, v. 36, p. 251-258. 2008.
- Fernandes, J. J., M. G. Carvalho, E. C. Andrade, S. H. Brommonschenkel, E. P. B. Fontes e F. M. Zerbini. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology*, v. 55, p. 513-522. 2006.
- Fontes, E. P. B., V. A. Luckow e L. Hanley-Bowdoin. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell*, v. 4, p. 597-608. 1992.
- Ge, L. M., J. T. Zhang, X. P. Zhou e H. Y. Li. Genetic structure and population variability of tomato yellow leaf curl China virus. *Journal of Virology*, v. 81, p. 5902-5907. 2007.
- González-Aguilera, J., S. S. Tavares, R. R. Sobrinho, C. A. D. Xavier, F. Dueñas-Hurtado, R. M. Lara-Rodrigues, D. J. H. D. Silva e F. M. Zerbini. Genetic structure of a Brazilian population of the begomovirus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). *Tropical Plant Pathology*, v. 37, p. 346-353. 2012.
- Hofer, P., I. D. Bedford, P. G. Markham, H. Jeske e T. Frischmuth. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology*, v. 236, p. 288-95. 1997.
- Huson, D. H. e D. Bryant. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, v. 23, p. 254-267. 2006.
- IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa>. Acessado em 19 de dezembro de 2014.
- Inoue-Nagata, A. K., L. C. Albuquerque, W. B. Rocha e T. Nagata. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods*, v. 116, p. 209-211. 2004.
- Jones, D. R. Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology*, v. 109, p. 195-219. 2003.
- Lima, A. T. M., R. R. Sobrinho, J. Gonzalez-Aguilera, C. S. Rocha, S. J. C. Silva, C. A. D. Xavier, F. N. Silva, S. Duffy e F. M. Zerbini. Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. *Journal of General Virology*, v. 94, p. 418-431. 2013.
- Mansoor, S., R. W. Briddon, Y. Zafar e J. Stanley. Geminivirus disease complexes: An emerging threat. *Trends in Plant Science*, v. 8, p. 128-34. 2003.

- Mansoor, S., Y. Zafar e R. W. Briddon. Geminivirus disease complexes: The threat is spreading. *Trends in Plant Science*, v. 11, p. 209-212. 2006.
- Martin, D. P., P. Lemey, M. Lott, V. Moulton, D. Posada e P. Lefevre. RDP3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*, v. 26, p. 2462-2463. 2010.
- Marubayashi, J. M., V. A. Yuki, K. C. G. Rocha, T. Mituti, F. M. Pelegrinotti, F. Z. Ferreira, M. F. Moura, J. Navas-Castillo, E. Moriones, M. A. Pavan e R. Krause-Sakate. At least two indigenous species of the *Bemisia tabaci* complex are present in Brazil. *Journal of Applied Entomology*, v. 137, p. 113-121. 2013.
- Melgarejo, T. A., T. Kon, M. R. Rojas, L. Paz-Carrasco, F. M. Zerbini e R. L. Gilbertson. Characterization of a new world monopartite begomovirus causing leaf curl disease of tomato in Ecuador and Peru reveals a new direction in geminivirus evolution. *Journal of Virology*, v. 87, p. 5397-5413. 2013.
- Monci, F., S. Sanchez-Campos, J. Navas-Castillo e E. Moriones. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*, v. 303, p. 317-26. 2002.
- Morales, F. J. e P. K. Anderson. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, v. 146, p. 415-441. 2001.
- Morales, F. J. e P. G. Jones. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research*, v. 100, p. 57-65. 2004.
- Muhire, B., D. P. Martin, J. K. Brown, J. Navas-Castillo, E. Moriones, F. M. Zerbini, R. Rivera-Bustamante, V. G. Malathi, R. W. Briddon e A. Varsani. A genome-wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the genus *Mastrevirus* (family *Geminiviridae*). *Archives of Virology*, v. 158, p. 1411-1424. 2013.
- Naito, F. Y. B. Avaliação da diversidade de begomovírus em tomateiro em três pólos de produção de tomate para processamento do Brasil. Tese de Mestrado. Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, 2012.
- Noueiry, A. O., W. J. Lucas e R. L. Gilbertson. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, v. 76, p. 925-932. 1994.
- Nylander, J. A. A. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. 2004.
- Orozco, B. M., A. B. Miller, S. B. Settlage e L. Hanley-Bowdoin. Functional domains of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 9840-6. 1997.
- Padidam, M., R. N. Beachy e C. M. Fauquet. The role of AV2 ("precoat") and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology*, v. 224, p. 390-404. 1996.
- Pedersen, T. J. e Hanley-Bowdoin. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. *Virology*, v. 202, p. 1070-1075. 1994.
- Polston, J. E. e P. K. Anderson. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease*, v. 81, p. 1358-1369. 1997.
- Pond, S. L. e S. D. Frost. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics*, v. 21, p. 2531-3. 2005.

- Prasanna, H. C., D. P. Sinha, A. Verma, M. Singh, B. Singh, M. Rai e D. P. Martin. The population genomics of begomoviruses: Global scale population structure and gene flow. *Virology Journal*, v. 7, p. 220. 2010.
- Price, E. W. e I. Carbone. SNAP: Workbench management tool for evolutionary population genetic analysis. *Bioinformatics*, v. 21, p. 402-404. 2005.
- Pritchard, J. K., M. Stephens e P. Donnelly. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v. 155, p. 945-959. 2000.
- Ribeiro, S. G., L. P. Ambrozevicius, A. C. Ávila, I. C. Bezerra, R. F. Calegario, J. J. Fernandes, M. F. Lima, R. N. Mello, H. Rocha e F. M. Zerbini. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v. 148, p. 281-295. 2003.
- Rocha, C. S., G. P. Castillo-Urquiza, A. T. M. Lima, F. N. Silva, C. A. D. Xavier, B. T. Hora-Junior, J. E. A. Beserra-Junior, A. W. O. Malta, D. P. Martin, A. Varsani, P. Alfenas-Zerbini, E. S. G. Mizubuti e F. M. Zerbini. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. *Journal of Virology*, v. 87, p. 5784-5799. 2013.
- Rojas, M. R., R. L. Gilbertson, D. R. Russell e D. P. Maxwell. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease*, v. 77, p. 340-347. 1993.
- Rozas, J., J. C. Sánchez-Delbarrio, X. Messeguer e R. Rozas. DnaSP: DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, v. 19, p. 2496-2497. 2003.
- Sambrook, J. e D. Russel. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (3^a ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. 2344 p.
- Sanderfoot, A. A. e S. G. Lazarowitz. Getting it together in plant virus movement: Cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends in Cell Biology*, v. 6, p. 353-358. 1996.
- Silva, F., A. Lima, C. Rocha, G. Castillo-Urquiza, M. Alves-Júnior e F. Zerbini. 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*, v. 11, p. 66. 2014.
- Silva, S. J. C., G. P. Castillo-Urquiza, B. T. Hora-Junior, I. P. Assunção, G. S. A. Lima, G. Pio-Ribeiro, E. S. G. Mizubuti e F. M. Zerbini. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. *Plant Pathology*, v. 61, p. 457-467. 2012.
- Sunter, G., M. D. Hartitz, S. G. Hormuzdi, C. L. Brough e D. M. Bisaro. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology*, v. 179, p. 69-77. 1990.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei e S. Kumar. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, p. 2731-2739. 2011.
- Vanitharani, R., P. Chellappan, J. S. Pita e C. M. Fauquet. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*, v. 78, p. 9487-98. 2004.

- Varsani, A., J. Navas-Castillo, E. Moriones, C. Hernández-Zepeda, A. Idris, J. K. Brown, F. M. Zerbini e D. P. Martin. Establishment of three new genera in the family *Geminiviridae*: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. *Archives of Virology*, v. 159, p. 2193-2203. 2014.
- Voinnet, O., Y. M. Pinto e D. C. Baulcombe. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 96, p. 14147-14152. 1999.
- Wang, H., K. J. Buckley, X. Yang, R. C. Buchmann e D. M. Bisaro. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Journal of Virology*, v. 79, p. 7410-7418. 2005.
- Were, H. K., S. Winter e E. Maiss. Viruses infecting cassava in Kenya. *Plant Disease*, v. 88, p. 17-22. 2004.

APÊNDICES

Apêndice A1. Sintomas de begomovírus induzidos em plantas de tomateiro e em plantas não-cultivadas. **A.** Mosaico em planta de *Sida acuta*. **B.** Mosaico e nanismo em plantas de *Blainvillea rhomboidea*. **C.** Mosaico em tomateiro. **D.** Nanismo e deformação foliar em tomateiro. **E.** Mosaico e deformação foliar em tomateiro.



Apêndice A2. Isolados de begomovírus (DNA-A) obtidos neste trabalho.

| Isolado | Local | Coleta | Lat (S) | Long (W) | Hospedeiro | Espécie | Enzima |
|----------------|--------------|---------------|----------------|-----------------|-------------------|--|---------------|
| OS 1-1S | Coimbra | 2013 | 20°49,02' 9" | 42°52,06'3" | <i>Sida acuta</i> | <i>Sida acuta mosaic virus (SAMV)</i> | <i>SacI</i> |
| OS 6-1S | Coimbra | 2013 | 20°49,02' 9" | 42°52,06'3" | <i>Sida acuta</i> | SAMV | <i>SacI</i> |
| OS 8-1S | Coimbra | 2013 | 20°49,02' 9" | 42°52,06'3" | <i>Sida acuta</i> | SAMV | <i>SacI</i> |
| OS 11-4S | Coimbra | 2013 | 20°49,02' 9" | 42°52,06'3" | <i>Sida acuta</i> | SAMV | <i>SacI</i> |
| OS 52-4S | Coimbra | 2013 | 20°51'29,9" | 42°51'42,2" | <i>Sida urens</i> | <i>Tomato mild mosaic virus (ToMIMV)</i> | <i>SacI</i> |
| OS 42-1S | Coimbra | 2013 | 20°51'29,9" | 42°51'42,2" | <i>Sida urens</i> | ToMIMV | <i>SacI</i> |
| OS 46-7S | Coimbra | 2013 | 20°51'29,9" | 42°51'42,2" | <i>Sida urens</i> | ToMIMV | <i>SacI</i> |
| OS38-6Xb | Coimbra | 2013 | 20°51'29,9" | 42°51'42,2" | Sidastrum | <i>Tomato severe rugose virus (ToSRV)</i> | <i>XbaI</i> |
| OS 73-1P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | <i>Tomato common mosaic virus (ToCmMV)</i> | <i>PstI</i> |
| OS 70-5XhI | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>XhoI</i> |
| OS 70-1P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS 70-5B | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>BamHI</i> |
| OS 73-2B | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>BamHI</i> |
| OS 73-4B | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>BamHI</i> |
| OS 78-1P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS 79-1P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS 80-1P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS 83-1P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS 84-5P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS 85-1XhI | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>XhoI</i> |
| OS 85-1P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS 86-6P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS 88-3P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS 91-1P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS92-2S | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |
| OS93-3S | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |
| OS 95-4P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |

| | | | | | | | |
|-----------|-----------|------|-------------|-------------|-----------|--|--------------|
| OS 100-1P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS 100-2P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS 103-3P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS 107-2P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS 109-4P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS 110-4P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS 114-2P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS 117-2P | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS119-7P | Coimbra | 2014 | 20°36'39,3" | 42°25'58,9" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS120-1P | Coimbra | 2014 | 20°36'39,3" | 42°25'58,9" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS122-1P | Coimbra | 2014 | 20°36'39,3" | 42°25'58,9" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS125-1P | Coimbra | 2014 | 20°36'39,3" | 42°25'58,9" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS127-1P | Coimbra | 2014 | 20°36'39,3" | 42°25'58,9" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS131-2P | Coimbra | 2014 | 20°36'39,3" | 42°25'58,9" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS172-1P | Coimbra | 2014 | 20°50'58,3" | 42°53'14,4" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS179-2P | Coimbra | 2014 | 20°50'58,3" | 42°53'14,4" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS182-9P | Coimbra | 2014 | 20°50'58,3" | 42°53'14,4" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS183-4P | Coimbra | 2014 | 20°50'58,3" | 42°53'14,4" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS183-9P | Coimbra | 2014 | 20°50'58,3" | 42°53'14,4" | Tomateiro | ToSRV | <i>PstI</i> |
| OS89-2B | Coimbra | 2013 | 20°51'43,2" | 42°51'27" | Tomateiro | <i>Sida common mosaic virus (SiCmMV)</i> | <i>BamHI</i> |
| OS201-1S | Florestal | 2014 | 19°55'51,3" | 44°23'52,5" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |
| OS202-4S | Florestal | 2014 | 19°55'51,3" | 44°23'52,5" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |
| OS204-1S | Florestal | 2014 | 19°55'51,3" | 44°23'52,5" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |
| OS206-3S | Florestal | 2014 | 19°55'51,3" | 44°23'52,5" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |
| OS207-1S | Florestal | 2014 | 19°55'51,3" | 44°23'52,5" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |
| OS209-2S | Florestal | 2014 | 19°55'51,3" | 44°23'52,5" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |
| OS213-1S | Florestal | 2014 | 19°55'51,3" | 44°23'52,5" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |
| OS214-1S | Florestal | 2014 | 19°55'51,3" | 44°23'52,5" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |
| OS215-3S | Florestal | 2014 | 19°55'51,3" | 44°23'52,5" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |
| OS216-2S | Florestal | 2014 | 19°55'51,3" | 44°23'52,5" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |
| OS218-3S | Florestal | 2014 | 19°55'51,3" | 44°23'52,5" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |

| | | | | | | | |
|----------|-----------|------|-------------|-------------|-------------------------------|--|-------------|
| OS219-3S | Florestal | 2014 | 19°55'51,3" | 44°23'52,5" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |
| OS222-2S | Florestal | 2014 | 19°55'51,3" | 44°23'52,5" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |
| OS223-1S | Florestal | 2014 | 19°55'51,3" | 44°23'52,5" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |
| OS231-1S | Florestal | 2014 | 19°52'25" | 44°25'03" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |
| OS237-4S | Florestal | 2014 | 19°52'25" | 44°25'03" | Tomateiro | ToSRV | <i>SacI</i> |
| OS32-1P | Coimbra | 2013 | 20°51'29,9" | 42°51'42,2" | <i>Blainvillea rhomboidea</i> | <i>Blainvillea yellow spot virus</i> (BIYSV) | <i>PstI</i> |
| OS32a-2A | Coimbra | 2013 | 20°51'29,9" | 42°51'42,2" | <i>Blainvillea rhomboidea</i> | BIYSV | <i>ApaI</i> |
| OS34a-2A | Coimbra | 2013 | 20°51'29,9" | 42°51'42,2" | <i>Blainvillea rhomboidea</i> | BIYSV | <i>ApaI</i> |
| OS37-1P | Coimbra | 2013 | 20°51'29,9" | 42°51'42,2" | <i>Blainvillea rhomboidea</i> | BIYSV | <i>PstI</i> |
| OS37-2P | Coimbra | 2013 | 20°51'29,9" | 42°51'42,2" | <i>Blainvillea rhomboidea</i> | BIYSV | <i>PstI</i> |
| OS51a-2A | Coimbra | 2013 | 20°51'29,9" | 42°51'42,2" | <i>Blainvillea rhomboidea</i> | BIYSV | <i>ApaI</i> |
| OS142-1P | Coimbra | 2014 | 20°50'58,3" | 42°53'14,4" | <i>Blainvillea rhomboidea</i> | BIYSV | <i>PstI</i> |
| OS151-4P | Coimbra | 2014 | 20°50'58,3" | 42°53'14,4" | <i>Blainvillea rhomboidea</i> | BIYSV | <i>PstI</i> |
| OS152-4P | Coimbra | 2014 | 20°50'58,3" | 42°53'14,4" | <i>Blainvillea rhomboidea</i> | BIYSV | <i>PstI</i> |
| OS154-1P | Coimbra | 2014 | 20°50'58,3" | 42°53'14,4" | <i>Blainvillea rhomboidea</i> | BIYSV | <i>PstI</i> |
| OS155-1P | Coimbra | 2014 | 20°50'58,3" | 42°53'14,4" | <i>Blainvillea rhomboidea</i> | BIYSV | <i>PstI</i> |
| OS156-1P | Coimbra | 2014 | 20°50'58,3" | 42°53'14,4" | <i>Blainvillea rhomboidea</i> | BIYSV | <i>PstI</i> |
| OS157-1P | Coimbra | 2014 | 20°50'58,3" | 42°53'14,4" | <i>Blainvillea rhomboidea</i> | BIYSV | <i>PstI</i> |
| OS164-1P | Coimbra | 2014 | 20°50'58,3" | 42°53'14,4" | <i>Blainvillea rhomboidea</i> | BIYSV | <i>PstI</i> |
| OS153-1P | Coimbra | 2014 | 20°50'58,3" | 42°53'14,4" | <i>Sida</i> sp. | BIYSV | <i>PstI</i> |

Apêndice A3. Sequências de begomovírus (DNA-A) obtidas do GenBank.

| Acrônimo | Espécie viral | Hospedeiro | Local de coleta | Ano de coleta | Acesso | Referência |
|-----------------|---|-------------------|------------------------|----------------------|---------------|-------------------|
| BR:Vic17.1:10 | <i>Tomato mild mosaic virus</i> (ToMIMV) | <i>Sida urens</i> | Viçosa | 2010 | KC706606 | |
| BR:Vic17.2:10 | ToMIMV | <i>Sida urens</i> | Viçosa | 2010 | KC706607 | |
| BR:Vic19:10 | ToMIMV | <i>Sida urens</i> | Viçosa | 2010 | KC706608 | |
| BR:Coi7:07 | <i>Tomato common mosaic virus</i> (ToCmMV) | Tomateiro | Coimbra | 2007 | KC706578 | |
| BR:Coi8:07 | ToCmMV | Tomateiro | Coimbra | 2007 | KC706579 | |
| BR:Coi10:07 | ToCmMV | Tomateiro | Coimbra | 2007 | KC706569 | |
| BR:Coi11:07 | ToCmMV | Tomateiro | Coimbra | 2007 | KC706570 | |
| BR:Coi12:07 | ToCmMV | Tomateiro | Coimbra | 2007 | KC706571 | |
| BR:Coi15:07 | ToCmMV | Tomateiro | Coimbra | 2007 | KC706572 | |
| BR:Coi18:07 | ToCmMV | Tomateiro | Coimbra | 2007 | KC706573 | |
| BR:Coi20:07 | ToCmMV | Tomateiro | Coimbra | 2007 | KC706574 | |
| BR:Coi21:07 | ToCmMV | Tomateiro | Coimbra | 2007 | KC706575 | |
| BR:Coi22:07 | ToCmMV | Tomateiro | Coimbra | 2007 | EU710754 | |
| BR:Coi23:07 | ToCmMV | Tomateiro | Coimbra | 2007 | KC706576 | |
| BR:Coi24:07 | ToCmMV | Tomateiro | Coimbra | 2007 | KC706577 | |
| BR:Jai125:08 | <i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV) | Tomateiro | Jaíba | 2008 | KC004068 | |
| BR:Jai127:08 | ToSRV | Tomateiro | Jaíba | 2008 | KC004069 | |
| BR:Flo165:08 | ToSRV | Tomateiro | Florestal | 2008 | KC004070 | |
| BR:Flo202:08 | ToSRV | Tomateiro | Florestal | 2008 | KC004071 | |
| BR:Flo203:08 | ToSRV | Tomateiro | Florestal | 2008 | KC004072 | |
| BR:Flo206:08 | ToSRV | Tomateiro | Florestal | 2008 | KC004073 | |
| BR:Flo208:08 | ToSRV | Tomateiro | Florestal | 2008 | KC004074 | |
| BR:Car214:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004075 | |
| BR:Car218.1:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004076 | |

| | | | | | |
|-----------------|-------|-----------------|----------|------|----------|
| BR:Car218.3:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004076 |
| BR:Car219.10:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004077 |
| BR:Car220:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004078 |
| BR:Car221.8:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004078 |
| BR:Car224:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004079 |
| BR:Car226.3:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004080 |
| BR:Car226.5:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004080 |
| BR:Car227:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004081 |
| BR:Car228:08 | ToSRV | <i>Sida sp.</i> | Carandaí | 2008 | KC004082 |
| BR:Car230:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004083 |
| BR:Car231.8:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004083 |
| BR:Car232:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004084 |
| BR:Car233:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004085 |
| BR:Car235:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004086 |
| BR:Car236.1:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004087 |
| BR:Car237.6:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004088 |
| BR:Car238:08 | ToSRV | Tomateiro | Carandaí | 2008 | KC004089 |
| BR:Vic01:09 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2009 | JX865615 |
| BR:Vic02:09 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2009 | JX865616 |
| BR:Vic03:09 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2009 | JX865617 |
| BR:Vic04:09 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2009 | JX865618 |
| BR:Vic05:09 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2009 | JX865619 |
| BR:Vic06:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865620 |
| BR:Vic07:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865621 |
| BR:Vic08:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865622 |
| BR:Vic09:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865623 |
| BR:Vic10:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865624 |
| BR:Vic11:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865625 |
| BR:Vic12:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865626 |
| BR:Vic13:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865627 |

| | | | | | |
|------------------|-------|-----------------------------|-----------------|------|----------|
| BR:Vic14:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865628 |
| BR:Vic15:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865629 |
| BR:Vic17:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865630 |
| BR:Vic18:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865631 |
| BR:Vic19:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865632 |
| BR:Vic20:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865633 |
| BR:Vic21:09 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2009 | JX865634 |
| BR:Vic22:09 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2009 | JX865635 |
| BR:Vic23:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865636 |
| BR:Vic24:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865637 |
| BR:Vic25:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865638 |
| BR:Vic26:09 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2009 | JX865639 |
| BR:Vic27:09 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2009 | JX865640 |
| BR:Vic28:09 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2009 | JX865641 |
| BR:Vic29:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865642 |
| BR:Vic30:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865643 |
| BR:Vic31:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865644 |
| BR:Vic32:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865645 |
| BR:Vic33:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865646 |
| BR:Vic34:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865647 |
| BR:Vic35:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865648 |
| BR:Vic36:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865649 |
| BR:Vic40:10 | ToSRV | Tomateiro | Viçosa | 2010 | JX865650 |
| BR:3539Tom8b:09 | ToSRV | Tomateiro | Acreúna, GO | 2009 | JX415202 |
| BR:3539Tom8a:09 | ToSRV | Tomateiro | Acreúna, GO | 2009 | JX415201 |
| BR:GO:Goi1646:03 | ToSRV | <i>Nicandra physaloides</i> | Goianápolis, GO | 2003 | JX415188 |
| BR:1646Nic1:08 | ToSRV | <i>Nicandra physaloides</i> | Goianápolis, GO | 2008 | JX415197 |
| BR:1646Tom4b:08 | ToSRV | Tomateiro | Goianápolis, GO | 2008 | JX415199 |
| BR:1646Tom4a:08 | ToSRV | Tomateiro | Goianápolis, GO | 2008 | JX415198 |
| BR:Ind2857:04 | ToSRV | Tomateiro | Indiana, GO | 2004 | JF803262 |

| | | | | | |
|--------------------|-------|-----------------------------|----------------|------|----------|
| BR:780Tom3:08 | ToSRV | Tomateiro | Luziânia, GO | 2008 | JX415196 |
| BR:768Tom8b:08 | ToSRV | Tomateiro | Luziânia, GO | 2008 | JX415193 |
| BR:768Cro3a:08 | ToSRV | <i>Crotalaria juncea</i> | Luziânia, GO | 2008 | JX415190 |
| Petrolina de Goiás | ToSRV | Pimentão | Petrolina, GO | 2005 | DQ207749 |
| BR:Pip1792:03 | ToSRV | Tomateiro | Pipiripau, DF | 2003 | JF803261 |
| BR:Pip1696:03 | ToSRV | Tomateiro | Pipiripau, DF | 2003 | JF803260 |
| PJU-São Paulo | ToSRV | Pimentão | Piraju, SP | 2005 | FJ824808 |
| Sumaré | ToSRV | <i>Nicandra physaloides</i> | Sumaré, SP | 2007 | EU086591 |
| Brazil:Ube1:2000 | ToSRV | Não informado | Uberlândia, MG | 2000 | AY029750 |
| BR:PADFM:04 | ToSRV | Tomateiro | DF | 2004 | JF803263 |
| Pi-1 | ToSRV | Tomateiro | Não informado | 2007 | HQ606467 |

Apêndice A4. Resultados dos testes de subdivisão da população de ToSRV.

| População | Nst | Fst |
|-----------------------------|-------|-------|
| Florestal (2008) e Carandaí | 0,745 | 0,742 |
| Florestal (2008) e Viçosa | 0,762 | 0,760 |
| Florestal (2008) e Coimbra | 0,688 | 0,685 |
| Florestal (2008) e Go_DF_SP | 0,689 | 0,686 |
| Carandaí e Viçosa | 0,430 | 0,429 |
| Carandaí e Coimbra | 0,215 | 0,215 |
| Carandaí e Go_DF_SP | 0,387 | 0,387 |
| Viçosa e Coimbra | 0,090 | 0,090 |
| Viçosa e Go_DF_SP | 0,507 | 0,506 |
| Coimbra e Go_DF_SP | 0,353 | 0,352 |

Go_DF_SP: Goiás, Distrito Federal e São Paulo