

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

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE BEGOMOVIRUS EM
TOMATEIRO EM TRÊS PÓLOS DE PRODUÇÃO DE TOMATE
PARA PROCESSAMENTO DO BRASIL

FERNANDA YURI BORGES NAITO

BRASÍLIA, 2012

FERNANDA YURI BORGES NAITO



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE BEGOMOVIRUS EM
TOMATEIRO EM TRÊS PÓLOS DE PRODUÇÃO DE TOMATE
PARA PROCESSAMENTO DO BRASIL

FERNANDA YURI BORGES NAITO

BRASÍLIA, 2012

FERNANDA YURI BORGES NAITO

FERNANDA YURI BORGES NAITO

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE BEGOMOVIRUS EM
TOMATEIRO EM TRÊS PÓLOS DE PRODUÇÃO DE TOMATE
PARA PROCESSAMENTO DO BRASIL

Orientadora: Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília como
requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em
Fitopatologia pelo Programa de
Pós-graduação em Fitopatologia.

BRASÍLIA - DISTRITO FEDERAL, 2012

Agradecimentos

A Deus, por sua presença em minha vida e pela saúde que me possibilita realizar cada sonho e trilhar meu caminho.

À minha orientadora, Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata, por tudo que me ensinou ao longo desses anos. Por ser um modelo de dedicação, por sua presença constante e por todo o incentivo que me possibilitou chegar até aqui.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, fazendo o máximo para que eu tivesse uma boa formação. Por todo o carinho e por me ensinarem muitos valores e me ajudarem a me tornar a pessoa que sou hoje.

Aos colegas e amigos de laboratório, por sempre me ajudarem quando foi preciso, me ensinando muitas coisas e tornando o ambiente de trabalho agradável.

Às minhas amigas Danyelle, Caroline, Daniele e Akemi, por sempre me apoiarem e incentivarem em todos os momentos da minha vida. Obrigada por sempre estarem presentes e tornarem todos os momentos mais felizes.

Aos amigos do SJG e WS, que me acompanharam durante vários anos, me trazendo momentos de lazer e alegria. Às pessoas maravilhosas que conheci graças aos grupos, que sempre vou ter em meu coração.

Aos colegas de mestrado e doutorado, que passaram junto comigo por vários momentos difíceis e que deixaram muitas boas memórias dessa experiência maravilhosa. Obrigada!

A todos do Departamento de Fitopatologia, professores, técnicos e funcionários, pelo acolhimento e ensinamentos.

À Embrapa Hortaliças, pelo espaço e apoio concedido para a realização desse trabalho.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

Dissertação de Mestrado realizada junto ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob orientação da pesquisadora Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata. Apoio institucional da Embrapa Hortaliças e financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Banca examinadora:

Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata (orientadora)

Universidade de Brasília – UnB

Embrapa Hortaliças – CNPH

Dr. Renato de Oliveira Resende

Universidade de Brasília – UnB

Dra. Fernanda Rausch Fernandes

Embrapa Hortaliças – CNPH

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVO GERAL.....	6
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
4.1. A cultura do tomate.....	8
4.2. Família <i>Geminiviridae</i>	11
4.3. Introdução de estirpe e variante como níveis taxonômicos para begomovírus.....	13
4.4. Características genômicas dos begomovírus.....	14
4.5. Replicação dos begomovírus	16
4.6. Um breve histórico dos geminivírus.....	17
4.7. Histórico de begomovírus no Brasil.....	21
4.8. Infecção mista e recombinação.....	25
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

RELAÇÃO DE ACRÔNIMOS

ACMV: *African cassava mosaic virus*

BCTV: *Beet curly top virus*

BGMV: *Bean golden mosaic virus*

CdTV: *Chino del tomato virus*

CMD: Cucumber mosaic disease

CMV: *Cucumber mosaic virus*

EACMV-UG: *East African cassava mosaic virus-Uganda*

MSD: Maize streak disease

MSV: *Maize streak virus*

PYMV-TT: *Potato yellow mosaic virus-Trinidad*

TGMV: *Tomato golden mosaic virus*

TLCV: *Tomato leaf curl virus*

TMV: *Tobacco mosaic virus*

TMoV: *Tomato mottle virus*

ToCMoV: *Tomato chlorotic mottle virus*

ToRMV: *Tomato rugose mosaic virus*

ToSRV: *Tomato severe rugose virus*

ToYVSV: *Tomato yellow vein streak virus*

TPCTV: *Tomato pseudo-curly top virus*

TYLCV: *Tomato yellow leaf curl virus*

TYLCSV: *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*

TYMV: *Tomato yellow mosaic virus*

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

BSA: Bovine serum albumin

CTAB: Cetyl trimethylammonium bromide

dNTP: Desorribonucleotídeo trifosfatado

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid

Fig.: Figura

GO: Goiás

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses

kb: Quilobase

L: litro

LB: Luria-Bertani

M: Molar

mL: Mililitro

mM: Milimolar

mRNA: RNA mensageiro

NaCl: Cloreto de Sódio

NaOH: Hidróxido de Sódio

ng: Nanograma

ORF: Open Reading Frame

PCR: Polymerase Chain Reaction

PE: Pernambuco

RCA: Rolling Circle Amplification

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RPM: Rotações por minuto

SDS: Sodium dodecyl sulfate

SP: São Paulo

TBE: Tris/Borate/EDTA

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

U: Unidade

μ L: Microlitro

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE BEGOMOVIRUS EM TOMATEIRO EM TRÊS PÓLOS DE PRODUÇÃO DE TOMATE PARA PROCESSAMENTO DO BRASIL

Resumo - Ao longo de muitos anos, a produção de tomate sofreu grandes perdas, chegando a até 100% em algumas áreas no Nordeste brasileiro. Esses problemas resultaram na transferência do centro de produção de tomate destinado à indústria ao Centro-Oeste do país, onde se encontra a maioria das fábricas processadoras atualmente. Um dos fatores que contribuiu fortemente para o desastre econômico na produção de tomate do Nordeste foi a ocorrência da begomovirose, causada por vírus transmitidos por moscas-brancas. Tais vírus foram caracterizados pela primeira vez (em tomateiro) em meados da década de 70 e começaram a causar grandes danos a partir da década de 90, coincidindo com a introdução do biótipo B de *Bemisia tabaci*. Desde então, diversos trabalhos têm sido publicados tratando de assuntos como diversidade, caracterização, determinação da gama de hospedeiros, interações entre planta e patógeno assim como patógeno e vetor, evolução, predominância, epidemiologia, dentre outros. O presente trabalho teve por objetivo analisar a diversidade de begomovírus presentes em tomateiros destinados ao processamento industrial em três regiões produtoras do Brasil: Luziânia (GO), Morrinhos (GO) e Ribeirão Preto (SP). As amostras foram coletadas no ano de 2008 de plantas que apresentavam sintomas como mosaico, deformação foliar e clorose internerval. O DNA total foi extraído das amostras e a presença de begomovírus foi detectada por PCR utilizando-se os *primers* universais pAL1v1978 e pAR1c496. Após a confirmação, uma análise do perfil de RCA-RFLP foi realizada para a avaliação preliminar da diversidade através da observação dos padrões de restrição. Houve uma maior diversidade de perfis em São Paulo, seguido de Morrinhos e Luziânia. Os diferentes padrões foram selecionados e os fragmentos de DNA-A viral foram clonados, totalizando 104 clones do componente A genômico sendo, 33 de Ribeirão Preto, 35 de

Luziânia e 36 de Morrinhos. Todas as sequências obtidas apresentaram elevada identidade com o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), indicando sua prevalência em todas as regiões estudadas. A identidade entre isolados coletados na mesma região variou de 99,2 a 100% para as três regiões. A maior diferença, embora pequena, foi observada entre isolados de Luziânia quando comparada com isolados de Morrinhos e Ribeirão Preto. Na análise filogenética, os isolados de São Paulo ficaram fortemente agrupados, enquanto os de Luziânia e Morrinhos formaram sub-grupos menores misturados entre si. Os resultados indicam que os vírus molecularmente identificados como isolados de ToSRV apresentam alta semelhança entre si, sendo que os isolados de SP aparentemente evoluem independentemente dos isolados de GO, provavelmente desencadeado pela distância que separa as regiões produtoras dos dois estados. Apesar disso, pôde-se observar diferenças entre os isolados caracterizados nesse trabalho com aqueles caracterizados em anos anteriores, mostrando que ocorreram mutações específicas que foram preservadas em novos isolados, já que as sequências cadastradas em bancos de dados públicos permaneceram agrupadas entre si e com alguns isolados de Ribeirão Preto, enquanto os isolados desse estudo agruparam-se entre si. A maioria das mutações nucleotídicas que ocorreram foram de purina para purina e de pirimidina para pirimidina e a maior parte delas ocorreu na *rep* e na *cp*, indicando que tais ORFs possam ser *hotspots* de mutação no ToSRV. O presente estudo mostra que o ToSRV é um dos principais begomovírus a ser focado em programas de melhoramento genético de tomateiros para fins de processamento.

Palavras-chave: geminivírus, begomovírus, diversidade, tomate, ToSRV, predominância.

Orientadora: Alice Kazuko Inoue Nagata (UnB; Embrapa Hortaliças – CNPH)

BEGOMOVIRUS' DIVERSITY AVALIATION IN TOMATO FROM THREE BRAZIL'S TOMATO PRODUCTION CLUSTERS DESTINED FOR PROCESSING

Abstract - Over many years, tomato production had suffered huge losses, sometimes reaching up to 100% losses in some areas in northeastern Brazil. These problems promoted the transference of the processing tomato production center to the midwest region of Brazil, where the majority of the processing industries is present nowadays. One of the factors that strongly contributed to this economic disaster on the northeast tomato production was the occurrence of begomoviruses, caused by whitefly-transmitted viruses. Such viruses were characterized for the first time (in tomato) in the mid 70's and they began to cause considerable damage from the 90's on, coinciding with the introduction of the B biotype of *Bemisia tabaci*. Since then, several studies have been published addressing issues such as diversity, characterization, determination of the host range, plant-pathogen and pathogen-vector interactions, evolution, prevalence, epidemiology, among others. The present work aimed at the analysis of the begomovirus diversity present in tomato plants destined to processing from three production areas of Brazil: Luziânia (GO), Morrinhos (GO) and Ribeirão Preto (SP). The samples were collected in 2008 from plants with symptoms such as mosaic, leaf distortion and interveinal chlorosis. The DNA was extracted from the samples and the presence of begomoviruses was detected by PCR using the universal *primers* pAL1v1978 and pAR1c496. After the confirmation, RCA-RFLP was carried out to enable a preliminary analyzes of the diversity through the comparison of their digestion patterns. The diversity was higher in São Paulo, followed by Morrinhos and Luziânia. The different patterns were selected and the begomoviruses cloned, in a total of 104 DNA-A clones (33 from Ribeirão Preto, 35 from Luziânia and 36 from Morrinhos). All the obtained sequences shared a high identity with *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), indicating its prevalence in

all studied regions. The identity of the isolates collected in the same region ranged from 99.2 to 100% in all three regions. The major difference, although small, was observed among Luziânia's isolates when compared with Morrinhos' and Ribeirão Preto's isolates. Furthermore, the phylogenetic tree showed a grouping of the São Paulo's samples, while Luziânia's and Morrinhos' samples were clustered together. The results indicate that the viruses molecularly identified as ToSRV share high similarity between each other, and that the isolates from SP apparently evolved independently from the GO isolates, probably due to the distance that separates the production areas of both states. Nevertheless, it could be observed some differences when they were compared with viruses from the same species that were characterized previously, showing that there was some particular mutations that were preserved, since the sequences from the databases were clustered with some Ribeirão Preto's isolates, while the others formed another group. The majority of the nucleotide mutations was observed from purine to purine and from pyrimidine to pyrimidine bases and mostly were in the *rep* and *cp* regions, indicating that those ORFs may be hotspots of mutation in the ToSRV genome. The present study shows that the ToSRV is one of the major begomoviruses to be focused in breeding programs of tomatoes for processing.

Key-words: geminivirus, begomovirus, diversity, tomato, ToSRV, prevalence.

Supervisor: Alice Kazuko Inoue Nagata (UnB; Embrapa Vegetables – CNPH)

1. INTRODUÇÃO

Dentre os vírus que afetam a cultura do tomateiro, encontram-se os begomovírus. São vírus pertencentes à família *Geminiviridae*, conhecidos por suas partículas icosaédricas incompletas e geminadas, cujo genoma é composto de DNA de fita simples circular. Os vírus desse gênero são transmitidos pelo aleirodídeo *Bemisia tabaci* e a rápida emergência de tais vírus provavelmente ocorreu devido à introdução do biótipo B, conhecido por ser muito polífago e apto a colonizar diferentes hospedeiros, incluindo o tomateiro. Os begomovírus do novo mundo são bipartidos (isto é, contém o DNA-A e DNA-B) e possuem ORFs tanto no sentido viral quanto no viral-complementar que codificam proteínas de replicação, fator de transcrição, amplificação da replicação e capa protéica no DNA-A e ORFs que codificam proteínas responsáveis pelo movimento célula-a-célula do vírus e transporte do DNA através do envelope nuclear no DNA-B. Em relação à classificação taxonômica, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) estabeleceu uma série de critérios taxonômicos, sendo que o principal deles consiste na análise da comparação entre o DNA-A dos isolados. Por esse critério, a identidade nucleotídica inferior a 89% de um isolado representa uma espécie distinta em relação ao outro. Ao longo dos anos, várias espécies de begomovirus foram descritas no Brasil, e trabalhos anteriores sugerem que a predominância de uma espécie sobre outra varia de acordo com a região do país. No entanto, ainda são escassas as informações a cerca da diversidade e variação intra-específica dos begomovírus que infectam o tomateiro no Brasil. É importante que haja a realização de estudos de diversidade a fim de dar suporte aos programas de melhoramento e aos estudos de evolução e epidemiologia molecular.

2. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo principal, o estudo da diversidade dos vírus do gênero *Begomovirus* em tomateiros destinados ao processamento industrial das regiões de Morrinhos (GO), Luziânia (GO) e Ribeirão Preto (SP), localizados nos dois maiores estados produtores de tomate do tipo rasteiro do Brasil.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

- Realizar a diagnose de begomovírus nas amostras coletadas;
- Extrair o DNA viral de folhas de tomateiro que apresentavam sintomas de begomovirose, coletadas em três regiões produtoras;
- Analisar o perfil de RCA-RFLP para a verificação preliminar de diversidade dos begomovírus;
- Utilizar o padrão de bandas para identificação da espécie de vírus presente nas amostras;
- Selecionar as amostras mais divergentes e clonar o DNA-A dos begomovírus presentes nas amostras das três regiões em estudo;
- Sequenciar completamente o DNA-A dessas amostras;
- Analisar a relação entre essas amostras através da construção de árvore filogenética e observação de mutações e padrões existentes entre as amostras.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. A cultura do tomate

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) pertence à família Solanaceae e tem sua origem na Bolívia, Equador e Peru e chegou à Europa através do México, onde foi cultivado, sendo que no século XVIII, o tomate já era consumido em diversos países europeus (da Silva & Giordano, 2000).

O tomateiro é uma das hortaliças mais cultivadas no Brasil, tendo como fatores positivos, sua resistência ao transporte e sua baixa perecibilidade, além de ser uma hortaliça muito versátil em termos de utilização tanto *in natura* como industrializada, o que justifica sua grande popularidade (Espinoza, 1991 & Gualberto *et al.*, 2002).

A cadeia de produção de tomate rasteiro é uma das mais importantes para o agronegócio no país. Além da própria produção de tomate em si, essa cultura também movimentada indústrias relacionadas a embalagens, insumos, equipamentos de irrigação e máquinas agrícolas (Fig. 1). Assim, a cultura do tomate para processamento industrial, torna-se uma das principais fontes de renda regional (Melo & Vilela, 2004). As indústrias processadoras podem ser caracterizadas como de primeiro processamento ou segundo processamento. As de primeiro processamento são responsáveis pela manipulação da matéria-prima bruta, para obter produtos semi-industrializados como a polpa concentrada ou cubeteados. Esses produtos são então destinados às indústrias de segundo processamento, que transforma essa matéria-prima bruta em produtos mais sofisticados com maior valor agregado, como extratos, purês, molhos e catchups, que se destinam ao consumidor (Nuevo, 1994).

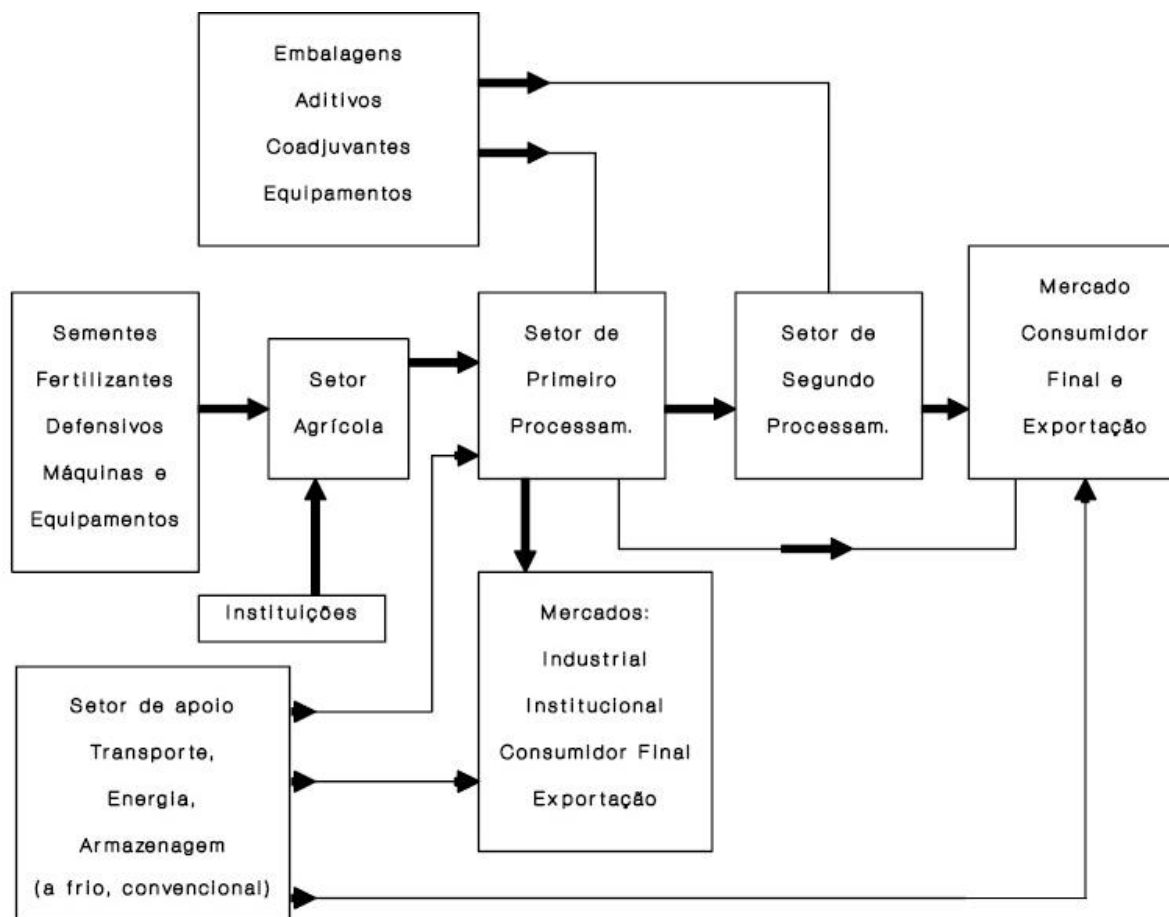


Figura 1: Fluxograma de Nuevo (1994) da cadeia produtora de tomate rasteiro e as indústrias relacionadas que sua produção envolve.

O cultivo do tomate destinado ao processamento industrial no Brasil começou no início do século XX, no Município de Pesqueira – PE. A partir da década de 50, com a instalação de indústrias processadoras em São Paulo, o cultivo dessa hortaliça foi ampliado para outras regiões (da Silva & Giordano, 2000). Na década de 80, as indústrias processadoras eram predominantemente localizadas no Nordeste e no Estado de São Paulo. Com o decorrer dos anos, a produção de tomate rasteiro aumentou significativamente, devido ao êxito da produção dessa hortaliça no Centro-Oeste (Goiás e Minas Gerais) e também pela melhoria tecnológica na produção do Estado de São Paulo. A produção no Nordeste sofreu com a traça do tomateiro e com a introdução do biótipo B de *Bemisia tabaci*, além da falta de tecnologia

presente nos outros Estados produtores (Camargo *et al.*, 2006). Desde 1990, a cultura vem se expandindo na região Centro-Oeste devido às características edafo-climáticas dessa região, que favorecem o cultivo do tomate rasteiro (Melo & Vilela, 2005).

No ano de 2010, a produção de tomate rasteiro no Brasil foi de 1.796.000 toneladas, chegando à quinta colocação na produção mundial de tomate para processamento, atrás apenas da Itália, Espanha, Califórnia e China (WPTC, 2011). Dados da produção de tomate no Brasil, no ano de 2010, mostram que Goiás, São Paulo e Minas Gerais possuem as maiores áreas plantadas e quantidades produzidas dessa hortaliça. O Estado de Goiás atingiu uma produção de 1.377.322 toneladas, seguido de São Paulo com 647.793 toneladas e Minas Gerais com 492.323 toneladas (IBGE).

Para o desenvolvimento deste trabalho, três regiões produtoras foram selecionadas, duas em GO (Morrinhos e Luziânia) e uma em SP (Ribeirão Preto). O Município de Luziânia foi responsável pela produção de 54.250 toneladas de tomate rasteiro, enquanto Morrinhos produziu 199.800 toneladas e Ribeirão Preto 1.658 toneladas no ano de 2010 (Fig.2).

Ano 2010	Ribeirão Preto	Luziânia	Morrinhos
Quantidade produzida	1658	54250	199800 toneladas
Valor da produção	2338	8951	29970 mil reais
Área plantada	26	775	2220 hectares
Área colhida	26	775	2220 hectares
Rendimento médio	63769	70000	90000 Kg/ha

Figura 2: Dados de produção de tomate rasteiro no ano de 2010 dos três municípios em estudo. Fonte: IBGE.

Na época da coleta das amostras, a mosca-branca (vetor dos begomovírus) nem sempre estava presente nos campos de Luziânia e o problema com begomovírus era esporádico. Atualmente o quadro é diferente. Já em Morrinhos, a mosca-branca está sempre presente e o problema com esses vírus é muito grande. Em Ribeirão Preto, o vetor nem sempre está presente e há begomovírus nas plantas de tomate, mas não chega a ser um problema.

4.2. Família *Geminiviridae*

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), os vírus da família *Geminiviridae* são conhecidos por apresentarem genoma composto de DNA fita simples circular, que varia de 2,5 a 3,0 kb, encapsidado em partículas icosaédricas geminadas (Lazarowitz, 1992). No ano de 1974 foi relatado que as partículas dos vírus relacionados ao maize streak e beet curl top disease são de morfologia geminada e *quasi*-isométricas (Bock *et al.*, 1974; Mumford, 1974). Três anos depois foi demonstrado que os genomas do *Maize streak virus* (MSV) e *Bean golden mosaic virus* (BGMV) são constituídos de DNA fita simples circular (Harrison *et al.*, 1977; Goodman, 1977). Os trabalhos posteriores de Haber *et al.* (1981), Bisaro *et al.* (1982) e Hamilton *et al.* (1982) demonstraram que para alguns desses vírus (BGMV e TGMV) o genoma é dividido em dois componentes. No ano seguinte, em 1983, o ACMV foi caracterizado e demonstrado o seu genoma bipartido (Stanley, 1983; Stanley & Gay, 1983). Logo em seguida, os genomas de outros vírus (monopartidos) também foram caracterizados: MSV, BCTV e TPCTV (Howell, 1984; Mullineaux *et al.*, 1984; Stanley *et al.*, 1986; Briddon *et al.*, 1996).

A família *Geminiviridae* é composta por quatro gêneros, que são divididos de acordo com a organização genômica, inseto vetor e gama de hospedeiras. Esses vírus podem possuir genoma monopartido ou bipartido. Os quatro gêneros que compõem a família *Geminiviridae* são *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* (Stanley *et al.*, 2005).

Gênero *Mastrevirus*: a espécie tipo é o *Maize streak virus*. Os critérios de demarcação de espécie nesse gênero consistem da identidade da sequência nucleotídica com valor <75% como o limiar para o estabelecimento de uma nova espécie; propriedades biológicas do vírus; *trans*-replicação de componentes genômicos; características da proteína capsidial; espécie do vetor; gama de hospedeiras e fenótipo dos sintomas. Os vírus desse gênero possuem genoma

monopartido e são transmitidos por cigarrinhas a monocotiledôneas em sua grande maioria (revisado por Fauquet *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2005).

Gênero *Curtovirus*: a espécie tipo é o *Beet curly top virus*. Os critérios taxonômicos para esse gênero são os mesmos dos mastrevírus, com a única diferença no valor de identidade utilizado para a demarcação de nova espécie. Para os curtovírus, o valor é <89%. Os curtovírus são monopartidos também são transmitidos por cigarrinhas a dicotiledôneas (revisado por Fauquet *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2005).

Gênero *Topocuvirus*: a espécie tipo é o *Tomato pseudo-curly top virus*. Os critérios são os mesmos dos curtovírus e atualmente esse gênero possui apenas uma espécie, de genoma monopartido. O inseto-vetor é um membracídeo (*Micrutalis malleifera*), que transmite o vírus para plantas dicotiledôneas (revisado por Fauquet *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2005).

Gênero *Begomovirus*: A espécie tipo desse gênero é o *Bean golden yellow mosaic virus*. Os critérios adotados para a demarcação de espécie nesse gênero são: o número de componentes genômicos; organização genômica; identidade nucleotídica <89% sugere nova espécie; propriedades biológicas do vírus; *trans*-replicação de componentes genômicos; capacidade de gerar pseudorecombinantes viáveis; características da proteína do capsídeo; gama de hospedeiras e fenótipo dos sintomas. Esses vírus podem ter genoma monopartido ou bipartido e seu inseto-vetor é o aleirodídeo (popularmente conhecido como mosca-branca) *Bemisia tabaci* (revisado por Fauquet *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2005).

4.3. Introdução de estirpe e variante como níveis taxonômicos para begomovírus

Em 2000, foram publicadas sugestões e diretrizes de padronização da nomenclatura para os novos geminivírus identificados (Fauquet *et al.*, 2000). Com relação à demarcação de espécies, em 2003 foi estabelecido pelo ICTV o valor de 89% de identidade nucleotídica para o genoma completo do DNA-A, como o limiar para que seja estabelecida uma nova espécie no gênero *Begomovirus* (Fauquet *et al.*, 2003). Com o passar dos anos, diversas espécies foram sendo descritas e o fato de que esses vírus sofrem constante recombinação, fez com que novos vírus, levemente diferentes das espécies descritas, fossem sendo relatados. Os especialistas no gênero acharam necessária a criação de novos níveis taxonômicos a fim de uma melhor compreensão no estudo desses vírus, e por isso começaram a adotar “estirpe” e “variante” como níveis taxonômicos abaixo de espécie (Fauquet & Stanley, 2005). No trabalho publicado em 2008 por Fauquet e colaboradores, foram propostos critérios de demarcação para estirpe e variante. Para isso, foi feita a comparação do genoma completo (DNA-A) de 672 isolados. Nessa análise, foram observados dois picos entre os valores de 85 a 100% de identidade, resultando na demarcação dos valores de 85 a 93% como estirpes e de 94 a 100% como variantes. As estirpes podem diferir em temas de biologia, sorologia ou molecularmente. Já as variantes podem diferir levemente no genoma, eficiência de transmissão ou sintomas.

A nomenclatura dos begomovírus quanto ao nome da espécie é feita da seguinte maneira: **Nome da hospedeira + nome do sintoma + “vírus”**. O nome da espécie deve estar em itálico e com a primeira letra da primeira palavra em maiúsculo. Um exemplo é *Tomato yellow leaf curl virus*. Cada vírus tem seu acrônimo, e nesse caso seria TYLCV. Apesar de existir essa regra, os estudiosos desse gênero de vírus visualizaram a necessidade de uma complementação aos nomes dos vírus devido ao grande número de espécies, estirpes e

variantes que começaram a ser relatadas. O que ficou sugerido no trabalho de Fauquet *et al.* (2008) foi que os pesquisadores passassem a dotar a seguinte nomenclatura: **Nome da espécie, descritor de estirpe** (sintoma, hospedeira, local ou uma letra) + [**descritor de variante** (país:local:[hospedeira]:ano)]. Um exemplo é *East African cassava mosaic virus*, Tanzania [Tanzania:Yellow vein].

No nono relatório publicado pelo ICTV, foram reconhecidas cerca de 214 espécies de geminivírus, sendo que mais de 190 pertencem ao gênero *Begomovirus*. Já existem mais de 100 espécies com o genoma completo disponível no banco de dados. (Brown *et al.*, 2011).

4.4. Características genômicas dos begomovírus

Quanto à organização genômica, os mastrevírus são os mais diferentes dentro da família *Geminiviridae* (revisado por Palmer & Rybicky, 1998). Já os curtovírus, topocuvírus e begomovírus sugerem uma origem evolucionária comum e mais recente por possuírem organização genômica parecida, diferindo apenas em alguns genes e funções dos mesmos (Stanley *et al.*, 2005).

Os begomovírus do Novo Mundo possuem genoma bipartido (DNA-A e DNA-B). O DNA-A é responsável pela replicação, regulação da expressão de genes, supressão do silenciamento e encapsidação, enquanto o DNA-B codifica proteínas responsáveis pela movimentação do vírus célula a célula, determinação da gama de hospedeiras e desenvolvimento de sintomas (revisado por Rojas *et al.*, 2005). Os dois componentes genômicos possuem cerca de 2.600 bases cada e não possuem homologia entre si, com a exceção de uma pequena região de 200 bases, chamada de região comum, que é altamente conservada em cada espécie (Harrison, 1985). O DNA-A possui cinco ORFs: AV1 (codifica a proteína *cp*), AC1 (proteína *rep*), AC2 (proteína *trap*), AC3 (proteína *ren*) e AC4. A *rep* é

responsável pela replicação do genoma viral. Sua função é se ligar ao sítio de iniciação da replicação (na região comum) e separar uma das fitas de DNA da forma replicativa (fita dupla), iniciando assim o processo. A AC4 é responsável por contrariar a resposta da hospedeira à expressão da *rep*. Já a proteína *trap*, é um fator de transcrição que atua *in trans* nos genes *cp* e *nsp*, além de atuar na supressão do silenciamento gênico, enquanto a proteína *ren* é responsável por amplificar a replicação viral. A *cp* é a proteína capsidial, que é essencial para que haja a transmissão do vírus pelo seu vetor. Com relação ao DNA-B, duas ORFs estão presentes: BC1 (codifica a proteína *mp*) e BV1 (proteína *nsp*). A proteína *mp* possui função de movimentação do vírus célula-a-célula, enquanto a *nsp* promove a movimentação do DNA viral através do envelope nuclear, fase que é necessária para que haja a infecção sistêmica (Fig. 3). Com relação aos begomovírus que possuem apenas uma molécula de DNA, a proteína responsável pela movimentação do vírus, está presente juntamente com as outras descritas no DNA-A dos bipartidos (revisão por Rojas *et al.*, 2005).

Os begomovírus bipartidos necessitam da presença tanto do DNA-A quanto do DNA-B para que seja estabelecida a infecção (Hamilton *et al.*, 1983; Stanley, 1983), apesar de já existirem estudos sobre a capacidade do DNA-A sozinho estabelecer uma infecção sistêmica, como por exemplo o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Galvão *et al.*, 2003).

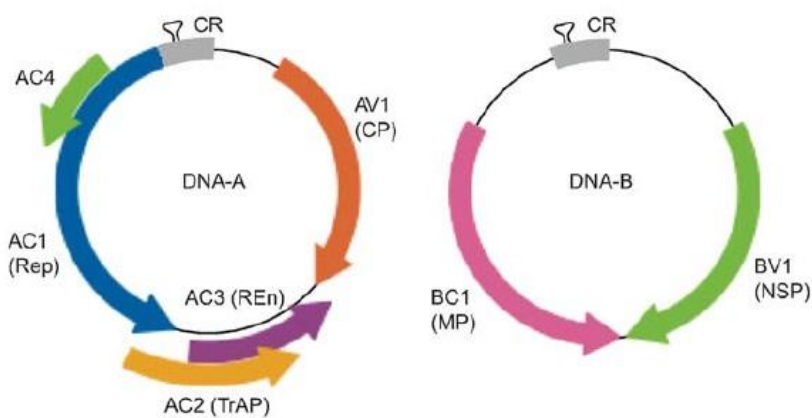


Figura 3: Exemplo de organização genômica de um begomovírus bipartido. Rojas *et al.*, 2005.

4.5. Replicação dos begomovírus

A replicação dos begomovírus ocorre no núcleo da célula hospedeira e se dá pelo mecanismo de círculo rolante (Saunders *et al.*, 1991; Stenger *et al.*, 1991), em que um pequeno *primer* de RNA dá início à síntese de uma fita complementar ao DNA viral, formando um intermediário de fita dupla (Donson *et al.*, 1984; Saunders *et al.*, 1992). Esse intermediário acumula-se em grandes concentrações na célula infectada e atua como molde para a síntese de mRNAs virais. Para a síntese desses mRNAs, ambas as fitas da forma replicativa são utilizadas, assim gerando três mRNAs com sequências complementares ao DNA-A e um com sequência igual ao DNA-A. O mesmo ocorre no DNA-B, com um mRNA de sequência complementar e um com sequência igual ao DNA-B. A replicação se inicia com a síntese da fita complementar ao genoma viral (forma replicativa). Então há a interação da proteína *rep* com o *loop* altamente conservado da região comum. Nos geminivírus essa sequência é TAATATTAC (Laufs *et al.*, 1995; Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995; Stanley, 1995). Tal sequência nucleotídica forma a origem de replicação juntamente com íterons. Os íterons são altamente específicos à *rep*, participando assim da iniciação da replicação e controle da expressão dos genes no sentido complementar (revisão por Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). É essa especificidade da região do íteron com a proteína *rep* que faz com que a *rep* de um vírus seja incompatível com a origem de replicação de outro vírus. O DNA-A é bastante recombinogênico, o que possibilita a propensão ao surgimento de recombinantes que os begomovírus possuem. Isso é possível, pois o DNA-A tende a doar sua origem de replicação a outros componentes (Roberts & Stanley, 1994; Hou & Gilbertson, 1996; Stanley *et al.*, 1997; Saunders & Stanley, 1999; Saunders *et al.*, 2002). Após a interação da proteína *rep* com o sítio de iniciação da replicação, novas fitas de DNA viral são sintetizadas por um processo chamado de círculo rolante. Nesse processo, a fita complementar é utilizada como molde para a formação de uma longa fita simples de DNA contendo várias unidades genômicas

(concatâmero). Essa longa fita é então clivada gerando monômeros, que são encapsidados. O DNA-A se replica independentemente do DNA-B, mas para que o vírus seja infeccioso, é necessária a presença de ambos (Gutierrez, 1999; Gutierrez, 2000; revisado por Zerbini Jr. *et al.*, 2002).

A replicação desses vírus reverte a célula vegetal a um estado de divisão celular. Normalmente os vírus infectam células vegetais já diferenciadas, ou seja, que não estão em processo de síntese de DNA. Esses patógenos, porém, necessitam de proteínas da hospedeira para completar sua replicação. Com esse objetivo, são capazes de ativar a transcrição dos genes da hospedeira que estão envolvidos na síntese das proteínas que necessitam. Esse processo resulta em consequências graves para a planta, justificando assim, os sintomas severos causados por esses vírus. Outro fator relacionado à expressão de sintomas, é a movimentação célula a célula do vírus, que leva a um desarranjo do transporte intercelular, levando ao surgimento de sintomas da infecção (Faria & Zerbini, 2000; revisado por Zerbini Jr. *et al.*, 2002).

4.6. Um breve histórico dos geminivírus

Ao contrário do que é observado para vírus animal, a maioria dos vírus de plantas possui genoma composto por RNA. Isso sugere que tais vírus necessitaram de uma série de modificações para driblar as dificuldades impostas a um vírus com genoma composto por DNA. Das famílias formadas por vírus que infectam plantas, apenas três possuem DNA como material genético: *Caulimoviridae*, *Nanoviridae* e *Geminiviridae*. Um fato interessante a ser observado é que os nanovírus e os geminivírus possuem DNA fita simples e genoma multipartido, enquanto os caulimovírus possuem DNA fita dupla e genoma monopartido, assim como os demais vírus de procariotos, invertebrados e vertebrados, o que sugere uma

evolução para adaptação com relação ao fato de possuírem apenas uma fita (Rojas *et al.*, 2005).

Dentre os vírus que infectam plantas, os geminivírus são bem caracterizados, isso devido ao pequeno tamanho de seu genoma; à sua replicação ser baseada em DNA de fita dupla, que permite fácil manipulação no processo de clonagem; e ao desenvolvimento de métodos de inoculação não-dependentes de vetor (Rojas *et al.*, 2005).

Os relatos de doenças causadas por vírus em plantas são muito antigos. A primeira descrição está em um poema japonês do século VIII. Nele, é descrito o sintoma causado por um vírus que hoje sabe-se ser um geminivírus (Saunders *et al.*, 2003). A partir de 1900 doenças causadas por vírus da família *Geminiviridae* começaram a chamar a atenção, uma vez que estavam levando a grandes perdas em diversas culturas (Kheyr-Pour *et al.*, 1991; Navot *et al.*, 1992; Dry *et al.*, 1993; Bedford *et al.*, 1994; Rochester *et al.*, 1994; Konate *et al.*, 1995; Padidam *et al.*, 1995; Bezerra *et al.*, 1997). O estudo desses vírus, porém, não era amplo, pois o pequeno tamanho, o fato de ficarem restritos ao floema e a dificuldade em purificar sua partícula a partir de tecidos de plantas infectadas restringiam seu conhecimento. Nessa época, os vírus dessa família começavam a ser relacionados com a presença dos insetos no campo. As grandes perdas causadas por esses vírus levaram a esforços que resultaram na caracterização do primeiro geminivírus, no final dos anos 70 (Matyis *et al.*, 1975).

Fatores que foram cruciais para a emergência de geminivirose foram o aumento da população e da distribuição dos insetos vetores, a dependência da monocultura e o trânsito de plantas entre as diferentes regiões do mundo. Atualmente, os geminivírus afetam grandes culturas como feijão, algodão, mandioca, curcubitáceas, milho, pimenta e tomate (Rojas *et al.*, 2005).

Os geminivírus são responsáveis por grandes perdas na produção de diversas culturas. Um exemplo de geminivírus que é um grande causador de prejuízo é o *African cassava mosaic virus* (ACMV). A África é o maior produtor mundial de mandioca e um dos patógenos mais amplamente distribuídos no país é o ACMV. Esse vírus, pertencente ao gênero *Begomovirus*, foi descrito pela primeira vez em 1894 e, desde então, passou a ocorrer também em outros lugares como Madagascar, Zanzibar, Índia, Seychelles e Java. Esse é um dos agentes causais da doença do mosaico da mandioca (Cassava mosaic disease - CMD). O vetor desse vírus é a mosca-branca, que também coloniza plantas de algodão, tabaco e batata-doce. A partir de 1920, o ACMV passou a causar grandes perdas no Leste da África e com o decorrer dos anos também no Oeste e Norte do país. Em 1987 o vírus já estava presente em todas as áreas onde se cultivava a mandioca, com incidência maior que 80% em todas elas (Fauquet & Fargette, 1990 & Pita *et al.*, 2001).

O curtovírus *Beet curly top virus* (BCTV), pertence ao gênero *Curtovirus* e é um dos grandes problemas no Ocidente dos Estados Unidos, podendo causar doença em cerca de 300 espécies de 44 famílias botânicas, afetando o cultivo de beterraba sacarina, pimenta, curcubitáceas, espinafre, feijão e tomate (Soto & Gilbertson, 2003). No início do século XX, esse vírus desestabilizou a viabilidade da produção de beterraba sacarina nos Estados Unidos devido a grandes perdas na produção. Apesar de já terem sido desenvolvidas cultivares com maior tolerância ou resistência parcial, o BCTV ainda traz dificuldades para o cultivo de diversas culturas (Stenger & McMahon, 1997).

Maize streak disease (MSD) é uma geminivirose causada por um complexo viral que tem o *Maize streak virus* (MSV) como agente causal (gênero *Mastrevirus*) e é uma das doenças mais importantes na África e ilhas vizinhas, afetando a cultura do milho, que é a mais importante da região. A produção persistentemente baixa e as epidemias causadas por esse vírus prejudicam a saúde e desenvolvimento social da população africana. Atualmente, já

foram descritas 11 estirpes de MSV (MSV-A ao MSV-K) (Owor *et al.*, 2007 & Monjane *et al.*, 2011). Desses, apenas o MSV-A é capaz de infectar o milho. A estirpe “A” tem cinco subtipos que são distribuídos diferentemente ao longo do continente africano. Mesmo com o uso de genótipos de milho resistentes ainda é difícil o controle dessa doença (Owor *et al.*, 2007 & Monjane *et al.*, 2011).

Em 1965 foi reportado pela primeira vez por Costa, o begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV), que se tornou o principal causador de danos no cultivo do feijoeiro no Brasil. As perdas chegaram a 100%, prejudicando tanto a produção quanto a qualidade dos grãos (Faria & Maxwell, 1999).

Outro vírus bastante disseminado da família *Geminiviridae* é o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), um geminivírus monopartido também transmitido pela mosca-branca e pertencente ao gênero *Begomovirus* (Lapidot *et al.*, 1997 & Moriones & Navas-Castillo, 2000). O TYLCV afetava o tomateiro na década de 60 no Oriente Médio e, a partir da década de 70, grandes perdas começaram a ser registradas devido a esse vírus, levando a perdas que chegavam a 100% da produção. Ao final dessa década, o TYLCV estava presente em todas as áreas produtoras de tomate do Oriente Médio. Já na década de 80, foi relatada a presença de doença TYLCV-like no Sudeste da Ásia, assim como a África Oriental e Ocidental. O TYLCV também foi introduzido ao Oeste da bacia do Mediterrâneo, além de novas áreas como Irã, Uzbequistão, China e ilhas do Caribe, pela primeira vez no Novo Mundo. A propagação desses vírus (assim como outros vírus) seguiu a propagação de seu vetor (*Bemisia tabaci* biótipo B) pelo mundo. Nas diferentes regiões do mundo, vários geminivírus estão presentes e em cada local, há um prevalente. Alguns outros exemplos de geminivírus já descritos são *Tomato leaf curl virus* (TLCV) na Índia e Austrália, *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) no Brasil, *Tomato mottle virus* (TMoV) na Flórida, dentre outros (Czosnek & Laterrot, 1997).

Com relação aos begomovírus em tomateiro, antes da introdução do biótipo B de *Bemisia tabaci*, poucos casos de begomoviroses eram relatados. No início da década de 60 foi relatada pela primeira vez a ocorrência de uma doença causada por geminivírus em tomateiro (Flores *et al.*, 1960). Alguns anos depois, soube-se que esse vírus era o *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) e na mesma época, na Venezuela, foi reportado outro vírus dessa mesma família (*Geminiviridae*), o *Tomato yellow mosaic virus* (TYMV), também afetando a cultura do tomate (Matyis *et al.*, 1975 & Debrot & Dao, 1963). Já na década de 70, no México, um novo vírus chamado de *Chino del tomate virus* (CdTV) era responsável por perdas na produção de tomate (Brown & Nelson, 1988). Esses eram os únicos descritos nas Américas até meados da década de 80, quando começaram a surgir mais relatos de geminiviroses (Polston & Anderson, 1997).

4.7. Histórico de begomovírus no Brasil

A cultura do tomate é afetada principalmente por vírus dos gêneros *Begomovirus*, *Potyvirus*, *Tospovirus*, *Tobamovirus* e *Cucumovirus* (Arnaud *et al.*, 2007). Os begomovírus são considerados vírus emergentes por sua incidência cada vez maior e pela severidade nas doenças que causam no grande número de espécies cultivadas que são capazes de infectar (Ambrozevicius *et al.*; 2002). Existem diversas definições para vírus emergentes. Alguns definem como: vírus que aparecem pela primeira vez numa população ou que já existiram anteriormente e estão rapidamente aumentando em incidência e distribuição geográfica (pela Organização de Saúde Mundial –WHO). Outra definição utilizada é como vírus que mudou ou apareceu recentemente e passou a ocupar e se espalhar em um novo nicho (Rojas & Gilbertson, 2008). Normalmente, utiliza-se o termo “vírus emergentes” para os que já existiam anteriormente e passaram a ser encontrados com maior frequência em um

determinado nicho devido a mudanças no ambiente, no genoma, no hospedeiro ou no vetor (Hanssen *et al.*, 2010).

O primeiro relato de begomovirose em cultivo comercial no Brasil foi no ano de 1965 em feijão comum. A esse vírus, foi dado o nome de *Bean golden mosaic virus* (BGMV) (Costa, 1965). No caso do feijoeiro, a diversidade dos begomovírus encontrados é muito baixa (Faria & Maxwell, 1999), o que contrasta com o quadro do tomateiro, onde há uma elevada diversidade desses mesmos vírus (Ribeiro *et al.*, 2003). Como esse foi o primeiro vírus desse gênero, foi dele que derivou o nome *Begomovirus*.

Foi na década de 1960, no estado de São Paulo, que foi relatada pela primeira vez uma doença causada por um vírus do gênero *Begomovirus* em tomateiro, levando à expressão de sintomas como o mosaico-dourado e clorose infecciosa (Flores *et al.*, 1960). A identificação desse vírus foi feita mais tarde, no ano de 1975, por Matyis e colaboradores que identificaram tal vírus como sendo o *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Matyis *et al.*, 1975).

O agente transmissor desses vírus, até o início da década de 1990, era o aleirodídeo *Bemisia tabaci* biótipo A. Até então, a incidência dessas doenças não causava alarde econômico (Ribeiro *et al.*, 2003). Em meados da década de 90, começou a aumentar o número de relatos de tais doenças e a introdução de um novo biótipo de mosca-branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) foi a causa da grande disseminação desses vírus. O biótipo B coloniza muito mais eficientemente o tomateiro e possui um hábito alimentar polífago (Bedford *et al.*, 1994), o que favoreceu sua rápida disseminação geográfica, causando grandes perdas em Minas Gerais, São Paulo, Distrito Federal e também no Nordeste (Giordano *et al.*, 2005). A incidência desses vírus em tomate não era alarmante até o ano de 1994, quando surtos desses vírus foram novamente relatados em tomateiros de diversos Estados do Brasil, incluindo Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo, Pernambuco e Bahia (revisado por Faria *et al.*, 2000). Foi no início

dos anos 90 também que foi relatada a presença do biótipo B da mosca-branca em São Paulo e, posteriormente, em outros Estados, em culturas economicamente importantes (França *et al.*, 1996; Lourenção & Nagai, 1994). O novo biótipo introduzido no Brasil foi um dos responsáveis também pelo abandono da tomaticultura intensiva na região do Submédio do Vale São Francisco que até os anos de 1997 e 1998 se localizava o principal produtor de tomate para processamento industrial (Cotrim *et al.*, 2007). Nessa região foi observado, no ano de 1996, pela primeira vez, o aparecimento de plantas de tomate com sintomas de begomovirose. No ano seguinte houve um grande aumento na incidência dessas viroses na região do Submédio do Vale São Francisco afetando não somente a cultura do tomate, como também de feijão, curcubitáceas, pimentão, algodão e mandioca em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Lima & Haji, 1998; Polston & Anderson, 1997). Já em 1998, foi detectada a presença desses vírus também em regiões produtoras de Pernambuco e Bahia (Lima *et al.*, 2001). Juntamente com o crescimento das populações de mosca-branca, foi sendo observado o aumento do número de espécies de vírus encontradas nos tomateiros (Ribeiro *et al.*, 2003). Antes da introdução do biótipo B, o único begomovírus relatado causando prejuízos em tomateiro era o *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Matyis *et al.*, 1975). Esse quadro foi drasticamente mudado em consequência do estabelecimento desse novo biótipo no país. Houve um grande aumento no número de espécies de begomovírus, além do aumento em sua prevalência e severidade na cultura do tomate, alcançando proporções epidêmicas (Ribeiro *et al.*, 2007).

Já foram encontradas fontes de resistência a alguns begomovírus, e híbridos de tomateiro têm sido colocados no mercado para a produção de tomates para consumo *in natura*. Já com relação ao tomate para processamento industrial, ainda há pouca oferta de híbridos resistentes, e o aumento da incidência desses vírus nos anos de 2002-2003 nos tomateiros para o segmento de indústria levou a grandes perdas no Sudeste, Centro-Oeste e

Nordeste, chegando a até 100% de plantas infectadas em Pernambuco e na Bahia (Giordano *et al.*, 2005).

Um fator interessante observado foi a grande diversidade de begomovírus infectando o tomateiro (Ribeiro *et al.*, 2003) comparada com a baixa diversidade desses mesmos vírus infectando *Phaseolus* (Faria & Maxwell, 1999). Nesse último caso, a explicação que se sugere é a co-evolução ao longo de vários anos tanto do hospedeiro quanto do vírus, levando a uma seleção de espécies virais mais adaptadas, o que seria responsável por essa baixa diversidade (Ribeiro *et al.*, 2003). Além disso, a prevalência de um vírus pode estar relacionada também à maior eficiência de transmissão desse vírus pelo inseto vetor, se comparado aos outros vírus (Rocha *et al.*, 2010).

Diversos estudos de diversidade de begomovírus em tomateiro já foram realizados em diferentes regiões do Brasil no decorrer de vários anos. No estado de São Paulo, os vírus mais encontrados em tomateiro eram *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Cotrim *et al.*, 2007). O trabalho de Fernandes e colaboradores (2008), realizado com amostras de tomateiro, para consumo *in natura*, dos anos de 2002 a 2004 em vários estados do Brasil, mostrou a prevalência do ToSRV juntamente com ToYVSV. No nordeste do Brasil, o primeiro begomovírus a ser isolado foi o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Ribeiro *et al.*, 2007).

Até o ano de 2012, já foram descritas mais de 50 espécies de geminivírus que infectam o tomateiro, a maioria sendo do gênero *Begomovirus* (Brown *et al.*, 2011).

4.8. Infecção mista e recombinação

Sabe-se que a ocorrência de infecção mista é muito observada em campo. Estudos demonstram que a presença de dois vírus numa mesma planta pode levar a um fenômeno conhecido como dominância negativa, que ocorre quando as proteínas de um vírus que são menos eficientes que as de outro vírus na interação com fatores da hospedeira, levam a uma diminuição da eficiência da interação das proteínas virais mais eficientes (Herskowitz, 1987). Esse fenômeno é utilizado em estudos para gerar plantas transgênicas resistentes (Antignus *et al.*, 2004; Duan *et al.*, 1997; Hou *et al.*, 2000; Noris *et al.*, 1996; Shivaprasad *et al.*, 2006).

O tempo que os sintomas demoram a aparecer após a inoculação do vírus, assim como a severidade dos sintomas, indicam a maior ou menor adaptação do vírus a uma determinada hospedeira (Morra & Petty, 2000; Rothenstein *et al.*, 2007). Com relação aos sintomas, a variação de severidade pode ser resultado de níveis diferentes de supressão da defesa da planta (Fontes *et al.*, 2004; Vanitharani *et al.*, 2004). O fator responsável por essa adaptação é a interação entre as proteínas virais e da hospedeira (Morra & Petty, 2000; Rothenstein *et al.*, 2007). A eficiência da interação de proteínas virais com fatores do hospedeiro reflete a eficiência do estabelecimento da infecção sistêmica. É essa eficiência que promove a melhoria na replicação, movimento célula-a-célula e/ou a supressão do silenciamento da planta hospedeira. Quando as proteínas virais não são eficientes nessa interação, o nível de acúmulo de DNA viral é muito baixo, refletindo a baixa adaptação do vírus àquela hospedeira (Petty *et al.*, 1995).

Diversos estudos já relataram o sinergismo e interferência entre geminivírus e vírus de outros gêneros e famílias. Alguns exemplos de sinergismo já descritos são como as geminiviroses que afetam a mandioca, que provocam uma melhoria na supressão do silenciamento (Fondong *et al.*, 2000; Pita *et al.*, 2001; Vanitharani *et al.*, 2004). Com relação

à interferência negativa, infecções duplas entre o begomovírus *Abutilon mosaic virus* (AbMV) e os tobamovírus *Tobacco mosaic virus* (TMV) e *Tomato mosaic virus* (ToMV), levaram à redução do acúmulo de DNA do AbMV em *Nicotiana benthamiana* (Pohl & Wege, 2007). Nos geminivírus, o sinergismo que pode ser representado pelo aumento na severidade dos sintomas, não necessariamente leva ao maior acúmulo de DNA viral. Esse fato foi observado por Morilla *et al.* (2004) com os vírus TYLCV e TYLCSV.

Alguns geminivírus ficam restritos aos tecidos vasculares (Hoefert, 1987; Horns & Jeske, 1991; Morilla *et al.*, 2004; Rojas *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1996), diferentemente de outros que podem infectar células do mesófilo foliar (Morra & Petty, 2000; Rushing *et al.*, 1987; Sudarshana *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1996; Wege *et al.*, 2000). A capacidade de ir além dos tecidos vasculares indica uma melhor adaptação do vírus à sua hospedeira e geralmente leva à maior severidade nos sintomas (Morra & Petty, 2000; Petty & Qin, 2001; Wege *et al.*, 2000; revisado por Rojas *et al.*, 2005).

No trabalho de Alves-Júnior *et al.* (2009) foi observado, através de hibridização *in situ*, que o ToYSV estava presente tanto em células associadas ao floema quanto em células do mesófilo, enquanto o ToRMV ficou restrito ao floema, em infecção simples. Além disso, foi observado também que comparado ao ToRMV, o ToYSV tem maior taxa de replicação. Esses dois fatos poderiam explicar o maior acúmulo e severidade dos sintomas causados pelo ToYSV. O mesmo foi feito com infecção mista entre esses dois vírus em *N. benthamiana* e foi observada a presença do ToRMV nas células do mesófilo, indicando assim que a presença do ToYSV permite que o ToRMV saia do floema, além de passar a ter um maior acúmulo mesmo sem aumentar a taxa de replicação. Além desse trabalho, o mesmo já foi demonstrado em infecção mista entre TGMV (infecta células do mesófilo) e BGMV ou ACMV (restritos ao floema), onde tanto o BGMV quanto o ACMV passaram a ser observados em células do mesófilo (Morra & Petty, 2000; Wege *et al.*, 2001). Esse fenômeno é observado também entre

geminivírus e vírus de outros gêneros, como TMV (Carr & Kim, 1983) e CMV (Wege & Siegmund, 2007). Esses estudos levam a crer que os fatores virais responsáveis pela movimentação sejam menos específicos que os relacionados à replicação (Alves-Júnior *et al.*, 2009).

Foi a introdução do biótipo B de *Bemisia tabaci* que levou ao aumento drástico de casos de begomovirose no mundo inteiro, afetando diversas plantas incluindo culturas de grande importância econômica (Rybicki & Pietersen, 1999; Chatchawankanphanich & Maxwell, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2005; Stonor *et al.*, 2003). Para que sejam realizados estudos sobre evolução e adaptação genética, é necessário o acompanhamento de uma introdução recente desses vírus em uma dada área (Sánchez-Campos *et al.*, 1999; Sánchez-Campos *et al.*, 2002). Na Espanha, a entrada dos begomovírus foi bem acompanhada, onde o primeiro relato foi do *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) e seguida pela introdução do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), possibilitando a interação entre esses dois vírus e adaptação a diferentes hospedeiros (Navas-Castillo *et al.*, 1999; Monci *et al.*, 2002; Morilla *et al.*, 2003; Morilla *et al.*, 2005).

Os parasitas recém-introduzidos em um determinado local necessitam evoluir rapidamente para contornar a perda de variação genética que normalmente é causada pelo efeito fundador e para se adaptar ao novo ambiente. A evolução é guiada pela migração, deriva genética, mutação, recombinação e seleção natural (Charlesworth & Charlesworth, 2003). Nos vírus, a diversidade genética pode ser obtida por meio da mutação, recombinação, *reassortment* e aquisição de gene de novo. Esses fatores podem ou não gerar mutações favoráveis evolutivamente e o impacto dessas mudanças pode variar nos níveis de espécies, gêneros e famílias (Keese & Gibbs, 1993; Morse, 1994; Gibbs *et al.*, 1995; Holland, 1998). A recombinação é uma estratégia muito utilizada pelos begomovírus (Chatchawankanphanich &

Maxwell, 2002; Monci *et al.*, 2002; Padidam *et al.*, 1999; Pita *et al.*, 2001; Preiss & Jeske, 2003; Sanz *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 1997).

A recombinação pode levar a alterações genômicas que influenciam tanto a replicação do vírus quanto o movimento e acúmulo do mesmo. Essas alterações podem levar à diferenciação na gama de hospedeiras e desenvolvimento de sintomas que o vírus causa (Santos *et al.*, 2004). Fatores como a mutação, recombinação e *reassortment* levam ao surgimento de novas variantes virais. Se forem positivas para o vírus, essas mutações rapidamente se multiplicam na população viral. O surgimento de novas estirpes, assim como de novas espécies, compromete a eficácia das estratégias de controle atualmente utilizadas (Moya *et al.*, 2004). Alguns trabalhos identificando geminivírus recombinantes já foram descritos, como exemplo em mandioca na África, algodão no Paquistão, pimenta no México e tomate na América Central (Deng *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1998; Torres-Pachecho *et al.*, 1993; Umaharam *et al.*, 1998). Cotton leaf curl disease (CLCuV) no Paquistão, causou grandes perdas na produção de algodão durante os anos 90 (Hameed *et al.*, 1994; Harrison *et al.*, 1997); Em Trinidad e Tobago, PYMV-TT se espalhou em tomateiros (Umaharan *et al.*, 1998); um novo *Cassava mosaic virus* (EACMV-UG) também surgiu devastando plantações de mandioca em Uganda (Deng *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1997); e na Espanha e Itália, o TYLCSV levou à perdas tanto em condições de campo como em casa de vegetação (Noris *et al.*, 1994). Todos esses vírus são frutos de recombinação e mostram a importância da recombinação na emergência de novos vírus. Estudos baseados em sequências parciais foram também realizados com amostras dos anos de 1994 a 1999 e várias espécies foram identificadas, inclusive novas espécies, que poderiam ter sido originadas a partir de recombinação e pseudorecombinação de espécies do Brasil, devido ao fato de ocorrer frequentemente infecções mistas (Ribeiro *et al.*, 2003).

Um outro fator importante na emergência de epidemias são as plantas nativas, que atuam como reservatórios e fontes desses vírus (Hull, 2002). O trabalho de García-Andrés *et al.* (2006) evidenciou a importância das espécies invasoras, uma vez que foram encontradas diversas espécies de begomovírus em plantas de *Solanum nigrum* também ocorrendo em infecções mistas. Além disso, também foi mostrada a presença de um novo vírus de natureza recombinante e propriedades patogênicas distintas de outras espécies já relatadas. A recombinação é capaz de alterar o *fitness* e a patogenicidade de um vírus, fatores que possuem importante papel na evolução e epidemiologia desses vírus (Fernández-Cuartero *et al.*, 1994; Gibbs & Weiller, 1999; Monci *et al.*, 2002; Pita *et al.*, 2001; Stenger *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1997). Já foi relatada a presença de alguns vírus como *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) em tomate e dos vírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) em pimentão, evidenciando que esses vírus podem ter hospedeiras alternativas (Rocha *et al.*, 2010). Barbosa *et al.* (2009) também identificaram a presença do ToSRV em *Nicandra physaloides*.

Supõe-se que a falta de um vetor agressivo o suficiente estivesse mantendo os begomovírus nas plantas daninhas e, após a introdução do biótipo B, essa grande diversidade contida nessas plantas pôde ser transferida para plantas de tomate, possibilitando assim o surgimento de novas espécies pela interação de espécies já existentes (Ambrozevicius *et al.*; 2002).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Coleta de amostras e extração de DNA viral

Foram coletadas no ano de 2008 folhas de tomateiro rasteiro apresentando sintomas de infecção viral (mosaico, deformação foliar e clorose internerval) em três regiões produtoras: Morrinhos (GO), Luziânia (GO) e Ribeirão Preto (SP) (Fig. 4). As amostras somaram 210, sendo 42 de Luziânia, 48 de Morrinhos e 120 de Ribeirão Preto. Nos campos onde as amostras foram coletadas, não era cultivado tomateiro com resistência a geminivírus. A extração de DNA total foi feita a partir das amostras através do método CTAB (Doyle & Doyle, 1987).



Figura 4: Amostras coletadas de tomateiros apresentando sintomas característicos de infecção por begomovírus (mosaico, deformação foliar e clorose internerval).

5.2. Confirmação da infecção por begomovírus

O DNA total extraído das folhas com sintomas foi submetido à reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando-se os *primers* degenerados universais para begomovírus pAL1v1978 e pAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993). A confirmação da amplificação de fragmentos de DNA específicos de begomovirus foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE 0,5x.

5.3. Amplificação por Círculo Rolante (RCA)

A amplificação por círculo rolante foi utilizada, de modo a amplificar o genoma completo do vírus a partir de uma pequena quantidade inicial de DNA. Para isso, foi feita uma reação com 0,5 µL de DNA total, 1,0 µL de tampão 10x, 1 µL de BSA 100x, 1 µL de dNTP 10 mM, 1 µL de *primer* 50 mM (haxanucleotídeo randômico), 0,1 µL de enzima *phi-29* DNA polymerase (NEB, 10.000 U/mL) e 5,4 µL de água miliQ autoclavada, para uma reação final de 10 µL. As amostras foram incubadas a 30 °C *overnight*. Esse processo foi feito com as 210 amostras coletadas. A confirmação da amplificação foi feita por eletroforese, como descrito anteriormente.

5.4. Visualização de padrão de bandas com *MspI*

Com 1 µL do produto da RCA, foi feita uma reação de digestão utilizando-se uma enzima de corte frequente (*MspI*) para uma avaliação preliminar da diversidade de vírus encontrados nas amostras. Supõe-se que vírus diferentes geram padrões diferentes de bandas. Juntamente com 1 µL do produto da RCA, foi acrescentado 1 µL do tampão 10x, 0,2 µL da enzima *MspI* (NEB, 20.000 U/mL) e 7,8 µL de água miliQ autoclavada, totalizando 210

digestões de 10 µL cada. As reações foram mantidas a 37°C *overnight* e a avaliação da digestão foi feita por eletroforese.

5.5. Seleção de enzimas para clonagem por Southern Blot e Hibridização

Para as 60 amostras selecionadas para clonagem do genoma, foi feita a seleção de enzimas, onde foram testadas quatro enzimas diferentes (*BamHI*, *EcoRI*, *SacI* e *XbaI*). Para isso, foram feitas quatro digestões para cada amostra, utilizando-se as enzimas citadas. Cada reação de digestão com 1 µL do produto da RCA da amostra, 1 µL do tampão 10x indicado pelo fabricante, 0,2 µL da enzima (NEB, 10.000 U/mL) e 7,8 µL de água miliQ autoclavada, totalizando 10 µL de reação que foi incubada a 37°C *overnight*.

Em seguida, foi feita a eletroforese para a confirmação da digestão e o gel foi submetido a um processo de desnaturação e neutralização. Primeiramente, o gel foi colocado em uma solução de desnaturação (1,5 M NaCl + 0,5 N NaOH) por 45 minutos e depois em uma solução de neutralização (1,5 M NaCl + 0,5 ~ 1 M Tris-HCl, pH 7,4) por 30 minutos. Em seguida, foi montado o sistema de transferência por capilaridade. Para isso, foi colocada uma solução SSC 20x (175,3g NaCl + 88,2g citrato de sódio para 1L) em uma vasilha e um suporte nessa solução. Sobre o suporte, uma folha de papel-filtro com as duas extremidades em contato com a solução SSC 20x e, sobre ela, mais uma folha de papel-filtro do tamanho do gel. O gel foi então colocado por cima do papel-filtro e a membrana de náilon cortada exatamente do tamanho do gel e previamente equilibrada com SSC 2x foi colocada em sobre o gel. Sobre a membrana (Hybond N+, GE Healthcare), foi colocada mais uma folha de papel-filtro do tamanho do gel. Em volta desse sistema, foi colocado papel filme (PVC) para

vedar o sistema. Sobre o sistema montado, previamente descrito, várias folhas de papel absorvente e um peso foram colocados. O sistema foi deixado dessa forma *overnight*.

No dia seguinte a membrana foi retirada do sistema e submetida ao processo de hibridização. Primeiramente, a membrana foi colocada em um tubo de vidro com 25 mL de tampão Church (0,25 M tampão fosfato de sódio, pH 7,2, 1mM EDTA, 1 % BSA, 7 % SDS) por 1 hora a 68°C. O tampão Church então foi retirado do tubo e em 10 mL desse tampão, foram adicionados 50 µL da sonda para DNA-A desnaturada. A sonda é o produto de PCR com *primers* para capa protéica de ToSRV (50µL tampão 10x, 40µL MgCl₂, 20µL dNTP, 5µL primer Cp1 (CCCGTCGACATGYCTAAGMGKGAAGCCCC), 5µL primer Cp2 (CCCCTGCAGAACTTCCAAGTCTGGACG), 5µL *Taq* DNA polimerase, ca. 5ng DNA total de planta infectada com isolado de ToSRV, 365µL água miliQ autoclavada, 2,5µL DIG-dUTP - Roche) no mesmo programa utilizado para PCR de geminivírus utilizado na detecção. Os 10 mL de tampão com a sonda, foram colocados novamente no tubo junto com a membrana e deixados a 68°C *overnight*. Em seguida, o tampão com a sonda foi retirado do tubo e armazenado a -20°C para o próximo uso e a membrana foi lavada duas vezes com SSC 2x (20 mL SSC 20x, 200 µL SDS 10% para 200 mL) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, mais duas lavagens com SSC 0,5x (5 mL SSC20x, 200 µL SDS 10% para 200 mL) foram realizadas. Cada lavagem por 15 minutos a 68°C. Após descartada a solução, foram colocados 50 mL do tampão de bloqueamento (0,5 g de agente bloqueador, 50 mL PBS Tween 1x) por 1 hora a temperatura ambiente. O tampão de bloqueamento foi então coletado e, em 10 mL do mesmo, foi adicionado 1 µL de anti-digoxigenina AP (150U/ul, Roche) e deixado em contato com a membrana por 1 hora a temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, a membrana foi lavada por três vezes com 15 mL de PBS Tween a temperatura ambiente por 10 minutos cada lavagem. A reação foi visualizada por colorimetria.

Após a revelação, foram escolhidas as enzimas que digeriam o DNA-A viral em um único ponto, ou seja, apresentavam uma única banda na hibridização. Para cada amostra, quatro enzimas foram testadas e uma enzima foi selecionada para clonagem.

5.6. Digestão com enzima selecionada

Depois de selecionada a enzima, foi feita uma digestão de maior volume. Para tal, foram adicionados 20 μL do produto da RCA da amostra, 6 μL do tampão 10x indicado pelo fabricante e 1,2 μL da enzima selecionada em 32,8 μL de água miliQ autoclavada, totalizando 60 μL de reação. Os microtubos foram deixados em estufa a 37°C *overnight*. Esse processo foi feito com as 60 amostras.

5.7. Eluição de banda e purificação

Foi feita a eletroforese com as digestões e as bandas de interesse (de 2,6 Kb) foram eluídas do gel e purificadas utilizando-se o kit da GE Healthcare (Illustra™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit), seguindo as instruções do fabricante. A confirmação e quantificação foram feitas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%.

5.8. Preparação do vetor pBlueScript (pBS)

Foi feito RCA do vetor, da mesma forma descrita anteriormente, para 100 μL total de reação. O produto da RCA foi então digerido com as quatro enzimas selecionadas, cada reação com 20 μL do produto da RCA e 60 μL total de reação, assim como foi feito com as amostras. As digestões foram então confirmadas por eletroforese.

Foi adicionado 1:10 do volume da digestão, de acetato de sódio 3M, pH5,2, e 2 volumes da digestão de etanol 100%. As reações foram deixadas a -80°C por 1 hora e os microtubos foram então centrifugados por 15 minutos a uma velocidade de 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes com 300 µL de etanol 70% gelado e centrifugado por 2 minutos a 12.000 rpm. Todo o sobrenadante foi retirado e os tubos foram deixados a temperatura ambiente por cerca de 30 minutos. O pellet foi então ressuscitado em 50 µL de água miliQ autoclavada.

A desfosforilação do vetor evita que o vetor se ligue novamente sem o inserto, aumentando a probabilidade de uma ligação efetiva entre vetor e inserto. Para isso, foram adicionados aos 50 µL da reação resultante da precipitação, 10 µL do tampão 10x *CIP*, 1 µL da enzima *CIP* (NEB, 10.000 U/mL) e 39 µL de água miliQ autoclavada. A reação foi deixada a 37°C por 15 minutos, adicionou-se mais 1 µL da enzima *CIP* e então a reação foi deixada a 55°C por 45 minutos. Decorridos os 45 minutos, foi adicionado 1 µL de EDTA 5mM, pH 8,0, e a reação foi incubada por 10 minutos a 75°C.

Na reação resultante, adicionou-se 200 µL de água miliQ autoclavada e 300 µL de fenol. O microtubo foi então submetido à vigorosa agitação por 1 minuto e submetido à centrifugação por 5 minutos a 12.000 rpm. A fase superior formada foi retirada e colocada em um novo microtubo e adicionou-se a ela 300 µL de fenol:clorofórmio. O tubo foi agitado por 1 minuto e centrifugado por 5 minutos a 12.000 rpm. Novamente a fase superior foi transferida para um novo tubo e adicionado a ela, 300 µL de clorofórmio. Agitou-se o tubo por 1 minuto e o mesmo foi centrifugado por mais 10 minutos a 12.000 rpm. A fase superior foi colocada em novo tubo e o processo de precipitação com etanol foi repetido, ressuscitando o pellet final em 20 µL de água miliQ autoclavada. A confirmação e quantificação foram feitas por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

5.9. Ligação

Tendo o vetor e o inserto preparados, foi feita a ligação entre eles. Todas as ligações foram feitas seguindo a proporção:

$$\text{ng inserto} = \frac{\text{ng vetor} \times \text{tamanho do inserto} \times 3}{\text{tamanho do vetor}}$$

Para a ligação, foi feita uma reação de 10 μL total com a quantidade equivalente a 100 ng de vetor, a quantidade equivalente a 260 ng de inserto, 1 μL do tampão 10x indicado pelo fabricante e 1 μL da enzima T4 DNA ligase (NEB, 400.000 U/mL). As reações foram incubadas a 16°C *overnight*.

5.10. Precipitação com N-butanol

A precipitação foi feita para que os sais fossem retirados da amostra e não prejudicassem a eletroporação. Aos 10 μL de ligação, foram adicionados 40 μL de água miliQ autoclavada e 500 μL de N-butanol. A reação foi homogeneizada e centrifugada por 10 minutos à velocidade máxima. O sobrenadante formado foi descartado e os tubos deixados em gelo por cerca de 5 minutos para retirada do excesso de N-butanol que escorre das paredes do tubo. O *pellet* seco foi então ressuspensionado em 4 μL de água miliQ autoclavada.

5.11. Transformação

A transformação foi feita por eletroporação, realizando-se um choque elétrico nas bactérias, assim desestabilizando suas membranas e permitindo a entrada do vetor com o

inserto e fazendo com que eles também se multipliquem juntamente com as células bacterianas. Para isso, 2 µL da ligação precipitada com N-butanol foram adicionados aos 50 µL de célula competente (*Escherichia coli*) DH5α. Os 50 µL juntamente com os 2 µL de ligação foram então transferidos para cubetas de eletroporação (BIORAD). O choque foi dado (1.700 volts) e foi acrescentado 1 mL de meio LB líquido à cubeta, misturando delicadamente todo o conteúdo. O meio (juntamente com as bactérias) foi transferido da cubeta para microtubo e deixado a 37°C em agitação de 900 rpm por 1 hora. Decorrido esse tempo, os microtubos foram centrifugados a 3.000 rpm por 2 minutos e retirou-se 800 µL do sobrenadante, ressuspensando o pellet nos 200 µL restantes. Os 200 µL foram plaqueados em placas contendo ampicilina, X-Gal e IPTG. As placas foram incubadas em estufa 37°C *overnight*.

5.12. Extração de DNA plasmidial

As colônias brancas foram selecionadas, pois indicam que o vetor está ligado ao inserto, uma vez que o inserto é ligado ao sítio de clonagem múltipla do vetor, que interrompe o gene LacZ, responsável por deixar a colônia azul na presença do substrato.

As colônias brancas foram retiradas da placa com palito de dente autoclavado e riscadas em uma nova placa contendo meio LB ágar (com ampicilina) e numeradas. As placas foram incubadas em estufa a 37°C *overnight*. O palito que foi usado para riscar cada colônia, foi colocado em tubo plástico de 15 mL com 5mL de meio LB líquido contendo ampicilina e deixado em agitação (160 rpm) a 37°C *overnight*. Foram escolhidas 4 colônias de cada transformação.

Com os 5 mL de meio líquido, foi feita a extração de DNA plasmidial. As bactérias foram precipitadas com centrifugação por 2 minutos a 12.000 rpm. O *pellet* formado foi então

ressuspendido em 100 µL de solução TEG (50mM de glucose, 25 mM de Tris, pH 8,0, 10 mM de EDTA, pH 8,0) e acrescentados 200 µL de solução de desnaturação (200 µL de 0,2 N NaOH, 1 mL de SDS 10% para 10 mL total). O microtubo foi invertido para homogeneizar a amostra e mantido em gelo por 5 minutos. Decorrido esse tempo, foram adicionados 150 µL de solução de acetato de potássio (60 mL acetato de potássio 5M + 11,5 mL de ácido acético glacial + 28,5 mL de água) e os tubos foram novamente invertidos e mantidos em gelo por 3 minutos e depois centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionou-se 100 µL de clorofórmio. O tubo foi invertido por 1 minuto e centrifugado por 5 minutos a 12.000 rpm. A fase superior formada foi transferida para um novo microtubo e acrescentou-se 900 µL de etanol 100%. Os tubos foram mantidos a -20°C por 1 hora e depois centrifugados por 5 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi então lavado com 200 µL de etanol 70% gelado e centrifugado a 12.000 rpm por 2 minutos. Todo o sobrenadante foi descartado e o *pellet* depois de seco ressuspendido em 50 µL de água miliQ autoclavada. Esse processo foi feito com as 4 colônias de cada amostra, resultando em 240 extrações de DNA plasmidial. A extração foi confirmada por eletroforese.

5.13. Confirmação de clonagem e padrão de bandas

Após a confirmação, foi feita a digestão do DNA plasmidial com as enzimas utilizadas na clonagem de cada amostra e com uma enzima de corte frequente (*MspI*) para a visualização de diversidade de padrões para escolher quais amostras seriam seqüenciadas. Para isso, foram feitas reações de digestão, conforme já descritas, com 10 µL de reação final tanto para a enzima selecionada, quanto para *MspI*. A confirmação da digestão foi feita por eletroforese. As amostras que apresentaram as bandas do vetor e do inserto (3,0 Kb e 2,6 Kb

respectivamente) nas digestões com as enzimas que foram clonadas e apresentavam padrões diferentes na digestão com *MspI*, foram selecionadas para sequenciamento.

5.14. Sequenciamento

Das amostras selecionadas para sequenciamento, foi feita novamente a extração de DNA plasmidial, dessa vez com kit para obtenção de DNA de maior pureza. O kit usado foi o da GE Healthcare (Illustra™ PlasmidPrep Mini Spin Kit), seguindo as instruções do fabricante. Foram mandadas para sequenciamento na Coréia do Sul 104 clones, e foram completamente sequenciados por *primer walking* (MACROGEN). As sequências foram analisadas utilizando-se o Staden Package (Staden *et al.*, 2003) e as sequências foram comparadas com as já depositadas no banco de dados com o auxílio do BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

5.15. Alinhamento

As sequências foram fechadas e alinhadas pelo Muscle utilizando-se o programa MEGA5. Juntamente com as sequências dos clones obtidos, foram colocadas sequências de ToSRV (DNA-A) retiradas do banco de dados (GenBank). As sequências utilizadas foram: ToSRV isolado MG[BR:Ind2857:04] (JF803262.1); ToSRV isolado MG[BR:Pip1696:03] (JF803260.1); ToSRV isolado DF[BR:PADFM:04] (JF803263.1); ToSRV isolado MG[BR:Pip1792:03] (JF803261.1); ToSRV isolado Pi-1 (HQ606467.1); ToSRV DNA-A (NC_009607.1); ToSRV estirpe Petrolina de Goiás (DQ207749.1); ToSRV DNA-A (AY029750.1); ToSRV estirpe Sumaré (EU086591.2); ToSRV estirpe PJU-São Paulo (FJ824808.1).

Após o alinhamento, foi feita uma comparação entre a diferença de identidade entre os clones de cada região dentro de cada região, entre regiões diferentes e entre os clones com as sequências de ToSRV do banco de dados. Além disso, foram construídas árvores filogenéticas também com o MEGA5 utilizando-se os métodos fenéticos, cladísticos e probabilísticos disponíveis a fim de comparar o agrupamento entre os diferentes parâmetros. Para a continuidade das análises, foi levada em conta somente a árvore gerada por *neighbor-joining*. Foram observadas as mutações de nucleotídeos ao longo das sequências alinhadas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para realizar o estudo sobre a diversidade de begomovírus em tomateiro rasteiro nas regiões de Luziânia, Morrinhos e Ribeirão Preto, foi feita uma análise preliminar por RCA-RFLP e em seguida, foram selecionadas amostras de cada região para a clonagem. O DNA-A das amostras selecionadas foi sequenciado e em seguida foram feitas comparações entre seus genomas através da construção de árvore filogenética e alinhamento de sequências.

6.1. RCA-RFLP para observação do padrão de bandas

A análise de perfil de digestão com a enzima de corte frequente (*MspI*) de produto de RCA foi realizada em diversas amostras que foram coletadas em campo apresentando sintomas variáveis e que estavam positivas em teste PCR para detecção de begomovírus. Foram 42 amostras de Luziânia, 48 de Morrinhos e 120 de Ribeirão Preto. Em Luziânia, foram observados três padrões diferentes, enquanto em Morrinhos, quatro, e Ribeirão Preto 14 perfis (Fig.5). O maior número de padrões em Ribeirão Preto pode ser apenas em consequência do maior número de amostras analisadas. Os perfis que ocorreram em maior frequência foram os mesmos em todas as regiões, enquanto aqueles perfis diferentes observados em Ribeirão Preto ocorreram apenas uma ou duas vezes.

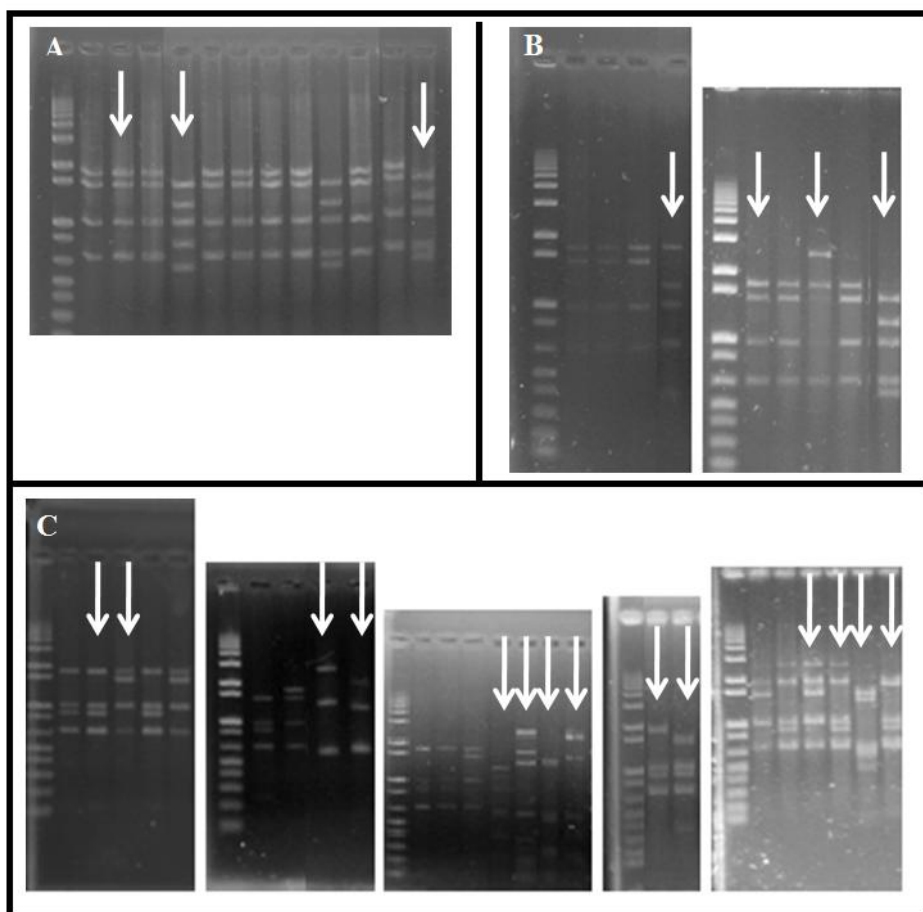


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1%. Produto de RCA digerido com enzima *MspI*. As setas brancas indicam alguns dos diferentes padrões observados. Marcador 1 kb plus (Invitrogen). **A:** padrões observados em Luziânia; **B:** padrões observados em Morrinhos; **C:** padrões observados em Ribeirão Preto.

Além de observar os padrões, também foi feito um padrão de restrição que seria esperado da digestão com *MspI* do DNA-A de ToSRV (o vírus mais amplamente distribuído no Brasil, GenBank: DQ207749.1). O mesmo foi feito com o DNA-B do ToSRV (NCBI reference sequence: NC_009612.1). O resultado para essas digestões virtuais foram três bandas para o DNA-A: 1.816, 672 e 105 nucleotídeos. Já para o DNA-B, foram duas bandas: 1.572 e 999 nucleotídeos.

Considerando as bandas esperadas, foi feita a comparação com o padrão de bandas obtido nas amostras testadas. Na maioria delas, foram observadas bandas tanto do DNA-A quanto do DNA-B de ToSRV (Fig. 6-A). Em alguns casos, pôde-se observar algumas bandas não específicas de nenhum dos dois segmentos genômicos (Fig. 6-B) ou até não pôde ser observada alguma banda do DNA-A (Fig. 6-C).

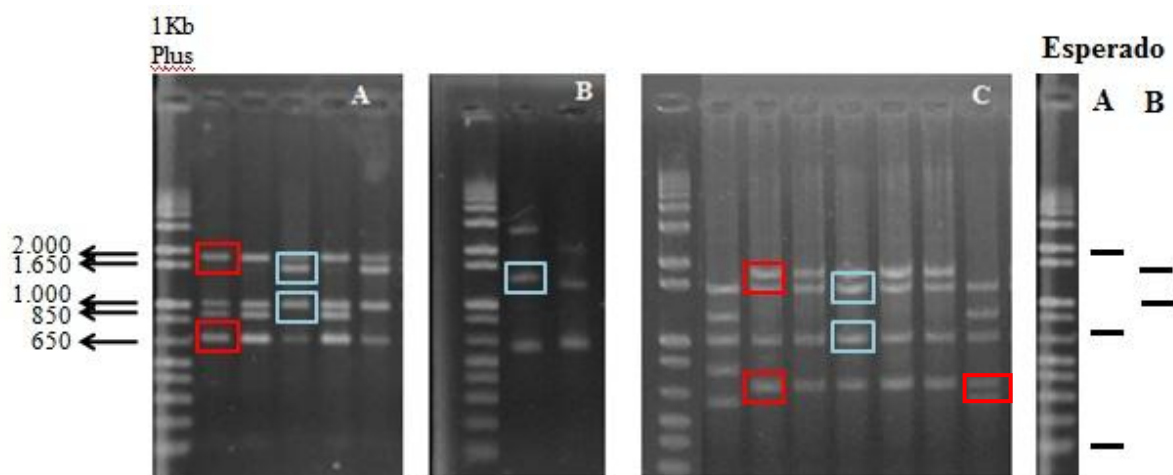


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando alguns dos padrões de banda obtidos pela digestão com *MspI*. Quadrados vermelhos indicam bandas esperadas para o DNA-A e quadrados azuis para o DNA-B. A: Amostras mostrando padrão esperado tanto para DNA-A quanto para o B; B: Amostras apresentando somente uma ou nenhuma banda esperada; C: Perfil contendo apenas uma das bandas do DNA-A. À direita, o exemplo dos padrões esperados para o DNA-A e DNA-B. Marcador 1 kb plus (Invitrogen).

Quando analisadas separadamente, três dos quatro (75%) perfis presentes nas amostras de Morrinhos apresentaram as duas bandas esperadas para o DNA-A de ToSRV. Dos três perfis de Luziânia, um (33,3%) apresentou as bandas esperadas para o DNA-A de ToSRV e em São Paulo, seis (42,85%). Apesar de serem esperadas três bandas, o menor fragmento (105 nucleotídeos) não aparece no gel. O perfil de RCA-RFLP foi utilizado como um método de observação da diversidade inicial das amostras, uma vez que a proposta do trabalho foi observar a diversidade de begomovírus nas três regiões. Com isso, pôde-se ter uma seleção de DNAs com algumas características diferenciadas.

Em estudos recentes, pode-se perceber que a incidência do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) têm aumentado em diversas áreas do Brasil, se tornando um dos vírus mais prevalentes (Fernandes *et al.*, 2008). A comparação feita com o padrão esperado tanto para o DNA-A quanto para o DNA-B mostrou que a maioria das amostras continha as bandas previstas desse vírus, sugerindo uma maior prevalência de ToSRV nas três regiões estudadas. Além disso, essa análise mostra que é possível obter uma visão preliminar da identificação dos begomovírus sem a necessidade de realizar o seqüenciamento de nucleotídeos, tendo como base o RCA-RFLP e comparando-se com padrões esperados para espécies de vírus já conhecidas. Um outro ponto positivo na utilização do RCA-RFLP é a possibilidade de identificação de infecções mistas, através do número de bandas e da soma de seus nucleotídeos, além dos inibidores presentes no DNA total extraído da planta inibir menos a reação de RCA em comparação ao PCR.

Com relação às bandas inespecíficas, o que pode ter ocorrido é uma modificação de alguns nucleotídeos, como mutação, adição ou deleção de alguns deles, fazendo com que algum sítio de *MspI* fosse modificado e resultando em bandas de tamanhos diferentes. Em alguns casos pôde-se observar que a soma de duas bandas inespecíficas formavam o tamanho da banda que seria esperada.

Após a realização da digestão com enzima de corte frequente (*MspI*), foram escolhidas 20 amostras de Luziânia, 19 de Morrinhos e 20 de Ribeirão Preto que contivessem todos os diferentes padrões de banda observados. Com essas 59 amostras, foi realizado o processo de clonagem.

6.2. Hibridização

As 60 amostras selecionadas foram digeridas com as enzimas *BamHI*, *EcoRI*, *SacI* e *XbaI*. Foi possível observar que para a maioria das amostras, as quatro enzimas foram capazes de digerir o DNA-A (Fig. 7) gerando fragmentos de tamanho aproximado do genoma. A seleção da enzima foi feita tendo-se por base a presença de uma única banda na hibridização e a intensidade da banda apresentada.

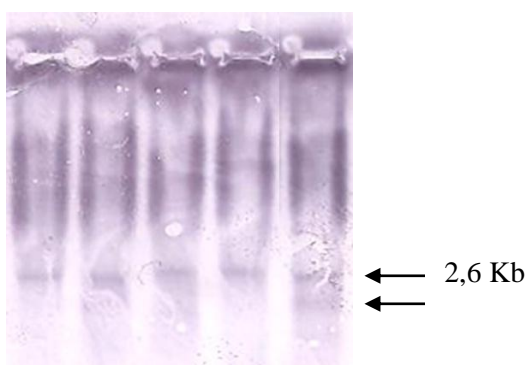


Figura 7: Exemplo de membrana da hibridização com revelação por colorimetria utilizando NBT e BCIP. Membrana com produto de RCA digerido com as 4 enzimas testadas (*BamHI*, *EcoRI*, *SacI* e *XbaI*) e hibridizada com sonda para DNA-A de begomovírus. Observa-se a presença de uma única banda nas quatro primeiras amostras e duas bandas na última amostra (setas).

Na hibridização, foi utilizada uma sonda para o DNA-A (capa protéica). Em algumas amostras, não foram visualizadas bandas do DNA-A de tamanho esperado do genoma, em outras, duas bandas estavam presentes (Fig. 7), mostrando que diferentes populações de DNA-A podem estar presentes na amostra

6.3. Clonagem

Após a digestão com a enzima escolhida, foi feita a eluição de banda do inserto (Fig. 8A) e a desfosforilação do vetor pBS (Fig. 8B) e em seguida, a ligação entre os dois, resultando na construção ilustrada na Figura 9.

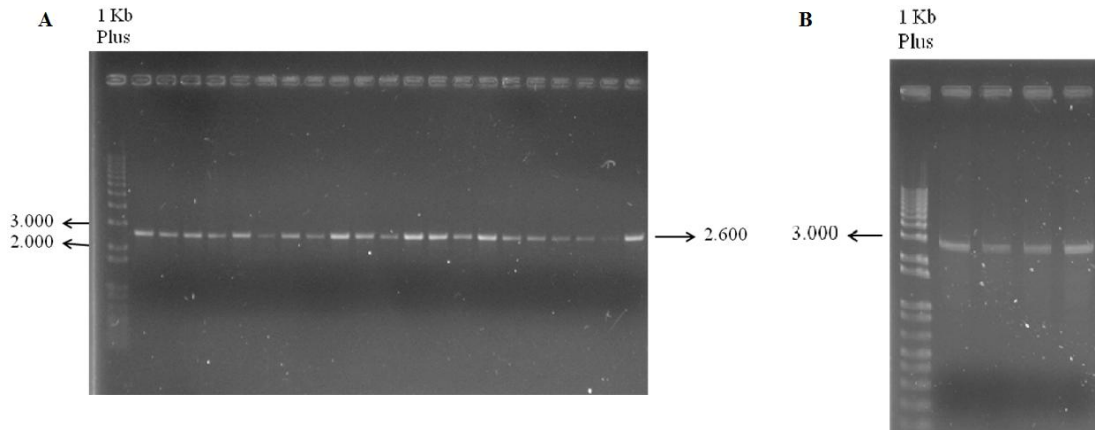


Figura 8: **A:** Gel de eletroforese em agarose a 1% mostrando a migração de fragmentos de DNA de begomovírus prontos para a ligação ao vetor pBS. Marcador 1 kb plus (Invitrogen); **B:** Gel de eletroforese em agarose a 1% mostrando vetor pBS desfosforilado após digestão com as quatro enzimas usadas no teste de seleção de enzimas para a clonagem do DNA-A de begomovírus. 1: *Bam*HI; 2: *Eco*RI; 3: *Sac*I; 4: *Xba*I. Marcador 1 kb plus (Invitrogen).

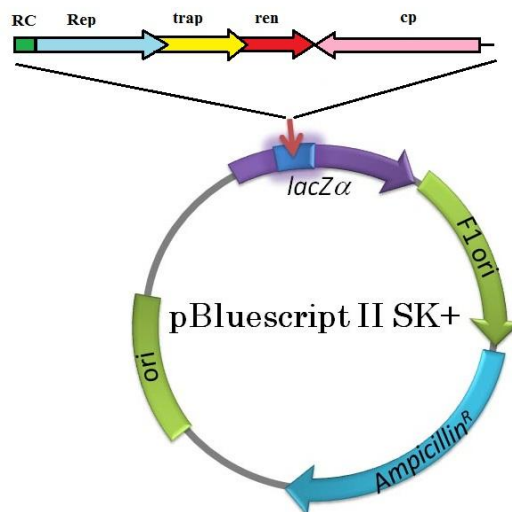


Figura 9: Ilustração demonstrando a construção obtida com a ligação do vetor pBS, de aproximadamente 3Kb, com o DNA-A viral, de cerca de 2,6 Kb.

A construção foi então transformada em célula competente e clonada. As colônias brancas selecionadas foram submetidas à extração de DNA plasmidial e esse DNA foi digerido com a enzima que foi clonado para a confirmação de que o inserto estava presente (Fig. 10). Após a confirmação, as amostras foram sequenciadas.

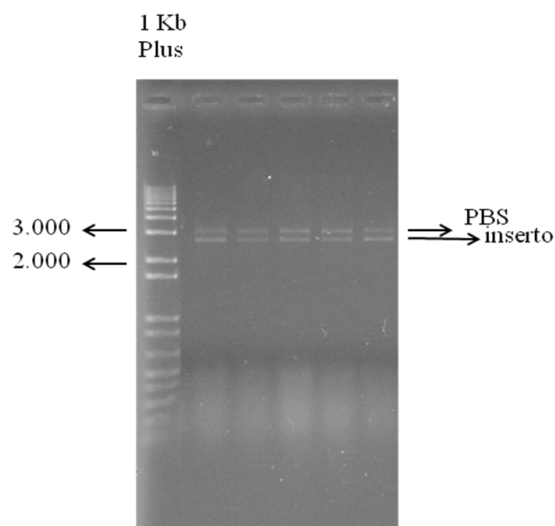


Figura 10: Gel de agarose 1% mostrando o DNA plasmidial digerido com a enzima selecionada apresentando tanto a banda do vetor pBS (3.000 nucleotídeos) quanto a banda do inserto (DNA-A de begomovírus de aproximadamente 2.600 nucleotídeos). Marcador 1 kb plus (Invitrogen).

Foram enviados para seqüenciamento, 59 amostras totalizando 104 clones, sendo 35 de Luziânia, 36 de Morrinhos e 33 de Ribeirão Preto. A Tabela 1 mostra o número de amostras clonadas com cada enzima.

Tabela 1: Número de amostras e clones de DNA-A de begomovírus enviados para seqüenciamento na Coréia do Sul e número de amostras clonadas com cada enzima.

Região	Nº de amostras	Nº de clones	BamHI	EcoRI	SacI	XbaI
Luziânia	20	35	9	4	0	7
Morrinhos	19	36	2	13	0	4
Ribeirão Preto	20	33	3	8	1	8
Total	59	104				

Para todos os isolados seqüenciados, observou-se elevada identidade nucleotídica com seqüência do DNA-A de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). Quando as seqüências foram comparadas com seqüências de ToSRV depositadas no banco de dados, a identidade mínima observada foi de 97,6%. Já quando comparadas as seqüências de cada região entre si, os valores obtidos foram de 99,2% para Luziânia, 99,5% para Morrinhos e 99,5% para Ribeirão Preto (Tabela 2).

Tabela 2: Variação da diferença nucleotídica entre as seqüências quando comparadas com seqüências de ToSRV já depositadas no banco de dados (citadas no material e métodos), quando comparadas entre si dentro da mesma região e comparadas com as outras regiões.

Comparação	Variação da diferença nucleotídica (%)
Lu x ToSRV	0,007 - 0,034
Mo x ToSRV	0,008 - 0,020
RP x ToSRV	0,006 - 0,031
Lu x Lu	0,000 - 0,018
Mo x Mo	0,000 - 0,015
RP x RP	0,000 - 0,015
Lu x RP	0,006 - 0,020
Lu x Mo	0,002 - 0,019
RP x Mo	0,006 - 0,017

Legenda: Lu: Luziânia; Mo: Morrinhos; RP: Ribeirão Preto;

A prevalência do ToSRV nos clones sequenciados já era esperada devido à análise preliminar através do RCA-RFLP realizado e pela comparação com o padrão esperado para o ToSRV. A porcentagem de 100% foi inesperada, visto que em trabalhos realizados em anos anteriores, obteve-se a prevalência de outros begomovírus assim como a presença de outras espécies ocorrendo no mesmo campo. No ano de 2000, o vírus prevalente em Araguari, Inidanópolis e Uberlândia era o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes, 2001). Já em 2002 e 2003, nos campos de cultivo de tomate industrial de Goiás, Distrito Federal e Minas Gerais, o vírus prevalente era o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), ocorrendo também o *Tomato golden vein virus* (TGVV) (Fernandes *et al.*, 2008). Em 2002 também em Minas Gerais foi detectado o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMV) (Ambrozevicius *et al.*, 2002) e em 2003 e 2004, o *Tomato yellow vein streak virus* (TYVSV) em São Paulo (Cotrim *et al.*, 2007). Tendo esses dados como comparação, esperava-se que houvesse alguma diversidade nas amostras em estudo. Assim, supõe-se que o ToSRV é atualmente o vírus prevalente e que seja o mais adaptado ao tomateiro e por isso foi detectado em 100% das amostras. Sua elevada adaptação é resultado da capacidade desse vírus de infectar outras plantas, como plantas daninhas e outras plantas cultivadas (Barbosa *et al.*, 2009 & Rocha *et al.*, 2012), além de ter uma maior eficiência de transmissão quando comparado a outro vírus como o TGVV (dados não publicados). Esses fatores influenciam diretamente na permanência do ToSRV em campo mesmo durante o vazio sanitário. O vazio foi implementado através da Instrução Normativa nº 24 em 15.04.2003 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a fim de controlar os begomovírus em campos de produção de tomate rasteiro através da ausência do tomateiro em campo durante 60 a 120 dias consecutivos. Na ausência do tomateiro, o ToSRV pode manter-se em campo em outras hospedeiras, como citado anteriormente.

Um outro fator que pode influenciar a seleção dessa espécie de begomovírus são as técnicas de cultivo do tomateiro para processamento industrial. Os tomateiros são plantados em larga escala e normalmente são cultivares que não possuem nenhuma resistência a begomovírus. Os tomates para indústria precisam de resistência a bacteriose, além de geminivírus e precisam manter características como brix, viscosidade, porte da planta e cor. (Inoue-Nagata *et al.*, 2009). Um exemplo de cultivar resistente é a cultivar Redenção, com resistência a geminivírus e tospovírus (Ferraz *et al.*, 2003). Ainda são poucas cultivares resistentes disponíveis para tomate rasteiro, sendo que a maioria dos campos são compostos de tomateiros sem resistência a esses vírus. Como o cultivo do tomateiro para processamento industrial vem mantendo as mesmas técnicas de cultivo, supõe-se que ocorreu a seleção do ToSRV.

Após o alinhamento das sequências, foram construídas diferentes árvores filogenéticas, utilizando-se os diversos parâmetros disponíveis com métodos fenéticos, cladísticos e probabilísticos (dados não mostrados). Para todas as árvores geradas, observou-se o mesmo padrão de agrupamento dos isolados sequenciados. Os isolados de Ribeirão Preto formam clados separados, diferentemente dos isolados de Luziânia e Morrinhos, onde se pode perceber que há uma mistura entre as sequências das duas regiões na formação dos clados. Uma vez que todas as árvores apresentaram padrões semelhantes, foi escolhido o método de *neighbor joining* (Fig. 11), que normalmente é o mais utilizado, para prosseguir com o restante das análises.

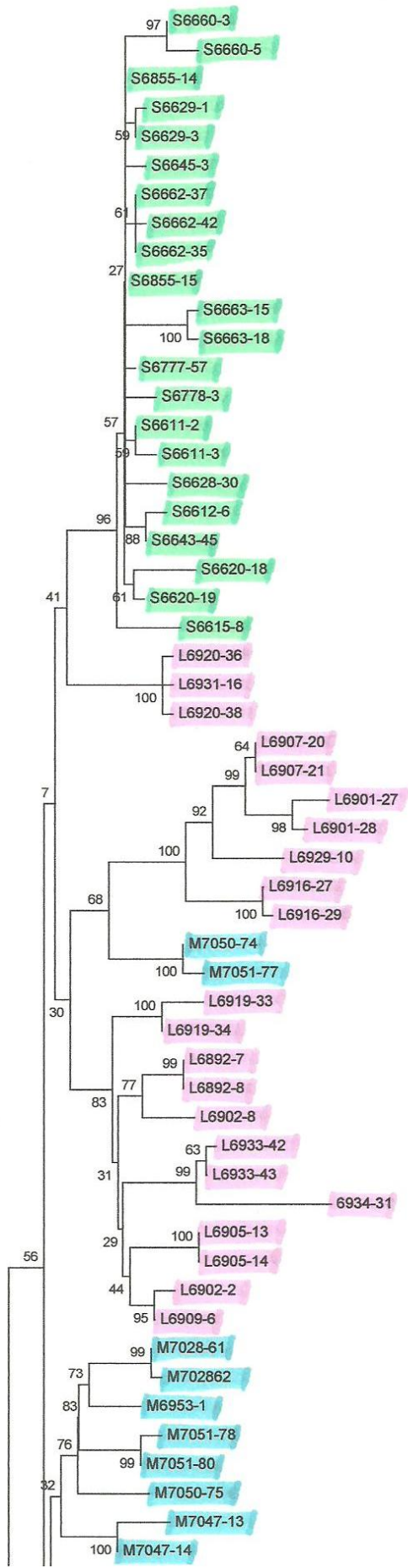
Os clones de Ribeirão Preto (Fig. 11) estavam presentes em dois agrupamentos, onde um grupo ficou junto com as sequências de ToSRV do banco de dados, enquanto outro grupo ficou separado do restante. Os clones de Morrinhos e Luziânia agruparam entre si, mas foi possível observar um subagrupamento separando cada micro-região. O padrão de distribuição observado na árvore filogenética sugere que houve uma introdução única do ToSRV nas áreas

de Morrinhos e Luziânia, e provavelmente evoluem independentemente, o que pode ser visualizado pelos subgrupos formados. Esse relacionamento mais próximo pode ser resultado da pequena distância que separa as duas áreas (cerca de 250 Km). Já os isolados de Ribeirão Preto, apresentam uma maior diferença em termos de genoma, possivelmente devido ao fato dessas áreas de produção serem geograficamente mais distantes uma das outras regiões (Fig. 11).

Com relação às mutações de ponto observadas após o alinhamento das sequências, pôde-se perceber que a maioria delas ocorreu dentro das ORFs da *rep* e da *cp* (dados não mostrados), indicando que essas ORFs possam ser *hotspots* de mutação no ToSRV. Outro fator observado foi que a maioria das mutações nucleotídicas observadas foram de purina para purina (A e G) e de pirimidina para pirimidina (T e C). Esse tipo de mutação ocorre com maior frequência devido a semelhança química entre esses nucleotídeos.

Estudos apontam que a taxa de substituição nucleotídica nos begomovírus é equivalente a taxa em vírus de RNA. Duffy & Holmes (2009), publicaram um trabalho onde foi comprovada a elevada taxa de mutação do EACMV. Um trabalho semelhante foi feito com TYLCV (Duffy & Holmes, 2008). Além disso, os geminivírus evoluem mais rapidamente que alguns vírus de planta compostos de RNA, como tobamovírus e crinivírus (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1991 & Marco & Aranda, 2005).

Em 2007, foi publicado um trabalho mostrando que a maior frequência de recombinação em begomovírus do Sul e Sudeste da Ásia, ocorre na porção N-terminal da proteína *rep* (Prasanna & Rai, 2007) enquanto quase não ocorre recombinação na *cp*. Não foram realizados estudos de recombinação nesse trabalho, apenas a observação da frequência de mutação pontual, indicando que a *rep* e a *cp* são *hotspots* de mutação pontual no ToSRV.



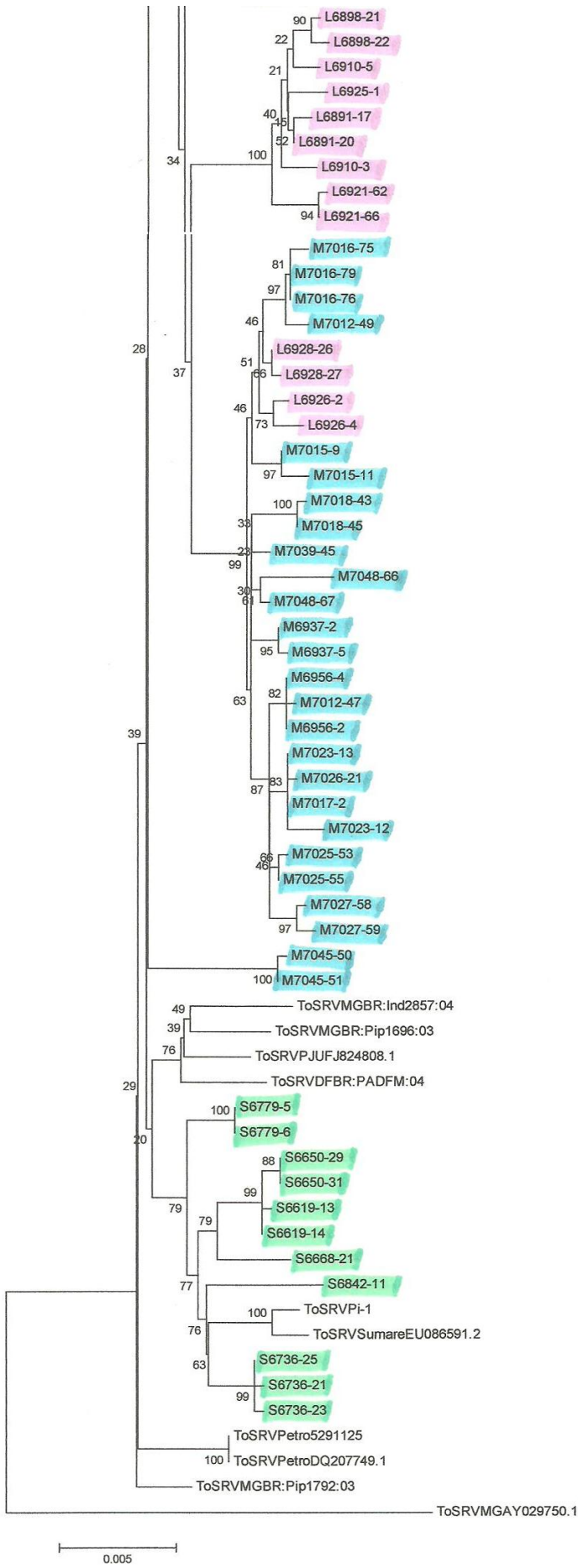


Figura 12: Árvore filogenética gerada por neighbor-joining com os 104 clones de DNA-A isolados de begomovírus de tomateiros desse estudo e 10 sequências de ToSRV dos bancos de dados. As letras a frente dos números indicam sua procedência. S: São Paulo (em verde); L: Luziânia (em rosa); M: Morrinhos (em azul). As sequências de ToSRV utilizadas possuem números de acesso e origem: MGAY029750.1, MGBR:Ind2857:04, MGBR:Pip1696:03 e MGBR:Pip1792:03 de tomate em MG; DFBR:PADFM:04 e Pi-1 de tomate do DF; Petro5291125 e PetroDQ207749.1 de pimenta de Petrolina de Goiás; SumareEU086591.2 de *Nicandra physaloides* em Sumaré; PJUFJ824808.1 de pimentão em PJU-São Paulo.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com esse trabalho, foi possível observar a relação entre o padrão RCA-RFLP e a espécie de begomovírus presente na amostra. Muitos padrões continham as bandas específicas do DNA-A de ToSRV e algumas do DNA-B do mesmo, mostrando assim, que é possível ter uma noção de diversidade antes do sequenciamento. Isso facilita a seleção de amostras a serem clonadas, tornando o trabalho mais rápido e menos dispendioso financeiramente. Além disso, pôde-se ter uma noção da predominância do *Tomato severe rugose virus* em alguns dos campos destinados à produção de tomate rasteiro nos estados de Goiás e São Paulo. O fato de não haver um único isolado de outra espécie indica a prevalência desse vírus em relação a outros do mesmo gênero. Uma razão para tal fato pode ser a capacidade do ToSRV de infectar plantas daninhas (por exemplo em *Nicandra physaloides*, Barbosa *et al.*, 2009), podendo assim se manter ao longo de todo o ano em campo e manter uma fonte mesmo estando em período de vazio sanitário. O vazio sanitário foi implementado em Goiás objetivando a diminuição da incidência de begomovirus em tomateiro. O fato do ToSRV conseguir se

estabelecer em plantas alternativas seria uma forma de driblar essa intervenção humana. Além disso, o vazio sanitário foi implementado apenas para tomate rasteiro. O tomate para o segmento de mesa não segue as mesmas regras, fazendo com que as moscas-brancas possam migrar das regiões sem tomateiros para aquelas que apresentam cultivo de tomateiros. Um outro fator que propicia a permanência do vírus mesmo na ausência do tomateiro, é o cultivo de outras plantas hospedeiras da mosca-branca e vírus, permitindo que o vírus mantenha-se em campo. Em São Paulo, o vazio sanitário não é obrigatório, porém é realizado pelos produtores de tomate para processamento de forma generalizada nos meses de chuva. Portanto, a aparente predominância de isolados de ToSRV em SP e GO pode ser tentativamente explicada pela alta adaptação desse vírus ao tomateiro e ao sistema de produção adotado atualmente pelos produtores de tomate brasileiros e pelas características particulares desse vírus quanto à sua sobrevivência e dispersão nas lavouras de tomateiro. Essas características ainda estão por ser determinadas.

Sabendo-se que o ToSRV é o vírus prevalente nos campos de tomate destinados ao processamento industrial, recomenda-se focar estudos de desenvolvimento de cultivares resistentes a esse vírus. Isso facilita o direcionamento, uma vez que existem muitas espécies de begomovírus. Os dados gerados nesse trabalho também podem ser utilizados para a realização de estudos de evolução e epidemiologia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES-JÚNIOR, M.; ALFENAS-ZERBINI, P.; ANDRADE, E.C.; ESPOSITO, D.A.; SILVA, F N.; CRUZ, A.C. F. da; VENTRELLA, M.C.; OTONI, W.C. & ZERBINI, F.M. Synergism and negative interference during co-infection of tomato and *Nicotiana benthamiana* with two bipartite begomoviruses. *Virology* 387:257–266. 2009.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402. 1997.

AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R. F.; FONTES, E.P.B.; DE CARVALHO, M.G. & ZERBINI, F.M. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in southeastern Brazil. *Fitopatologia brasileira* 27(4):372-377. 2002.

ANTIGNUS, Y.; VUNSH, R.; LACHMAN, O.; PEARLSMAN, M.; MASLENIN, L.; HANANYA, U. & ROSNER, A. Truncated Rep gene originated from Tomato yellow leaf curl virus-Israel [Mild] confers strain-specific resistance in transgenic tomato. *Annals of Applied Biology* 144: 39–44. 2004.

ARNAUD, L.S.E.P.; SANTOS, C.D.G.; LIMA, J.A.A. & FEITOSA, F.A.A. Predominância de begomovírus em tomateiros na região produtora da Ibiapaba, Ceará, e sua detecção natural em plantas daninhas. *Fitopatologia Brasileira* 32(3):241-246. 2007.

BARBOSA, J.C.; BARRETO, S.S.; INOUE-NAGATA, A.K.; REIS, M.S.; FIRMINO, A.C.; BERGAMIN FILHO, A. & REZENDE, J.A.M. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. *Journal of General Plant Pathology* 75(6):440-443. 2009.

- BEDFORD, I.D., BRIDDON, R.W., BROWN, J.K., ROSELL, R.C. & MARKHAM, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology* 125:311-325. 1994.
- BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; JONES, P.; ALKAFF, N. & MARKHAM, P.G. Differentiation of three whitefly-transmitted geminivirus from the Republic of Yemen. *European Journal of Plant Pathology* 100:243-257. 1994.
- BEZERRA, I.C.; LIMA, M.F.; RIBEIRO, S.G.; GIORDANO, L. de B. & ÁVILA, A.C. de. Occurrence of geminivirus in tomato producing areas in Submedio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira* 22(Suplemento):331. 1997.
- BISARO, D.M.; HAMILTON, W.D.O.; COUTTS, R.H.A. & BUCK, K.W. Molecular cloning and characterisation of the two components of tomato golden mosaic virus. *Nucleic Acids Research* 10:4913– 4922. 1982.
- BOCK, K.R.; GUTHRIE, E.J. & WOODS, R.D. Purification of maize streak virus and its relationship to viruses associated with streak diseases of sugarcane and *Panicum maximum*. *Annals of Applied Biology* 77:289– 296. 1974.
- BRIDDON, R.W.; BEDFORD, I.D.; TSAI, J.H. & MARKHAM, P.G. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato psuedo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology* 219:387– 394. 1996.
- BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; ZERBINI, M.; MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. Geminiviridae. *In*: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U. & BALL, L. A. (eds) *Virus Taxonomy*, ixth report of the ICTV. Elsevier/Academic Press. London. 2011.

BROWN, J.K. & NELSON, M.R. Transmission, host range, and virus-vector relationships of chincho del tomate, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. *Plant Disease* 72:866-869. 1988.

CAMARGO, F.P. de; ALVES, H.S.; CAMARGO FILHO, W.P. de & VILELA, N.J. Cadeia produtiva de tomate industrial no Brasil: resenha da década de 1990, produção regional e perspectivas. *Informações Econômicas* 36(11):7-20. 2006.

CARR, R.J. & KIM, K.S. Evidence that bean golden mosaic virus invades non-phloem tissue in double infections with tobacco mosaic virus. *Journal of General Virology* 64:2489–2492. 1983.

CHARLESWORTH, B. & CHARLESWORTH, D. *Evolution: a very short introduction*. Oxford University Press. 2003.

CHATCHAWANKANPHANICH, O & MAXWELL, D.P. Tomato leaf curl Karnataka virus from Bangalore, India, appears to be a recombinant virus. *Phytopathology* 92:637-645. 2002.

COSTA, A.S. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. *FAO Plant Protection Bulletin* 13:121-130. 1965.

COTRIM, M.A. de A.; KRAUSE-SAKATE, R.; NARITA, N.; ZERBINI, F.M. & PAVAN, M.A. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica* 33(3):300-303. 2007.

CZOSNEK, H. & LATERROT, H. A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Archives of Virology* 142:1391-1406. 1997.

DA SILVA, J.B.C. & GIORDANO, L. DE B. *Tomate para processamento industrial*. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 1ª edição. CIP Brasil. 2000.

DEBROT, E. & DAO, H.Y.F. Nota preliminar sobre un “mosaico amarillento del tomate” in Venezuela. *Agron. Trop.* 13:33-41. 1963.

DENG, D.; OTIM-NAPE, W.G.; SANGARE, A.; OGWAL, S.; BEACHY, R.N. & FAUQUET, C.M. Presence of a new virus closely related to east African cassava mosaic geminivirus, associated with cassava mosaic outbreak in Uganda. *African Journal of Root Tuber Crops* 2:23-28. 1997.

DONSON, J.; MORRIS-KRSINICH, B.A.M.; MULLINEAUX, P.M.; BOULTON, M.I. & DAVIES, J.W. A putative primer for second-strand synthesis of maize streak virus is virion-associated. *EMBO Journal* 3:3069– 3073. 1984.

DOYLE, J.J. & DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15. 1987.

DRY, I.B.; RIGDEN, J.E.; KRAKE, L.R.; MULLINEAUX, P.M. & REZAIAN, M.A. Nucleotide sequence and genome organization of tomato leaf curl geminivirus. *Journal of General Virology* 74:147-151. 1993.

DUAN, Y.P.; POWELL, C.E.; PURCIFULL, D.E. & HIEBERT, E. Geminivirus resistance in transgenic tobacco expressing mutated BC1 protein. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 10:617–623. 1997.

DUFFY, S & HOLMES, E.C. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus*. *Journal of Virology* 82(2):957–965. 2008.

DUFFY, S & HOLMES, E.C. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *Journal of General Virology* 90:1539–1547. 2009.

ESPINOZA, W. Manual de produção de tomate industrial no Vale do São Francisco. Brasília. IICA, Escritório no Brasil. Tropical Gráfica Editora. p.13. 1991.

FARIA, J.C., BEZERRA, I.C., ZERBINI, F.M., RIBEIRO, S.G. & LIMA, M.F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 25:125-137. 2000.

FARIA, J.C. & MAXWELL, D.P. Variability in Geminivirus Isolates Associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology* 89(3):262-268. 1999.

FARIA, J.C. & ZERBINI, F.M. Família *Geminiviridae* – taxonomia, replicação e movimento. *RAPP* 8:27-57. 2000.

FAUQUET, C. & FARGUETTE, D. African Cassava Mosaic Virus: Etiology, Epidemiology, and Control. *Plant Disease* 74(6):404-411. 1990.

FAUQUET, C.M.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P.; STENGER, D.C. & STANLEY, J. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology* 148:405–421. 2003.

FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; MORIONES, E.; STANLEY, J; ZERBINI, M. & ZHOU, X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* 153:783–821. 2008.

FAUQUET, C.M.; MAXWELL, D.P.; GRONENBORN, B. & STANLEY, J. Revised proposal for naming geminiviruses. *Archives of Virology* 145:1743–1761. 2000.

FAUQUET, C.M. & STANLEY, J. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Archives of Virology* 150:2151–2179. 2005.

FERNANDES, J.J. Caracterização e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro na região do Triângulo Mineiro. (Tese D.S.). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2001.

FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUE, L.C. de; GIORDANO, L. de B.; BOITEUX, L.S.; ÁVILA, A.C. de & INOUE-NAGATA, A.K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36:251–258. 2008.

FERNANDEZ-CUARTERO, B.; BÜRGYAN, J.; ARANDA, M.A.; SALANKI, K.; MORIONES, E. & GARCÍA-ARENAL, F. Increase in the relative fitness of a plant-virus RNA associated with its recombinant nature. *Virology* 203:373-377. 1994.

FERRAZ, E.; RESENDE, L.V.; LIMA, G.S.A.; SILVA, M.C.L.; FRANÇA, J.G.E. & SILVA, D.J. Redenção: nova cultivar de tomate para a indústria resistente a geminivírus e tospovírus. *Horticultura Brasileira* 21(3):578-580. 2003.

FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K. & KRAMER, M. Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do CAMPO. *O Biológico* 26:65-69. 1960.

FONDONG, V.N.; PITA, J.S.; REY, M.E.C.; KOCHKO, A.; BEACHY, R.N. & FAUQUET, C.M. Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new doublerecombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. *Journal of General Virology* 81:287–297. 2000.

FONTES, E.P.B.; SANTOS, A.A.; LUZ, D.F.; WACLAWOVSKY, A.J. & CHORY, J. The geminivírus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. *Genes & Development* 18:2545–2556. 2004.

FRANÇA, F.H.; VILLAS-BÔAS, G.L. & BRANCO, M.C. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 25:369-372. 1996.

GALVÃO, R.M.; MARIANO, A.C.; LUZ, D.F.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, E.C.; ZERBINI, F.M.; ALMEIDA, M.R. & FONTES, E.P.B. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. Journal of General Virology 84:18783-18780. 2003.

GARCÍA-ANDRÉS, S.; MONCI, F.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. Virology 350:433-442. 2006.

GIBBS, A.; CALISHER, C. H. & GARCIA-ARENAL, F. Molecular Basis of Viral Evolution. Cambridge University Press. Cambridge. 1995.

GIBBS, M.J. & WEILLER, G.F. Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A. 96:8022-8027. 1999.

GIORDANO, L. de B.; FONSECA, M.E. de N.; SILVA, J.B.C. da; INOUE-NAGATA, A.K. & BOITEUX, L.S. Efeito da infecção precoce por Begomovirus com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. Horticultura brasileira 23(3):815-818. 2005.

GOODMAN, R.M. Single-stranded DNA genome in a whitefly transmitted plant virus. Virology 83:171– 179. 1977.

GUALBERTO, R.; BRAZ, L.T.; & BANZATTO, D.A. Produtividade, adaptabilidade e estabilidade fenotípica de cultivares de tomateiro sob diferentes condições de ambiente. Pesquisa Agropecuária 37(1)81-88. 2002.

GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56:313-329. 1999.

GUTIERREZ, C. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO Journal* 19:792-799. 2000.

HABER, S.; IKEGAMI, M.; BAJET, N.B. & GOODMAN, R.M. Evidence for a divided genome in bean golden mosaic virus, a geminivirus. *Nature* 289:324– 326. 1981.

HAMEED, S.; KHALID, S.; EHSAN U.L.; H. & HASHMI, A.A. Cotton leaf curl disease in Pakistan caused by a whitefly transmitted geminivirus. *Plant Disease* 78:529. 1994.

HAMILTON, W.D.O.; BISARO, D.M. & BUCK, K.W. Identification of novel DNA forms in tomato golden mosaic virus infected tissue. Evidence for a two component viral genome. *Nucleic Acids Research* 10:4901–4912. 1982.

HAMILTON, W.D.O.; BISARO, D.M.; COUTTS, R.H.A. & BUCK, K.W. Demonstration of the bipartite nature of the genome of a single-stranded DNA plant virus by infection with the cloned DNA components. *Nucleic Acids Research* 11:7387-7396. 1983.

HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR, S. & ROBERTSON, D. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:71– 106. 1999.

HANSSEN, I.M.; LAPIDOT, M. & THOMMA, B.P.H.J. Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23(5):539-548. 2010.

HARRISON, B.D. Advances in geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology* 23:83–96. 1985.

HARRISON, B.D.; BARKER, H.; BOCK, K.R.; GUTHRIE, E.J.; MEREDITH, G. & ATKINSON, M. Plant viruses with circular single-stranded DNA. *Nature* 270:760– 762. 1977.

HARRISON, B.D.; LIU, Y.L.; KHALID, S.; HAMEED, S.; OTIM-NAPE, G.W. & ROBINSON, D.J. Detection and relationships of cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan. *Annals of Applied Biology* 130:61-75. 1997.

HERSKOWITZ, I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 329:219–222. 1987.

HEYRAUD-NITSCHKE, F.; SCHUMACHER, S.; LAUFS, J.; SCHAEFER, S.; SCHELL, J. & GRONENBORN, B. Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. *Nucleic Acids Research* 23:910– 916. 1995.

HOEFERT, L. Association of squash leaf curl virus with nuclei of squash vascular cells. *Phytopathology* 77:1596–1600. 1987.

HOLLAND, J.D.E. Origin and evolution of viruses. *Virus Genes* 16:13-21. 1998.

HORNS, T. & JESKE, H. Localization of abutilon mosaic virus (AbMV) DNA within leaf tissue by in situ hybridization. *Virology* 181:580–588. 1991.

HOU, Y.M. & GILBERTSON, R.L. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *Journal of Virology* 70:5430–5436. 1996.

HOU, Y.M.; SANDERS, R.; URSIN, V.M. & GILBERTSON, R.L. Transgenic plants expressing geminivirus movement proteins: abnormal phenotypes and delayed infection by

Tomato mottle virus in transgenic tomatoes expressing the Bean dwarf mosaic virus BV1 or BC1 proteins. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 13:297–308. 2000.

HOWELL, S.H. Physical structure and genetic organization of the genome of maize streak virus (Kenyan isolate). *Nucleic Acids Research* 12:7359– 7375. 1984.

HULL, R. *Matthews' Plant Virology*. 4th ed. Academic Press. San Diego. 2002.

IBGE. www.ibge.gov.br Consultado em: 23/05/2012.

INOUE-NAGATA, A.K.; ÁVILA, A.C. & BÔAS, G.L.V. Os geminivírus em sistema de produção integrada de tomate indústria. Circular Técnica 71. Embrapa Hortaliças. 2009.

KEESE, P.; & GIBBS, A. Plant viruses: master explorers of evolutionary space. *Current Opinion in Genetics and Development* 3:873-877. 1993.

KHEYR-POUR, A.; BENDAHMANE, M.; MATZEIT, V.; ACCOTTO, G.P.; CRESPI, S. & GRONENBORN, B. Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. *Nucleic Acids Research* 19:6763-6769. 1991.

KONATE, G.; BARRO, N.; FARGETT, D.; SWANSON, M.M. & HARRISON, B.D. Occurrence of whitefly-transmitted geminiviruses in crops in Burkina Faso and their serological detection and differentiation. *Annals of Applied Biology* 196:121-129. 1995.

LAPIDOT, M.; FRIEDMANN, M.; LACHMAN, O.; YEHEZKEL, A.; NAHON, S.; COHEN, S.; PILOWSKY, M. Comparison of Resistance Level to Tomato Yellow Leaf Curl Virus Among Commercial Cultivars and Breeding Lines. *Plant Disease* 81(12):1425-1428. 1997.

LAUFS, J.; TRAUT, W.; HEYRAUD, F.; MATZEIT, V.; ROGERS, S.G.; SCHELL, J. & GRONENBORN, B. In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the

replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 92:3879– 3883. 1995.

LAZAROWITZ, S.G. Geminiviruses: genome structure and gene function. Critical Review in Plant Sciences 11:327-349. 1992.

LIMA, M.F.; BEZERRA, I.C.; RIBEIRO, S.G. & ÁVILA , A.C. de. Distribuição de geminivírus nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale São Francisco. Fitopatologia brasileira 26(1):81-85. 2001.

LIMA, M.F. & HAJI, F.N.P. Mosca branca x geminivírus na cultura do tomate no Submédio do Vale do São Francisco. Horticultura Brasileira 15: contracapa. 1998.

LOURENÇÃO, A.L. & NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. Bragantia 53(1):53-59. 1994.

MARCO, C.F. & ARANDA, M.A. Genetic diversity of a natural population of Cucurbit yellow stunting disorder virus. Journal of General Virology 86:815–822. 2005.

MAYTIS, J.C.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R.; COSTA, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. Summa Phytopathologica 1: 267-274. 1975.

MELO, P.C.T. de ; VILELA, N.J. Desafios e perspectivas para a cadeia brasileira do tomate para processamento industrial. Horticultura Brasileira 23(1)154-157. 2005.

MELO, P.C.T. de ; VILELA, N.J. Desempenho da cadeia agroindustrial brasileira do tomate na década de 90. Horticultura Brasileira 22(1)154-160. 2004.

MONCI, F.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. 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* 303:317-326. 2002.

MONJANE, A.L.; HARKINS, G.W.; MARTIN, D.P.; LEMEY, P.; LEFEUVRE, P.; SHEPHERD, D.N.; OLUWAFEMI, S.; SIMUYANDI, M.; ZINGA, I.; KOMBA, E.K.; LAKOUTENE, D.P.; MANDAKOMBO, N.; MBOUKOULIDA, J.; SEMBALLA, S.; TAGNE, A.; TIENDRE'BE'OGO, F.; ERDMANN, J.B.; ANTWERPEN, T.V.; OWOR, B.E.; FLETT, B.; RAMUSI, M.; WINDRAM, O.P.; SYED, R.; LETT, J.; BRIDDON, R.W.; MARKHAM, P.G.; RYBICKI, E.P. & VARSANI, A. Reconstructing the history of Maize streak virus strain a dispersal to reveal diversification hot spots and its origin in Southern Africa. *Journal of Virology* 85(18):9623–9636. 2011.

MORILLA, G.; ANTÚNEZ, C.; BEJARANO, E.R.; JANSSEN, D. & CUADRADO, I.M. A new Tomato yellow leaf curl virus strain in southern Spain. *Plant Disease* 87:1004. 2003.

MORILLA, G.; KRENZ, B.; JESKE, H.; BEJARANO, E.R. & WEGE, C. Tête à tête of tomato yellow leaf curl virus and tomato yellow leaf curl sardinia virus in single nuclei. *Journal of Virology* 78:10715–10723. 2004.

MORILLA, G.; JANSSEN, D.; GARCÍA-ANDRÉS, S.; MORIONES, E.; CUADRADO, I.M. & BEJARANO, E.R. Pepper (*Capsicum annuum*), is a dead-end host for *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). *Phytopathology* 95:1089-1097. 2005.

MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research* 71(1-2):123-134. 2000.

MORRA, M.R. & PETTY, I.T.D. Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *Plant Cell* 12:2259–2270. 2000.

MORSE, S.S. *The Evolutionary Biology of Viruses*. Raven Press, New York. 1994.

MOYA, A., HOLMES, E.C., & GONZÁLEZ-CANDELAS, F. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews* 2:279-288. 2004.

MULLINEAUX, P.M.; DONSON, J.; MORRIS-KRSINICH, B.A.M.; BOULTON, M.I. & DAVIES, J.W. The nucleotide sequence of maize streak virus DNA. *EMBO Journal* 3:3063–3068. 1984.

MUMFORD, D.L. Purification of curly top virus. *Phytopathology* 64:136–139. 1974.

NAVAS-CASTILLO, J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; DÍAZ, J.A.; SÁEZ, E. & MORIONES, E. Tomato yellow leaf curl virus-Is causes a novel disease of common bean and severe epidemics in tomato in Spain. *Plant Disease* 81:19-32. 1999.

NAVOT, N.; ZEIDAN, M.; PICHERSKY, R.; ZAMIR, D. & CZOSNEK, H. Use of the polymerase chain reaction to amplify tomato yellow leaf curl virus DNA from infected plants and viruliferous whiteflies. *Phytopathology* 82:1199-1202. 1992.

NORIS, E.; ACCOTTO, G.P.; TAVAZZA, R.; BRUNETTI, A.; CRESPI, S. & TAVAZZA, M. Resistance to tomato yellow leaf curl geminivirus in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a truncated viral C1 gene. *Virology* 224:130–138. 1996.

NORIS, E.; HIDALGO, E.; ACCOTTO, G.P. & MORIONES, E. High similarity among the tomato yellow leaf curl virus isolates from the West Mediterranean Basin: The nucleotide sequence of an infectious clone from Spain. *Archives of Virology* 135:165-170. 1994.

NUEVO, P.A.S. Aspectos da cadeia agroindustrial do tomate no Brasil. *Informações Econômicas* 24(2)31-46. 1994.

OWOR, B.E.; DARREN, P.M.; DIONNE, N.S.; RICHARD, E.; ADE'RITO, L.M.; EDWARD, P.R.; JENNIFER A.T. & ARVIND, V. Genetic analysis of maize streak virus

isolates from Uganda reveals widespread distribution of a recombinant variant. *Journal of General Virology* 88:3154–3165. 2007.

PADIDAM, M.; BEACHY, R.N. & FAUQUET, C.M. Tomato leaf curl geminivirus from India has a bipartite genome and coat protein is not essential for infectivity. *Journal of General Virology* 76:25-35. 1995.

PADIDAM, M; SAWYER, S & FAUQUET, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265:218-225. 1999.

PALMER, K.E. & RYBICKI, E.P. The molecular biology of mastreviruses. *Advances in Virus Research* 50:183– 234. 1998.

PETTY, I.T.D.; MILLER, C.G.; MEADE-HARSH, T.J. & SCHAFFER, R.L. Complementary and noncomplementary host adaptation defects in bipartite geminiviruses. *Virology* 212:263–267. 1995.

PETTY, I.T.D. & QIN, Y. Genetic analysis of bipartite geminivirus tissue tropism. *Virology* 291:311–323. 2001.

PITA, J.S.; FONDONG, V.N.; SANGARÉ, A.; OTIM-NAPE, G.W.; OGWAL, S. & FAUQUET, C.M. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology* 82:655–665. 2001.

POHL, D. & WEGE, C. Synergistic pathogenicity of a phloem-limited begomovirus and tobamoviruses, despite negative interference. *Journal of General Virology* 88:1034–1040. 2007.

POLSTON, J.E. & ANDERSON, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease* 81(12):1358-1369. 1997.

PREISS, W. & JESKE, H. Multitasking in replications is common among geminiviruses. *Journal of Virology* 77:2972-2980. 2003.

PRASANNA, H.C. & RAI, M. Detection and frequency of recombination in tomato-infecting begomoviruses of South and Southeast Asia. *Virology Journal* 4:111-120. 2007.

RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVÍCIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N. de; ROCHA, H. & ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 148: 281–295. 2003.

RIBEIRO, S.G.; MARTIN, D.P.; LACORTE, C.; SIMÕES, I.C.; ORLANDINI, D.R.S. & INOUE-NAGATA, A.K. Molecular and biological characterization of Tomato chlorotic mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology* 97(6):702-711. 2007.

ROBERTS, S. & STANLEY, J. Lethal mutations within the conserved stem-loop of African cassava mosaic virus DNA are rapidly corrected by genomic recombination. *Journal of General Virology* 75:3203– 3209. 1994.

ROCHA, K.C.G.; MARUBAYASHI, J.M.; NAVAS-CASTILLO, J.; PAVAN, M.A. & KRAUSE-SAKATE, R. Ocorrência e variabilidade genética do *Tomato severe rugose virus* em tomateiro e pimentão no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* 36(3):222-227. 2010.

ROCHA, K.C.; SAKATE, R.K.; PAVANI, M.A.; KOBORI, R.F.; GIORIA, R. & YUKI, V.A. Avaliação de danos causados pelo Tomato severe rugose virus (ToSRV) em cultivares

de pimentão. *Summa Phytopathologica* 38(1)87-89. 2012.

ROCHESTER, D.E.; FAUQUET, C.M.; DEPAULO, J.J. & BEACHY, R.N. Complete nucleotide sequence of the geminivirus, tomato yellow leaf curl virus (Thailand isolate). *Journal of General Virology* 75:477-485. 1994.

RODRÍGUEZ-CEREZO, E.; ELENA, S.F.; MOYA, A. & GARCÍA-ARENAL, F. High genetic stability in natural populations of the plant RNA virus Tobacco mild green mosaic virus. *Journal of Molecular Evolution* 32:328–332. 1991.

ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L.; RUSSEL, D.R. & MAXWELL, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminivirus. *Plant Disease* 77:340-347. 1993.

ROJAS, M.R. & GILBERTSON, R.L. Chapter 3, Emerging plant viruses: A diversity of mechanisms and opportunities. Em *Plant Virus Evolution*. M. J. Roossinck, ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. p.27-51. 2008.

ROJAS, M.R.; HAGEN, C.; LUCAS, W.J. & GILBERTSON, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and Emergence of Geminiviruses. *Annual Reviews of Phytopathology* 43:361–394. 2005.

ROJAS, M.R.; JIANG, H.; SALATI, R.; XOCONOSTLE-CAZARES, B.; SUDARSHANA, M.R.; LUCAS, W.J. & GILBERTSON, R.L. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, tomato yellow leaf curl virus. *Virology* 291:110–125. 2001.

- ROTHENSTEIN, D.; KRENZ, B.; SELCHOW, O. & JESKE, H. Tissue and cell tropism of Indian cassava mosaic virus (ICMV) and its AV2 (precoat) gene product. *Virology* 359:137–145. 2007.
- RUSHING, A.E.; SUNTER, G.; GARDINER, W.E.; DUTE, R.R. & BISARO, D.M. Ultrastructural aspects of tomato golden mosaic virus infection in tobacco. *Phytopathology* 77:1231–1236. 1987.
- RYBICKI, E.P. & PIETERSEN, E.G. Plant virus problems in the developing world. *Advances in Virus Research* 53:127-175. 1999.
- SANCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS-CASTILLO, J.; CAMERO, R.; SORIA, C.; DÍAZ, J.A. & MORIONES, E. Displacement of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology* 89:1038-1043. 1999.
- SANCHEZ-CAMPOS, S.; DÍAZ, J.A.; MONCI, F.; BEJARANO, E.R.; REINA, J.; NAVAS-CASTILLO, J.; ARANDA, M.A. & MORIONES, E. High genetic stability of the begomovirus Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in southern Spain over an 8-year period. *Phytopathology* 92:842-849. 2002.
- SANTOS, C.D.G.; D'ÁVILA, A.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; RESENDE, R.O. Espécies vegetais hospedeiras de begomovírus isolados de tomateiro em Goiás e no Distrito Federal. *Fitopatologia brasileira* 29(4):450-455. 2004.
- SANZ, A.I.; FRAILE, A.; GARCIA-ARENAL, F.; ZHOU, X.P.; ROBINSON, D.J.; KHALID, S.; BUTT, T. & HARRISON, B.D. Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *Journal of General Virology* 81:1839-1849. 2000.

SAUNDERS, K., BEDFORD I.D., YAHARA, T. & STANLEY, J. The earliest recorded plant virus disease. *Nature* 422:831. 2003.

SAUNDERS, K.; LUCY, A. & STANLEY, J. DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus consistent with a rolling circle mechanism of replication. *Nucleic Acids Research* 19:2325–2330. 1991.

SAUNDERS, K.; LUCY, A. & STANLEY, J. RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus African cassava mosaic virus. *Nucleic Acids Research* 20:6311-6315. 1992.

SAUNDERS, K.; SALIM, N.; MALI, V.R.; MALATHI, V.G.; BRIDDON, R.W.; MARKHAM, P.G. & STANLEY, J. Characterisation of Sri Lankan cassava mosaic virus and Indian cassava mosaic virus: evidence for acquisition of a DNA B component by a monopartite begomovirus. *Virology* 293:63–74. 2002.

SAUNDERS, K. & STANLEY, J. A nanovirus-like DNA component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology* 264:142–152. 1999.

SHIVAPRASAD, P.V.; THILLAICHIDAMBARAM, P.; BALAJI, V. & VELUTHAMBI, K. Expression of full-length and truncated Rep genes from Mungbean yellow mosaic virus-*Vigna* inhibits viral replication in transgenic tobacco. *Virus Genes* 33:365–374. 2006.

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

STANLEY, J. Infectivity of the cloned geminivirus genome requires sequences from the both DNAs. *Nature* 305:643-645. 1983.

STANLEY, J. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology* 206:707–712. 1995.

STANLEY, J.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P. & STENGER, D.C. Geminiviridae. *In*: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U. & BALL, L.A. (eds) *Virus Taxonomy*, viiiith report of the ICTV. Elsevier/Academic Press. London. 2005.

STANLEY, J. & GAY, M.R. Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. *Nature* 301:260–262. 1983.

STANLEY, J.; MARKHAM, P.G.; CALLIS, R.J. & PINNER, M.S. The nucleotide sequence of an infectious clone of the geminivirus beet curly top virus. *EMBO Journal* 5:1761–1767. 1986.

STANLEY, J.; SAUNDERS, K.; PINNER, M.S. & WONG, S.M. Novel defective interfering DNAs associated with ageratum yellow vein geminivirus infection of *Ageratum conyzoides*. *Virology* 239:87–96. 1997.

STENGER, D.C.; DAVIS, K.R. & BISARO, D.M. Recombinant Beet curly top virus genomes exhibit both parental and novel pathogenic phenotypes. *Virology* 200:677-685. 1994.

STENGER, D.C. & MCMAHON, C.L. Genotypic Diversity of Beet Curly Top Virus Populations in the Western United States. *Phytopathology* 87(7):737-744. 1997.

STENGER, D.C; REVINGTON, G.N.; STEVENSON, M.C. & BISARO, D.M. Replication release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for rolling-circle

replication of a plant viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 88:8029–8033. 1991.

STONOR, J.; HART, P.; GUNTHER, M.; DEBARRO, P. & REZAIAN, M.A. Tomato leaf curl geminivirus in Australia: occurrence, detection, sequence diversity and host range. *Plant Pathology* 52:379-388. 2003.

SUDARSHANA, M.R.; WANG, H.L.; LUCAS, W.J. & GILBERTSON, R.L. Dynamics of bean dwarf mosaic geminivirus cell-to-cell and long-distance movement in *Phaseolus vulgaris* revealed, using the green fluorescent protein. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 11:277–291. 1998.

TORRES-PACHECO, I.; GARZON, T.J.A.; HERRERA-ESTRELLA, L. & RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: Analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *Journal of General Virology* 74:2225-2231. 1993.

UMAHARAN, P.; PADIDAM, M.; PHELPS, R.H.; BEACHY, R.N. & FAUQUET, C.M. Distribution and diversity of geminiviruses in Trinidad and Tobago. *Phytopathology* 88:1262-1268. 1998.

VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J.S. & FAUQUET, C.M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* 78:9487–9498. 2004.

WANG, H.L.; GILBERTSON, R.L. & LUCAS, W.J. Spatial and temporal distribution of bean dwarf mosaic geminivirus in *Phaseolus vulgaris* and *Nicotiana benthamiana*. *Phytopathology* 86:1204–1214. 1996.

WEGE, C.; GOTTHARDT, R.D.; FRISCHMUTH, T. & JESKE, H. Fulfilling Koch's postulates for Abutilon mosaic virus. *Archives of Virology* 145:2217–2225. 2000.

WEGE, C.; SAUNDERS, K.; STANLEY, J. & JESKE, H. Comparative analysis of tissue tropism of bipartite geminivirus. *Journal of Phytopathology* 149:359–368. 2001.

WEGE, C. & SIEGMUND, D. Synergism of a DNA and an RNA virus: enhanced tissue infiltration of the begomovirus Abutilon mosaic virus (AbMV) mediated by Cucumber mosaic virus (CMV). *Virology* 357:10–28. 2007.

World Processing Tomato Council. <http://www.wptc.to/releases/releases38.pdf> Consultado em: 12/01/2012.

ZERBINI JR., F.M.; DE CARVALHO, M.G. & ZAMBOLIM, E.M. Introdução à virologia vegetal. 1ª ed. Editora UFV. Viçosa. 2002.

ZHOU, X.P.; LIU, Y.L.; CALVERT, L.; MUNOZ, C.; OTIM-NAPE, G.W.; ROBINSON, D.J. & HARRISON, B.D. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology* 78:2101-2111. 1997.

ZHOU, X.; LIU, Y.; ROBINSON, D.J. & HARRISON, B.D. Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. *Journal of General Virology* 79:915-925. 1998.