



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**Avaliação de Mecanismos da Resistência Conferida pelo Gene  
*Ty-1* Contra *Tomato chlorotic mottle virus* -ToCMoV na  
Linhagem de Tomate LAM 144R**

**LEYDY LORENA MENDOZA TOBAR**

**Brasília – DF**

**2013**

**LEYDY LORENA MENDOZA TOBAR**

**Avaliação de Mecanismos da Resistência Conferida pelo Gene *Ty-1* Contra  
*Tomato chlorotic mottle virus* -ToCMoV na Linhagem de Tomate LAM 144R**

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

**Orientador**

Dra. Rita de Cássia Pereira Carvalho,

**Co-orientação:**

Dra. Simone da Graça Ribeiro

**BRASÍLIA**

**DISTRITO FEDERAL – BRASIL**

**2013**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Mendoza, L.L.

Avaliação de Mecanismos da Resistência Conferida pelo Gene *Ty-1* Contra *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV na Linhagem de Tomate LAM 144R. Leydy Lorena Mendoza Tobar.

Brasília, 2013

Número de páginas p.: 143

Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

*Begomovirus*, tomate, resistência, movimento viral

II. Título. Avaliação de Mecanismos da Resistência Conferida pelo Gene *Ty-1* Contra *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV na Linhagem de Tomate LAM 144R.

*Dedicado a Deus, minha  
mãe, meu pai, minhas duas  
irmãs, demais familiares na  
Colômbia, meu anjo Rafael  
Marques e minha mentora  
Rita que fizeram possível  
este sonho com seu apoio  
incondicional.*



Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da **Dra. Rita de Cássia Pereira Carvalho** e co-orientação da pesquisadora **Dra. Simone da Graça Ribeiro**. Apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) através de bolsa concedida a Rede EstRESCE - Rede de Estudos da Resistência a Estresses para a Sustentabilidade do Agronegócio no Cerrado, e da Empresa Embrapa- Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen).

**Avaliação de Mecanismos da Resistência Conferida pelo Gene *Ty-1* Contra *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV na Linhagem de Tomate LAM 144R.**

**LEYDY LORENA MENDOZA TOBAR**

DISSERTAÇÃO APROVADA em \_\_/\_\_/\_\_\_\_ por:

---

Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata  
(Examinador Interno)

---

Dra. Marília Santos Silva  
(Examinador Externo)

---

Dra Rita de Cássia Pereira Carvalho  
(Orientadora Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL  
BRASIL  
**2013**

## SUMARIO

<b>RESUMO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>GENERAL ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>7</b>
<b>HIPÓTESES .....</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>12</b>
<b>1. CULTURA DO TOMATEIRO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. ALGUNS VÍRUS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA INFECTANDO TOMATEIRO NO BRASIL.....</b>	<b>16</b>
2.1 Gênero Tospovirus .....	16
2.2 Gênero Potyvirus .....	18
2.3 Gênero Tobamovirus .....	19
2.4 Gênero Crinivirus .....	20
<b>3. FAMÍLIA GEMINIVIRIDAE.....</b>	<b>22</b>
3.1 Gêneros da família <i>Geminiviridae</i> .....	22
3.1.1 Gênero Mastrevirus .....	24
3.1.2 Gênero Curtovirus .....	26
3.1.3 Gênero Topocovirus .....	27
<b>4. GÊNERO Begomovirus.....</b>	<b>27</b>
4.1 Organização genômica dos vírus classificados no gênero <i>Begomovirus</i> .....	29
4.1.1 Organização genômica do DNA-A: genes, produtos gênicos, estrutura e função	31
4.1.2 Organização genômica do DNA-B: genes, produtos gênicos, estrutura e função	33
4.2 Transmissão natural dos <i>Begomovirus</i> .....	34
4.3 Replicação dos <i>Begomovirus</i> na planta hospedeira.....	36
4.4 Movimento viral .....	38
4.4.1 Movimento a curta distância (intra e intercelular) .....	39
4.4.2 Movimento a longa distância .....	40

4.5	Genes de Resistência a <i>Begomovirus</i> no Tomate .....	41
<b><u>CAPÍTULO 2. ESTUDO DA REPLICAÇÃO E MOVIMENTO VIRAL NA LINHAGEM DE TOMATEIRO RESISTENTE LAM 144R FRENTE AO <i>Tomato chlorotic mottle virus</i> - ToCMoV.</u></b> .....		
<b><u>RESUMO</u></b> .....		<b>51</b>
<b><u>ABSTRACT</u></b> .....		<b>53</b>
<b><u>1. INTRODUÇÃO</u></b> .....		<b>55</b>
<b><u>2. MATERIAL E MÉTODOS</u></b> .....		<b>58</b>
2.1	Local de realização dos ensaios.....	58
2.2.	Origem do isolados virais .....	58
2.3	Isolados virais para agroinfiltração.....	58
2.4	Preparo do clone viral para inoculação via Biobalística.....	58
2.5	Material vegetal .....	59
2.6	Acúmulo diferencial de <i>Tomato chlorotic mottle virus</i> - ToCMoV na linhagem resistente LAM 144R ( <i>Ty</i> -1) e suscetível LAM 144S quantificado via qPCR. ....	59
2.6.1	Agroinfiltração .....	59
2.6.2	Extração de DNA. ....	60
2.6.3	Reação quantitativa em cadeia da Polimerase (qPCR) .....	61
2.7	Avaliação do movimento a longa distância de <i>Tomato chlorotic mottle virus</i> – ToCMoV em LAM 144R e LAM 144S. ....	63
2.7.1	Inoculação viral por biobalística .....	63
2.7.2	Tissue blot .....	65
2.7.3	Extração de DNA total das amostras coletadas.....	66
2.7.4	Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	66
2.7.5	Southern blot .....	67
<b><u>3. RESULTADOS</u></b> .....		<b>68</b>
3.1	Replicação viral .....	68
3.2	Avaliação do movimento sistêmico do virus <i>Tomato chlorotic mottle virus</i> - ToCMoV, conferido pelo gene <i>Ty</i> -1 na linhagem LAM 144R. ....	71
<b><u>4. DISCUSSÃO</u></b> .....		<b>75</b>
<b><u>5. CONCLUSÃO</u></b> .....		<b>81</b>

<b><u>CAPÍTULO 3. AMPLITUDE DA RESISTÊNCIA CONFERIDA PELO GENE TY-1 PRESENTE NA LINHAGEM LAM 144R À DIFERENTES ESPÉCIES DE BEGOMOVIRUS BIPARTIDOS</u></b> .....	<b>82</b>
<b><u>RESUMO</u></b> .....	<b>83</b>
<b><u>ABSTRACT</u></b> .....	<b>85</b>
<b><u>1. INTRODUÇÃO</u></b> .....	<b>86</b>
<b><u>2. MATERIAL E MÉTODOS</u></b> .....	<b>90</b>
2.1 Local de realização dos ensaios.....	90
2.2 Origem dos isolados virais .....	90
2.3 Material vegetal de estudo - linhagem avaliada .....	90
2.4 Inoculação viral pelo mecanismo de Biobalística. ....	91
2.5 Avaliação dos sintomas .....	92
2.6 Avaliação da acumulação de ToCMoV mediante Southern blot .....	92
2.6.1 Extração de DNA total das amostras coletadas.....	92
2.6.2 Southern blot .....	92
<b><u>3. RESULTADOS</u></b> .....	<b>94</b>
3.1 Avaliação de sintomas de plantas infectadas com as diferentes espécies de <i>Begomovirus</i> .....	94
<b><u>4. DISCUSSÃO</u></b> .....	<b>101</b>
<b><u>5. CONCLUSÕES</u></b> .....	<b>104</b>
<b><u>CONCLUSOES GERAIS</u></b> .....	<b>106</b>
<b><u>PERSPECTIVAS</u></b> .....	<b>107</b>
• <u>Avaliar a replicação viral durante amostragem realizadas a partir do dia 6<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup> dpi e após o 10<sup>o</sup> dpi.</u> ....	<b>107</b>
• <u>Realizar o sequenciamento e estudo da expressão gênica do gene Ty-1 na isolinha LAM 144R.</u> .....	<b>107</b>
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b> .....	<b>108</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1. MARCO REFERENCIAL

**Figura 1.** Representação dos componentes do genoma viral de *Begomovirus*, DNA-A e DNA-B. As setas azuis representam as ORFs (“open reading frames”) codificadas no sentido viral e as setas vermelhas as ORFs codificadas no sentido complementar. Os nomes das proteínas codificadas encontram-se dentro de parênteses. No DNA-A, no sentido viral encontram-se os genes: AV1 que corresponde ao gene *cp* e codifica a proteína capsidial (CP) e no sentido complementar encontra-se a AC1 correspondente ao gene da *rep*, a AC2 correspondente ao gene *trap* e AC3 correspondente ao gene *ren* as quais codificam: a proteína associada à replicação (Rep), ativadora da transcrição (TrAP) e a proteína potenciadora da replicação viral (REn), respectivamente. O DNA B possui duas ORFs, uma em sentido viral (BV1) correspondendo ao gene *nsp* que codifica uma proteína que controla o movimento intracelular e outra no sentido complementar (BC1) correspondente ao gene *mp* e que codifica a proteína responsável pelo movimento. A ORF AV2 encontra-se ausente em *Begomovirus* do Novo Mundo. A região comum entre as regiões codantes está representada em roxo. Esquema baseado em Fernandes (2011). ..... 24

**Figura 1. 1.** Ilustração do ciclo replicativo de espécies da família *Geminiviridae*, dividida em três estágios. Estágio 1: conversão de ssDNA em um covalente circular de forma replicativa (FR) ou dsDNA. Estágio 2: replicação pelo mecanismo de amplificação em círculo rolante para a geração de FR. Estágio 3: produção de ssDNA para encapsidação. Baseado em Gutierrez (1999). ..... 38

Figura 1.2 Conceitos referentes à resposta da planta ao vírus e à doença segundo Cooper & Jones (1983). ..... 48

### CAPÍTULO 2. ESTUDO DA REPLICACÃO E MOVIMENTO VIRAL NA LINHAGEM DE TOMATEIRO RESISTENTE LAM 144R FRENTE AO *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV.

Figura 2. Etapas do procedimento da dupla enxertia. A. Um corte em bisel é feito no enxerto B. Um corte tipo fenda é feito no porta-enxerto. C. Junção do enxerto e porta-enxerto. D. Um grampo é colocado para estabilidade e suporte para cicatrização dos tecidos e as plantas são levadas para um ambiente com câmara úmida. E. Plantas enxertadas e F. Plantas são mantidas em câmara úmida que proporciona um ambiente favorável para a recuperação e cicatrização dos tecidos. .... 64

- Figura 2.1. Etapas do procedimento do tissue blott realizado aos 61 dias após inoculação (dai)  
 A. corte do sobre-enxerto de forma reta acima do grampo que o segura. B-C. impressão do sobre-enxerto sobre a membrana de náilon. D. corte do enxerto no meio dos dois grampos e, E-F. impressão na membrana de náilon. G. elaboração do tissue blot do porta-enxerto. Realiza-se um corte abaixo do primeiro grampo e H. impressão na membrana de náilon. .... 65
- Figura 2.2. Curva padrão obtida para a quantificação absoluta de *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV-A. Os pontos vermelhos indicam a correlação entre os valores de Threshold Cycle (Ct) e a quantidade de moléculas virais de ToCMoV-A (Quantity) das diluições seriadas com concentrações conhecidas ajustados no padrão linear. Os pontos verdes indicam a correlações entre os valores de Threshold Cycle (Ct) e a quantidade de moléculas virais de ToCMoV-A das amostras de estudo ajustadas no padrão linear. .... 69
- Figura 2.3. Quantidade média de moléculas de ToCMoV-A  $\pm$  Desvio padrão segundo o tempo de coleta. Letras diferentes indicam que os genótipos diferem significativamente ( $P < 0.05$ ) segundo os contrastes obtidos no modelo binomial negativo. .... 70
- Figura 2.4. Detecção de *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV inoculado via biobalística em plantas suscetíveis LAM 144S usadas como porta-enxerto em experimentos de dupla enxertia. A. Tissue blot de 12 plantas (2, 5, 6, 7, 10, 11, 9, 12, 15, 16, 18 e 19) aos 15 dias após a inoculação (dai) B. Gel de agarose a 1% de fragmentos obtidos por PCR com primers PALv1978/PARc715 das plantas inoculadas. PCR feita aos 13 dai. MM = Marcador molecular 1Kb plus (Invitrogen). .... 71
- Figura 2.5. Experimento de dupla enxertia usando como porta-enxerto plantas LAM 144S infectadas com ToCMoV, plantas sadias LAM 144S como sobre-enxerto e plantas LAM 144S (2,5,6,7,10 e 11) e LAM 144R (9,12,15,16,18 e 19) como enxerto. Plantas foram analisadas por PCR com primers específicos para o componente A de begomovírus e Southern blot do gel do ensaio da PCR de amostras de folhas apicais do enxerto aos 5, 10 e 15 dias após a enxertia (dape) e do porta-enxerto 5, 10, 15 e 20 dias após a segunda enxertia (dase) (segundo experimento). .... 74
- Figura 2.6. Experimento de dupla enxertia com plantas LAM 144S infectadas com ToCMoV como porta-enxertos. Plantas LAM 144S como sobre-enxerto e A. Plantas LAM 144S e B. LAM 144R, como enxerto. Avaliação realizada 61 dias após da segunda enxertia por tissue blott do caule do porta-enxerto, enxerto e sobre-enxerto. .... 75

**CAPÍTULO 3. AMPLITUDE DA RESISTÊNCIA CONFERIDA PELO GENE TY-1  
PRESENTE NA LINHAGEM LAM 144R À DIFERENTES ESPÉCIES DE  
BEGOMOVIRUS BIPARTIDOS**

Figura 3. Aparelho de biobalística utilizado para a inoculação de plantas com *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV). ..... 91

Figura 3. 1. A-D. Sintomas apresentados por isolinhas de tomateiro resistente (LAM 144R) e suscetível (LAM 144S) inoculadas com *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV via biobalística. LAM 144R aos 21 dias após inoculação (dai) (A) e 41 dai (C). LAM 144S aos 21 dai (B) e 41 dai (D). ..... 97

Figura 3. 2. A-D Sintomas apresentados por isolinhas de tomateiro resistente (LAM 144R) e suscetível (LAM 144S) inoculadas com *Tomato rugose mosaic virus* - ToRMV via biobalística. LAM 144R aos 21 dias após inoculação (dai) (A) e 41 dai (C). LAM 144S aos 21 dai (B) e 41 dai (D). ..... 97

Figura 3. 3. A-D Sintomas apresentados por isolinhas de tomateiro resistente (LAM 144R) e suscetível (LAM 144S) inoculadas com *Tomato severe rugose virus* - ToSRV via biobalística. LAM 144R aos 21 dias após inoculação (dai) (A) e 41 dai (C). LAM 144S aos 21 dai (B) e 41 dai (D). ..... 98

Figura 3.4. A-D Sintomas apresentados por isolinhas de tomateiro resistente (LAM 144R) e suscetível (LAM 144S) *Tomato yellow vein streak virus* - ToYVSV via biobalística. LAM 144R aos 21 dias após inoculação (dai) (A) e 41 dai (C). LAM 144S aos 21 dai (B) e 41 dai (D). ..... 98

Figura 3.5. Análise por Southern blot do acúmulo de DNA-A de *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV em plantas de LAM 144R (resistentes) e LAM 144S (susceptíveis) aos 30 dias após a inoculação. OC: Open circular DNA, SS: single strand DNA. .... 99

Figura 3.6. Análise por Southern blot do acúmulo de DNA-A de *Tomato rugose mosaic virus* - ToRMV em plantas de LAM 144R (resistentes) e LAM 144S (susceptíveis) aos 30 dias após a inoculação. OC: Open circular DNA, SS: single strand DNA ..... 99

Figura 3.7. Análise por Southern blot do acúmulo de DNA-A de *Tomato severe rugose virus* - ToSRV em plantas de LAM 144R (resistentes) e LAM 144S (susceptíveis) aos 30 dias após a inoculação. OC: Open circular DNA, SS: single strand DNA. .... 100

Figura 3. 8. Análise por Southern blot do acúmulo de DNA-A de *Tomato yellow vein streak virus* ToYVSV em plantas de LAM 144R (resistentes) e LAM 144S (susceptíveis) aos 30 dias após a inoculação. OC: Open circular DNA, SS: single strand DNA. .... 100

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1. MARCO REFERENCIAL**

Tabela 1. Relação das espécies de tomate classificadas no gênero *Solanum* (classificação atual) e equivalentes classificados anteriormente no gênero *Lycopersicon*, bem como o modo de reprodução de cada espécie. Extraído e modificado de Peralta *et al* (2006). ..... 15

Tabela 1. 1. Fontes de resistência a espécies de *Begomovirus* do ‘complexo viral TYLCD’, seguindo a antiga nomenclatura do gênero ..... 43

### **CAPÍTULO 3. AMPLITUDE DA RESISTÊNCIA CONFERIDA PELO GENE TY-1 PRESENTE NA LINHAGEM LAM 144R À DIFERENTES ESPÉCIES DE BEGOMOVIRUS BIPARTIDOS**

Tabela 3. Avaliação aos 21 e 41 dias após a inoculação e estudo de acúmulo viral aos 30 dias nas linhagens LAM 144R e LAM 144S frente à infecção com as espécies de *Begomovirus* bipartido: *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV). ..... 96

## RESUMO GERAL

A cultura de tomate no Brasil é uma das mais importantes do ponto de vista econômico e social. Estudos publicados pela FAO em 2011 posicionam o Brasil no oitavo lugar do ranking mundial de produção. O cultivo de tomateiro no Brasil é feito em diferentes estados e durante grande parte dos meses do ano, favorecendo a ocorrência de diferentes doenças de importância econômica, dentre elas, destacam-se aquelas causadas por espécies do gênero *Begomovirus*.

O gênero *Begomovirus* encontra-se composto por espécies com partículas geminadas formadas por dois icosaedros incompletos e ácido nucleico do tipo ssDNA encapsidado em um componente ou dois componentes genômicos (DNA A e B), denominadas de monopartidas ou bipartidas, respectivamente. Até o presente momento no Brasil, em tomateiro, não foram relatadas espécies de begomovírus de genoma monopartido. Espécies de *Begomovirus* são transmitidas com grande eficiência pelo vetor *Bemisia tabaci*.

Para controle das doenças causadas por espécies de *Begomovirus* esforços vêm sendo concentrados no desenvolvimento de materiais elite através da introgressão de genes de resistência, muitas vezes, provenientes de acessos selvagens do gênero *Solanum*. Um exemplo é a linhagem LAM 144R que contém o gene dominante *Ty-1* caracterizado por conferir resistência a diferentes espécies de *Begomovirus*.

Neste trabalho a linhagem LAM 144R foi avaliada com o objetivo de elucidar os mecanismos virais da resistência conferida pelo *Ty-1* e a amplitude da resistência deste gene frente às espécies de *Begomovirus* bipartidos encontrados no Brasil: *Tomato*

*chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV).

A avaliação da replicação viral foi realizada mediante experimentos de agroinfiltração do componente A de ToCMoV na linhagem resistente LAM 144R e na isolinha suscetível LAM 144S. A quantificação da carga viral foi realizada por PCR quantitativa em tempo real (qPCR), usando primers específicos para capa proteica (CP1). Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis. O título viral foi significativamente menor nas plantas da isolinha LAM 144R em comparação com LAM 144S, mostrando uma quantidade duas vezes menor de carga viral na linhagem resistente no décimo dia após a infiltração.

Para avaliar o efeito deste gene no movimento a longa distância de *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) na linhagem LAM 144R duplas enxertias foram realizadas. Plantas LAM 144S (susceptível) foram inoculadas com ToCMoV. Duplas enxertias foram realizadas utilizando como enxerto segmentos de LAM 144R ou LAM144S e como sobre-enxerto, LAM 144S. Amostras foram coletadas em diferentes tempos após as enxertias e a detecção de ToCMoV por PCR e Southern blot mostraram uma restrição no movimento viral a longa distância quando foram usadas as plantas LAM 144R contendo o gene *Ty-1* como enxerto

Para o estudo da amplitude da resistência conferida pelo gene *Ty-1* na linhagem LAM 144R, plantas foram inoculadas via biobalística com DNA das quatro espécies de *Begomovirus* mencionadas acima. Como controle positivo utilizou-se plantas de LAM 144S. As avaliações de sintomas foram realizadas aos 21 e 40 dias após inoculação (dai) e a acumulação viral foi avaliada aos 30 (dai) mediante Southern Blot usando sondas para o componente A de *Begomovirus*. Como resultado as plantas de LAM 144R inoculadas

com ToCMoV apresentaram sintomas leves e baixa acumulação viral. Para ToSRV observou-se ausência de sintomas ou sintomas leves e baixa acumulação viral. Para ToRMV poucas plantas apresentaram sintomas leves e não foi detectada acumulação viral. Para ToYVSV observou-se sintomas leves em algumas plantas, um baixa acumulação viral em cinco delas e uma forte acumulação em duas amostras.

Os resultados encontrados neste estudo demonstram que LAM 144R pode ser considerada promissora para uso em programas de melhoramento no desenvolvimento de diferentes cultivares comerciais.

## GENERAL ABSTRACT

The tomato crop in Brazil is important economically and socially. FAO placed, Brazil in the 8<sup>th</sup> position in the world rank of tomato production. Tomatoes in Brazil are grown in different states and during most months of the year, what favors the appearance of different diseases of economic importance, such as those caused by begomoviruses.

Begomoviruses are transmitted very efficiently by the vector *Bemisia tabaci*. The genome can be either monopartite or bipartite (DNA A and DNA B). So far, only bipartite tomato begomoviruses have been reported in Brazil.

To control diseases caused by begomovirus include the development of elite materials through introgression of resistance genes from wild *Solanum* accessions. An example is the line LAM 144R that contains the dominant gene *Ty-1* which confer resistance to different *Begomovirus* species.

This line LAM 144R was here evaluated in order to elucidate the mechanisms of viral resistance conferred by *Ty-1*. The breadth of this resistance was tested by inoculation with four bipartite *Begomovirus*-species found in Brazil: *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), and *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV). As positive control LAM 144S were used plants. Symptoms were scored at 21 and 40 days after inoculation (dai) and viral accumulation was evaluated at 30 (dai) by Southern blot. As a result LAM 144R mild symptoms and low or no viral accumulation was observed with ToCMoV, ToSRV, ToRMV and ToYVSV.

The evaluation of virus replication was carried out by agronfiltration experiments of ToCMoV DNA-A in the resistance LAM 144R and susceptible LAM 144S isolines. Quantification of the viral load was performed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using primers specific for coat protein (CP1). Data were analyzed by nonparametric Kruskal-Wallis test. The viral titer was significantly lower in plants LAM 144R compared to the isoline LAM 144S, showing 2 times lower viral load in the resistant lineage ten days after agroinfiltration.

To evaluate the effect of this gene on the long-distance movement of *Tomato chlorotic mottel virus* , in near isogening lines LAM 144R and LAM 144S, double grafts were performed. Plants LAM 144S (susceptible) were inoculated with ToCMoV. Double grafts were performed using graft segments of LAM 144R and LAM 144S and as overgraft, LAM 144S plants. Samples were collected at different times after grafting and ToCMoV was detected by PCR, Southern blot, and tissue blott showing a restriction in long-distance viral movement when plants LAM 144R containing the *Ty-1* gene was used as graft.

The results of this study demonstrate that LAM 144R can be considered promising for the use in breeding programs for the development of new resistant cultivars.

The evaluation of virus replication was carried out by agronfiltration of ToCMoV DNA-A in the resistant LAM 144R and susceptible LAM 144S isolines. Quantification of viral load was performed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using primers specific for the coat protein (CP1). Data was analyzed by nonparametric Kruskal-Wallis test. The viral titer was significantly lower in plants LAM

144R compared to the LAM 144S, showing 2 times lower viral load in the resistant line at tenth day after agroinfiltration.

To evaluate the effect of this gene on the long-distance movement of *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) in the near isogenic lines LAM 144R and LAM 144S, double grafts were performed. Plants LAM 144S (susceptible) were inoculated with ToCMoV. Double grafts were performed using as grafts LAM 144R or LAM 144S segments and as overgrafts, LAM 144S plants. Samples were collected at different times ToCMoV was detected by PCR and Southern blot showing a restriction in long-distance viral movement when plants LAM 144R containing the *Ty-1* gene was used as grafts.

The results of this study demonstrate that LAM 144-R can be considered promising for the use in breeding programs for the development of new resistant cultivars to different *Begomovirus* species.

## INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) apresenta grande importância no Brasil e no Mundo. No Brasil, oitavo produtor mundial (FAO 2011), destaca-se a importância sócio-econômica desta olerícola como fonte geradora de empregos e por ser uma cadeia agro-industrial competitiva e eficiente concentrando a maior produção em Goiás, São Paulo e Minas Gerais.

Vários patógenos acometem a cultura, dentre eles merece destaque espécies virais que distribuídas em diferentes gêneros como *Potyvirus*, *Tospovirus*, *Tobamovirus*, *Crinivirus* e *Begomovirus* causam infecções simples ou mistas e conduzem forte e drasticamente para a oneração dos custos da lavoura e na maioria das vezes a grandes perdas. Dentre estas diferentes espécies virais tem crescido nos últimos anos a importância de espécies classificadas no gênero *Begomovirus*.

Espécies de *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) apresentam ssDNA encapsidado em partículas geminadas e podem apresentar um ou dois componentes genômicos (DNA A e B), sendo denominadas monopartidas ou bipartidas, respectivamente. No componente DNA-A encontram-se informações para replicação e encapsidação das partículas virais e no componente DNA-B informações para movimento viral no interior da planta. Até o presente momento no Brasil, em tomateiro, todas as espécies relatadas apresentam genoma bipartido.

No Mundo as epidemias em decorrência de doenças causadas por espécies de *Begomovirus* têm sido apontadas como as principais causas de perdas econômicas em lavouras de tomate. No Brasil o aumento da incidência e severidade das doenças causadas por espécies de *Begomovirus*, bem como aumento na diversidade destas espécies tem sido

atribuído em grande parte à introdução no país do biótipo B do inseto vetor *Bemisia tabaci* na década de 1990.

Ao se alimentar em uma planta infectada, o vetor adquire o vírus. A relação estabelecida entre vírus e inseto vetor é do tipo circulativa não propagativa. Desta maneira, o vírus adquirido, após circular pelo corpo do vetor (sem se replicar), atinge as glândulas salivares para então ser transmitido. Após a entrada do vírus na célula da planta, mediado pelo vetor, para o sucesso de uma infecção viral é preciso que se cumpram os processos de decapsidação, replicação/expressão de genoma e movimento viral no interior da planta.

A replicação de espécies de *Begomovirus* ocorre no núcleo das células companheiras e parenquimáticas que compõem o tecido vascular juntamente com os elementos de tubo crivado e o movimento viral a partir das células inicialmente infectadas é feito via plasmodesmas (movimento a curta distância) e floema (movimento sistêmico).

As barreiras interpostas pelas membranas nuclear e citoplasmática devem ser ultrapassadas para garantir o sucesso da infecção viral. Assim, espécies de *Begomovirus* com genoma bipartido realizam o movimento do DNA dentro da planta com o auxílio de três proteínas, uma delas, codificada pelo componente A (CP – capa proteica) e as outras duas codificadas pelo componente B denominadas proteína de movimento (MP) e a nuclear shuttle protein (NSP).

Atualmente um complexo de espécies de *Begomovirus* bipartidos encontra-se distribuído em diferentes regiões produtoras de tomate no Brasil, dentre elas se encontram *Tomato yellow vein streak virus* (TYVSV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV),

*Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV).

Devido à grande diversidade de espécies de *Begomovirus* existentes no país e as dificuldades inerentes ao sucesso do controle do inseto vetor a opção mais atraente é o desenvolvimento de variedades com atributos de resistência ampla, estável e durável ao vírus e/ou vetor. Esforços vêm sendo concentrados no desenvolvimento de materiais elite através da introgressão de genes de resistência provenientes de acessos selvagens do gênero *Solanum* (*Solanum pimpinellifolium*, *Solanum habrochaites*, *Solanum peruvianum* e *Solanum chilense*) para posterior piramidização de diferentes genes nestes materiais.

Em tomate já foram relatados oito genes de resistência a espécies do gênero *Begomovirus*: *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4*, *Ty-5*, *tcm-1*, *tgr-1* e *ty-5*.

O gene *Ty-1*, introgridido a partir de *Solanum chilense* e mapeado no cromossomo 6, foi o primeiro a ser caracterizado e é um dos mais usados nos programas de melhoramento, conferindo resistência a espécies de *Begomovirus* monopartidos e bipartidos, entretanto para estes a informação é escassa com respeito à caracterização da resistência sobre os processos virais que ocorrem para o desenvolvimento da infecção viral.

Recentemente foram obtidas na Embrapa Hortaliças, linhagens quase isogênicas de tomateiro provenientes do mesmo programa de melhoramento para introgressão do loco *Ty-1*. Estas linhagens foram obtidas por SSD (Single seed descendent ou descendente de uma única semente) sendo denominadas LAM 144R (resistente, *Ty-1/Ty-1*) e LAM 144S (suscetível, *ty-1/ty-1*).

A interferência em uma ou mais etapas do ciclo viral e os mecanismos de resistência envolvendo a interação LAM 144R/begomovírus ainda não foram elucidadas.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivos contribuir para esclarecer os mecanismos de resistência conferida pelo gene *Ty-1* na LAM 144R, bem como avaliar a amplitude da resistência de *Ty-1* nesta linhagem.

## **HIPÓTESES**

A resistência conferida pelo gene *Ty-1* presente na linhagem LAM 144R restringe o movimento e/ou a replicação por um isolado viral de *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV.

A resistência conferida pelo *Ty-1* é uma resistência ampla a espécies de *Begomovirus* bipartidos do Brasil.

## **OBJETIVO GERAL**

Caracterizar e analisar a resistência conferida pelo gene *Ty-1* na linhagem LAM 144R, contra ToCMoV em comparação com sua isolinhagem suscetível LAM 144S e a amplitude da resistência a *Tomato yellow vein streak virus* (TYVSV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV)

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a amplitude da resistência conferida pelo *Ty-1* presente na linhagem resistente LAM 144R
- Estudar alguns dos mecanismos envolvidos na resistência da linhagem LAM 144R ao begomovírus bipartido *Tomato chlorotic mottle virus*.

## **CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1. CULTURA DO TOMATEIRO

O tomate (*Solanum lycopersicum*) pertence à família Solanaceae e tem como centro de origem a zona andina e ilhas Galápagos (Darwin et al., 2003, Peralta et al., 2005), Chile, Peru, Bolívia, Equador e Colômbia (Fontes and Silva, 2002, Esquinas Alcázar and Nuez, 1995). Largamente cultivado e consumido em todo o mundo, o tomate é considerado uma das principais hortaliças tipo fruto entre as olerícolas, podendo ser usado tanto para consumo *in natura* como destinado ao processamento industrial. O cultivo de tomate apresenta uma elevada importância econômica e social no Brasil por ser uma grande fonte de emprego devido à mão de obra que é requerida no processo de cultivo e comercialização (Espinosa, 1991, ABSEM, 2010).

A planta pode apresentar crescimento determinado ou indeterminado atingindo até 2,5 m. A espécie cultivada é uma planta herbácea, enquanto outras ocorrem na forma de moita, sendo assim, para o consumo *in natura*, a planta é cultivada com tutoramento, enquanto que o tomate para consumo industrial é cultivado sem tutoramento e é denominado rasteiro. Em consequência deste tipo de comportamento, variedades de tomate são melhoradas visando o local e a forma de cultivo, além da sua finalidade para o consumo (de Camargo Filho et al., 1994).

A produção de tomate durante o ano é determinada pelas exigências climáticas da cultura, uma vez que o tomateiro é suscetível à geada e não produz bem sob calor intenso, características estas apresentadas também por outras solanáceas e plantas de clima subtropical (do Espírito Santo, 2003, de Camargo Filho et al., 1994). A produção na estação mais quente do ano é realizada nas regiões altas e o cultivo para colheita no inverno e primavera é feito em regiões não sujeitas a geadas. Assim, as características regionais climáticas, sócio-econômicas e a proximidade do mercado determinaram

diferentes épocas de cultivo de tomate por microrregião homogênea (de Camargo Filho et al., 1994).

Em 1753 Linnaeus classificou o tomate no gênero *Solanum*. No ano seguinte, Miller reclassificou o tomate no gênero *Lycopersicum* e Peralta et al. (2005) adotaram a classificação inicial proposta por Linnaeus e consideraram como características para esta re-classificação a possibilidade de cruzamento fácil com *Solanum lycopersicum* e características morfológicas e moleculares que confirmaram que os tomates fazem partir de um grupo próximo as batatas, abrangendo 17 espécies (**Tabela 1**) (Peralta et al., 2005, Peralta et al., 2006).

O Brasil ocupa a oitava posição no ranking mundial da produção de tomate (FAO, 2011), e o seu cultivo é um dos mais importantes no País, destacando-se como o principal produtor o estado de Goiás (maior produtor da região Centro-Oeste) seguido por São Paulo em segundo lugar e Minas Gerais em terceiro lugar (IBGE, 2013). Atualmente são cultivados 60.872 hectares de tomate, com uma produção anual de 3.769.959 toneladas e com uma produtividade média de 61.933 t/ha (IBGE, 2013).

O cultivo do tomateiro em quase todas as regiões brasileiras é realizado praticamente o ano todo propicia condições favoráveis ao desenvolvimento de pragas e patógenos (Inoue-Nagata et al., 2009, Souza and Reis, 2003).

**Tabela 1.** Relação das espécies de tomate classificadas no gênero *Solanum* (classificação atual) e equivalentes classificados anteriormente no gênero *Lycopersicon*, bem como o modo de reprodução de cada espécie. Extraído e modificado de Peralta *et al* (2006).

Nome da espécie	Equivalente em <i>Lycopersicon</i>	Reprodução
<i>Solanum arcanum</i> Peralta	Parte de <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller	Tipicamente autoincompatível, alógama, raramente autocompatível, autógama, alógama facultativa
<i>Solanum cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg	<i>Lycopersicon cheesmaniae</i> L. Riley	Autocompatível, exclusivamente autógama
<i>Solanum chilense</i> (Dunal) Reiche	<i>Lycopersicon chilense</i> Dunal	Autoincompatível, alógama
<i>Solanum chmeilewskii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	<i>Lycopersicon chmeilewskii</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle	Autocompatível, alógama facultativa
<i>Solanum corneliomuelleri</i> J.F. Macbr	Parte de <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller; também conhecida como <i>L. glandulosum</i> C.F. Müll.	Tipicamente autoincompatível, alógama
<i>Solanum galapagense</i> S.C. Darwin & Peralta	Parte de <i>Lycopersicon cheesmaniae</i> L. Riley	Autocompatível, exclusivamente autógama
<i>Solanum habrochaites</i> S. Knapp & D.M. Spooner	<i>Lycopersicon hirsutum</i> Dunal	Tipicamente autoincompatível
<i>Solanum huaylasense</i> Peralta & S. Knapp	Parte de <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller	Tipicamente autoincompatível, alógama
<i>Solanum juglandifolium</i> Dunal	<i>Lycopersicon ochranthum</i> (Dunal) J.M.H. Shaw	Autoincompatível, alógama
<i>Solanum lycopersicoides</i> Dunal	<i>Lycopersicon lycopersicoides</i> (Dunal em D.C.) A. Child ex J.M.H. Shaw	Autoincompatível, alógama

<i>Solanum lycopersicum</i> L.	<i>Lycopersicon esculentum</i> Miller	Autocompatível, autógama, alógama facultativa
<i>Solanum neorickii</i> D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	<i>Lycopersicon parviflorum</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle	Autocompatível, altamente autógama
<i>Solanum ochrantum</i> Dunal	<i>Lycopersicon juglandifolium</i> (Dunal) J.M.H. Shaw	Autoincompatível, alógama
<i>Solanum pennelli</i> Correll	<i>Lycopersicon pennelli</i> (Correll) D'Arcy	Usualmente autoincompatível, algumas autocompatíveis
<i>Solanum peruvianum</i> L.	<i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller	Tipicamente autoincompatíveis, alógama
<i>Solanum pimpinellifolium</i> L.	<i>Lycopersicon</i> <i>pimpinellifolium</i> (L.) Miller	Autocompatíveis, autógama, alógama facultativa
<i>Solanum sitiens</i> I.M. Johnst.	<i>Lycopersicon sitiens</i> (I.M. Johnst.) J.M.H. Shaw	Autoincompatíveis, alógama

## 2. ALGUNS VÍRUS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA INFECTANDO TOMATEIRO NO BRASIL

### 2.1 Gênero *Tospovirus*

Espécies classificadas no gênero *Tospovirus* (família *Bunyaviridae*) são conhecidas por causarem a “spotted wilt”, “peste negra” (Williams et al., 2001) e “vira-cabeça-do-tomateiro” (Silberschmidt, 1937). Na natureza, a transmissão de espécies classificadas no gênero *Tospovirus* é feita por vetores classificados na ordem Thysanoptera (gêneros *Trips* e *Frankliniella*). Espécies de *Tospovirus* também são

transmitidas por inoculação mecânica e não se conhece a transmissão pelas sementes (Wijkamp et al., 1995, Wijkamp and Peters, 1993, Wijkamp et al., 1993).

Espécies de *Tospovirus* apresentam RNA fita simples (ssRNA) caracterizadas por apresentarem um genoma tripartido (denominados L, M e S) cujas extremidades são complementares entre si, formando uma estrutura conhecida como “cabo de panela”(De Haan et al., 1989). O componente L é senso negativo e codifica a polimerase dependente de RNA, enquanto os componentes M e S são ambisenso. O componente M abriga os genes das proteínas NSm (proteína de movimento responsável pelo transporte célula-a-célula) e precursores das glicoproteínas Gc e Gn. O componente S codifica a proteína NSs (supressora do silenciamento gênico) (Takeda et al., 2002) e a proteína N que forma o nucleocapsídeo viral e está envolvida na regulação da transcrição/replicação (Snippe et al., 2007).

No Brasil, já foram identificadas quatro espécies de *Tospovirus* infectado tomate: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (de Ávila et al., 2004, Colariccio et al., 2000, Nagata et al., 1995), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) (Colariccio et al., 2001a, Nagata et al., 1995) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) (de Ávila et al., 2004, Colariccio et al., 2000, Nagata et al., 1995) e, de acordo com Scholthof (2011), TSWV está dentre as dez mais importantes espécies de vírus para a agricultura.

Atualmente, o gênero *Tospovirus* é composto por 23 espécies, sendo oito consideradas como definitivas e quinze delas permanecem ainda como espécies tentativas (Plyusnin et al., 2011). O critério considerado para definir novas espécies refere-se ao índice de 90% de identidade da sequência da proteína do nucleocapsídeo (N), embora

outras características como relação sorológica, sintomatologia, gama de hospedeiras e transmissão, também sejam importantes (Plyusnin et al., 2011).

Para o controle da doença, o desenvolvimento de cultivares resistentes ao vírus é a opção mais promissora. Neste contexto, genes de resistência ao TSWV (dois dominantes: *Sw-1a* e *Sw-1b* e três recessivos: *sw-2*, *sw-3* e *sw-4*) (Finlay, 1953) foram identificados e a resistência conferida por eles já foi superada. Outro gene de resistência foi identificado e denominado *Sw-5* (Stevens et al., 1991, Meshi et al., 1989). Anos mais tarde, pesquisadores reportaram a superação da resistência conferida pelo *Sw-5* em plantas de tomate no nordeste da Espanha (Aramburu and Marti, 2003) e Itália (Ciuffo et al., 2005).

## **2.2 Gênero Potyvirus**

Espécies de *Potyvirus* (família *Potyviridae*) caracterizam-se por apresentarem partículas alongadas e flexuosas (680- 900 x 11-13 nm) e são transmitidas por afídeos, (em uma relação não circulativa não persistente). O genoma viral é do tipo RNA fita simples, sentido positivo que codifica uma poliproteína apresentando uma proteína codificada pelo vírus (VPg) ligada covalentemente à extremidade 5' do genoma viral e uma cauda poli-A na extremidade 3' (Riechmann et al., 1992, Adams et al., 2011a). A poliproteína é clivada por proteínas com função de proteases resultando na liberação das várias proteínas que serão usadas pelo vírus durante o ciclo de infecção viral.

A proteína capsidial (CP) juntamente com HC-Pro estão ligadas ao processo de movimento viral a curta e a longa distância e, também à transmissão de espécies por vetores, os afídeos (Cronin et al., 1995). Além disto, HC-Pro atua suprimindo o mecanismo de silenciamento gênico da planta (Kasschau et al., 2003, Mallory et al.,

2001) e outras proteínas, como NIb, NIa, CI, 6K2, P1, HC e P3 estão relacionadas com a replicação viral.

O gênero *Potyvirus* é considerado o segundo maior gênero de vírus de plantas (em número de espécies), com 175 espécies classificadas das quais 143 espécies são definitivas e 32 são prováveis espécies novas. Espécies de *Potyvirus* são capazes de infectar mais de 2.000 espécies de plantas (Adams et al., 2011a) e encontram-se amplamente distribuídas pelo Mundo.

No Brasil duas espécies de *Potyvirus* já foram descritas infectando tomateiro, *Potato virus Y* (PVY) agente causal da risca do tomateiro (Zerbini and Zambolim, 1999) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (Maciel-Zambolim et al., 2004) que no tomateiro induz principalmente sintoma de mosaico (Dianese et al., 2008).

Como medidas de controle vêm sendo desenvolvidos estudos em busca de cultivares resistentes, como método de controle mais eficiente (Dianese et al., 2008, Lourenção et al., 2005, Juhász et al.). Resistência a PepYMV foi identificada em *S. habrochaites* e *S. peruvianun* (Parrella et al., 2002, Stevens et al., 1991), enquanto resistência simultânea aos dois vírus foi detectada apenas *S. habrochaites*. De acordo com Le Gall et al (2011) esta resistência simultânea pode estar associada ao gene *pot-1* ou um alelo deste gene.

### **2.3 Gênero Tobamovirus**

Espécies do gênero *Tobamovirus* (família *Virgaviridae*) apresentam partículas alongadas e rígidas (300-310 x 18 nm de diâmetro), RNA de fita simples, sentido positivo e genoma com 6.3 kb, que codifica uma única proteína estrutural (17 kDa) e três proteínas não estruturais, duas delas requeridas para a replicação viral e uma terceira para o movimento viral célula-a-célula e a longa distância (Adams et al., 2011b). As espécies

de *Tobamovirus* não possuem vetores, entretanto são transmitidas por sementes, contato mecânico e práticas culturais (Moreira et al., 2003, Lanfermeijer et al., 2005).

No gênero *Tobamovirus* encontram-se classificadas 31 espécies sendo 25 definitivas e 6 tentativas (Adams et al., 2011b). As espécies caracterizam-se por sua elevada produção de partículas virais que localizam-se no citoplasma formando agregados amorfos ou cristalinos (Conti et al., 2001).

Espécies de *Tobamovirus* encontradas infectando tomateiro são o *Tomato mosaic virus* (ToMV) e o *Tobacco mosaic virus* (TMV), sendo esta última, a espécie tipo do gênero. No tomateiro, estes vírus causam frequentemente infecção latente, mas estirpes severas podem induzir mosaico suave alternado com bolhosidades, rugosidades, redução do limbo foliar (também conhecido como cordão de sapato) e epinastia dos folíolos (Fletcher, 1992, Moreira et al., 2003, Lanfermeijer et al., 2005)

O controle baseia-se principalmente no uso de sementes livres de vírus, eliminação de restos de culturas anteriores e cuidados durante operações culturais (Colariccio, 2005).

Em tomate foram reportados os genes *Tm*, *Tm-2* e *Tm-2-2* (provenientes de *S. habrochaites* e *S. peruvianum*) que conferem resistência a ToMV e TMV. Plantas com estes genes, além do uso em programas de melhoramento são utilizadas também para a diferenciação de patótipos virais (Lanfermeijer et al., 2005).

## **2.4 Gênero Crinivirus**

Espécies classificadas no gênero *Crinivirus* apresentam partículas alongadas e flexuosas. *Crinivirus* são os únicos membros da família *Closteroviridae* que apresentam genoma de RNA bipartido (exceção para *Potato yellow vein virus* - PYVV com genoma tripartido) (Klaassen et al., 1995, Livieratos et al., 2004, Martelli et al., 2011)

Dependendo da espécie viral a transmissão pode ser feita por *Bemisia tabaci* e/ou *Trialeurodes vaporariorum*.

Até o presente momento, no gênero *Crinivirus* encontram-se classificadas 14 espécies sendo 12 definitivas e 2 tentativas (Martelli et al., 2011).

No Brasil, o *Tomato chlorosis virus* - ToCV é o único vírus pertencente ao gênero *Crinivirus* relatado na cultura do tomate até o momento (Barbosa et al., 2008). Cada componente genômico encontra-se encapsidado separadamente e ambos são necessários para a infecção (Martelli et al., 2002). O RNA 1 é organizado em quatro “open reading frames” (ORFs) e codifica proteínas envolvidas na replicação incluindo a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). No RNA2 encontram-se as ORFs HSP70h, CP e CPm (King et al., 2011), sendo a CP a encarregada de encapsidar a maior parte do genoma viral, enquanto a CPm está associada a encapsidação do extremo 5' terminal do genoma viral (Wintermantel et al., 2005).

Em estudos desenvolvidos no Brasil, na busca de fontes de resistência para controle de ToCV, resposta de tolerância foi observada na linhagem LAM 148 originada de *S. lycopersicum* (Pereira-Carvalho et al., 2011). Na Espanha, as linhagens 821-13-1 (provenientes de *Solanum lycopersicum* x *Solanum peruvianum* acesso LA 0444) e 802-11-1 (proveniente do acesso LA1028 (*S. chmielewskii*), mostraram uma resistência em condições de infecção natural e condições controladas de inoculação (García-Cano et al., 2010).

### 3. FAMÍLIA GEMINIVIRIDAE

A família *Geminiviridae* está representada segundo o ICTV 2011 por quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, não entanto publicações recentes confirmaram a adição de três gêneros novos dentro da família, denominados *Becurtovirus* (Hernández-Zepeda et al., 2013), *Eragrovirus* e *Turncurtovirus* (Adams et al., 2013) classificados devido às ferramentas moleculares atualmente disponíveis. O ácido nucléico viral é do tipo DNA fita simples, com transcrição bidirecional e sobreposição de ORFs, o que propicia uma maior eficiência em conteúdo de informação genética (Rojas et al., 2005).

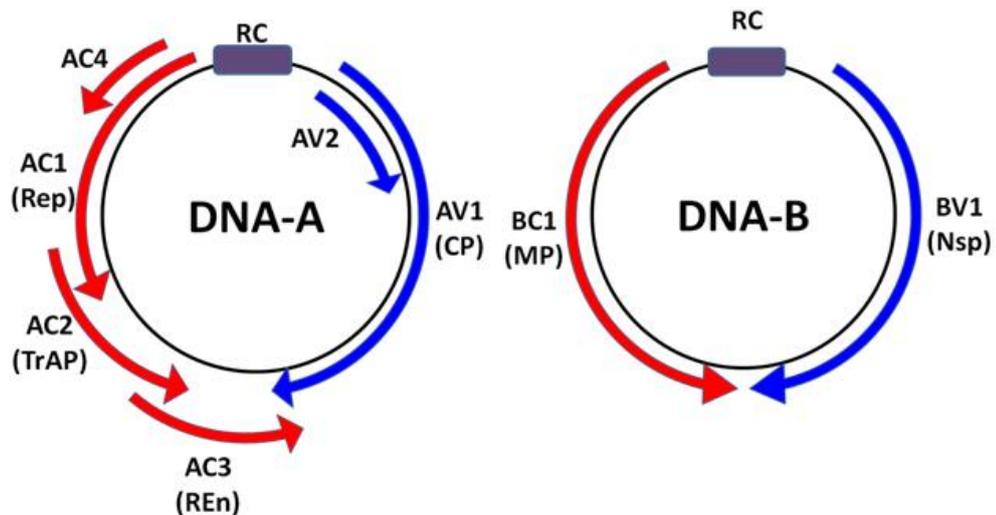
O ácido nucléico é encapsidado em uma partícula geminada formada por dois icosaedros incompletos. Os vírus pertencentes a esta família podem apresentar genoma composto por uma ou duas moléculas de DNA, sendo denominados monopartidos ou bipartidos, respectivamente (Brown et al., 2011). Os membros desta família encontram-se dentro do grupo dos menores vírus conhecidos até agora e sua transmissão é feita por meio de insetos vetores das famílias Aleyrodidae, Ciccadellidae e Membracidae (Briddon and Stanley, 2009, Brown et al., 2011).

#### 3.1 Gêneros da família *Geminiviridae*

Embora 7 gêneros sejam classificados na família *Geminiviridae* (Hernández-Zepeda et al., 2013):(Adams et al., 2013) neste trabalho consideraremos a posição adotada de acordo com o último relatório do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus que apresenta quatro gêneros classificados na família *Geminiviridae*. Estes gêneros são: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, podem ser separados de acordo com características de organização genômica, gama de hospedeiras, inseto vetor e relações filogenéticas (Brown et al., 2011), considerar os outros gêneros aqui também!

Dos quatro gêneros acima listados, apenas espécies classificadas no gênero *Begomovirus* podem apresentar dois componentes genômicos (bipartido) (Figura 1.) e os demais apresentam apenas um componente genômico (monopartido). Todas as espécies virais classificadas nos diferentes gêneros infectam dicotiledôneas. Todos os vetores das espécies classificadas em gêneros de *Geminiviridae* estão classificados na ordem Hemiptera (Brown et al., 2011).

Espécies do gênero *Mastrevirus* são transmitidas por cigarrinhas e infectam basicamente espécies de monocotiledôneas. Neste gênero encontram-se espécies de vírus de importância agrônômica como o *Wheat dwarf virus* (WDV) atingindo a culturas de trigo e o *Maize streak virus* (MSV) a cultura do milho. Espécies classificadas em *Curtovirus* são transmitidas também por cigarrinhas. Dentro deste gênero a principal espécie de importância econômica é *Beet curly top virus* (BCTV), infectando *Beta vulgaris*, *Solanum lycopersicum* e *Solanum tuberosum*. A espécie *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV) é a única representante do gênero *Topocuvirus* e é transmitida por membracídeos (família: Membracidae), enquanto espécies do gênero *Begomovirus* são transmitidas por aleirodídeos (família: Aleyrodidae) (Bridson and Stanley, 2009, Brown et al., 2011).



**Figura 1.** Representação dos componentes do genoma viral de *Begomovirus*, DNA-A e DNA-B. As setas azuis representam as ORFs (“open reading frames”) codificadas no sentido viral e as setas vermelhas as ORFs codificadas no sentido complementar. Os nomes das proteínas codificadas encontram-se dentro de parênteses. No DNA-A, no sentido viral encontram-se os genes: AV1 que corresponde ao gene *cp* e codifica a proteína capsidial (CP) e no sentido complementar encontra-se a AC1 correspondente ao gene da *rep*, a AC2 correspondente ao gene *trap* e AC3 correspondente ao gene *ren* as quais codificam: a proteína associada à replicação (Rep), ativadora da transcrição (TrAP) e a proteína potenciadora da replicação viral (REn), respectivamente. O DNA B possui duas ORFs, uma em sentido viral (BV1) correspondendo ao gene *nsp* que codifica uma proteína que controla o movimento intracelular e outra no sentido complementar (BC1) correspondente ao gene *mp* e que codifica a proteína responsável pelo movimento. A ORF AV2 encontra-se ausente em *Begomovirus* do Novo Mundo. A região comum entre as regiões codantes está representada em roxo. Esquema baseado em Fernandes (2011).

### 3.1.1 Gênero Mastrevirus

**Espécie tipo:** *Maize streak virus*

Espécies de *Mastrevirus* apresentam genoma multipartido, circular, DNA fita simples, com um tamanho aproximado de 2.6 a 2.8 kb codificando dois genes no sentido

complementar: C1 que codifica a RepA e C2 que codifica a Rep e dois no sentido viral: V2 que codifica a proteína de movimento (MP) que atua também como uma proteína de transporte nuclear e V1 que codifica a capa protéica CP (Brown et al., 2011, Fauquet and Stanley, 2005).

Espécies classificadas no gênero *Mastrevirus* codificam duas proteínas de replicação viral a RepA e a Rep, e utilizam *splicing* ou clivagem transcricional. As proteínas codificadas a partir do mRNA clivado, codificadas por C1 e C2 estão envolvidas na replicação viral e codificam uma proteína iniciadora da replicação. O genoma apresenta a região intergênica denominada neste caso região intergênica maior (LIR) e uma região intergênica menor (SIR) (Brown et al., 2011, Wright et al., 1997).

A porcentagem de identidade para a separação de espécies no gênero *Mastrevirus* é de 75% da sequência nucleotídica do genoma completo, entretanto existem estudos que propõem uma nova porcentagem de identidade para a classificação de isolados e espécies (Brown et al., 2011, Muhire et al., 2013).

Até o presente momento 21 espécies fazem parte deste gênero, sendo 14 espécies definitivas e 7 tentativas (Brown et al., 2011).

Espécies classificadas no gênero apresentam uma gama de hospedeiras restrita limitada a membros da família *Poaceae* (monocotiledôneas) com apenas três exceções: *Tobacco yellow dwarf virus* (TbYDV), *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV) e a espécie tentativa *Chickpea chlorotic dwarf virus* (CpCDV) que infectam algumas espécies das famílias *Solanaceae* e *Fabaceae* (Brown et al., 2011, Palmer and Rybicki, 1998).

A transmissão de *Mastrevirus* na natureza é feita por cigarrinhas como *Cicadulina mbila* (Ordem: Hemiptera e família Cicadellidae) e a relação estabelecida

entre inseto e vírus é do tipo circulativa não propagativa. Normalmente as espécies não são transmitidas por inoculação mecânica (Brown et al., 2011).

### 3.1.2 Gênero *Curtovirus*

#### **Espécie tipo: *Beet curly top virus* (BCTV)**

Os vírus pertencentes a este gênero caracterizam-se pelo genoma monopartido com um tamanho de 2,9 a 3,0 kb. *Curtovirus* infectam uma ampla variedade de plantas dicotiledôneas. O genoma é composto por seis ou sete “open reading frames” ORFs, sendo três no sentido viral: V1 que codifica a CP responsável pela encapsidação, proteção, movimento viral e transmissão pelo vetor; V2 que codifica a proteína de movimento (MP) e V3 envolvida na regulação dos níveis de ssDNA e dsDNA. No sentido complementar encontram-se quatro ORFs: C1 que codifica a proteína associada à replicação (Rep), requerida para o início da replicação; C2 que atua como fator de patogenicidade em alguns hospedeiros; C3 que codifica a proteína potencializadora da replicação (Ren - replication enhancer protein) e que pode estar ausente em algumas espécies como em *Horseradish curly top virus* (HrCTV) e C4, uma importante proteína, relacionada com a determinação da sintomatologia e também participa na regulação do ciclo celular da hospedeira (Brown et al., 2011, Briddon and Markham, 2001, Stenger, 2002)

A porcentagem de identidade dentro deste gênero para a separação de espécies é de 89% de identidade da sequência completa de nucleotídeos de acordo com ICTV (2011). Até o presente momento oito espécies foram classificadas em *Curtovirus*, sendo sete espécies definitivas e uma tentativa (Brown et al., 2011).

A gama de hospedeiras é bastante ampla entre as dicotiledôneas e a espécie tipo infecta aproximadamente 300 espécies distribuídas em 44 famílias botânicas. Sua

transmissão é feita por cigarrinhas como *Circulifer tenellus* (ordem: Hemiptera e família Cicadellidae) e a relação estabelecida entre vírus e vetor é do tipo circulativa e não propagativa (Brown et al., 2011, Chen, 2008, Soto and Gilbertson, 2003).

### **3.1.3 Gênero Topocuvirus**

**Espécie tipo:** *Tomato pseudo-curly top virus*.

Este gênero é monotípico e o genoma do *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV) encontra-se constituído por um único componente de DNA circular, de 2,8 kb. O genoma, que codifica seis proteínas assemelha-se ao genoma de *Begomovirus* monopartidos. A capa proteica é mais estreitamente relacionada com os membros do gênero *Curtovirus* que são transmitidos por cigarrinha (Brown et al., 2011).

A gama de hospedeiras de TPCTV encontra-se restrita a espécies de dicotiledôneas, incluindo ervas daninhas como *Solanum nigrum*, *Datura stramonium* e *Stellaria media*, além de plantas cultivadas como o tomate e o feijão (*Phaseolus vulgaris*). Na natureza a transmissão viral é realizada através do membracídeo *Micrutalis malleifera* (ordem: Hemiptera e família: Membracidae) (Brown et al., 2011).

## **4. GÊNERO Begomovirus**

**Espécie tipo:** *Bean golden yellow mosaic virus*

O gênero *Begomovirus* é considerado o maior e um dos mais importantes gêneros de vírus de plantas. O gênero abriga espécies com genoma monopartido distribuídas no “Velho Mundo”(Brown et al., 2011) com uma única exceção no “Novo Mundo”, o *Sweet potato leaf curly virus* (SPLCV) reportada recentemente infectando plantas de batata no Brasil (São Paulo- SP, Rio Grande do Sul-RS, Pernambuco-PE e Paraíba- PB) e também em outros países além do Peru (Albuquerque et al., 2011, Fuentes

and Salazar, 2003, Paprotka et al., 2010). No Brasil até o presente momento infectando tomate foram encontradas apenas espécies de *Begomovirus* bipartidos (que apresentam uma ampla distribuição tanto no hemisfério oriental como ocidental) (Brown et al., 2011, Inoue-Nagata et al., 2004).

Na natureza a transmissão é feita para plantas dicotiledôneas por meio de insetos aleirodídeos popularmente conhecidos como mosca-branca, cuja espécie é *Bemisia tabaci* (ordem: Hemiptera e família Aleyrodidae). A relação estabelecida entre vírus e inseto vetor é do tipo circulativa não propagativa (Brown et al., 2011).

No Brasil, o primeiro relato de begomovírus em tomateiro foi feito ainda na década de 1960 (Costa, 1975, Flores et al., 1960), sendo denominado *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Maytis et al., 1975). Este vírus não apresentou maior importância para o cultivo de tomate na época e somente em 1998 foi novamente relatado, porém em cultivos no Rio de Janeiro (Alfenas et al., 1998).

A partir da década de 90 observou-se um aumento na incidência e severidade das doenças causadas por begomovírus, inicialmente no estado de São Paulo, sendo este aumento atribuído ao incremento populacional de *Bemisia tabaci* biótipo B (Lourenção and Nagai, 1994), que entrou no Brasil provavelmente no início desta década e se disseminou rapidamente em várias regiões do país incluindo áreas importantes de produção de tomate (Lourenção and Nagai, 1994, Melo, 1992). O biótipo B apresenta diferenças quando comparado ao biótipo que prevalecia anteriormente no Brasil, o biótipo A. O biótipo B é muito mais polífago, além de apresentar maior fecundidade e capacidade de dispersão, devido ao alto grau de adaptabilidade que apresenta (De Barro, 1995, Brown, 2007, Costa, 1975). Devido a este aumento na incidência e severidade das doenças causadas por espécies de *Begomovirus*, bem como o relato de novas espécies a

partir de 1994, esforços têm sido concentrados em estudos de identificação e diversidade de espécies de *Begomovirus* na cultura de tomate no país.

Várias espécies de *Begomovirus* têm sido reportadas em tomate no Distrito Federal, dentre elas podem ser citadas: Tomato golden vein virus (TGVV) (Ferreira et al., 2007), Tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV) (Franco et al., 2007), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), Tomato chlorotic vein virus (ToCVV) e Okra mottle virus (OMoV) (Fernandes, 2010).

Em estados da região Nordeste já foram relatadas as espécies ToCMoV, *Tomato golden mottle virus* (ToGMoV), ToMoLCV, ToSRV e *Tomato golden mosaic virus* (Ribeiro et al., 2003; Fernandes 2010).

Em levantamentos realizados em plantios no Sudeste do país, foram encontrados ToCMoV, ToYVSV e ToRMV (Colariccio et al., 2001b, Faria et al., 1997, Souza-Dias et al., 1996, Ambrozevicius et al., 2002). Para a mesma região, Fernandes (2010) reportou o ToRMV, ToSRV, ToYVSV, OMoV, *Sida mottle virus* (SiMoV), Tomato leaf distortion virus (ToLDV), *Tomato golden mottle virus*, Euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), Tomato common mosaic virus (ToCMV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (Andrade et al., 2007, Calegario et al., 2007).

De acordo com ICTV (2011) até o presente momento 276 espécies fazem parte deste gênero, sendo 190 espécies definitivas e 86 tentativas (Brown et al., 2011).

#### **4.1 Organização genômica dos vírus classificados no gênero *Begomovirus***

O genoma da maioria dos begomovirus é bipartido e os componentes genômicos (DNA A e DNA B) são encapsidados separadamente por uma única proteína estrutural e

as partículas são formadas por dois icosaedros incompletos com cerca de 18-30 nm (Brown et al., 2011, Lazarowitz and Shepherd, 1992). O tamanho dos componentes varia de 2,5 – 2,8 kb, não havendo identidade de sequências, exceto por uma região comum (RC) de aproximadamente 200pb de onde divergem os genes em ambos sentidos (viral e complementar). Em uma mesma espécie a identidade da RC encontra-entre 77% e 100%, porém esta região é divergente entre vírus de diferentes espécies (Ribeiro et al., 2003).

Dentro da região comum encontram-se sequências essenciais que atuam como pontos de reconhecimento de processos comuns para ambos os genomas como a replicação, início da transcrição e encapsidação viral (Lazarowitz and Shepherd, 1992). Uma característica notável na região intergênica é uma repetição invertida conservada que é capaz de formar um grampo que deixa exposto uma sequência de nove nucleotídeos TAATATTAC (identificada como o ponto de iniciação da replicação e onde ocorre o corte do DNA durante o mesmo processo) (Bridson and Stanley, 2009, Heyraud et al., 1993a, Heyraud et al., 1993b).

Alguns begomovírus monopartidos têm um ou mais tipos de moléculas satélites que são pequenas moléculas de ssDNA com aproximadamente a metade do tamanho da molécula viral e encontram-se divididas em dois grupos, os  $\alpha$ -satélites e os  $\beta$ -satelites (Bridson and Stanley, 2006 ). Satélites do tipo  $\alpha$ -satelites não contém sequências virais, com a exceção da região intergênica não codificante que é requerida para a replicação. Os  $\beta$ -satelites são amplamente diversos e apresentam uma estrutura conservada que codifica um produto conhecido como  $\beta$ C1, o qual é determinante da patogenicidade, atua como supressor de SGPT (Silenciamento gênico pós-transcricional), e possivelmente encontra-se envolvido no movimento viral (Bridson and Stanley, 2006 , Cui et al., 2005, Saunders et al., 2004 ). Ainda não se sabe com muita clareza o papel destes satélites, porém alguns

estudos têm relacionado estes satélites com a modulação da virulência pela supressão do silenciamento gênico da planta hospedeira, auxiliando assim espécies virais que não conseguem contrapor o sistema de defesa da planta hospedeira (Brown et al., 2011, Rojas et al., 2005).

#### **4.1.1 Organização genômica do DNA-A: genes, produtos gênicos, estrutura e função**

O componente A ou DNA-A de begomovírus pode conter de 5 a 6 “open reading frames” (ORFs) codificando proteínas essenciais para os processos de replicação, transcrição e encapsidação viral (**Figura1**). No sentido viral encontram-se duas ORFs: AV1 e AV2 (ausente nos begomovírus do Novo Mundo e que tem sido relacionada com o movimento viral) e no sentido complementar encontram-se quatro ORFs que são AC1, AC2, AC3, AC4 (Brown et al., 2011, Ha et al., 2008).

AV1 codifica proteína capsidial (CP), com funções de proteção da informação genética viral, direcionamento nuclear e exportação nuclear de DNA. Em espécies de *Begomovirus* monopartidos trabalhos evidenciam que a capa proteica encarrega-se de mediar o movimento sistêmico viral na planta e com os níveis de acumulação de ssDNA nas células da hospedeira (Harrison et al., 2002, Azzam et al., 1994, Briddon et al., 1990, Höfer et al., 1997). Além disto, a CP é necessária também para a transmissão e especificidade do vírus pelo vetor *Bemisia tabaci* (Briddon et al., 1990, Höfer et al., 1997) e no processo circulativo pela hemolinfa através das paredes do intestino do inseto vetor (Morin et al., 2000, Morin et al., 1999). A CP se liga a proteínas (homólogas a GroEL) produzidas por endossimbiontes e que tem como função proteger as partículas virais da degradação (Morin et al., 2000, Morin et al., 1999).

O gene AV2 (“pre-coat”) está presente apenas nos *Begomovirus* do “Velho Mundo”, e atua no movimento do vírus na planta (Padidam et al., 1996).

No sentido complementar quatro genes são transcritos. O primeiro deles corresponde a ORF AC1 (gene *rep*) que codifica a proteína Rep. A replicação dos *Begomovirus*, realiza-se por meio do mecanismo de amplificação em círculo rolante (ACR), estritamente dependente da proteína Rep. A Rep não é uma proteína homóloga à nenhuma enzima polimerase conhecida. O vírus necessita da enzima polimerase do hospedeiro para a síntese de DNA (Koonin and Ilyina, 1992). A função da Rep consiste em se ligar ao interon de iniciação da replicação viral (sequência TAATATT | AC) presente na região comum, e cortar uma das fitas de DNA, iniciando o processo (Laufs et al., 1995). Outra função importante da Rep consiste na autoregulação, visto que ela reprime sua própria síntese em nível transcricional e atua como reguladora pós-transcricional de genes de expressão tardia (Sunter et al., 1993, Laufs et al., 1995, Gafni and Epel, 2002).

Dentro da proteína Rep foram identificados alguns motivos ou regiões conservadas denominados de I, GSP, II e III. O motivo I (LFTY) é indispensável para que ocorra a ligação específica ao dsDNA (DNA de fita dupla). O motif II (HLH) encarrega-se de coordenar os íons metálicos que podem estar envolvidos na conformação da proteína e conformação da proteína e da clivagem do DNA. O motif GSP, descoberto recentemente, encontra-se relacionado com o desenvolvimento da infecção. O GRS encontra-se localizado entre o motif I e III. O motif III (YxxxKD/E) é um ponto catalítico que contém triosina para a realização da clivagem do DNA, no resíduo hidroxila e encontra-se formando um enlace covalente com o grupo fosforil da extremidade 5' da cadeia clivada de DNA (Nash et al., 2011, Gutierrez, 1999, Orozco and Hanley-Bowdoin, 1998). Estudos recentes mostram que a Rep interfere na maquinaria de metilação do

DNA da planta suprimindo o sistema de silenciamento gênico transcricional. (Rodríguez-Negrete et al., 2013)

A proteína TrAp (Transcriptional Activator Protein) AL2 ou AC2, de aproximadamente 15kDa tem como função transativar a expressão dos genes AV1 (que codifica a proteína de movimento CP) e BV1 (que codifica a “nuclear shuttle nprotein” proteína de movimento nuclear NSP) (Hormuzdi and Bisaro, 1995, Gutierrez, 1999, Sunter and Bisaro, 1991).

A proteína REn (Replication enhancer) de aproximadamente 16kDa, contida na ORF AC3, é considerada como um fator potencializador da replicação viral. Apesar de não ser indispensável para que a replicação ocorra, alguns estudos têm demonstrado que a mutação neste gene conduz a uma menor acumulação viral nas plantas infectadas (Sunter et al., 1990, Stanley et al., 1992, Castillo et al., 2003).

#### **4.1.2 Organização genômica do DNA-B: genes, produtos gênicos, estrutura e função**

O componente B dos begomovírus apresenta duas ORFs: BV1 e BC1 que codificam proteínas relacionadas ao movimento do vírus no interior da planta. As proteínas codificadas por estas ORFs atuam de maneira coordenada para facilitar o movimento viral de célula a célula e dentro da célula (do núcleo para o citoplasma) (Noueiry et al., 1994, Sanderfoot and Lazarowitz, 1995, Frischmuth et al., 2007).

A BV1 é transcrita no sentido viral e corresponde ao gene que codifica a proteína NSP “nuclear shuttle protein” encarregada de transportar moléculas de ssDNA e dsDNA viral do núcleo até o citoplasma. A BC1 transcrita no sentido complementar codifica a proteína de movimento MP encarregada do transportar de ssDNA ou dsDNA

célula a célula através do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (Noueiry et al., 1994, Sanderfoot et al., 1996, Ward and Lazarowitz, 1999, Frischmuth et al., 2007).

#### **4.2 Transmissão natural dos *Begomovirus***

Um dos critérios para a classificação dos gêneros dentro da família *Geminiviridae* refere-se ao inseto vetor.

Espécies de *Begomovirus* são transmitidas por *Bemisia tabaci* que encontra-se classificada em diferentes biótipos, os quais foram denominados com letras, baseando-se em análises morfológicas, estudos de gama de hospedeiras, adaptabilidade à-hospedeira, indução de reações fitotóxicas, resistência a inseticidas, padrões de banda e análises de RAPD-PCR e AFLP (Cervera et al., 2000, De Barro et al., 2005, De Barro et al., 2000), no entanto estudos recentes afirmam que o *Bemisia tabaci* é um complexo grupo composto por 11 grupos de alto nível bem definidos que contém pelo menos 24 espécies morfológicamente indistinguíveis (De Barro et al., 2011).

As culturas afetadas por espécies de *Begomovirus* encontram-se distribuídas em regiões de clima tropical, subtropical, e mediterrâneo e compreendem culturas importantes como mandioca (*Manihot esculenta*) (Serubombwe et al., 2008), algodão (*Gossypium* spp) (Chowda Reddy et al., 2005), feijão caupi (*Vigna unguiculata*) (Rouhibakhsh and Malathi, 2005), cucurbitáceas, crucíferas, tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Morán et al., 2006), tomate (*Solanum lycopersicum*) (Albuquerque et al., 2004), batata (*Solanum tuberosum*) (Robert et al., 1986), dentre outras.

No Brasil umas das culturas mais importantes afetadas pelas doenças causadas por espécies de *Begomovirus* é a cultura do tomate. A partir da década de 90 um aumento na incidência e severidade das doenças causadas por *Begomovirus* foi observado. Tal fato coincidiu com a introdução no país do biótipo B de *Bemisia tabaci* (Lourenção and

Nagai, 1994, Melo, 1992). De acordo com De (De Barro, 1995, Jones, 2003) e a disseminação de espécies virais em áreas onde antes não eram reportadas, deve-se à ampla gama de hospedeiros deste biótipo do vetor.

*Bemisia tabaci* alimentam-se no estágio de ninfa e fase adulta pela inserção de seu estilete dentro da folha penetrando no floema e retirando a seiva elaborada onde encontram-se as partículas virais. Desta forma o vírus é adquirido pelo inseto vetor. As partículas são levadas do intestino médio e são distribuídas na hemolinfa e posteriormente atingem as glândulas salivares o que foi catalogado como uma relação circulativa (Ohnesorge and Bejarano, 2009, Morin et al., 2000, Markham et al., 2006, Zeidan and Czosnek, 1994, De Barro, 1995).

Estudos realizados com afídeos, *Potato leafroll virus* e *Buchnera* apontaram a importância deste endossimbionte na transmissão de vírus (Ishikawa, 1984). Proteínas homólogas a GroEL produzida pela bactéria endossimbionte (*Buchnera*) de afídeo, também são produzidas por endossimbiontes de *Bemisia tabaci*. Estas proteínas têm afinidade pela capa protéica viral e atuam protegendo as partículas virais da degradação na hemolinfa do inseto (Morin et al., 2000, Morin et al., 1999). Todas as espécies de mosca-branca abrigam o endossimbionte primário *Candidatus* “*Portiera aleyrodidarum*” (Thao and Baumann, 2004). Vários endossimbiontes são reportados em populações de *Bemisia tabaci* ao redor do mundo incluindo *Candidatus* ‘*Hamiltonella defense*’ (Enterobacteriaceae); *Wolbachia*, *Arsenophonus*, *Cardinium* (Bacteroidetes); *Fritschea bemisiae* (Simkaniaceae) e *Rickettsia* (Baumann, 2005, Gottlieb et al., 2006, Li et al., 2007, Nirgianaki et al., 2003, Thao and Baumann, 2004, Weeks and Breyer, 2003). Endossimbiontes apresentam uma variedade de efeitos nas suas hospedeiras como por

exemplo *Hamiltonella* aumenta a eficiência de *Bemisia tabaci* como vetora de vírus (Gottlieb et al., 2010).

### **4.3 Replicação dos *Begomovirus* na planta hospedeira**

A habilidade de replicar seu ácido nucléico em altos níveis em células que normalmente tem restritas limitações na produção de novas moléculas de ácido nucléico é uma das características importante dos vírus.

Espécies de *Begomovirus* possuem genomas pequenos que codificam poucas proteínas, porém o ciclo de replicação é realizado usando na sua maioria as proteínas de replicação de DNA da hospedeira. A estratégia usada pelos *Begomovirus* para sua replicação pode-se dividir em diferentes estádios (**Figura 1.1**).

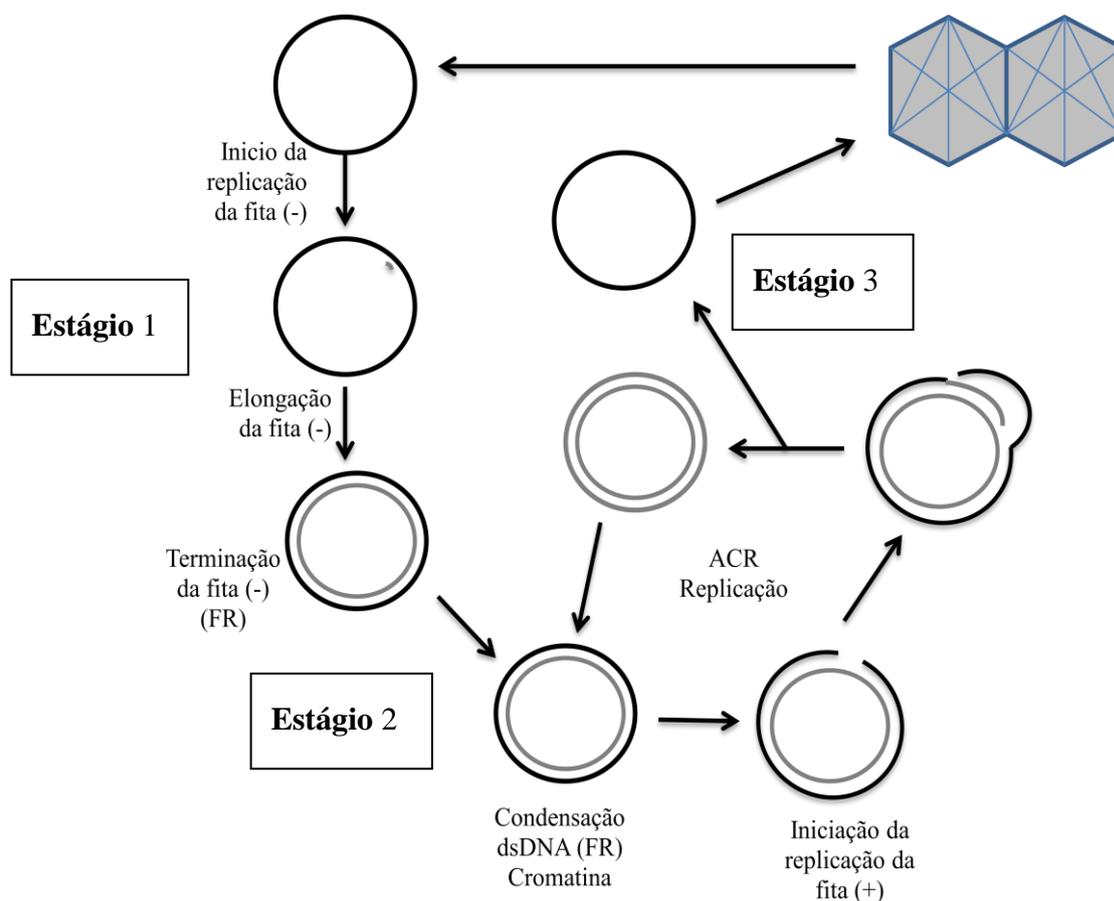
O primeiro estágio é a síntese de um DNA de fita dupla (dsDNA) a partir do DNA de fita simples (ssDNA). Esta fita dupla de DNA é conhecida como a forma replicativa (RF) e é uma forma intermediária, que posteriormente, servirá como molde para a transcrição viral e para a elaboração de novas fitas de DNA fita simples pelo mecanismo de amplificação em círculo rolante (ACR) (Gutierrez, 1999, Bisaro, 1996). Para dar início ao processo, a Rep se liga a uma sequência específica na região comum (Orozco and Hanley-Bowdoin, 1998) que é constituída por duas sequências repetidas denominadas “iterons”. Após a ligação da Rep e o estabelecimento do complexo Rep, Rep e os fatores da hospedeira, a Rep cliva a cadeia de ssDNA dando o início a replicação (Gutierrez, 2000, Koonin and Ilyina, 1992). A Rep se liga ao DNA por meio de uma ligação fosfodiéster no terminal 5', enquanto que o terminal 3'-OH é usado como um iniciador para a síntese de uma nova fita de DNA. A Rep caracteriza-se ainda por ter

uma atividade de “Nicking-Closing” similar as topoisomerasas (Bisaro, 1996). A síntese de DNA é realizada por proteínas de replicação da hospedeira.

O segundo estágio da replicação pelo mecanismo ACR consiste na geração adicional de dsDNA circular. Este estágio é iniciado pela Rep que tem como função cortar a fita dupla de DNA em uma sequência específica, seguido pelo corte da ligação fosfodiéster (**Figura 1.2**). A extremidade 3'-OH é usada como um primer para a síntese de uma nova fita “plus” (fita a partir da qual serão codificadas as ORFs no sentido viral podendo ser ssDNA ou dsDNA ) desde uma fita “minus” (fita a partir da qual serão codificadas as ORFs no sentido complementar, encontrada apenas em dsDNA. No início do ciclo de replicação, o ssDNA circularizado é usado como molde para a síntese de DNA complementar ou fita negativa, resultando na amplificação de RF (Bisaro, 1996, Gutierrez, 1999).

O terceiro estágio é a síntese de ssDNA a partir de dsDNA que acontece no final do ciclo de replicação e é responsável pela acumulação de genomas virais para a encapsidação (Fontes et al., 1994, Bisaro, 1996, Gutierrez, 1999).

A transcrição viral de proteínas ocorre a partir da forma intermediária de dsDNA, bem como para a replicação viral adicional (Gutierrez, 1999, Hanley-Bowdoin et al., 1990).



**Figura 1. 1.** Ilustração do ciclo replicativo de espécies da família *Geminiviridae*, dividida em três estágios. Estágio 1: conversão de ssDNA em um covalente circular de forma replicativa (FR) ou dsDNA. Estágio 2: replicação pelo mecanismo de amplificação em círculo rolante para a geração de FR. Estágio 3: produção de ssDNA para encapsidação. Baseado em Gutierrez (1999).

#### 4.4 Movimento viral

A máxima expressão da infecção viral em uma planta hospedeira suscetível ao vírus depende do transporte viral no interior da planta. A partir da célula inicialmente infectada, existem duas formas de transporte viral conhecidas: movimento a curta distância de célula-a-célula (via plasmodesma) e a longa distância via sistema vascular da planta (Carrington et al., 1996, Vuorinen et al., 2011).

Espécies de *Begomovirus* bipartidos realizam o movimento do DNA dentro da planta por meio de três proteínas, uma delas, codificada pelo componente A (CP) e as

outras duas codificadas pelo componente B (**Figura 1**) denominadas proteína de movimento (MP) e a nuclear shuttle protein (NSP) (Hehnle et al., 2004). Em begomovírus monopartidos a CP é essencial para a dispersão viral, no entanto em begomovírus bipartidos, a CP não é necessária para o movimento sistêmico viral, tendo em vista, que a sua função pode ser exercida pela NSP, entretanto, em estudos onde a NSP sofreu mutações, a CP pode auxiliar no movimento sistêmico viral (Gafni and Epel, 2002, Guevara-González et al., 1999, Ward et al., 1997).

#### **4.4.1 Movimento a curta distância (intra e intercelular)**

A replicação de vírus da família *Geminiviridae* é realizada no núcleo da célula, entretanto estes vírus precisam superar duas fronteiras para conseguir atingir toda a planta: a membrana nuclear e a membrana citoplasmática. Para superar estas barreiras, membros da família *Geminiviridae* contam com duas proteínas importantes codificadas a partir de seus dois componentes genômicos: a CP (onde já foram identificados sinais de localização celular que interagem com importinas  $\alpha$  para a importação da partícula viral pelos poros nucleares) e a NSP que é o veículo de transporte do núcleo para o citoplasma (Guerra-Peraza et al., 2005, Hallan and Gafni, 2001, Kunik et al., 2002, Sanderfoot et al., 1996). Cada proteína tem a capacidade de ligar-se ao ssDNA e/ou dsDNA de modo sequência-independente (Lazarowitz and Beachy, 1999).

O movimento de vírus bipartidos é independente da CP (em algumas hospedeiras) indicando que o movimento pode realizar-se entre as células em forma de ácido nucléico (Niehl and Heinlein, 2011).

Estudos realizados demonstraram que a MP presente nos begomovírus bipartidos se liga a DNA, mas não a RNA e o tipo de ligação é dependente da forma em que se encontra o DNA (ssDNA ou dsDNA) e do tamanho da molécula. Acredita-se que uma

interação entre a MP e a NSP seja necessária para fazer a transferência do DNA que se encontra formando um complexo com o NSP depois de sair do núcleo, complexo este, que é movimentado através dos plasmodesmas (Sanderfoot and Lazarowitz, 1996, Noueiry et al., 1994). Estudo desenvolvido com o begomovírus *Squash leaf curl virus* (SqLCV) em abóbora mostrou a localização da MP em estruturas especializadas tubulares derivadas do retículo endoplasmático (RE). Estas estruturas tubulares encontram-se atravessando os plasmodesmas, o que sugere a participação da MP na alteração da estrutura do plasmodesma e o movimento viral através deles (Ward et al., 1997).

A interação de NSP e MP, dependendo do vírus de estudo, pode formar complexo com dsDNA ou ssDNA e além disto a interação de MP pode realizar-se apenas com o DNA ou com o complexo DNA-NSP (Niehl and Heinlein, 2011, Gilbertson et al., 2003, Noueiry et al., 1994).

#### **4.4.2 Movimento a longa distância**

A replicação da maioria dos begomovirus é realizada em células companheiras e células parenquimáticas do floema que se encontram adjacentes aos elementos de tubo crivado. Embora a interface celular entre os componentes dos vasos constituam o principal obstáculo no bloqueio da entrada dos vírus nos elementos de tubo crivado e interfira na mobilidade viral a longa distância. Os vírus contam com mecanismos que permitem superar este tipo de barreira (Sanderfoot and Lazarowitz, 1996, Vuorinen et al., 2011).

Carboidratos elaborados nas células do mesófilo são transportados por meio dos elementos de tubos crivados para outras partes onde são usados para o crescimento e desenvolvimento da planta. O movimento dos fotoassimilados é feito a partir dos tecidos denominados fonte de fotoassimilados, que são as partes desenvolvidas e

fisiologicamente mais “velhas” e que geram este tipo de produtos por meio da fotossíntese, até as partes mais novas denominadas dreno. As folhas receptoras que se encontram em processo de desenvolvimento e que ainda não podem gerar os produtos fotoassimilados, possuem plasmodesmas mais dilatados em comparação com os plasmodesmas de folhas já desenvolvidas na sua totalidade. O destino final dos fotoassimilados também define a direção para onde serem transportados os vírus (Turgeon, 1989, Crawford and Zambryski, 2001).

Poucos plasmodesmas conectam as células do parênquima vascular com o complexo formado entre as células companheiras e os elementos de tubo crivados, proporcionando uma rota simplástica para o carregamento de carboidratos nos elementos de tubo crivado. A rota simplástica é normalmente usada para o carregamento de macromoléculas, tais como partículas virais para floema em muitos tipos de plantas (Davidson et al., 2011, Vuorinen et al., 2011).

#### **4.5 Genes de Resistência a *Begomovirus* no Tomate**

Devido à diversidade de espécies de *Begomovirus* infectando tomateiros e as desvantagens apresentadas pelo controle do inseto vetor, a melhor opção para o controle desses patógenos tem sido o uso de cultivares resistentes. Dessa forma, as principais estratégias do melhoramento têm sido a busca de fontes com amplo espectro de resistência e/ou a ‘piramidização’ de diferentes genes de resistência em linhagens elite. Várias fontes de resistência a *Begomovirus* já foram identificadas em espécies selvagens do gênero *Solanum* (Ferreira et al., 1999, Giordano et al., 1998, Pilowsky and Cohen, 2000, Santana et al., 2001a), dentro das quais foram identificados vários genes, os quais podem ser introgrididos em cultivares comerciais.

Os genes de resistência *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4*, *Ty-5*, *tcm-1* e *tgr-1* são genes/'loci' que já foram identificados e podem ser empregados em programas de melhoramento para resistência a *Begomovirus* (**Tabela 1.1**).

**Tabela 1. 1.** Fontes de resistência a espécies de *Begomovirus* do ‘complexo viral TYLCD’, seguindo a antiga nomenclatura do gênero

Espécie	Acesso	Modo de Herança	Referência
<i>Lycopersicon chilense</i>	LA 1969	Monogênica. Dominância parcial (gene <i>Ty-1</i> )	(Czosnek et al., 1993, Kunik et al., 1994, Zakay et al., 1991, Zamir et al., 1994)
	LA 1938		(Yassin et al., 1989)
	LA 1959		
	LA1960		
	LA1961		
	LA 1963		
	LA 1968		
	LA 2762		
	LA 2774		
	LA 2779		
	LA 1932		
	<i>Ty-3</i> e <i>Ty-4</i>	(Ji et al., 2007, Ji and Scott,	

			2006, Pietersen and Smith, 2002)
	LA 1971	-	(Pico et al., 1999)
	LA 2884	-	
	FLA653	<i>tgr-1</i>	(Bian et al., 2007)
<i>Lycopersicon peruvianum</i>	LA 452	-	(Kasrawi et al., 1988)
	LA 462	-	
	LA 1333	-	
	LA 1373	-	
	LA 1274	-	
	f. humifusum LA 385	-	
	PI-126935	Poligênica (5 genes). Recessiva	(Pilowsky and Cohen, 1990)
	3407	-	(Hassan et al., 1982)
	78-1556	-	(Kasrawi et al., 1988)
	81-2274	-	
PI-127831	-	(Zamir et al., 1994)	

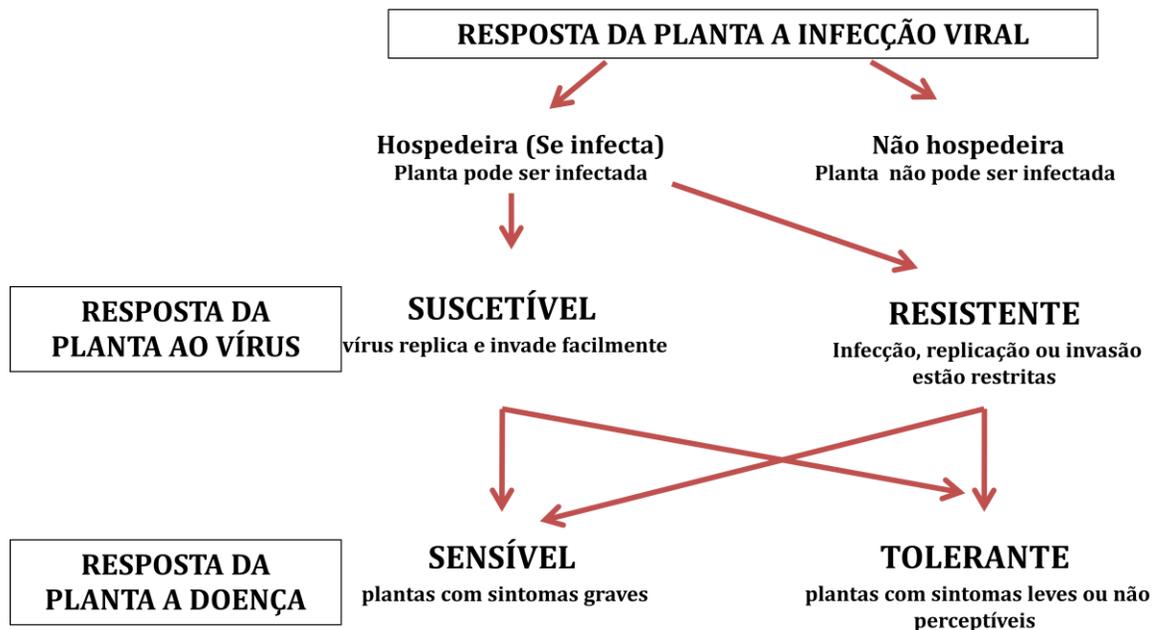
	CMV sel. INRA	Dominância Parcial	
	PI-127831	-	(Kasrawi et al., 1988, Zamir et al., 1994)
	TY172	<i>Ty-5</i>	(Anbinder et al., 2009)
	Fla. 8753 Fla. 344	<i>ty-5</i>	(Hutton et al., 2012)
<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	LA 121	Monogênico. Dominância incompleta Poligênico. Parcialmente recessivo	(Hassan et al., 1982, Pilowsky and Cohen, 1990)
	LA 373	Poligênico. Parcialmente recessivo	(Hassan et al., 1982, Kasrawi et al., 1988)
	LA 1579	Monogênico. Dominante	(Hassan et al., 1982)
	LA1589	Monogênico. Dominante	
	LA 1690	Monogênico. Dominante	
	Hirsute-INRA	-	(Kasrawi et al., 1988, Kasrawi, 1989)
	LA 1478	-	
	69- 187	Monogênico. Dominante	(Zamir et al., 1994)

	75-298	Monogênico. Dominante	
	LA 1335 -	-	(Channarayappa et al., 1992)
	PI 19532	-	
<i>Lycopersicon cheesmani</i> ssp. <i>minor</i>	LA 1401	Recessivo	(Hassan et al., 1982)
<i>Lycopersicon hirsutum</i>	LA 386	Poligênico. Dominante	(Channarayappa et al., 1992, Hassan et al., 1984, Kasrawi et al., 1988)
	LA1352 -		(Hassan et al., 1982)
	LA1691		
	f. <i>glabratum</i> LA1624		
	LA 1393 -		(Kasrawi et al., 1988)
	f. <i>glabratum</i> LA 1252		
	LA 1777 -		(Channarayappa et al., 1992)
	H2-INRA	Recessiva	(Czosnek et al., 1993, Kasrawi

			and Mansour, 1994, Kunik et al., 1994, Zamir et al., 1994)
	LA 771418		(Cohen and Antignus, 1994)
	<i>f. glabratum</i> LA407		
	PI 34418		
	PI-390658		(Channarayappa et al., 1992)
	PI-390659		(Channarayappa et al., 1992)
	<i>f. glabratum</i> B6013	<i>Ty-2</i>	(Hanson et al., 2006)

Modificado de: (Marín, 2004, Pereira- Carvalho, 2009, Garcia-Cano, 2008).

É importante definir a terminologia envolvida na resposta da planta ao patógeno, para isto, neste trabalho foram adotados os conceitos definidos por Cooper e Jones (1983), onde os termos **resistência** e **suscetibilidade** são usados para descrever a resposta da planta ao patógeno e **tolerância** e **sensibilidade** a resposta da planta à doença (**Figura 1.2**) (Cooper and Jones, 1983.).



**Figura 1.2** Conceitos referentes à resposta da planta ao vírus e à doença segundo Cooper & Jones (1983).

Dentre os genes de resistência encontrados existem alguns de carácter dominante e outros de carácter recessivo, introgrididos a partir de diferentes acessos selvagens do gênero *Solanum* (**Tabela 1.1**) para a espécie cultivada *Solanum lycopersicum*. Os genes dominantes já estudados conferindo resistência a diferentes begomovírus são: *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3* *Ty-4* e *Ty-5*, inicialmente relatados por conferir resistência a *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), um importante begomovírus de genoma monopartido que tem causado perdas em diferentes regiões do mundo. Estudos

desenvolvidos têm demonstrado que alguns desses genes, como o *Ty-1*, conferem resistência a espécies de bipartidos como por exemplo, aqueles introgrididos a partir de *Solanum chilense* (**Tabela 1.1**) a *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), dentre outros (Boiteux et al., 2007; Pereira-Carvalho et al., 2009) e o *Ty-3* a *Tomato mottle virus* (ToMoV) (Ji and Scott, 2006; Ji et al., 2007). O *Ty-4* é eficaz contra múltiplos (até sete) begomovírus bipartidos que já foram identificados na Guatemala (Nakhla et al., 2004).

Dentre os genes recessivos podem ser citados: *tcm-1*, *tgr-1* e o *ty-5* (descoberto recentemente). Estes genes conferem resistência a TYLCV e a diferentes variantes virais e ao *Tomato leaf curl virus* (TLCV) (García-Cano et al., 2008, Bian et al., 2007, Hutton et al., 2012, Laterrot, 1995). O *tcm-1* confere resistência a bipartidos como o *Tomato chlorotic mottle virus* (Giordano et al., 2005), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Pereira-Carvalho et al., 2010) e também a monopartidos (García-Cano et al., 2008).

O *Ty-1* foi o primeiro gene em ser caracterizado, mapeado e já vem sendo utilizado em híbridos comerciais no Brasil como forma de controle contra as doenças causadas por espécies de vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* (Pereira-Carvalho, 2009).

**CAPÍTULO 2. ESTUDO DA REPLICAÇÃO E MOVIMENTO VIRAL NA  
LINHAGEM DE TOMATEIRO RESISTENTE LAM 144R FRENTE AO  
*Tomato chlorotic mottle virus - ToCMoV.***

## RESUMO

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é umas das culturas mais importantes do Brasil, posicionando o país no oitavo lugar do ranking mundial de produção segundo estadísticas da FAO 2011. O cultivo do tomate em quase todas as regiões brasileiras e praticamente o ano todo propicia condições favoráveis ao desenvolvimento de pragas e patógenos, destacando-se espécies pertencentes ao gênero *Begomovirus*. Espécies de *Begomovirus* podem apresentar um ou dois componentes genômicos sendo denominadas de monopartidas ou bipartidas, respectivamente. No Brasil até o presente momento existem relatos apenas de *Begomovirus* bipartidos infectando o tomateiro. O vetor das espécies do gênero *Begomovirus* é a mosca-branca *Bemisia tabaci*.

Após a introdução do biótipo B de *Bemisia tabaci* houve um aumento na incidência das doenças causadas por espécies de *Begomovirus* em tomate. Além disto, novas espécies vêm sendo relatadas desde então. Pesquisas vêm sendo direcionadas para o desenvolvimento de variedades resistentes ao vírus e/ou vetor como estratégia de controle. Em tomate já foram relatados oito genes de resistência a espécies do gênero *Begomovirus*. Estes genes foram denominados: *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4*, *Ty-5*, *tcm-1*, *tgr-1* e *ty-5*. Dentre eles *Ty-1* foi o primeiro a ser caracterizado e a maioria das cultivares comerciais resistentes possui *Ty-1*.

Neste trabalho ensaios foram realizados para determinar possíveis mecanismos que possam estar envolvidos na resistência conferida pelo gene *Ty-1* presente em uma linhagem resistente denominada LAM 144R, frente a uma das espécies virais do complexo de espécies de begomovírus importantes para o país:

*Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV). Para isto foram desenvolvidos experimentos visando avaliar a replicação e o movimento sistêmico.

Para avaliar a replicação viral de ToCMoV na linhagem resistente LAM 144R em comparação com a isolinha LAM 144S plantas foram agroinoculadas com o componente A de ToCMoV via *Agrobacterium tumefaciens*. As coletas foram realizadas aos 0, 2, 6 e 10 dias após inoculação (dai). A quantificação da carga viral foi realizada mediante reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), usando primers específicos para capa proteica (CP1). Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis e mostraram uma menor acumulação viral na linhagem resistente em comparação com a suscetível aos 10 dai.

Para analisar o movimento sistêmico, plantas LAM 144S (susceptível) foram inoculadas com ToCMoV. Duplas enxertias foram realizadas utilizando como enxerto segmentos de LAM 144R ou LAM144S e como sobre-enxerto, LAM 144S. Amostras foram coletadas em diferentes tempos após as enxertias e a detecção de ToCMoV por PCR e Southern blot mostraram uma restrição no movimento viral a longa distância quando foram usadas as plantas LAM 144R contendo o gene *Ty-1* como enxerto

## ABSTRACT

In Brazil the introduction of the B biotype of *Bemisia tabaci* lead to an increase in incidence and severity of diseases caused by species of *Begomovirus* in tomato. In addition, new virus species have been reported since then. Research studies have been directed to the development of resistant varieties to the virus and/or the vector as control strategy. Eight resistance genes to different species of *Begomovirus* have been reported In tomato. They are named genes *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4* *Ty-5*, *tcm-1* *tgr-1* and *ty-5*. The gene *Ty-1* was the first to be characterized and introduced in most of the commercial tomato cultivars.

In this study, viral replication and system movement were analysed to determine possible mechanisms that may be involved in the resistance conferred by *Ty-1* gene present in the line LAM 144R, against *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV).

To evaluate viral replication, resistant LAM 144R and susceptible LAM 144S plants were agroinfiltrated with ToCMoV DNA-A. Samples were collected at 0, 2, 6 and 10 dai. Quantification of viral load was performed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The data were analyzed by the nonparametric Kruskal-Wallis test and showed lower viral accumulation in the resistant line compared to the susceptible at 10 dai.

To analyze the system movement, susceptible LAM 144S plants were inoculated with ToCMoV. Double grafts were performed using as grafts LAM 144R or LAM 144S segments and as overgrafts, LAM 144S susceptible plants. Samples were

collected from the overgrafts at different times and ToCMoV was detected by PCR and Southern blot, showing a restriction in long-distance viral movement when plants LAM 144R containing the *Ty-1* gene were used as grafts.

Keywords: *Begomovirus*, bipartite, resistance, tomato, biolistic

## 1. INTRODUÇÃO

O tomate [*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.] (Peralta *et al.*, 2005) é uma das hortaliças mais importantes, posicionando o Brasil no oitavo lugar no ranking mundial de produção (FAO, 2011). Epidemias causadas por espécies de *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) no Brasil e no mundo têm sido apontadas como causas de perdas econômicas para a cultura do tomateiro (Varma and Malathi, 2003, Seal *et al.*, 2006, Giordano *et al.*, 2005, Pereira- Carvalho, 2009).

Espécies de *Begomovirus* apresentam ácido nucléico do tipo DNA de fita simples circular encapsidado separadamente em um ou dois componentes genômicos, sendo denominadas de monopartidas (apenas um componente genômico) ou bipartidas (dois componentes genômicos, DNA-A e DNA-B) e são transmitidas de maneira eficiente pelo vetor *Bemisia tabaci* (família *Aleyrodidae*) (Bedford *et al.*, 2008, Briddon and Stanley, 2009, Brown *et al.*, 2011, Jeske, 2009).

No Brasil até o presente momento todas as espécies infectando tomateiro apresentam dois componentes genômicos, dentre estas espécies destacam-se *Tomato yellow vein streak virus* (TYVSV) (Colariccio *et al.*, 2007, Cotrim *et al.*, 2007, Faria *et al.*, 1997, Castillo-Urquiza *et al.*, 2008, Fernandes, 2010), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (Fernandes, 2010, Ribeiro *et al.*, 2003, Rocha *et al.*, 2010, Souza-Dias *et al.*, 2008), *Tomato chlorotic mosaic virus* (ToCMoV) (Ambrozevicius *et al.*, 2002, Fernandes, 2010, Ribeiro *et al.*, 2002, Ribeiro *et al.*, 2007) e *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Colariccio *et al.*, 2006, Fernandes *et al.*, 2006, Fernandes, 2010, Ribeiro *et al.*, 2003).

Infecções causadas por *Begomovirus* normalmente restringem-se a células do floema (p. ex. *Bean golden mosaic virus* - BGMV em feijoeiro) e a replicação ocorre nas células companheiras e parenquimáticas que encontram-se formando o tecido vascular juntamente com os elementos de tubo crivado. Estas células e tecidos representam obstáculos a entrada viral no tecido vascular, entretanto os vírus contam com mecanismos para superar estas barreiras (Sanderfoot and Lazarowitz, 1996, Vuorinen et al., 2011).

Por outro lado para que a infecção sistêmica ocorra é preciso que o vírus alcance os tubos crivados que o transportará a outras partes da planta. Para a grande maioria dos vírus o movimento é feito seguindo o fluxo de fotoassimilados (via floema), embora em alguns casos como para *Southern bean mosaic virus* - SBMV (e outros *Sobemovirus*) o movimento seja realizado via xilema (Hull, 2002).

No componente A de *Begomovirus* com genoma bipartido encontram-se os genes que codificam as proteínas envolvidas nos processos de replicação (Rep, RE<sub>n</sub>), transcrição (TrAP) e encapsidação (CP) do DNA viral. A replicação viral realiza-se no núcleo das células infectadas mediante um DNA de fita dupla denominado DNA intermediário ou forma replicativa por replicação por círculo rolante. A atividade da DNA polimerase-DNA dependente é proporcionada pela célula hospedeira (Bisaro, 1996, Gutierrez, 1999).

O componente B dos begomovírus codifica genes relacionados com o movimento viral intracelular, como a proteína de transporte nuclear (NSP) e intercelular promovido pela proteína de movimento (MP). De uma forma bastante

simplificada, a NSP transporta o DNA viral do núcleo para o citoplasma. O complexo NSP-DNA liga-se a MP. A proteína NSP retorna ao núcleo e o DNA viral é direcionado ao plasmodesma e o movimento é feito pelo aumento do tamanho do limite de exclusão dos plasmodesmas proporcionado pela MP. Em espécies de *Begomovirus* monopartidos estudos desenvolvidos demonstram que a capa protéica (CP) media o movimento sistêmico viral na planta (Harrison et al., 2002, Padidam et al., 1996).

Conforme mencionado, o sucesso de uma infecção viral depende da replicação, expressão do genoma e movimento viral no interior da planta. Entretanto, estudos desenvolvidos sobre fatores codificados pela planta que impeçam um ou mais destes processos fazendo com que a infecção não ocorra, tem sido relacionados com a presença de genes específicos, denominados genes de resistência.

Alguns genes de resistência têm sido identificados, descritos e introgrididos em cultivares comerciais de tomateiro. Dentre estes genes cita-se o *Ty-1* como sendo o primeiro gene de resistência a *Begomovirus* (monopartidos e bipartidos) a ser caracterizado conferindo resistência aos isolados do complexo de espécies de *Begomovirus* do Velho Mundo TYLCD (*Tomato yellow leaf curl disease*), em especial *Tomato yellow leaf curl virus* – TYLCV (Michelson et al., 1994) e Novo Mundo (Blawid et al., 2010a, Pereira- Carvalho, 2009). Para begomovírus bipartidos do Novo Mundo há pouca informação referente à caracterização da resistência no que se refere aos processos virais que ocorrem para o desenvolvimento da infecção viral. Neste contexto, o objetivo deste capítulo foi avaliar os processos de replicação e movimento viral a longa distância em uma linhagem resistente de tomateiro desenvolvida pelo programa de Melhoramento da Embrapa Hortaliças – CNPH e denominada LAM

144R, homozigota para *Ty-1* (*Ty-1/Ty-1*) frente à uma importante espécie do complexo de espécies de *Begomovirus* bipartidos que infectam tomateiro no Brasil, *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local de realização dos ensaios.**

Os ensaios foram realizados em condições de casa de vegetação e no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga III (LPPIII) na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen - Distrito Federal.

### **2.2. Origem do isolados virais**

O isolado viral de ToCMoV utilizado foi proveniente da coleção de vírus do laboratório LPPIII da Embrapa Cenargen, mantido a -80°C em estoque de glicerol a 20% produzidos e mantidos sob os cuidados da Dra. Simone Ribeiro (Ribeiro, 2006)

### **2.3 Isolados virais para agroinfiltração**

O clone infeccioso de ToCMoV-[BA-Se1] contendo 1.8 cópias do DNA-A (pCAMBIA-ToCMoV-DNA-A) foi obtido e introduzido em *Agrobacterium tumefaciens* para a agroinfiltração de acordo com Ribeiro (2006).

### **2.4 Preparo do clone viral para inoculação via Biobalística**

Os clones de DNA-A e DNA-B de ToCMoV – [BA-Se1] foram preparados por meio de digestão enzimática com a enzima de restrição *Kpn-I* (DNA-A) e *Hind- III* (DNA-B) como descrito por Ribeiro *et al.* (2007). A ligação intramolecular foi feita utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e mantida a 16°C por 20 horas. O

resultado da digestão e ligação foi visualizado em gel de agarose 1% em TAE 1X corado com brometo de etídeo (Ribeiro, 2006).

## **2.5 Material vegetal**

As isolinhas de tomateiro LAM 144R (material resistente) e LAM 144S (material suscetível) estudadas foram geradas a partir de um híbrido denominado Ellen (*Ty-1/ty-1*) pelo uso da técnica SSD (Single Seed Descendent ou descendente de uma única semente) pelo pesquisador Leonardo Silva Boiteux (Embrapa Hortaliças). A técnica SSD consiste no avanço de gerações, após cruzamento, coletando-se uma semente por planta a partir da F<sub>2</sub> até a F<sub>5</sub> ou F<sub>6</sub>, sem efetuar seleção nas gerações iniciais de autofecundações, para aumento de homozigose nos descendentes e obtenção de linhagens (Cubero, 2003).

## **2.6 Acúmulo diferencial de *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV na linhagem resistente LAM 144R (*Ty-1*) e suscetível LAM 144S quantificado via qPCR.**

A replicação de um *Tomato chlorotic mottle virus* em LAM 144R e LAM 144S foi avaliada através da agroinfiltração do DNA-A clonado em vetor binário e a quantificação foi realizada por qPCR descrito segundo Mason et al (2008).

### **2.6.1 Agroinfiltração**

Trinta e cinco plantas da linhagem LAM 144R e 35 plantas da linhagem LAM 144S foram agroinfiltradas. Foram preparados 50 mL de meio LB (10g/L de Triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl) acrescido com canamicina (50 mg/mL) inoculado com aproximadamente 2 µL da solução bacteriana de *A. tumefaciens*

transformadas com pCAMBIA-ToCMoV-DNA-A (Ribeiro, 2006). As células bacterianas foram colocadas em estufa por 18h a 28° C com agitação contínua e a densidade ótica (OD<sub>600</sub>) ajustada com MES, MS (meio Murashige & Skoong de sigma) e acetoseringona (10 mg/uL) para 0,5 (600 nm).

A agroinfiltração foi realizada usando um sistema de vácuo (VIANA et al., 2012), onde as porções foliares das plantas foram submersas na solução bacteriana, e submetidas à pressão de vácuo. A pressão foi liberada rapidamente, certificando-se que todo o mesófilo das folhas (especialmente os primeiros folhas verdadeiras) estivesse completamente infiltrado. Em seguida as plantas de tomate foram cobertas com sacos plásticos e mantidas na câmara úmida até finalizar o experimento.

### **2.6.2 Extração de DNA.**

O DNA total foi extraído utilizando o método CTAB (Doyle and Doyle, 1987), com algumas modificações. Uma folha coletada por planta foi colocada em tubos de 1,5mL e trituradas em nitrogênio líquido. Posteriormente procedeu-se a nova maceração após adição de 800 uL de tampão CTAB (2%CTAB, 100mM Tris HCl pH 8,0, 50mM NaCl e 0,2 % de 2-β-Mercaptoetanol). A seguir adicionou-se 400 uL de clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico, 24:1). Agitou-se vigorosamente utilizando vórtex e as amostras foram incubadas a 54°C por 10min em agitação constante. Em seguida os tubos foram submetidos à centrifugação por 10min a 13.000 rpm. O sobrenadante (700 uL) foi transferido a um novo tubo e adicionou-se 1,2X de isopropanol. Os tubos foram agitados manualmente por inversão e a seguir foram centrifugados a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o

precipitado obtido foi lavado com 500uL etanol 70% e seco a temperatura ambiente. Para ressuspensão do pellet, 50uL da solução TE-RNase (0,1mM de EDTA, 10mM de Tris-HCl e 0,01ug/ul de RNase) foram adicionados.

A quantificação de DNA total foi realizada no espectrofotômetro Nanodrop (Spectrophotometer, ND-100, Thermo) e as amostras foram posteriormente diluídas para 2.24ng/μL com TE (Mason et al., 2008)

### **2.6.3 Reação quantitativa em cadeia da Polimerase (qPCR)**

A replicação viral foi avaliada por meio da quantificação absoluta das moléculas virais por qPCR.e o reagente Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen) que atua como fluoróforo que se associa com a molécula de DNA interagindo com a estrutura secundária do DNA de dupla fita acoplado-se energeticamente aos ácidos nucleicos que o conformam de modo que aumenta significativamente a sua taxa de emissão fluorescente.

As coletas foram realizadas nos tempos 0, 2, 6 e 10 dias após infiltração (dai) e o DNA extraído de cada amostra como descrito no item 2.6.2 deste capítulo. Para o experimento foram coletadas 66 amostras sendo 33 provenientes de LAM 144R e 33 de LAM 144S para o tempo zero. Logo em seguida, foram coletadas 11 amostras para cada tempo das plantas LAM 144R e 11 amostras para cada tempo da linha LAM 144S. A curva de calibração foi feita a partir de DNA plasmidial contendo o componente A do *Tomato chlorotic mottle virus*. Elaborou-se uma diluição a 100ng/μL o que equivale a uma quantidade de  $7.79 \times 10^9$  moléculas/uL com DNA de plantas

sadias de tomate, e posteriormente fez-se diluições seriadas até alcançar o valor de 7.79 x10. Para a obtenção dos valores anteriores levou-se em conta o seguinte cálculo:

$$\text{Moléculas}/\mu\text{L} = (A * (6.022 * 10^{23})) / 660\text{MW} * (B)$$

**A:** concentração do plasmídeo que contém o genoma viral.

**B:** é o tamanho do plasmídeo contendo a sequência de interesse (neste caso ToCMoV Componente A).

**6.022×10<sup>23</sup>:** número de Avogadro

**660:** Peso molecular de um par de bases.

Aplicando-se os valores reais à fórmula:

$$\text{Moléculas}/\mu\text{L} = (10 * 10^{-8} \text{g}/\mu\text{L}) * (6.022 * 10^{23}) / 660\text{MW} * (11713\text{pb})$$

$$\text{Moléculas}/\mu\text{L} = 7.79 * 10^9 \text{ equivalente a } 100\text{ng}/\mu\text{L}$$

As reações foram realizadas em triplicata em um volume final de 10  $\mu\text{L}$ , contendo 1  $\mu\text{L}$  de DNA (2.24 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 1.0  $\mu\text{L}$  de cada primer utilizado a 10  $\mu\text{M}$  para uma concentração final de 1 $\mu\text{M}$  (CP1-F e CP1R), 2.0  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O milli-Q autoclavada e 5.0 $\mu\text{L}$  do mix Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen).

As condições térmicas de ciclagem foram estão divididas em diferentes estágios: **Holding stage** de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos. **Cycling stage** de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (40 vezes). **Melt curva stage** de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos.

Este ciclo tem a duração de aproximadamente 2 horas utilizando-se o 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os *primers* utilizados foram CP1 forward (5' TGTCACATCAGAGACGCACA 3') e CP1 reverse (5'ACAGGCCCATGTACAGGAAG 3') que foram desenhados anteriormente utilizando o programa Primer 3 (Blawid et al., 2011).

As análises estatísticas foram elaboradas pelo uso de teste não paramétrico Kruskal- Wallis, já que a grande variação nos dados não permitiu a utilização de modelos paramétricos. No caso da comparação dos genótipos considerando os tempos de coleta, o modelo binomial negativo ajustou-se bem os dados. As análises foram desenvolvidas no programa de linguagem estatística R, de livre acesso. (Wolfe and Hollander, 1973, McCullagh and Nelder, 1989).

## **2.7 Avaliação do movimento a longa distância de *Tomato chlorotic mottle virus* – ToCMoV em LAM 144R e LAM 144S.**

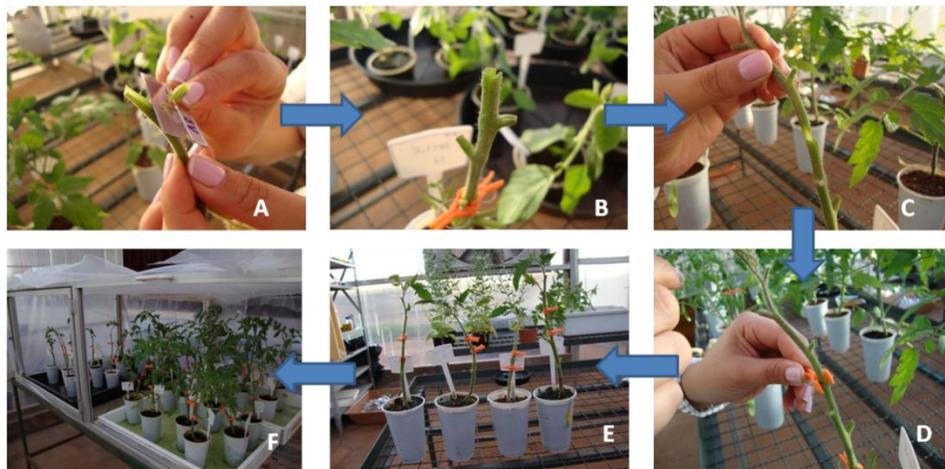
### **2.7.1 Inoculação viral por biobalística**

Mudas de aproximadamente três semanas de idade, com duas folhas verdadeiras foram usadas para inoculação via bombardeamento. Foram utilizadas seis plantas de cada genótipo e duas repetições biológicas.

Duplas enxertias foram realizadas (**Figura 2**) para o estudo do movimento viral a longa distância de acordo com Garcia-Cano et al (2010). Inicialmente plantas da linhagem suscetível LAM 144S foram inoculadas por biobalística com 2.5 ug do DNA de cada componente de ToCMoV por preparação (Ribeiro, 2006). O aparelho utilizado encontra-se ilustrado na **Figura 3 do Capítulo 3** e a metodologia utilizada foi a mesma

descrita por Aragão et al (1998). Doze plantas confirmadas como positivas (por tissue blot e PCR (Polymerase Chain Reaction) foram usadas como porta-enxerto para seis plantas resistentes (LAM 144R) e seis suscetíveis (LAM 144S). Amostras das folhas apicais das plantas enxertadas foram coletadas aos 5, 10 e 15 dias após a primeira enxertia e no 15º dia foi feita uma segunda enxertia com plantas LAM144S suscetíveis (sobre-enxerto), das quais foram tomadas amostras das folhas apicais aos 5, 10, 15, 20 e 61 dias depois da enxertia (de acordo com metodologia realizada em ensaios preliminares).

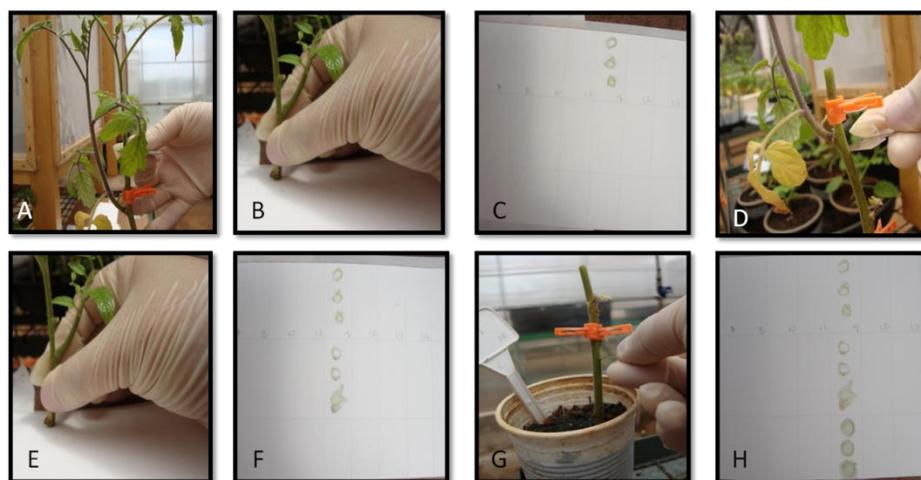
Aos 61 dias após segunda enxertia realizou-se uma hibridização por tissue blot do porta-enxerto, enxerto e sobre-enxerto (**Figura 2.1**). Este ensaio foi realizado duas vezes.



**Figura 2.** Etapas do procedimento da dupla enxertia. A. Um corte em bisel é feito no enxerto B. Um corte tipo fenda é feito no porta-enxerto. C. Junção do enxerto e porta-enxerto. D. Um grampo é colocado para estabilidade e suporte para cicatrização dos tecidos e as plantas são levadas para um ambiente com câmara úmida. E. Plantas enxertadas e F. Plantas são mantidas em câmara úmida que proporciona um ambiente favorável para a recuperação e cicatrização dos tecidos.

### 2.7.2 Tissue blot

A técnica de tissue blot foi utilizada para detecção viral. Cortes do caule das plantas avaliadas foram cuidadosamente pressionadas sobre a membrana de náilon (Amersham GE Hybond -N+) (**Figura 2.1**). Antes da hibridização a membrana foi tratada com NaOH 0.2N por 5 minutos, Tris-HCl 1M pH 7.4 por 5 minutos, SSC2x por 5 minutos e finalmente duas lavagens com etanol 95%, sendo cada uma delas com uma duração de 5 minutos e deixada para secar a temperatura ambiente (Brasileiro and Carneiro, 1998).



**Figura 2.1.** Etapas do procedimento do tissue blott realizado aos 61 dias após inoculação (dai) A. corte do sobre-enxerto de forma reta acima do grampo que o segura. B-C. impressão do sobre-enxerto sobre a membrana de náilon. D. corte do enxerto no meio dos dois grampos e, E-F. impressão na membrana de náilon. G. elaboração do tissue blot do porta-enxerto. Realiza-se um corte abaixo do primeiro grampo e H. impressão na membrana de náilon.

Para a detecção viral, foram utilizadas sondas radioativas. O molde utilizado foi uma mistura de fragmentos do DNA-A de ToCMoV e ToRMV obtidos por PCR

com os primer PAL1v1978/PARc715 (Rojas et al., 1993) As sondas foram preparadas utilizando o kit Rediprime II Labeling System (GE healthcare) e  $\alpha^{32}\text{PdCTP}$ , de acordo com as instruções do fabricante. A hibridização foi feita com tampão Church modificado a 55°C e as lavagens com SSC 2X, SDS 0,1% e SSC 1X, SDS 0,1% na mesma temperatura. As membranas foram expostas no Imaging plate BAS-MS (FujiFilm) e analisadas em um equipamento Bio Imaging Analyser FLA 3000 (FujiFilm) (Blawid et al., 2010b, Fontenele et al., 2010).

### **2.7.3 Extração de DNA total das amostras coletadas**

Amostras foliares foram coletadas da quarta folha do ápice para baixo do porta-enxerto e sobre-enxerto aos 5,10,15 e 5,10,15,20 dias após inoculação e enxertia (dai), respectivamente. DNA total foi extraído das amostras utilizando o método CTAB (Doyle and Doyle, 1987) conforme descrito no ítem 2.6.2.. A quantificação de DNA total foi realizada no espectrofotômetro Nanodrop (Spectrophotometer, ND-100, Thermo) e as amostras foram posteriormente diluídas a 100ng/ $\mu\text{L}$  com TE-RNase. As amostras foram armazenadas em freezer -20 °C até o uso.

### **2.7.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Para a detecção do ToCMoV nas diferentes amostras coletadas, um fragmento do DNA-A viral foi amplificado através de PCR utilizando os ‘primers’ (10 $\mu\text{M}$ ): ‘pAL1v1978’ (5’-GCATCTGCAGGCCCAACTYGTCTTTYCCNGT-3’) e ‘pARc715’ (5’- GATTCTGCAGTTDATRTTYTCRTCCATCCA-3’) (Rojas et al., 1993). As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25  $\mu\text{L}$  contendo 2.5 $\mu\text{L}$  de Tampão 10X da enzima *Taq* DNA Polymerase (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 e

500 mM KCl, Invitrogen), 2.5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen), 0.35 µL dNTPs (2,5 mM, Invitrogen), 0.35 µL de cada primer PALv1978/PARc715 (10uM), 0.15 µL da enzima *Taq* DNA Polimerase (5U/µL, Invitrogen), água MiliQ e 100ng de DNA,

As reações foram amplificadas usando termociclador Master Cycler (Eppendorf). As condições foram: temperatura inicial de 94°C durante 5 minutos e posteriormente 35 ciclos sendo cada um deles de 94°C por 30 segundos (desnaturação); 55°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 3 minutos (extensão). Após os 35 ciclos procedeu-se uma etapa final de extensão a 72°C durante 7 minutos.

### **2.7.5 Southern blot**

Dois microlitros do produto da PCR foram separados por eletroforese em um gel de agarose a 1%. A seguir tratou-se o gel com tampão de desnaturação (1.5M de NaCl e 0.5M de NaOH) e incubação a temperatura ambiente por 30 minutos em agitação constante. Após lavar o gel em água procedeu-se a neutralização com tampão (1.5 NaCl e 0.5M Tris pH. 7.5) e incubação por 30 minutos a temperatura ambiente em agitação constante. Repetiu-se o procedimento de lavar o gel em água e os ácidos nucleicos foram transferidos por capilaridade para membrana de nailón (Amersham Hybond -N+). Como tampão de transferência foi utilizado SSC 20X pH 7-8 ( 3M de NaCl; Citrato Trissódico 0,3M).

Para a detecção viral, foram utilizadas sondas radioativas. O molde utilizado foi uma mistura de fragmentos do DNA-A de ToCMoV e ToRMV obtidos por PCR com os primer PAL1v1978/PARc715. A sonda utilizada, condições de hibridização,

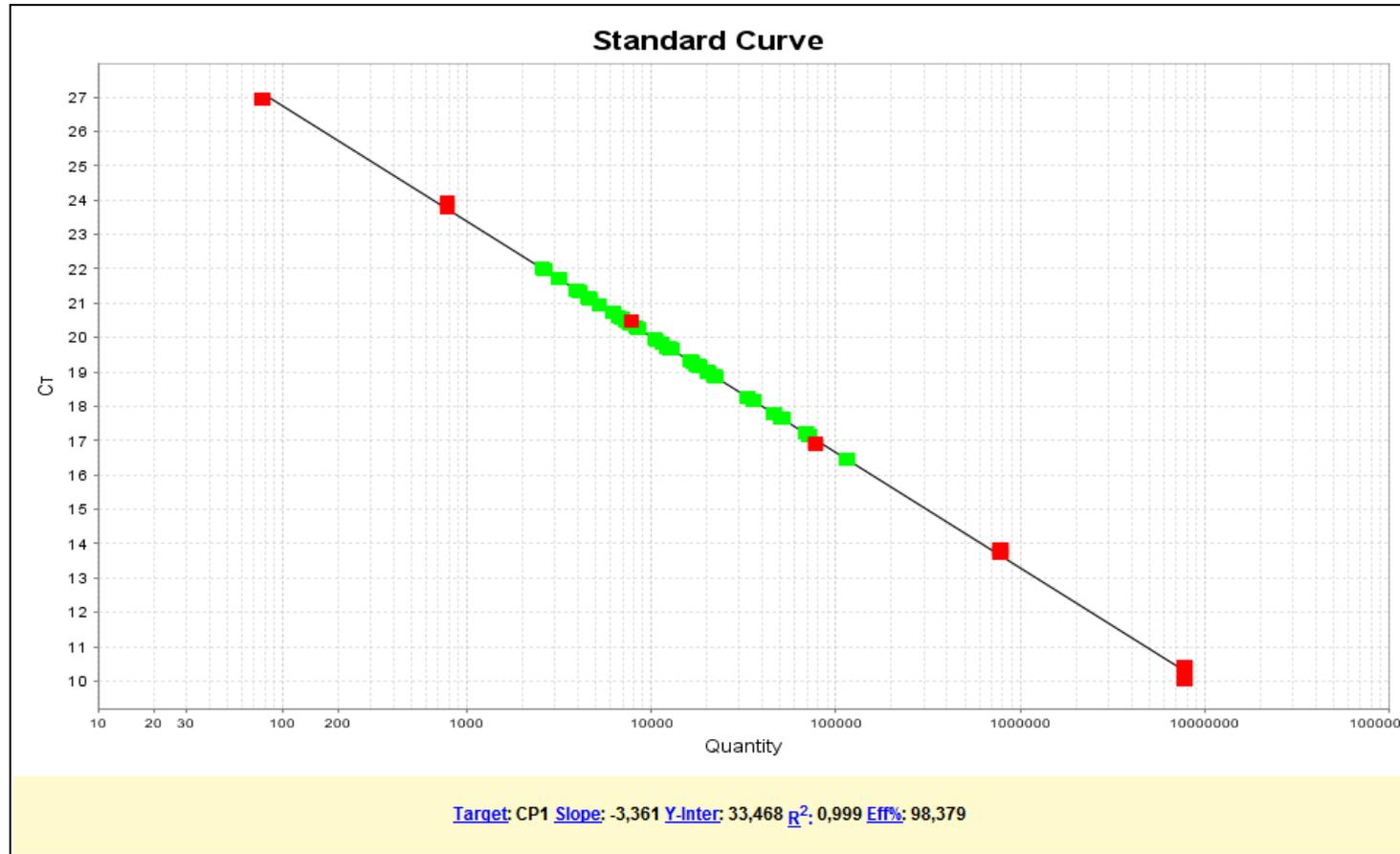
lavagem, exposição e obtenção da imagem foram realizadas como descrito no ítem 2.7.2.

### **3. RESULTADOS**

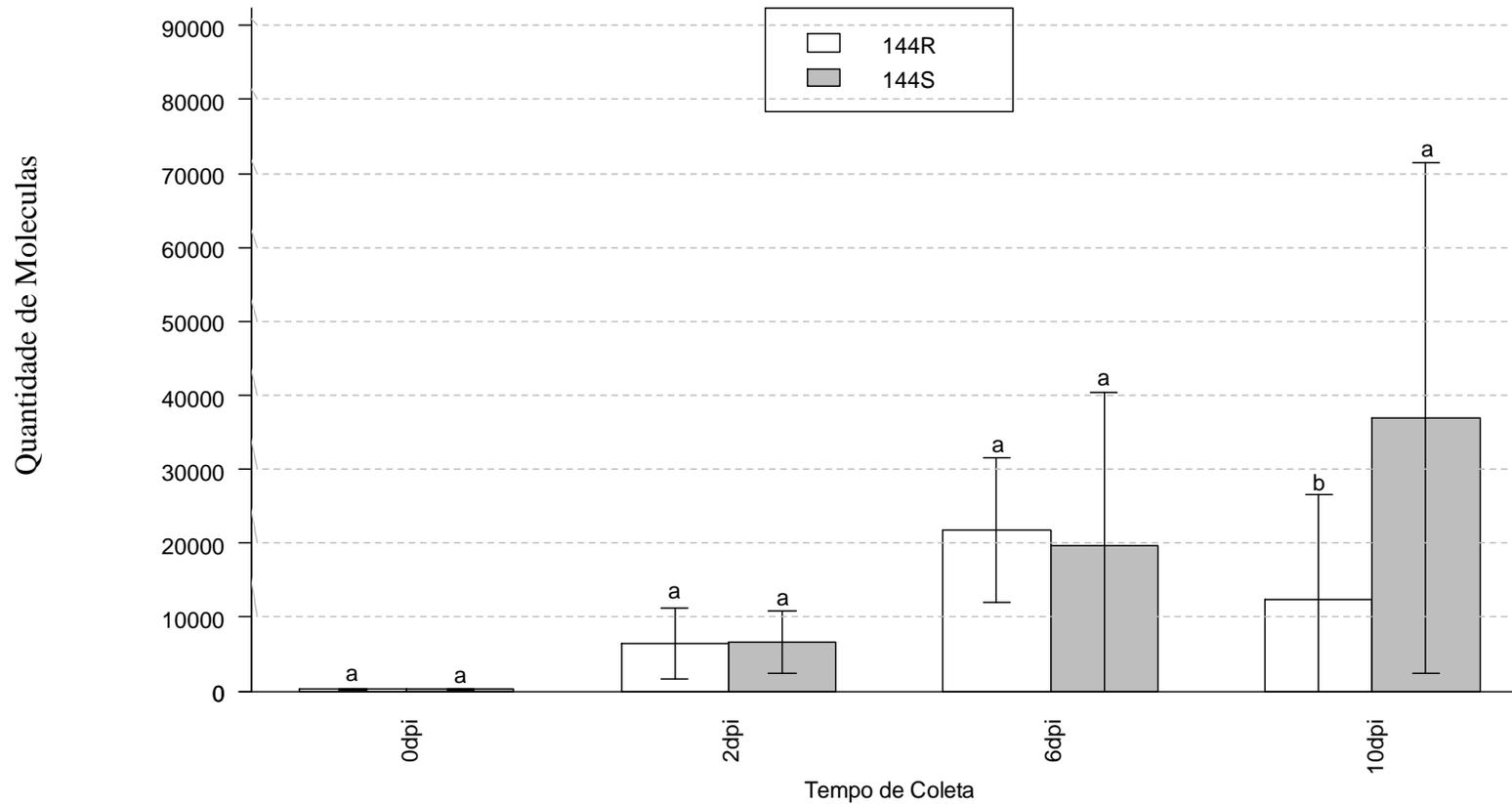
#### **3.1 Replicação viral**

A avaliação comparativa da replicação viral (LAM 144R e LAM 144S) foi feita através de quantificação por qPCR. As curvas padrão foram obtidas por análise de regressão linear do valor Threshold Cycle (Ct) de cada uma das seis diluições padrões realizadas em triplicata sobre o logaritmo da quantidade total de DNA presente em cada amostra. A quantificação absoluta da carga viral de ToCMoV nas plantas infectadas foi determinada nas amostras coletadas nos diferentes tempos (0, 2, 6 e 10 dai) e pelo uso da equação de regressão linear, foram interpoladas para cada amostra experimental a partir da curva padrão, a qual é obtida a partir de DNA genômico de concentrações conhecidas para a espécie viral em estudo, com um  $R^2 = 0,999$ , e uma eficiência de 98.379% mostrando um alto coeficiente de correlação (**Figura 2.2**).

Análises estatísticas dos resultados obtidos foram realizadas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, devido à grande variabilidade nos dados. Os resultados obtidos mostraram que nos tempos 0, 2 e 6 dai, os valores obtidos de carga viral não mostraram diferenças significativas, no entanto aos 10dpi, foi possível observar uma diferença significativa entre o número de moléculas apresentada pela linhagem resistente em comparação a linhagem suscetível, com mais de duas vezes o número de moléculas (**Figura 2.3**).



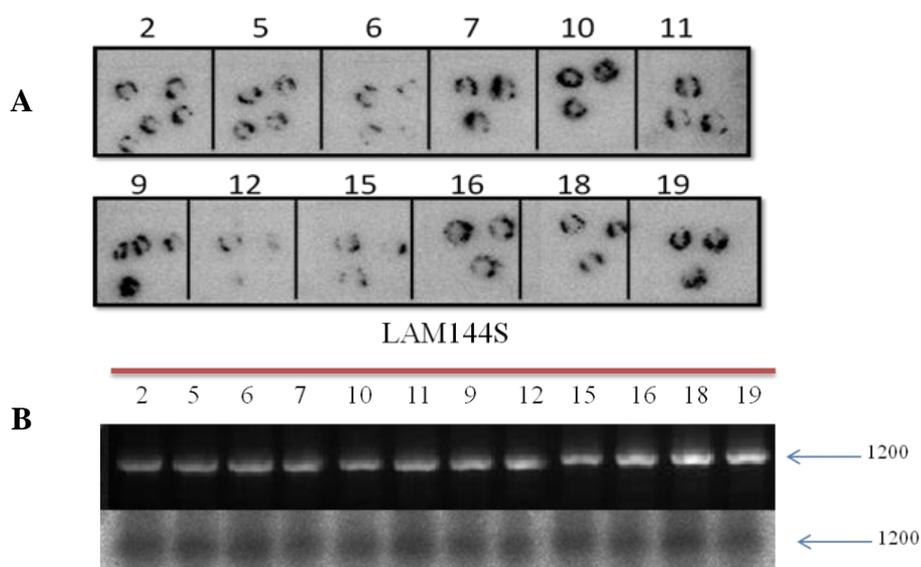
**Figura 2.2.** Curva padrão obtida para a quantificação absoluta de *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV-A. Os pontos vermelhos indicam a correlação entre os valores de Threshold Cycle (Ct) e a quantidade de moléculas virais de ToCMoV-A (Quantity) das diluições seriadas com concentrações conhecidas ajustados no padrão linear. Os pontos verdes indicam a correlação entre os valores de Threshold Cycle (Ct) e a quantidade de moléculas virais de ToCMoV-A das amostras de estudo ajustadas no padrão linear.



**Figura 2.3.** Quantidade média de moléculas de ToCMoV-A  $\pm$  Desvio padrão segundo o tempo de coleta. Letras diferentes indicam que os genótipos diferem significativamente ( $P < 0.05$ ) segundo os contrastes obtidos no modelo binomial negativo.

### 3.2 Avaliação do movimento sistêmico do vírus *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV, conferido pelo gene *Ty-1* na linhagem LAM 144R.

Com a finalidade de avaliar o efeito da resistência conferida pelo gene *Ty-1* na linhagem LAM 144R sobre o mecanismo de movimento sistêmico de ToCMoV, duplas enxertias foram realizadas em porta-enxertos inoculados com o clone infeccioso de ToCMoV (componente A e B) por meio de biobalística. A confirmação de uma infecção viral positiva para a escolha dos porta-enxertos foi feita por PCR do DNA total extraído dos folíolos apicais e a reconfirmação do resultado foi observada por meio de tissue blot do caule no momento em que foi feita a primeira enxertia (**Figura 2.4**).



**Figura 2.4.** Detecção de *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV inoculado via biobalística em plantas suscetíveis LAM 144S usadas como porta-enxerto em experimentos de dupla enxertia. A. Tissue blot de 12 plantas (2, 5, 6, 7, 10, 11, 9, 12, 15, 16, 18 e 19) aos 15 dias após a inoculação (dai) B. Gel de agarose a 1% de fragmentos obtidos por PCR com primers PALv1978/PARc715 das plantas inoculadas. PCR feita aos 13 dai. MM = Marcador molecular 1Kb plus (Invitrogen).

O DNA das amostras coletadas aos 5, 10 e 15 dias após a primeira enxertia (dape) (LAM 144R e LAM 144S) e aos 5, 10, 15 e 20 dias após a segunda enxertia (dase) (LAM 144S) foi usado em reações de PCR usando com os primers PALv1978/PARc715 para detecção viral e o Southern blot realizado do gel do produto da PCR de forma comparativa. Os resultados observados mostraram que aos 5 dape não foi possível detectar ToCMoV por PCR nem através do Southern blot em amostras dos enxertos constituídos por plantas LAM 144R ou LAM 144S, nem nos sobre-enxertos contituídos por plantas LAM 144S (**Figura 2.5**).

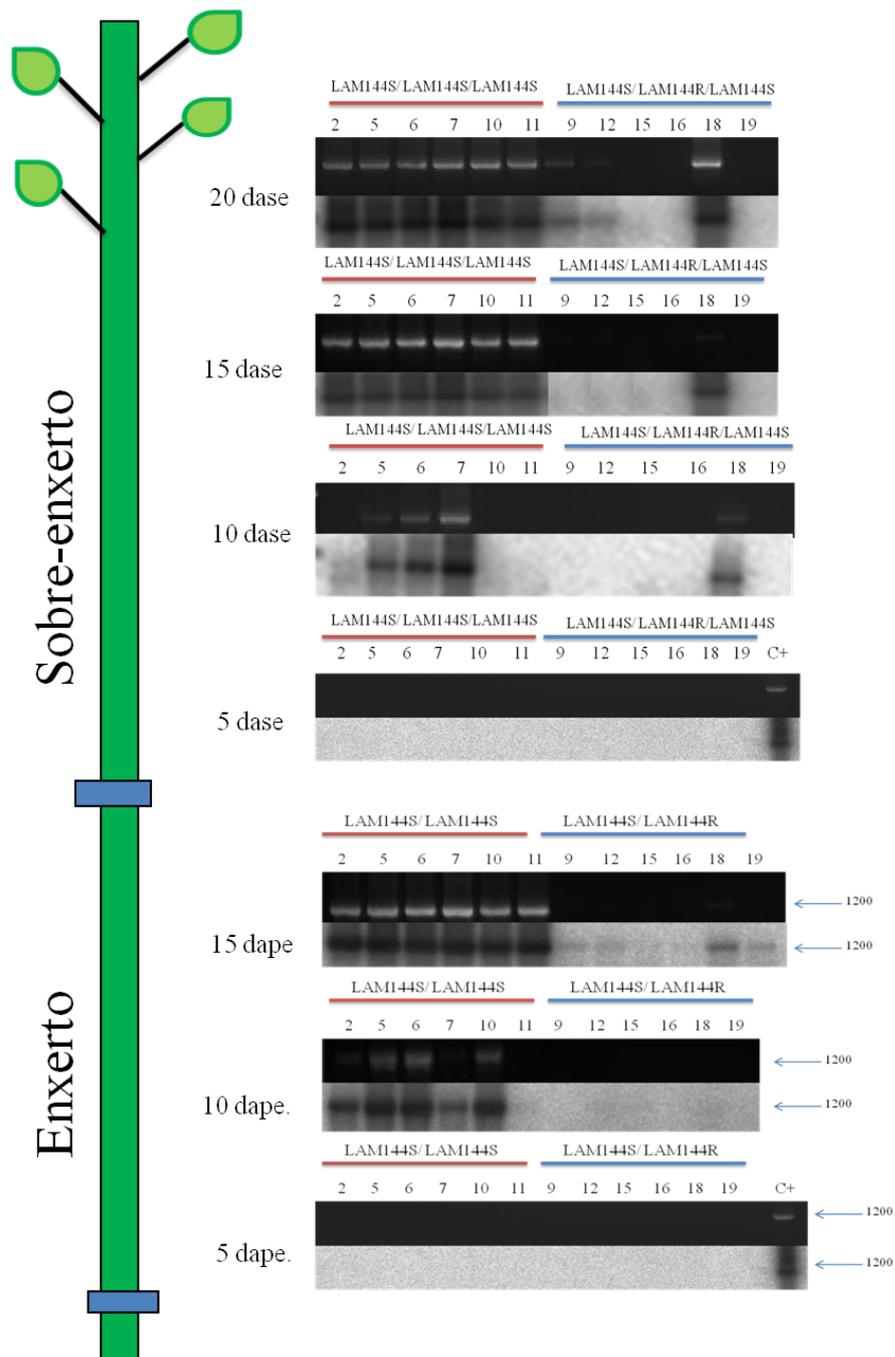
Aos 10 dape e 10 dase detectou-se a presença de ToCMoV por PCR e Southern blot, nas amostras coletadas das plantas com enxertos LAM 144S e seus sobre-enxertos LAM 144S, mas não nas amostras das plantas constituídas por enxertos LAM 144R nem em seus sobre-enxertos LAM 144S (**Figura 2.5**).

A PCR das amostras coletadas 15dape do enxerto LAM 144S e seu sobre-enxerto LAM 144S detectou a presença de vírus, por meio de bandas e com maior intensidade que aquelas observadas aos 10 dape e 10 dase, entretanto a presença de vírus nas amostras do enxerto LAM 144R só foi detectada por meio do Southern Blot, mostrando uma maior sensibilidade de detecção que a PCR. As amostras coletadas aos 15 dase do sobre-enxerto LAM 144S não mostraram resultados positivos na PCR nem no Southern blot, com uma única exceção apresentada na amostra 18 (**Figura 2.5**).

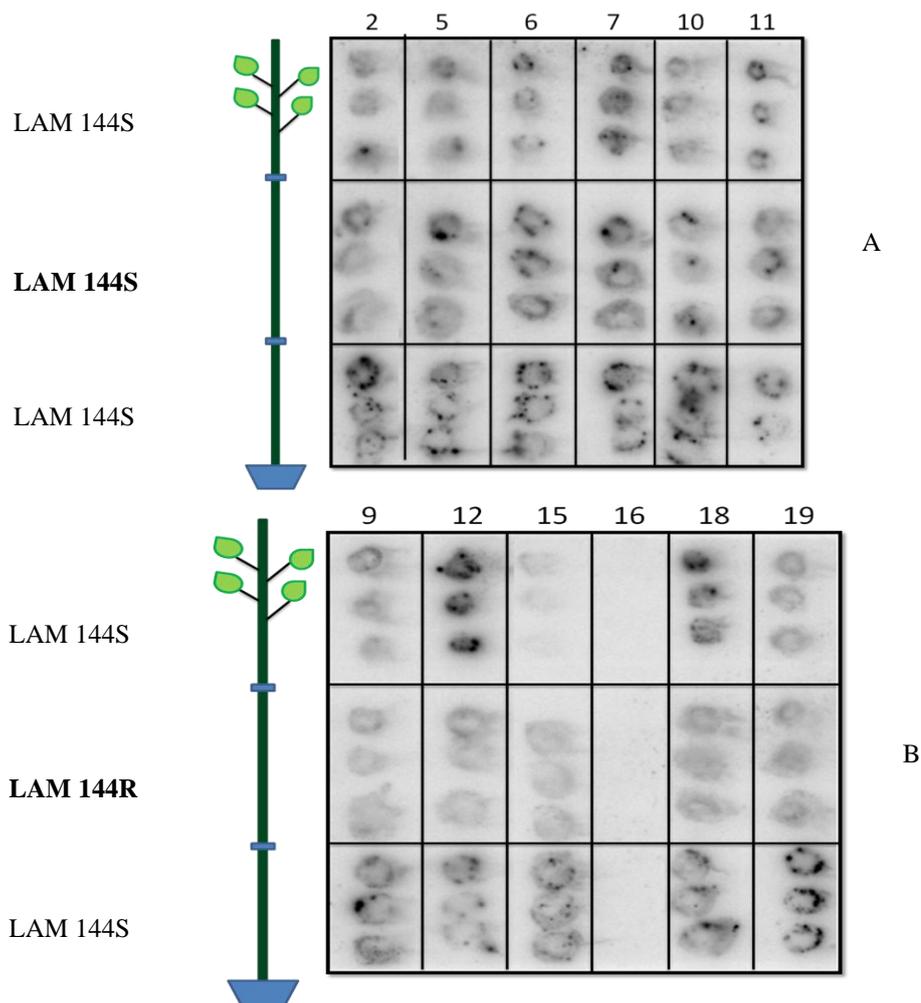
As amostras tomadas aos 20 dase do sobre-enxerto LAM 144S provenientes de plantas enxertadas com LAM 144S mostraram resultados positivos para ToCMoV tanto na PCR como no Southern blot. Em contrapartida as amostras do sobre-enxerto LAM 144S de plantas enxertadas com LAM 144R apresentaram bandas com intensidades menores (amostra 9 e 12) ou ausência delas (Amostras 15, 16 e 19) na PCR e no southern

blot, com exceção da amostra 18 que teve um comportamento similar ao controle (**Figura 2.5**).

As avaliações de detecção viral aos 61 dias foram realizadas por tissue blot do porta-enxerto, enxerto e sobre-enxerto e os resultados mostraram uma restrição no movimento viral a longa distância quando foram usadas as plantas LAM 144R, e também uma sinal de hibridização de menor intensidade (observada no Southern blot) nas plantas suscetíveis enxertadas sobre enxertos resistentes (**Figura 2.5 e Figura 2.6**).



**Figura 2.5.** Experimento de dupla enxertia usando como porta-enxerto plantas LAM 144S infectadas com ToCMoV, plantas saudias LAM 144S como sobre-enxerto e plantas LAM 144S (2,5,6,7,10 e 11) e LAM 144R (9,12,15,16,18 e 19) como enxerto. Plantas foram analisadas por PCR com primers específicos para o componente A de begomovírus e Southern blot do gel do ensaio da PCR de amostras de folhas apicais do enxerto aos 5, 10 e 15 dias após a enxertia (dape) e do porta-enxerto 5, 10, 15 e 20 dias após a segunda enxertia (dase) (segundo experimento).



**Figura 2.6.** Experimento de dupla enxertia com plantas LAM 144S infectadas com ToCMoV como porta-enxertos. Plantas LAM 144S como sobre-enxerto e A. Plantas LAM 144S e B. LAM 144R, como enxerto. Avaliação realizada 61 dias após da segunda enxertia por tissue blott do caule do porta-enxerto, enxerto e sobre-enxerto.

#### 4. DISCUSSÃO

A infecção sistêmica de uma planta depende de sucesso em etapas importantes como replicação e movimento viral (a curta e a longa distância) no interior da planta (Carrington et al., 1996, Vuorinen et al., 2011).

De acordo com Niehl & Heinlein (2011) o processo de infecção viral é dependente do balanço estabelecido entre os fatores que são codificados pela hospedeira

e aqueles que são codificados pelos vírus. As interações são bem complexas e a infecção sistêmica muitas vezes é limitada a certa gama de hospedeiras.

As doenças causadas por espécies virais pertencentes ao gênero *Begomovirus* destacam-se por serem responsáveis por causarem grandes perdas econômicas (Seal et al., 2006, Varma and Malathi, 2003).

Uma das opções mais promissoras para controle das doenças causadas por espécies e *Begomovirus* é o desenvolvimento de materiais genéticos com resistência ampla, duradoura e estável seja por melhoramento clássico ou transgenia.

Diferentes genes de resistência de caráter dominante e recessivo têm sido encontrados em acessos selvagens de espécies próximas à espécie cultivada *Solanum lycopersicum*. Vários destes genes já foram mapeados e o primeiro a ser caracterizado e mapeado foi denominado *Ty-1*. O gene *Ty-1* introgridido a partir de *Solanum chilense*, confere resistência a espécies de *Begomovirus* monopartidos do Velho Mundo como o TYLCV e também bipartidos do Novo Mundo como o *Tomato yellow vein streak virus*, *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) como foi demonstrado no capítulo 3 do presente trabalho, entre outras espécies virais (Blawid et al., 2010a, Boiteux et al., 2007, Perez de Castro et al., 2007, Zamir et al., 1994).

Para este estudo avaliou-se a resistência conferida pelo gene *Ty-1* sobre os mecanismos de replicação e movimento viral a longa distância de ToCMoV na linhagem resistente LAM 144R em comparação com a linhagem suscetível LAM 144S.

A replicação dos *Begomovirus* ocorre no núcleo das células infectadas e inicia-se logo após a introdução das partículas virais pelo inseto vetor *Bemisia tabaci* e decapsidação da partícula viral. O vírus se movimenta através do poro nuclear e da

parede celular com a finalidade de atingir células vizinhas e posteriormente aos tecidos vasculares. Para isto, espécies do gênero *Begomovirus* codificam as proteínas de movimento MP e NSP (componente B).

A proteína NSP tem como função servir como veículo de transporte do DNA viral desde o núcleo até o citoplasma e do citoplasma para o núcleo (Guerra-Peraza et al., 2005, Hallan and Gafni, 2001, Kunik et al., 2002, Sanderfoot et al., 1996). A Mp também atua nestes processos de movimento intracelular do núcleo até o citoplasma e citoplasma/núcleo e além disto, a proteína capsidial (CP), codificada a partir do componente A do DNA dos *Begomovirus* também está relacionada ao movimento destas espécies virais na planta. Estudos realizados têm demonstrado que dentro da estrutura da CP, existem sinais de localização celular que interagem com importinas  $\alpha$  para a importação da partícula viral pelos poros nucleares (Lange et al., 2007, Yaakov et al., 2011).

Neste trabalho, a primeira e importante etapa do ciclo de infecção viral, referente à replicação viral foi estudada mediante agroinfiltração apenas do componente A de ToCMoV em plantas da linhagem resistente LAM 144 R e suscetível LAM 144S. A quantificação foi feita aos 0, 2, 6 e 10 dias após as agroinfiltrações por qPCR.

A técnica de PCR em tempo real é amplamente usada para auxiliar na quantificação de uma sequência alvo de DNA e tem sido muito utilizada para estudos de quantificação de begomovírus em plantas e em vetores como, o *Tomato yellow leaf curl – Sardinia virus* (TYLCSV), em tomateiro e em *Bemisia tabaci* (Mason et al., 2008).

Os resultados obtidos para replicação viral demonstraram que não houve uma diferença significativa na carga viral das amostras coletadas aos 0, 2 e 6 dai, no entanto aos 10 dai, o título viral foi significativamente menor nas plantas da linhagem LAM 144R

em comparação com o LAM 144S, mostrando uma quantidade duas vezes menor de carga viral na linhagem resistente (**Figura 2.3**). Estes resultados indicam que até os 6 dias após a inoculação a replicação viral na linhagem resistente apresenta-se similar a replicação na linhagem suscetível, entretanto aos 10 dias já é possível observar um grande diferença na carga viral indicando que o mecanismo de resistência conferido pelo gene *Ty-1* presente em LAM 144R encontra-se atuando. O tempo exato em que o mecanismo de restrição da replicação e/ou acúmulo do DNA viral é desencadeado poderia ser avaliado em estudos futuros através de coletas entre os tempos 6 e 10. Além disto, seria interessante também analisar o comportamento da resistência conferida pelo gene após o tempo 10.

Além do desvio padrão significativo encontrado entre as duas isolinhas, também observou-se um alto desvio entre as amostras da linha LAM 144R que pode ser devido a diferenças na carga viral (durante a agroinfiltração com *Agrobacterium tumefaciens*) inoculada e pelo fato de não se ter a garantia de incorporação plasmidial após a inoculação.

Na literatura outros genes têm sido relacionados à interferência na replicação viral. Como exemplo podemos citar além do gene resesivo *sbm-1* em *Pisum sativa* conferindo resistência a espécie de *Potyvirus* (Johansen et al., 2001), também encontramos o *Rx-1* e *Rx-2* em batata contra o *Potato virus X* (Bendahmane et al., 1997) e *Tm-1* em tomate contra o *Tobacco mosaic virus* (Fraser and Loughlin, 1980).

Estudos realizados levando-se em consideração genes recessivos e resistência a espécies de *Begomovirus* em tomate foram realizados por Almeida (2013) e Bian et al (2007) demonstrando também a atuação dos genes *tcm-1* e *tgr-1* na restrição replicação viral.

Avaliações de protoplastos de LAM 144R e LAM 144S inoculados com ToCMoV-DNA-A poderiam também confirmar os resultados aqui encontrados com relação a menor replicação viral no material resistente. O uso apenas do componente A de ToCMoV na agroinfiltração deve-se ao fato de que a informação genética presente neste componente é responsável pela replicação viral e no componente B os produtos das ‘ORFs’ têm função no movimento viral, entretanto os resultados aqui obtidos não permitem excluir alguma possível interferência proveniente de restrições no movimento a curta distância, tendo em vista principalmente que na literatura, embora raros, encontram-se dois trabalhos mencionando o movimento viral após a inoculação apenas do componente A, do ToCMoV-[MG-Bt]-DNA-A, obtendo como resultado uma infecção sistêmica na ausência do componente B em plantas de *Nicotiana benthamiana*, *Solanum lycopersicum* e *Chenopodium quinoa* (Fontenelle et al., 2007, Galvão et al., 2003). Anteriormente, entretanto, não foi observada a movimentação sistêmica do ToCMoV-[BA-Se-1]-DNA-A (estirpe utilizada neste trabalho) quando inoculado por biobalística na ausência do DNA-B (Ribeiro et al., 2007).

De um modo geral o movimento de um determinado vírus a curta distância é bem lento, da ordem de 1 mm por dia e é realizado de uma célula a outra através de plasmodesmas (Carrington et al., 1996, Oparka et al., 1996, Roberts and Oparka, 2003).

Para determinar o papel de *Ty-1* no movimento a curta distância outros estudos poderão ser conduzidos. Como por exemplo estudos de infecção com os dois componentes de maneira localizada em uma única folha e amostragem em regiões adjacentes ao ponto de inoculação da mesma folha.

Por outro lado para que a infecção sistêmica ocorra é preciso que o vírus alcance os tecidos vasculares. Para a grande maioria dos vírus o movimento é feito seguindo o fluxo de fotoassimilados.

Para determinar a o papel de *Ty-1* no movimento sistêmico ensaios foram realizados através de duplas enxertias conforme já realizado anteriormente por Garcia-cano et al (2010), Bian et al (2007), entre outros.

Os resultados obtidos no experimento do movimento sistêmico mostraram uma restrição do movimento viral através de diferenças exibidas pelas plantas das linhagens LAM 144R e LAM 144S. As diferenças foram avaliadas tendo em conta o tempo de detecção e a intensidade da sinal de hibridização viral de forma diferencial diferencial entre as duas linhagens, no enxerto e sobre-enxerto .

Nas plantas que continham o enxerto correspondente à linhagem LAM 144R, houve um atraso na detecção da infecção viral, que foi possível ser verificada apenas no Southern blot dos produtos da PCR até o 10 dape e dase e com uma intensidade de sinal visualmente mais baixa no em comparação com as plantas com enxerto correspondente á linhagem LAM 144S.

Este resultado indica uma provável restrição do movimento sistêmico inferida pelo gene *Ty-1* desde o enxerto LAM 144R e à sensibilidade das técnicas usadas. Os resultados observados também mostraram uma maior sensibilidade da técnica de Southern blot em comparação com a PCR (**Figura 2.5**)

Os dados das duas repetições dos experimentos são concordantes quanto ao comportamento das linhagens avaliadas.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam o que já foi observado na linhagem 52 de tomateiro com o 'locus' *Ty-1* frente a *Tomato yellow leaf curly virus*

(TYLCV) (Michelson et al., 1994). Outros exemplos de resistência também relacionada à restrição do movimento viral a longa distância pode ser encontrada em linhagens de milho resistentes a *Maize dwarf mosaic virus* - MDMV (Lei and Agrios, 1986), e de tomateiro contendo o gene *tgr-1*, conferindo resistência a TLCV (Bian et al., 2007).

O mecanismo pelo qual o *Ty-1* confere este tipo de resistência (restrição da replicação e movimento sistêmico) ainda não foi elucidado, no entanto estudos desenvolvidos recentemente por Verlaam et al (2013), mostram que o gene *Ty-1* codifica uma RNA-polimerase dependente de RNA, pertencente ao grupo  $\Upsilon$ , que possivelmente pode estar envolvida no processo de silenciamento gênico, promovendo a geração de siRNAs que dirigem principalmente a metilação de DNA e, assim, estimular o silenciamento transcricional do genoma de DNA dos geminivírus. Segundo Verlaam et al (2013), se esta hipótese for verdadeira, isto poderia explicar porque estes genes não conferem resistência (parcial) à maioria dos outros vírus de plantas, que abrigam um genoma de RNA e, assim, não podem ser silenciados transcricionalmente pelo siRNA dirigido via metilação do DNA.

## 5. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos pode-se concluir que a resistência conferida pelo gene *Ty-1* na linhagem LAM 144R ao begomovírus bipartido *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), encontra-se relacionada com a restrição da replicação e do sistêmico dentro da hospedeira, o que torna esta linhagem atraente para uso em programas de melhoramento.

**CAPÍTULO 3. AMPLITUDE DA RESISTÊNCIA CONFERIDA PELO  
GENE *TY-1* PRESENTE NA LINHAGEM LAM 144R À DIFERENTES  
ESPÉCIES DE *BEGOMOVIRUS* BIPARTIDOS**

## RESUMO

Diferentes espécies virais afetam o cultivo do tomateiro, dentre elas merece destaque as espécies de *Begomovirus*. No Brasil até o presente momento todas as espécies de *Begomovirus* infectando o tomateiro apresentam dois componentes genômicos (DNA A e DNA B), sendo denominadas bipartidas. A melhor opção para o controle das espécies de *Begomovirus* e outros patógenos vem sendo o uso de cultivares resistentes através do desenvolvimento de linhagens/híbridos com genes de resistência que permitam ao cultivar superar o efeito do vírus favorecendo a produção. Resistência ampla, durável e estável são alguns requisitos dos programas de melhoramento no desenvolvimento de materiais resistentes, e a resposta para a amplitude da resistência é obtida após avaliações frente a várias espécies virais.

Neste trabalho, para o estudo da resistência conferida pelo gene *Ty-1* na isolinha LAM 144R (resistente), plantas LAM 144R e plantas LAM 144S (suscetível) foram inoculadas via biobalística com quatro espécies de *Begomovirus* bipartidos: *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV). As avaliações foram feitas pela observação de sintomas verificação da acumulação viral por Southern Blot.

As plantas LAM 144R inoculadas com ToCMoV apresentaram resposta caracterizada pela ausência de sintomas e pelo baixo ou indetectável acúmulo de DNA viral. Para ToSRV observou-se ausência de sintomas ou sintomas leves e um baixo acúmulo viral. Para ToRMV poucas plantas apresentaram resposta caracterizada por sintomas leves e não foi detectada acumulação viral. A resposta observada nas plantas inoculadas com TYVSV foi caracterizada por sintomas leves em algumas plantas, e uma

diminuição da acumulação viral. Todas as plantas LAM 144S apresentaram sintomas severos e uma notável acumulação de DNA viral, em resposta à infecção com os diferentes vírus estudados.

**Palavra-chave:** *Begomovirus*, bipartidos, resistência, tomate, biobalística

## ABSTRACT

Different viral species affect tomatoes, among them a large number of *Begomovirus* species. Until now, in Brazil, all *Begomovirus* species infecting tomato are bipartite, having two genomic components, DNA A and DNA B. The best option for the control of *Begomovirus* and other pathogens has been the use of resistant cultivars obtained by developing lines/ hybrids with resistance genes which enable the cultivar to overcome the virus effect, thus favoring production. Broad, durable and stable resistance is an ideal objective of breeding programs aiming the production of resistant cultivars.

To better understand the mechanism of the resistance conferred by the gene *Ty-1* in the resistant LAM 144R line, Thus, plants of LAM 144R and the near isogenic susceptible line LAM 144S were inoculated, with four bipartite *Begomovirus* species: *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) and *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) by biolistics. The assessment of the resistance was made by observing disease symptoms and viral DNA accumulation using Southern blot.

LAM 144R plants inoculated with ToCMoV showed absence of symptoms and low or undetectable viral DNA accumulation. In plants bombarded with ToSRV, there was absence or mild symptoms and low viral accumulation. Few plants showed mild symptoms in response to ToRMV, and viral accumulation was not detected. In plants inoculated with TYVSV mild symptoms were present in some plants that showed reduced viral accumulation. All LAM 144S plants showed severe symptoms and a remarkable accumulation of viral DNA in response to infection with all viruses studied.

Keywords: *Begomovirus*, bipartite, resistance, tomato, biolistic

## 1. INTRODUÇÃO

O tomate [*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.], classificado na família *Solanaceae*, gênero *Solanum* seção *Lycopersicon* (Peralta et al., 2005), é uma das olerícolas mais consumida em todo o mundo podendo ser utilizado para consumo *in natura* ou destinado ao processamento industrial. No Brasil destaca-se sua importância tanto pela área cultivada como pela importância sócio-econômica caracterizando-se como fonte geradora de empregos e por ser uma cadeia agro-industrial competitiva e eficiente (de Melo and Vilela, 2005). O Brasil ocupa a oitava posição no ranking mundial da produção de tomate (FAO, 2011) e o seu cultivo é um dos mais importantes no País, destacando-se regiões produtoras como Goiás como o maior produtor do Centro-Oeste seguido por São Paulo e Minas Gerais (IBGE, 2013).

O cultivo do tomateiro praticamente o ano todo tem propiciado condições favoráveis a vários patógenos, destacando-se as espécies do gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*), que constituem sérios problemas interferindo na produtividade do tomateiro e diversas outras culturas no Brasil e no Mundo (Polston and Anderson, 1999, Morales and Anderson, 2001, Giordano et al., 2005, Varma and Malathi, 2003, Seal et al., 2006, Monci et al., 2002, Briddon, 2003).

Espécies classificados no gênero *Begomovirus* são transmitidos na natureza pelo vetor *Bemisia tabaci* (*B. tabaci* biótipo B = *B. argentifolii*) (França et al., 1996, Bellows et al., 1994, De Barro et al., 2011), vulgarmente conhecido como mosca-branca, e podem apresentar o genoma mono ou bi-segmentados. No caso dos begomovírus bipartidos, no DNA-A encontram-se informações para replicação e encapsidação das partículas virais, enquanto no componente B as informações referem-se ao movimento viral a curta e longa

distância, bem como desenvolvimento de sintomas e gama de hospedeiras (Timmermans et al., 1994, Palmer and Rybicki, 1998).

O complexo de espécies de *Begomovirus* monopartidos, conhecido como ‘Tomato yellow leaf curl disease’ (TYLCD) é considerado o principal fator limitante para a produção de tomate em diversos países (Hanssen et al., 2010, Kasrawi et al., 1988, Laterrot, 1995, Pilowsky and Cohen, 2000, Zakay et al., 1991) mas até o momento, nenhum dos vírus componentes deste complexo foi identificado no Brasil infectando tomateiro (Inoue-Nagata et al., 2004) e para esta cultura todos os vírus identificados são endêmicos e possuem genoma bipartido.

No Brasil, o primeiro relato de *Begomovirus* em tomateiro foi feito ainda na década de 1970 (Costa, 1975), sendo denominado como *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Maytis et al., 1975). Este vírus não apresentou maior importância para o cultivo de tomate na época e somente em 1998 foi novamente relatado, porém em cultivos no Rio de Janeiro (Alfenas et al., 1998). O aumento na incidência de *Begomovirus* em tomate no país ocorreu a partir da entrada do biótipo B de *B. tabaci* no país (Lourenção and Nagai, 1994, Melo, 1992). Nos anos que se seguiram foram feitos relatos de begomovírus infectando tomate no Distrito Federal (Ribeiro et al., 1994), Minas Gerais (Rezende et al., 1996, Zerbini et al., 1996), novamente em São Paulo (Faria et al., 1997) e Rio de Janeiro (Galvão et al., 2003) e no Nordeste (Bezerra et al., 1996, Faria et al., 2000, Ribeiro et al., 1996). Várias espécies novas foram propostas e descritas sugerindo uma alta diversidade genética de *Begomovirus* no país (Ambrozevicius et al., 2002, Ribeiro et al., 2003). Dentre estas espécies podemos citar *Tomato rugose mosaic virus* - ToRMV (Fernandes et al., 2006); *Tomato chorotic mottle virus* - ToCMoV (Ribeiro et al., 2002, Ribeiro et al., 2007), *Tomato yellow spot virus* - ToYSV (Calegario

et al., 2007), *Tomato yellow vein streak virus* - TYVSV e *Tomato severe rugose virus* - ToSRV (Fernandes et al., 2008). Além destas, outras espécies também foram descritas (Ambrozevicius et al., 2002, Ribeiro et al., 2003, Inoue-Nagata et al., 2006, Fernandes-Acioli et al., 2011, Fernanedes-Acioli et al., 2011, Albuquerque et al., 2012, Rocha et al., 2012.)

Devido à grande diversidade de espécies de *Begomovirus* existentes no país, medidas de controle devem ser adotadas em conjunto visando redução do inóculo viral no campo bem como a população do inseto vetor. O uso de produtos químicos para o controle do inseto vetor onera e polui o ambiente e pode conduzir ao rápido desenvolvimento de resistência por parte dos vetores (Horowitz and Ishaaya, 1995).

Neste contexto, a melhor opção para o controle das doenças causadas por espécies de *Begomovirus* seria o uso de cultivares resistentes ao vírus e/ou ao vetor. Vários programas de melhoramento têm sido baseados na introgressão de genes de resistência presentes em espécies de *Solanum* para a espécie cultivada *S. lycopersicum*. Resistência de plantas de tomate ao inseto vetor já foi relatada (Toscano et al., 2002, Muigai et al., 2003). Vários níveis de resistência inicialmente ao TYLCV e também aos isolados brasileiros foram encontrados em *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum habrochaites*, *Solanum peruvianum* e *Solanum chilense* (Ferreira et al., 1999, Pico et al., 1999, Picó et al., 1996, Pilowsky and Cohen, 2000, Pereira- Carvalho, 2009, Santana et al., 2001b).

Estabilidade, durabilidade e resistência ampla são alguns atributos para resistência de plantas a vírus e a outros patógenos. Dessa forma, as principais estratégias do melhoramento têm sido a busca de fontes com estas características e/ou a ‘piramidização’ de diferentes genes de resistência em linhagens elite.

Alguns genes responsáveis por conferir resistência a espécies de *Begomovirus* têm sido descritos como o *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4*, *Ty-5*, *tcm-1*, *tgr-1* e *ty-5* (Anbinder et al., 2009, Bian et al., 2007, Giordano et al., 2005, Hanson et al., 2006, Hanson et al., 2000, Ji et al., 2007, Ji and Scott, 2006, Ji et al., 2009, Laterrot, 1995, Maxwell, 2009, Nakhla et al., 2004, Zamir et al., 1994).

O loco *Ty-1* foi introgridido na espécie cultivada através de cruzamentos com *S. chilense*, e mapeado no cromossomo 6 de tomate (Michelson et al., 1994, Zamir et al., 1994). Acessos dentro de *Solanum chilense* apresentam alto nível de resistência a vários isolados de *Begomovirus* de Israel, França, Flórida e Américas (Zakay et al., 1991). O gene *Ty-1* caracteriza-se por apresentar dominância parcial e ampla resistência a espécies de *Begomovirus* e o seu produto gênico parece relacionar-se com a proteína de movimento viral (célula-a-célula), sendo mais eficiente em condições de baixa pressão de inóculo (Michelson et al., 1994, Zamir et al., 1994, Laterrot, 1995), entretanto estudos recentes mostram que o *Ty-1* codifica para uma RNA polimerase dependente de RNA que pode estar envolvida no silenciamento gênico transcricional (Verlaan et al., 2013).

Recentemente foram obtidas na Embrapa Hortaliças, linhagens quase isogênicas de tomateiro provenientes do mesmo programa de melhoramento para introgressão do loco *Ty-1*. Essas linhagens foram obtidas por SSD (Single seed descendent ou descendente de uma única semente) sendo denominadas LAM 144R (resistente, *Ty-1/Ty-1*) e LAM 144S (suscetível, *ty-1/ty-1*).

A piramidização destes diferentes genes de resistência em uma linhagem ou cultivar é uma estratégia bastante atrativa que permite acumular um conjunto de genes em um único genótipo na tentativa de obter uma resistência durável (Vidavski et al., 2008). Outras características a serem consideradas referem-se à amplitude e estabilidade já mencionadas anteriormente.

Assim, diante da importância da cultura do tomate e da problemática enfrentada com espécies de *Begomovirus* no cultivo do tomate, o objetivo principal do trabalho descrito neste capítulo foi a avaliação da amplitude da resistência encontrada na isolinhagem LAM 144R frente a quatro espécies de begomovírus bipartidos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local de realização dos ensaios.**

Os ensaios foram conduzidos em condições de casa de vegetação e no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga III (LPPIII) na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Distrito Federal.

### **2.2 Origem dos isolados virais**

Todos os isolados virais utilizados foram provenientes da coleção de vírus do LPPIII da Embrapa CENARGEN (produzidos e mantidos sob os cuidados da Dra. Simone da Graça Ribeiro). Foram utilizados clones infecciosos de quatro begomovírus (*Tomato severe rugose virus* - ToSRV, *Tomato yellow vein streak virus* - ToYVSV, *Tomato rugose mosaic virus* - ToRMV e *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV) (Ribeiro et al., 2003, Ribeiro et al., 2006, Ribeiro, 2006). Estes clones estão sendo mantidos em glicerol 20% (-80C), em *Escherichia coli* XL1- blue.

### **2.3 Material vegetal de estudo - linhagem avaliada**

Plantas de LAM 144R e LAM 144S foram geradas a partir de um híbrido denominado Ellen (*Ty-1/ty-1*) pelo uso da técnica SSD (Single Seed Descendent ou descendente de uma única semente) pelo pesquisador Leonardo Silva Boiteux (Embrapa Hortaliças). Esta técnica consiste no avanço de gerações, após cruzamento, coletando-se uma semente por planta a partir da F<sub>2</sub> até a F<sub>5</sub> ou F<sub>6</sub>, sem efetuar seleção nas gerações

iniciais de autofecundações, para aumento de homozigoze nos descendentes e obtenção de linhagens (Cubero, 2003).

#### **2.4 Inoculação viral pelo mecanismo de Biobalística.**

De onze a quatorze plantas de LAM 144R e LAM 144S foram inoculadas com quatro espécies diferentes de *Begomovirus*: *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (Ribeiro et al., 2003, Ribeiro et al., 2006, Ribeiro, 2006) via biobalística com 0.18ug de DNA de cada componente viral por planta (Blawid et al., 2010a, Fontenele et al., 2010). Como controles negativos foram utilizadas plantas resistentes e suscetíveis não inoculadas. Um aparelho que utiliza gás hélio sob alta pressão foi utilizado (**Figura 2**) seguindo a metodologia descrita por Aragão et al (1995).



**Figura 3.** Aparelho de biobalística utilizado para a inoculação de plantas com *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV).

## **2.5 Avaliação dos sintomas**

As avaliações de sintomas nas plantas inoculadas foram realizadas aos 21 e 41 dias após a inoculação (dai).

## **2.6 Avaliação da acumulação de ToCMoV mediante Southern blot**

### **2.6.1 Extração de DNA total das amostras coletadas**

A acumulação viral foi verificada aos 30 dai por Southern blot. Amostras foram coletadas da quarta folha aos 30 dai e o DNA total foi extraído utilizando o método CTAB (Doyle and Doyle, 1987), com algumas modificações. Folhas coletadas foram colocadas em micro tubos (1,5mL) e trituradas em Nitrogênio líquido. Posteriormente procedeu-se a nova maceração após adição de 800uL de tampão CTAB (2%CTAB, 100mM Tris HCl pH 8,0, 50mM NaCl e 0,2 % de 2-β-Mercaptoetanol). A seguir adicionou-se 400uL de clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico, 24:1). Agitou-se vigorosamente utilizando vórtex e as amostras foram incubadas a 54°C por 10min em agitação constante. Em seguida os tubos foram submetidos à centrifugação por 10min a 13.000 rpm. O sobrenadante (700 uL) foi transferido a um tubo novo e adicionou-se 1,2X de isopropanol. Os tubos foram agitados manualmente por inversão e a seguir foram centrifugados a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi lavado com 500 uL etanol 70% e seco a temperatura ambiente. Para ressuspensão do pellet, 50 uL da solução TE-RNase (0,1mM de EDTA, 10mM de Tris-HCl e 0,01ug/ul de RNase) foram adicionados. As amostras foram armazenadas a uma temperatura de -20 até o uso.

### **2.6.2 Southern blot**

O DNA total extraído foi quantificado em Nanodrop (Spectrophotometer, ND-100 da Thermo). Quinze microgramas de DNA total foram separados por eletroforese em

um gel de agarose a 1% . A seguir tratou-se o gel com tampão de desnaturação (1.5M de NaCl e 0.5M de NaOH) e incubou-se a temperatura ambiente por 30 minutos em agitação constante. Após lavar o gel em água procedeu-se a neutralização com tampão (1.5 NaCl e 0.5M Tris pH. 7.5) e incubação por 30 minutos a temperatura ambiente em agitação constante. Repetiu-se o procedimento de lavar o gel em água e os ácidos nucleicos foram transferidos por capilaridade para membrana de nailón (GE Hybond -N+). Como tampão de transferência foi utilizado SSC 20X pH 7-8 (3 M de NaCl; 3M Citrato Trissódico).

Para a detecção viral, foram utilizadas sondas radioativas. O molde utilizado foi uma mistura de fragmentos do DNA-A de ToCMoV e ToRMV obtidos por PCR com os primer PAL1v1978/PARc715. As sondas foram preparadas utilizando o kit Rediprime II Labeling System (GE healthcare) e  $\alpha^{32}\text{PdCTP}$ , de acordo com as instruções do fabricante. A hibridização foi feita com tampão Church modificado a 55°C e as lavagens com SSC 2X, SDS 0,1% e SSC 1X, SDS 0,1% na mesma temperatura. As membranas foram expostas em uma Imaging e plate BAS-MS (FujiFilm) e analisadas em um equipamento Bio Imaging Analyser FLA 3000 (FujiFilm).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Avaliação de sintomas de plantas infectadas com as diferentes espécies de *Begomovirus*

Das onze plantas LAM 144R inoculadas com ToCMoV nenhum sintoma foi observado aos 21 dai (**Figura 3.1 e Tabela 3**). Sintomas leves foram observados aos 41 dai (**Figura 3.1C e Tabela 3**). Observou-se uma baixa acumulação viral em algumas plantas (8) em comparação com suscetível LAM 144S (suscetível) (**Figura 3.5**). As plantas não inoculadas permaneceram assintomáticas até o final do ensaio. Todas as plantas da linhagem LAM 144S apresentaram sintomas aos 21 dai (**Figura 3.1 e Tabela 3**) e os sintomas permaneceram até os 41 dai, período da última avaliação (**Figura 3.1C e Tabela 3**). Foi observada uma alta acumulação de DNA viral (**Figura 3.5**).

Das quatorze plantas de LAM 144R inoculadas com ToRMV, uma planta morreu, três (8,10 e 13) apresentaram sintomas muito leves aos 21 e 41 dai (**Figura 3.2A, Figura 3.2C e Tabela 3**) e não foi detectada acumulação viral aos 30 dai (**Figura 3.6**). Três das quatorze plantas LAM 144S morreram. Oito plantas apresentaram sintomas aos 21 (**Figura 3.2B e Tabela 3**) e 41dai (**Figura 3.2D e Tabela 3**) e apresentaram alta acumulação viral (**Figura 3.7**).

Uma das quatorze plantas de LAM 144R inoculadas com ToSRV morreu, quatro apresentaram sintomas leves, quase imperceptíveis aos 21 e 41 dai (**Figura 3.3A e Tabela 3**) (**Figura 3.3C e Tabela 3**). Uma leve acumulação viral foi observada em 11 plantas (**Figura 3.7**). As plantas não inoculadas permaneceram assintomáticas até o final do ensaio. Uma das quatorze plantas da linhagem LAM 144S morreu e treze apresentaram sintomas característicos de mosaico aos 21 e 41 dai (**Figura 3.3B e Tabela 3**) (**Figura 3.3D e Tabela 3**) e alta acumulação viral observada no Southern blot (**Figura 3.7**).

Cinco das quatorze plantas de LAM 144R inoculadas com ToYVSV apresentaram sintomas tênues (leve amarelecimento) aos 21 dai (**Figura 3.4** e **Tabela 3**) e sete apresentaram sintomas leves aos 41 dai (**Figura 3.4C** e **Tabela 3**). A acumulação viral foi observada em seis destas plantas, sendo que duas delas apresentaram acumulação igual a acumulação viral observada nas plantas suscetíveis (**Figura 3.8**). As plantas não inoculadas permaneceram assintomáticas até o final do ensaio. Doze das quatorze plantas da linhagem LAM 144S apresentaram sintomas aos 21 e 41 dai (**Figura 3.4B** e **Figura 3.4D**, **Tabela 3**) e forte acumulação viral (**Figura 3.8**).

**Tabela 3.** Avaliação aos 21 e 41 dias após a inoculação e estudo de acúmulo viral aos 30 dai nas linhagens LAM 144R e LAM 144S frente à infecção com as espécies de *Begomovirus* bipartido: *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV).

Linhagem	ToCMoV			ToRMV			ToSRV			ToYVSV		
	PS/PI 21dpi	PS/PI 41dpi	PIF/PI 30dpi									
LAM 144S	11/11	11/11	11/11	08/11*	08/11	8/11	13/14	13/14	13/14	12/14	12/14	12/14
LAM 144R	0/11	8/11	8/11	3/13*	3/13	2/13	4/13*	4/13	11/13	5/14	7/14	6/14

\* Uma ou mais plantas mortas

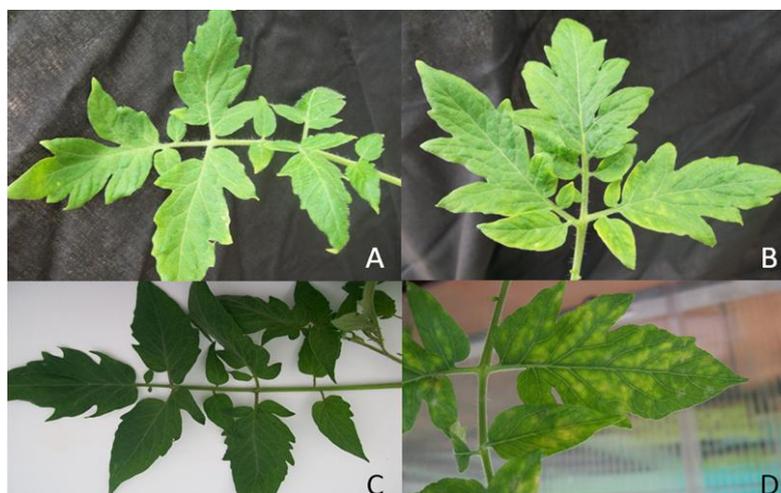
PS: Plantas sintomáticas – avaliação visual

PI: Plantas inoculadas via biobalística

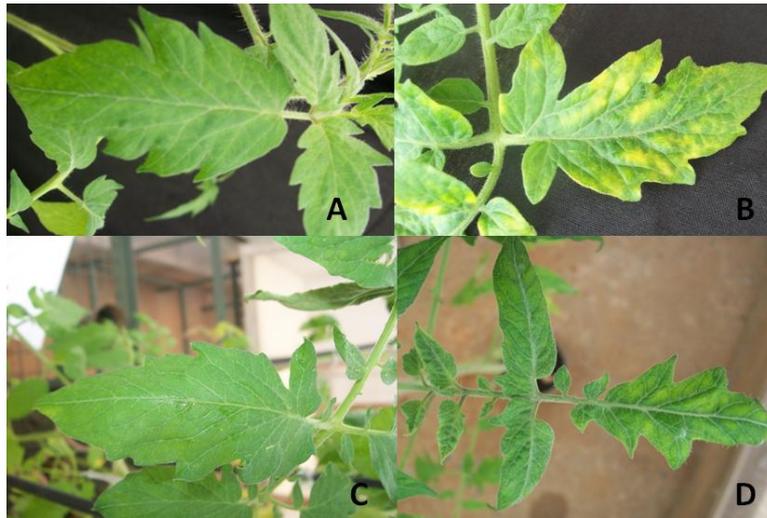
PIF: Plantas infectadas confirmadas mediante Southern blot



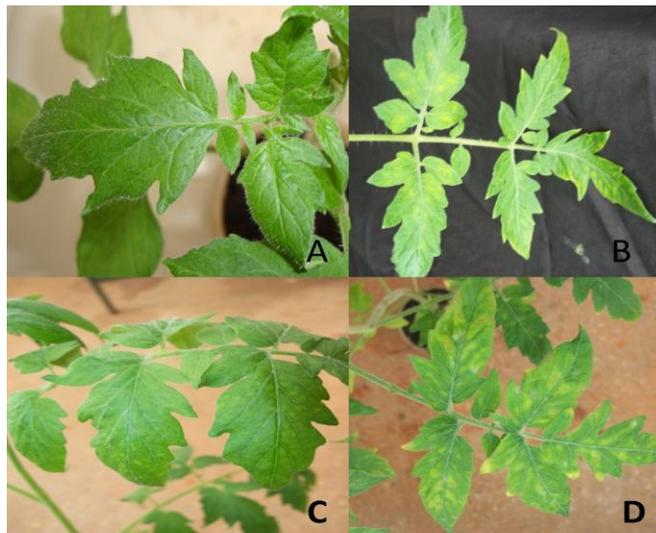
**Figura 3. 1. A-D.** Sintomas apresentados por isolinhas de tomateiro resistente (LAM 144R) e suscetível (LAM 144S) inoculadas com *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV via biobalística. LAM 144R aos 21 dias após inoculação (dai) (A) e 41 dai (C). LAM 144S aos 21 dai (B) e 41 dai (D).



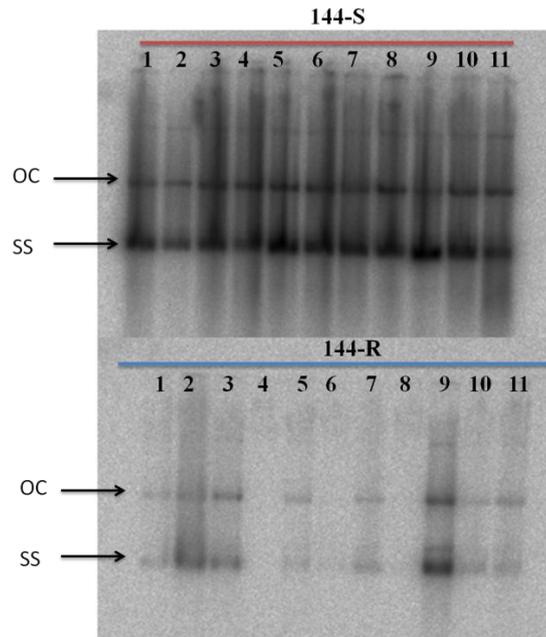
**Figura 3. 2. A-D** Sintomas apresentados por isolinhas de tomateiro resistente (LAM 144R) e suscetível (LAM 144S) inoculadas com *Tomato rugose mosaic virus* - ToRMV via biobalística. LAM 144R aos 21 dias após inoculação (dai) (A) e 41 dai (C). LAM 144S aos 21 dai (B) e 41 dai (D).



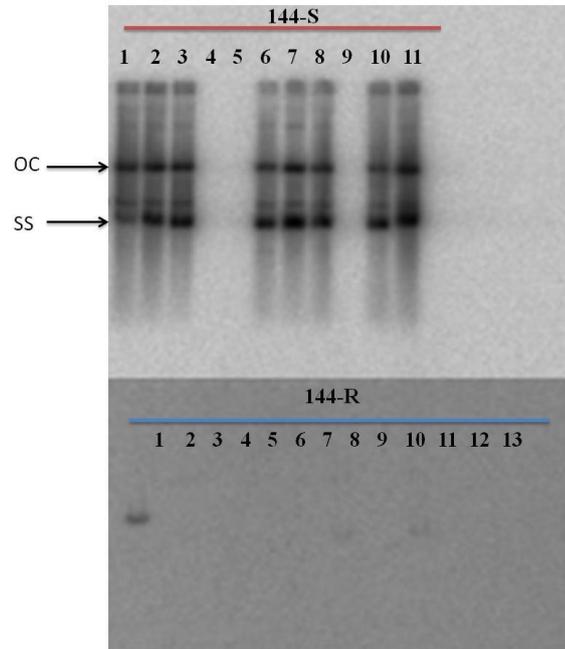
**Figura 3.3.** A-D Sintomas apresentados por isolinhas de tomateiro resistente (LAM 144R) e suscetível (LAM 144S) inoculadas com *Tomato severe rugose virus* - ToSRV via biobalística. LAM 144R aos 21 dias após inoculação (dai) (A) e 41 dai (C). LAM 144S aos 21 dai (B) e 41 dai (D).



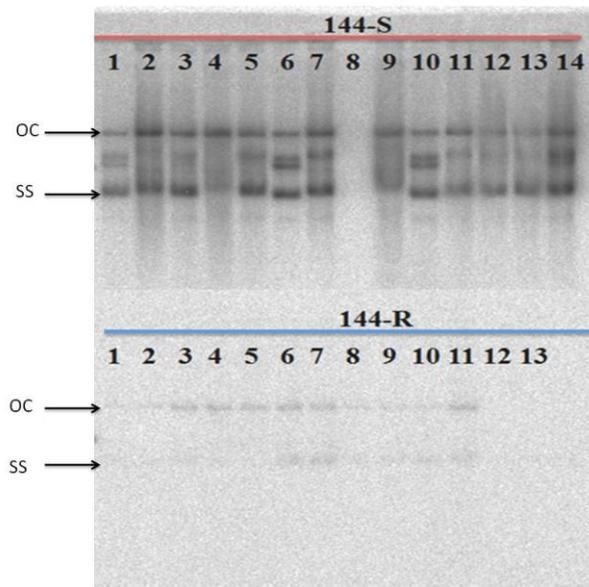
**Figura 3.4.** A-D Sintomas apresentados por isolinhas de tomateiro resistente (LAM 144R) e suscetível (LAM 144S) *Tomato yellow vein streak virus* - ToYVSV via biobalística. LAM 144R aos 21 dias após inoculação (dai) (A) e 41 dai (C). LAM 144S aos 21 dai (B) e 41 dai (D).



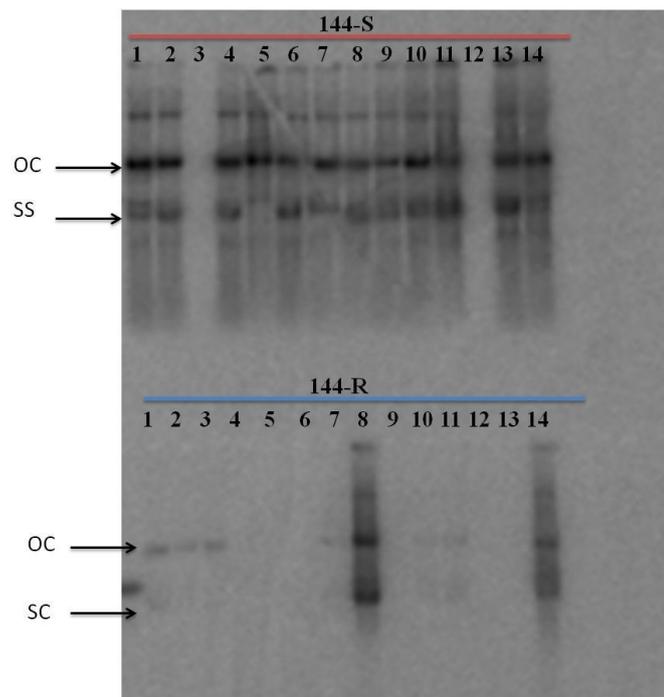
**Figura 3.5.** Análise por Southern blot do acúmulo de DNA-A de *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV em plantas de LAM 144R (resistentes) e LAM 144S (suscetíveis) aos 30 dias após a inoculação. OC: Open circular DNA, SS: single strand DNA.



**Figura 3.6.** Análise por Southern blot do acúmulo de DNA-A de *Tomato rugose mosaic virus* - ToRMV em plantas de LAM 144R (resistentes) e LAM 144S (suscetíveis) aos 30 dias após a inoculação. OC: Open circular DNA, SS: single strand DNA



**Figura 3.7.** Análise por Southern blot do acúmulo de DNA-A de *Tomato severe rugose virus* – ToSRV em plantas de LAM 144R (resistentes) e LAM 144S (suscetíveis) aos 30 dias após a inoculação. OC: Open circular DNA, SS: single strand DNA.



**Figura 3. 8.** Análise por Southern blot do acúmulo de DNA-A de *Tomato yellow vein streak virus* ToYVSV em plantas de LAM 144R (resistentes) e LAM 144S (suscetíveis) aos 30 dias após a inoculação. OC: Open circular DNA, SS: single strand DNA.

#### 4. DISCUSSÃO

As doenças causadas por espécies de *Begomovirus* são as mais importantes doenças virais que afetam a cultura do tomateiro e devido às dificuldades inerentes ao controle do vetor *Bemisia tabaci*, pesquisadores tem concentrado na busca de cultivares resistentes como a melhor forma de controle (Boiteux et al., 2012, Costa, 1974, de Castro-Nizio et al., 2008, Fontenele et al., 2010, Horowitz and Ishaaya, 1995, Hurtado et al., 2012, Pereira- Carvalho, 2009, Pilowsky and Cohen, 1990).

A busca de resistência em acessos selvagens de tomate conduziu a descoberta de genes responsáveis pela resistência a espécies virais classificadas no gênero *Begomovirus*. Marcadores moleculares para vários destes genes já estão disponíveis e alguns deles já foram relatados e usados para identificação dos mesmos em acessos selvagens de tomate como **Ty-1**, **Ty-2** e **Ty-3** (de Castro-Nizio et al., 2008, Vieira et al., 2011, Vieira et al., 2010).

Na literatura vários exemplos de genes são descritos com resistência dominante para várias espécies virais que causam doenças em plantas como, por exemplo, o **Ty-1** introgridido de *S. chilense* em cultivares comerciais, como uma medida de controle pela resistência que confere a diferentes espécies do gênero *Begomovirus*. O uso em programas de melhoramento genético em diferentes países como França, Israel, Itália, Flórida e as Américas caracteriza este gene como uma fonte importante para o controle das doenças causadas por espécies de *Begomovirus* no Mundo (Zakay et al., 1991, Scott et al., 1995). O mapeamento do gene foi realizado no cromossoma 6 e estudos (Zamir et al., 1994) recentes mostraram que o **Ty-3** é considerado como alélico ao **Ty-1** (Verlaan et al., 2013). **Ty-1** localiza-se próximo a outros genes de resistência para outros patógenos

como o gene *Mi* que confere resistência a espécies de *Meloidogine* (Perez de Castro et al., 2007, Pereira-Carvalho et al., 2010).

Em praticamente todos os casos detectou-se DNA viral nos diferentes acessos, entretanto os níveis de acumulação viral foram mais baixos e os sintomas mais leves em acessos provenientes de *S. hirsutum* e *S. chilense* de onde provém **Ty-1** (Zakay et al., 1991).

Para o estudo da amplitude da resistência conferida pelo gene **Ty-1 frente à begomovírus presentes no Brasil**, neste trabalho avaliou-se o acúmulo viral através de *Southern blot* e a manifestação de sintomas em plantas das isolinhas LAM 144R e LAM 144S inoculadas com os vírus: ToCMoV, ToRMV, ToSRV e TYVSV.

Os resultados obtidos mostraram que em geral a LAM 144R apresentou uma resposta caracterizada por uma baixa acumulação viral e sintomas ausentes ou leves em comparação com a linhagem LAM 144S suscetível para todos os vírus avaliados.

A ausência ou presença leve e muitas vezes quase imperceptível dos sintomas nas plantas da linhagem LAM 144R inoculadas com os diferentes vírus estudados pode ser atribuída à tolerância conferida pelo gene *Ty-1* que se encontra de forma homozigota, bem como diferentes pressões de inóculo e características intrínsecas de cada espécie viral.

Estudos anteriores demonstraram que a presença do alelo na forma homozigota suscetível (*ty-1/ty-1*) e homozigota resistente (*Ty-1/Ty-1*) tem uma influência nos sintomas e no grau de infecção. De acordo com Boiteux et al (2007a), em condições de homozigose suscetível, em torno de 95% das plantas estudadas mostraram infecção viral e sintomas característicos, enquanto que em condições de heterozigose, observou-se uma porcentagem de 35% de plantas infectadas e manifestando sintomas. Foi observado

também que em todos esses ensaios, a expressão dos sintomas nos genótipos heterozigotos para o loco **Ty-1** foi mais suave quando comparado aos genótipos suscetíveis (Boiteux et al., 2007). Contudo ao comparar os resultados obtidos entre linhagens homozigotas resistentes e híbridos, foi demonstrado que os genótipos heterozigotos para o loco **Ty-1** exibem sintomas mais brandos que os suscetíveis, porém, mais acentuados do que os homozigotas resistentes. Assim, mesmo algumas plantas homozigotas para o loco **Ty-1** exibiram sintomas de infecção sistêmica (de Castro-Nizio et al., 2008), concordando com nossos resultados.

Nos resultados obtidos no Southern blot, a ausência de bandas em algumas amostras de plantas pertencentes à isolinha suscetível LAM 144S (**Figura 3.6** amostras 4, 5 e 9; **Figura 3.7** amostra 8; **Figura 3.8** amostras 3 e 12) concordam com a ausência de sintomas característicos pela infecção aos 21 dai e 41dai, que pode ser devido a um eventual escape de inoculação.

Algumas exceções onde o acúmulo viral em amostras da isolinha resistente foi quase igual ou maior que na isolinha suscetível, foi observada na amostra 8 e 14 inoculadas com TYVSV (**Figura 3.8**) sendo concordante com os sintomas observados. Devido ao pouco número de plantas (duas) que mostraram este resultado, este efeito pode ter sido em consequência de uma maior pressão de inóculo nestas plantas pois os disparos efetuados pelo equipamento podem não ter sido uniformes e mais partículas com o DNA viral podem ter atingido essas plantas podendo interferir na eficiência da resistência. Um maior número de plantas positivas na avaliação de sintomas da isolinha LAM 144R foi observado com respeito às inoculações realizadas com ToCMoV e ToSRV, o que também pode refletir uma resistência menos eficiente a esses begomovírus nas condições experimentais nas quais desenvolveu-se o trabalho. No entanto é importante ter em conta

que de forma comparativa o acúmulo viral foi menor em relação às plantas da linhagem suscetível.

Os melhores resultados de tolerância e acumulação viral foram observados nas plantas da linha LAM 144R inoculadas como ToRMV (**Figura 3.6**), seguida por ToSRV (**Figura 3.7**). Alguns resultados na literatura concordam com os nossos e outros são discrepantes como por exemplo, os resultados de estudos desenvolvidos com a linhagem TY52 contendo o *Ty-1*, onde a resposta observada foi uma baixa tolerância à infecção com ToSRV (Hurtado et al., 2012). No entanto, este fato pode ser devido a alguma característica biológica distinta entre os isolados de ToSRV utilizados, visto que os isolados utilizados nos dois trabalhos não foram o mesmo. A inoculação do isolado utilizado por Hurtado et al. (2012) na isolinha LAM 144R poderia esclarecer esse ponto.

Em geral os resultados obtidos concordam com publicações anteriores, onde foram estudadas linhagens contendo o gene *Ty-1* (Fontenele et al., 2010, Blawid et al., 2010b, Blawid et al., 2010a), podendo assim concluir que o loco *Ty-1* confere uma resistência de amplo espectro na linhagem LAM 144R, nas condições experimentais testadas, posicionando-a como uma fonte potencial para a geração de cultivares de tomate de mesa comercial, resistente a diferentes espécies virais do gênero *Begomovirus*.

## 5. CONCLUSÕES.

A linhagem LAM 144R como esperado, mostrou-se resistente em comparação com a linhagem LAM 144S, frente à infecção por diferentes espécies virais pertencentes ao gênero *Begomovirus*. A resistência manifestou-se em uma ausência de sintomas ou sintomas leves, e uma baixa acumulação viral a uma ampla gama de espécies de

*Begomovirus*, o que torna esta linhagem atraente para uso em programas de melhoramento.

## CONCLUSOES GERAIS

- A linha LAM 144R que apresenta o gene *Ty-1* apresenta uma ampla resistência refletida em uma ausência de sintomas ou sintomas leves, e uma baixa acumulação viral a uma gama de espécies de *Begomovirus* constituída por ToCMoV, ToRMV, ToSRV e TYVSV.

- A resistência conferida pelo gene *Ty-1* na linhagem LAM 144R encontra-se relacionada com a restrição da replicação e movimento sistêmico dentro da hospedeira frente a infecção com ToCMoV.

- O presente trabalho representou importantes resultados indicando uma promissora fonte de resistência contra importantes espécies do complexo de *Begomovirus* bipartidos presentes na cultura do tomateiro no Brasil.

## **PERSPECTIVAS**

- Avaliar a replicação viral durante amostragem realizadas a partir do dia 6<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup> dpi e após o 10<sup>o</sup> dpi.
- Realizar o sequenciamento e estudo da expressão gênica do gene *Ty-1* na isolinha LAM 144R.

## BIBLIOGRAFIA

ABSEM. 2010. *Tomate lidera crescimento e lucratividade no setor de hortaliças* [Online]. Available: <http://www.abcsem.com.br/noticia.php?cod=284> [Accessed 22 janeiro 2013].

ADAMS, M., ZERBINI, F., FRENCH, R., RABENSTEIN, F., STENGER, D. & VALKONEN, J. 2011a. Family *Potyviridae*. *Virus taxonomy, 9th report of the International Committee for Taxonomy of Viruses*. San Diego-USA: Elsevier Academic Press, .

ADAMS, M. J., HEINZE, C., JACKSON, A. O., KREUZE, J. F., MACFARLANE, S. A. & ORRANCE, L. 2011b. Family *Virgaviridae*. In: AMQ, K., ADAMS, M. J., CARSTENS, E. B. & ELLIOT, J. M. (eds.) *Virus taxonomy. 9th report of the International Committee for Taxonomy of Viruses*. San Diego Elsevier Academic Press.

ADAMS, M. J., KING, A. M. Q. & CARSTENS, E. B. 2013. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Archives of Virology*, 1-8.

ALBUQUERQUE, L. C., CARRIJO, F. R. F., GIORDANO, L. B., BOITEUX, L. S., ÁVILA, A. C., FONSECA, M. E. N., NAGATA, T. & INOUE-NAGATA, A. K. 2004. A new begomovirus species in tomato crop in central Brazil. Nova espécie de begomovirus em plantios de tomate no Brasil Central. *Fitopatologia Brasileira*. , 29, 218-219.

ALBUQUERQUE, L. C., INOUE-NAGATA, A. K., PINHEIRO, B., RIBEIRO, S. G., RESENDE, R. O., MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2011. A novel monopartite begomovirus infecting sweet potato in Brazil. *Archives of Virology*, 156, 1291-1294.

ALBUQUERQUE, L. C., VARSANI, A., FERNANDES, F. R., PINHEIRO, B., MARTIN, D. P., DE TARSO OLIVEIRA FERREIRA, P., LEMOS, T. O. & INOUE-NAGATA, A. K. 2012. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, 1-6.

ALFENAS, P., GALVÃO, R., ANDRADE, E., MANDELLI, M., FERNANDES, A., ZERBINI, F. & FONTES, E. 1998. Detecção e caracterização molecular de novos geminivírus que infectam tomates. *Fitopatologia Brasileira*, 23, 311.

ALMEIDA, L. M. 2013. *Replicação e movimento diferencial de ToCMoV e perfil de expressão de microRNAs em linhas resistentes e suscetíveis de tomateiro*. Mestrado, Universidade de Brasília.

AMBROZEVICIUS, L. P., CALEGARIO, R. F., FONTES, E. P. B., G, C. M. & ZERBINI, F. M. 2002. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 27, 372-377.

ANBINDER, I., REUVENI, M., AZARI, R., PARAN, I., NAHON, S., SHLOMO, H., CHEN, L., LAPIDOT, M. & LEVIN, I. 2009. Molecular dissection of *Tomato leaf curl virus* resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 119, 519-530.

ANDRADE, E. C., ALAFENAS ZERBINI, P., MANHANI, G. G., CALEGARIO, R. F., LIMA, A. T. M., FONTES, E. P. B. & ZERBINI, F. M. 2007. *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil with a recombinant origin, is capable of forming viable pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida* sp. *International Geminivirus Symposium. International ssDNA Comparative Virology Workshop*. Ouro Preto, MG.: UFV.

ARAGÃO, F., REACH, E., BRASIELEIRO, A. & CANEIRO, V. 1998. Biobalística. in: *Brasileiro, ACM; Carneiro, VTC., Manual de transformação genética de plantas*. Brasília. Embrapa/SPI, 51-64.

ARAGÃO, F. J. L., BRASILEIRO, A. C. M., RIBEIRO, S. G., FARIA, J. & RECH, E. L. 1995. Inoculation of bean and soybean with cloned bean golden mosaic virus (BGMV) DNA using particle acceleration. *Fitopatologia Brasileira*, 20 642-644.

ARAMBURU, J. & MARTI, M. 2003. The occurrence in north-east Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the Sw-5 gene. *Plant Pathology*, 52, 407-407.

AZZAM, O., FRAZER, J., DE LA ROSA, D., BEAVER, J., AHLQUIST, P. & MAXWELL, D. 1994. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology*, 204, 289-296.

BARBOSA, J., TEIXEIRA, A., MOREIRA, A., CAMARGO, L., FILHO, A. B., KITAJIMA, E. & REZENDE, J. 2008. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Brazil. *Plant Disease*, 92, 1709-1709.

BAUMANN, P. 2005. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 155-189.

BEDFORD, I., BRIDDON, R., BROWN, J., ROSELL, R. & MARKHAM, P. 2008. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Annals of Applied Biology*, 125, 311-325.

BELLOWS, T., PERRING, T. M., GILL, R. & HEADRICK, D. 1994. Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 195-206.

BENDAHMANE, A., KANYUKA, K. & BAULCOMBE, D. 1997. High-resolution genetical and physical mapping of the Rx gene for extreme resistance to *Potato virus X* in tetraploid potato. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 153-162.

BEZERRA, I., RIBEIRO, S., ÁVILA, A. & GIORDANO, L. 1996. Survey of geminivirus infection in tomato producing areas in Federal District. *VIII Encontro Nacional de Virologia. São Lourenço, MG.*

BIAN, X.-Y., THOMAS, M. R., RASHEED, M. S., SAEED, M., HANSON, P., DE BARRO, P. J. & REZAIAN, M. A. 2007. A recessive allele (*tgr-1*) conditioning tomato resistance to geminivirus infection is associated with impaired viral movement. *Phytopathology*, 97, 930-937.

BISARO, D. M. 1996. Geminivirus DNA replication. *DNA Replication in Eukaryotic Cells*, 33, 833-854.

BLAWID, R., FONTENELE, R., LACORTE, C., PEREIRA-CARVALHO, R. C., RESENDE, R. O., BOITEUX, L. S., FONSECA, M. E. N., BRASILEIRO, A. C. M. & RIBEIRO, S. G. 2011. Real-time qPCR as a tool for the Quantification of *Tomato chlorosis mottle virus* (ToCMoV) in susceptible and resistant tomato lines. *III Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas*. Ilhéus.: Abstract III Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas.

BLAWID, R., FONTENELE, R. S., LACORTE, C., PEREIRA-CARVALHO, R. C., RESENDE, R. O., BOITEUX, L. S., FONSECA, M. E. N. & RIBEIRO, S. G. 2010a. Resistência ampla de linhagens de tomateiro contendo os loci *tcm-1* e *Ty-1* a begomovirus bipartidos. *43º Congresso Brasileiro de Fitopatologia*. Cuiabá: Tropical Plant Pathology (Suplemento).

BLAWID, R., FONTENELE, R. S., LACORTE, C. C., PEREIRA-CARVALHO, R. C., RESENDE, R. O., BOITEUX, L. S., FONSECA, M. E. N. & RIBEIRO, S. G. 2010b. Resistência ampla de linhagens de tomateiro contendo os loci *tcm-1* e *Ty-1* a begomovirus bipartidos. *43º Congresso Brasileiro de Fitopatologia*. Cuiabá: Tropical Plant Pathology (Suplemento).

BOITEUX, L. S., DE NORONHA FONSECA, M. E., VIEIRA, J. V. & DE CÁSSIA PEREIRA-CARVALHO, R. 2012. Breeding for Resistance to Viral Diseases. *Plant Breeding for Biotic Stress Resistance*. Springer.

BOITEUX, L. S., OLIVEIRA, V. R., SILVA, C. H., MAKISHIMA, N., INOUE-NAGATA, A. K., FONSECA, M. E. D. N. & GIORDANO, L. D. B. 2007. Reaction of tomato hybrids carrying the *Ty-1* locus to Brazilian bipartite Begomovirus species. *Horticultura Brasileira*, 25, 20-23.

BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. 1998. *Manual de transformação genética de plantas*, Serviço de Produção de Informação-SPI.

BRIDDON, R. & MARKHAM, P. 2001. Complementation of bipartite begomovirus movement functions by Topocuviruses and Curtoviruses. *Archives of Virology*, 146, 1811-1819.

BRIDDON, R., PINNER, M., STANLEY, J. & MARKHAM, P. 1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*, 177, 85-94.

BRIDDON, R. W. 2003. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology*, 4, 427-434.

BRIDDON, R. W. & STANLEY, J. 2006 Sub-viral agents associated with plant-infecting single-stranded DNA viruses. *Virology* 344, 198–210.

BRIDDON, R. W. & STANLEY, J. 2009. *Geminiviridae. Encyclopedya of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chischester.

BROWN, J., FAUQUET, C., BRIDDON, R., ZERBINI, F., MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2011. Family *Geminiviridae*. In: KING AMQ, ADAMS AJ, CARSTENS EB & (EDS), L. E. (eds.) *Virus taxonomy. 9th report of the international committee on taxonomy of viruses*. . San Diego: Elsevier Academic Press.

BROWN, J. K. 2007. The *Bemisia tabaci* complex: genetic and phenotypic variability drives *Begomovirus* spread and virus diversification. *APSnet Feature Story January*.

CALEGARIO, R. F., FERREIRA, S. D. S., ANDRADE, E. C. D. & ZERBINI, F. M. 2007. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 42, 1335-1343.

CARRINGTON, J. C., KASSCHAU, K. D., MAHAJAN, S. K. & SCHAAD, M. C. 1996. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *The Plant Cell*, 8, 1669.

CASTILLO-URQUIZA, G. P., BESERRA, J. E. A., BRUCKNER, F. P., LIMA, A. T., VARSANI, A., ALFENAS-ZERBINI, P. & MURILO ZERBINI, F. 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology*, 153, 1985-1989.

CASTILLO, A. G., COLLINET, D., DERET, S., KASHOGGI, A. & BEJARANO, E. R. 2003. Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (Ren) and viral replication protein (Rep). *Virology*, 312, 381-394.

CERVERA, M., CABEZAS, J., SIMON, B., MARTINEZ-ZAPATER, J., BEITIA, F. & CENIS, J. 2000. Genetic relationships among biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on AFLP analysis. *Bulletin of Entomological Research*, 90, 391-396.

CHANNARAYAPPA, C., SHIVASHANKAR, G., MUNIYAPPA, V. & FRIST, R. 1992. Resistance of *Lycopersicon* species to *Bemisia tabaci*, a tomato leaf curl virus vector. *Canadian Journal of Botany*, 70, 2184-2192.

CHEN, L.-F. 2008. *Investigation of curtovirus-plant-insect vector interactions/ Role of the acquisition host and pathway of virus movement through the beet leafhopper vector*, University of California, Davis.

CHOWDA REDDY, R., MUNIYAPPA, V., COLVIN, J. & SEAL, S. 2005. A new begomovirus isolated from *Gossypium barbadense* in Southern India. *Plant Pathology*, 54, 570-570.

CIUFFO, M., FINETTI-SIALER, M., GALLITELLI, D. & TURINA, M. 2005. First report in Italy of a resistance-breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* infecting tomato cultivars carrying the *Sw-5* resistance gene. *Plant Pathology*, 54, 564-564.

COHEN, S. & ANTIGNUS, Y. 1994. *Tomato yellow leaf curl virus*, a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. *Advances in disease vector research*, 10, 259-288.

COLARICCIO, A. 2005. *O impacto das viroses na cultura do tomateiro* [Online]. Available: <http://www.feagri.unicamp.br/tomates/pdfs/impacviros.pdf> [Accessed Janeiro 2013].

COLARICCIO, A., BERGMANN, J. C., EIRAS, M., CHAVES, A. L., CHAGAS, C. M. & ZERBINI, F. M. 2006. *Tomato rugose mosaic virus* in tomato crops in São Paulo State, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 31, 606-606.

COLARICCIO, A., CHAVES, A. L. R., EIRAS, M., CHAGAS, C. M., CASTRO, L. C. & SCHROEDER, A. L. 2000. Identificação do *Tomato spotted wilt tospovirus* em tomateiro no Estado de Santa Catarina. *Arquivos do Instituto Biológico*, 67, 86.

COLARICCIO, A., CHAVES, A. L. R., EIRAS, M., CHAGAS, C. M., FRANGIONI, D. S. S. & PAVAN, M. A. 2001a. Ocorrência do *Groundnut ringspot virus* em pimentão no Estado de São Paulo. *Summa phytopatológica*, 27, 323-325.

COLARICCIO, A., EIRAS, M., CHAVES, A., BERGMANN, J., ZERBINI, F., HAKAKAVA, R. & CHAGAS, C. 2007. *Tomato yellow vein streak virus*, a new begomovirus on tomato from Brazil: complete DNA-A sequence and some molecular and biological features. *Journal of Plant Pathology*, 89, 385-390.

COLARICCIO, A., SOUZA-DIAS, J., CHAGAS, C., SAWAZAKI, H., CHAVES, A. & EIRAS, M. 2001b. Novo surto de geminivirus em *Lycopersicon esculentum* na região de Campinas, SP. *Summa Phytopatologica, Jaboticabal*, 27, 105.

CONTI, M., GALLITELLI, D., V.LISA, LOVISOLO, O., MARTELLI, G. P., RAGOZZINO, A., RANA, G. L. & VOVLAS, C. 2001. Principales Virus de Las Plantas Hortícolas. *In: MUNDI-PRENSA, E. (ed.)*.

COOPER, J. I. & JONES, A. T. 1983. Responses of plants to viruses: proposal for the use of terms. *Phytopathology* 73, 127-128.

COSTA, A. 1974. Molestias de tomateiro no Brasil transmitidas pela mosca branca *Bemisia tabaci*. *Fitopatologia*, 9.

COSTA, A. Year. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legume crops in Brazil. *In: Tropical diseases of legumes.*, 1975. Academic Press, 27-49.

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

CRAWFORD, K. M. & ZAMBRYSKI, P. C. 2001. Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. *Plant physiology*, 125, 1802-1812.

CRONIN, S., VERCHOT, J., HALDEMAN-CAHILL, R., SCHAAD, M. C. & CARRINGTON, J. C. 1995. Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *The Plant Cell Online*, 7, 549-559.

CUBERO, J. I. 2003. *Introducción a la Mejora Genética Vegetal* España, Mundi Prensa.

CUI, X., LI, G., WANG, D., HU, D. & ZHOU, X. 2005. A *Begomovirus* DNA  $\beta$ -Encoded Protein Binds DNA, Functions as a Suppressor of RNA Silencing, and Targets the Cell Nucleus. *Journal of Virology*, 79, 10764-10775.

CZOSNEK, H., KHEYR-POUR, A., GRONENBORN, B., REMETZ, E., ZEIDAN, M., ALTMAN, A., RABINOWITCH, H., VIDAUSKY, S., KEDAR, N. & GAFNI, Y. 1993. Replication of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCSV) DNA in agroinoculated leaf discs from selected tomato genotypes. *Plant Molecular Biology*, 22, 995-1005.

DARWIN, S. C., KNAPP, S. & PERALTA, I. E. 2003. Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). *Systematics and Biodiversity*, 1, 29-53.

DAVIDSON, A., KELLER, F. & TURGEON, R. 2011. Phloem loading, plant growth form, and climate. *Protoplasma*, 248, 153-163.

DE ÁVILA, A. C., INOUE-NAGATA, A. K., COSTA, H., BOITEUX, L. S., NEVES, L. O. Q., PRATES, R. S. & BERTINI, L. A. 2004. Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. *Horticultura Brasileira*, 22, 655-658.

DE BARRO, P., TRUEMAN, J. & FROHLICH, D. 2005. *Bemisia argentifolii* is a race of *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae): the molecular genetic differentiation of *B. tabaci* populations around the world. *Bulletin of Entomological Research*, 95, 193-203.

DE BARRO, P. D. 1995. *Bemisia tabaci* biotype B: A review of its biology, distribution and control. *CSIRO Australia Division of Entomology Technical Paper*.

DE BARRO, P. J., DRIVER, F., TRUEMAN, J. W. & CURRAN, J. 2000. Phylogenetic Relationships of World Populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) Using Ribosomal ITS1. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16, 29-36.

DE BARRO, P. J., LIU, S.-S., BOYKIN, L. M. & DINSDALE, A. B. 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual review of entomology*, 56, 1-19.

DE CAMARGO FILHO, W. P., SUEYOSHI, M. L. S. & DE CAMARGO, A. M. M. P. 1994. Evolução da produção de tomate no Brasil. *Agricultura em São Paulo*, 41, 41.

DE CASTRO-NIZIO, D. A., MALUF, W. R., DOS REIS FIGUEIRA, A., NOGUEIRA, D. W., DE FÁTIMA SILVA, V. & NETO, Á. C. G. 2008. Caracterização de genótipos de tomateiro resistentes a begomovírus por marcador molecular co-dominante ligado ao gene *Ty-1*. *Pesq. agropec. bras., Brasília*, 43, 1699-1705.

DE HAAN, P., WAGEMAKERS, L., PETERS, D. & GOLDBACH, R. 1989. Molecular cloning and terminal sequence determination of the S and M RNAs of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of General Virology*, 70, 3469-3473.

DE MELO, P. C. T. & VILELA, N. J. 2005. Desafios e perspectivas para a cadeia brasileira do tomate para processamento industrial. *Hortic. bras*, 23.

DIANESE, É. C., RESENDE, R. O. & INOUE-NAGATA, A. K. 2008. Alta incidência de *Pepper yellow mosaic virus* em tomateiro em região produtora no Distrito Federal. *Tropical Plant Pathology*, 33, 67-68.

DO ESPÍRITO SANTO, E. N. 2003. TOMATES: PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO NO MUNICÍPIO DE CHAPECÓ, SC. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, 20, 161-180.

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

ESPINOSA, W. 1991. *Manual de Produção de tomate industrial no vale do São Fransisco*, Brasília.

ESQUINAS ALCÁZAR, J. & NUEZ, F. 1995. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. In: MUNDI-PRENSA, E. (ed.) in: Nuez, F., *El cultivo del Tomate*. 1ª edición ed. Madrid España.

FAO. 2011. <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=es> [Online]. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Accessed 23 janeiro 2013 2013].

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

FARIA, J., SOUZA-DIAS, J., SLACK, S. & MAXWELL, D. 1997. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease*, 81, 423-423.

FAUQUET, C. & STANLEY, J. 2005. 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.

FERNANDES-ACIOLI, N. A. N., FONSECA, M. E. N., PEREIRA-CARVALHO, R. C., FONTENELE, R. S., LACORTE, C., RIBEIRO, S. G. & BOITEUX, L. S. 2011. Sequencia completa do DNA-A de uma nova espécie de *Begomovirus* infectando tomateiro no Estado do Tocantins, Brazil. . *XLIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia*. Bento Gonçalves - RS.: Tropical Plant Pathology.

FERNANDES, F. R., DE ALBUQUERQUE, L. C., DE BRITTO GIORDANO, L., BOITEUX, L. S., DE ÁVILA, A. C. & INOUE-NAGATA, A. K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus genes*, 36, 251-258.

FERNANDES, J., CARVALHO, M., ANDRADE, E., BROMMONSCHENKEL, S., FONTES, E. & ZERBINI, F. 2006. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting *Begomovirus* from Brazil. *Plant Pathology*, 55, 513-522.

FERNANDES, N. A. N. 2010. Variabilidade genômica e geográfica de espécies de begomovírus em tomateiro e em dois gêneros de plantas daninhas no Brasil. *Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil*

FERNANDES, N. A. N. 2011. Variabilidade genômica e geográfica de espécies de begomovírus em tomateiro e em dois gêneros de plantas daninhas no Brasil.

FERNANDES-ACIOLI, N. A. N., FONSECA, M. E. N., PEREIRA-CARVALHO, R. C., FONTENELE, R. S., LACORTE, C., RIBEIRO, S. G., REIS, A. & BOITEUX, L. S. 2011. Registro no Estado do Amazonas de um novo *Begomovirus* do tomateiro relacionado com espécies virais da América Central e Caribe. . *XLIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia*. Bento Gonçalves - RS. : Tropical Plant Pathology.

FERREIRA, P. T. O., BEZERRA, I. C., VILLAS BÔAS, G. L., RIBEIRO, S. G. & GIORDANO, L. B. 1999. Avaliação de fontes de resistência a isolado de geminivírus com genoma bipartido transmitido por *Bemisia argentifolli* em *Lycopersicon* spp. . *Fitopatologia Brasileira* 24, 131-135.

FERREIRA, P. T. O., LESMOS, T. O., FERNANDES, F. R. & INOUE-NAGATA, A. K. 2007. *Tomato golden vein vírus*-new Begomovirus from Brazil. *International Geminivirus Symposium & International ssDNA Comparative Virology Workshop*. Ouro Preto, MG: UFV.

FINLAY, K. 1953. Inheritance of spotted wilt resistance in the tomato II. Five genes controlling spotted wilt resistance in four tomato types. *Australian journal of biological sciences*, 6, 153-163.

FLETCHER, J. F. 1992. *Compendium of Tomato Diseases*, Minnesota, APS Press (The American Pathological Society Press)

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

FONTENELE, R. S., BLAWID, R., LACORTE, C. C., PEREIRA-CARVALHO, R. C., RESENDE, R. O., BOITEUX, L. S., FONSECA, M. E. N. & RIBEIRO, S. G. 2010. Seleção de isolinhas de tomateiro resistentes a *Begomovirus* para

estudos de transcriptoma e proteoma. *43º Congresso Brasileiro de Fitopatologia*. Cuiabá: Tropical Plant Pathology (Suplemento).

FONTENELLE, M. R., LUZ, D. F., GOMES, A. P. S., FLORENTINO, L. H., ZERBINI, F. M. & FONTES, E. P. 2007. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus *Tomato chlorotic mottle virus*. *Virus Research*, 126, 262-267.

FONTES, E., EAGLE, P. A., SIPE, P. S., LUCKOW, V. A. & HANLEY-BOWDOIN, L. 1994. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 8459-8465.

FONTES, P. C. R. & SILVA, D. J. H. 2002. *Produção de tomate de mesa*, Viçosa.

FRANÇA, F., VILLAS BÔAS, G. & BRANCO, M. C. 1996. Occurrence of *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) in the Federal District. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 25, 369-372.

FRANCO, C. M., FERNANDES, F. R., ALBUQUERQUE, L. B., GIORDANO, L. B., BOITEUX, L. S. & INOUE-NAGATA, A. K. 2007. Molecular characterization of the bipartite begomovirus *Tomato mottle leaf curl virus* isolate DFM, from Brazil. *International Geminivirus Symposium & International ssDNA Comparative Virology Workshop*. Ouro Preto, M.G: UFV.

FRASER, R. & LOUGHLIN, S. 1980. Resistance to *Tobacco mosaic virus* in tomato: effects of the *Tm-1* gene on virus multiplication. *Journal of General Virology*, 48, 87-96.

FRISCHMUTH, S., WEGE, C., HÜLSER, D. & JESKE, H. 2007. The movement protein BC1 promotes redirection of the nuclear shuttle protein BV1 of *Abutilon mosaic geminivirus* to the plasma membrane in fission yeast. *Protoplasts*, 230, 117-123.

FUENTES, S. & SALAZAR, L. 2003. First report of *Sweet potato leaf curl virus* in Peru. *Plant Disease*, 87, 98-98.

GAFNI, Y. & EPEL, B. L. 2002. The role of host and viral proteins in intra-and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiological and molecular plant pathology*, 60, 231-241.

GALVÃO, R. M., MARIANO, A. C., LUZ, D. F., ALFENAS, P. F., ANDRADE, E. C., ZERBINI, F. M., ALMEIDA, M. R. & FONTES, E. P. 2003. 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, 715-726.

GARCIA-CANO, E. 2008. La Resistencia Como Estrategia de Control de Virus Causante de Amarillos en Tomate. . *Tesis Doctoral*. Málaga: Universidad de Malaga.

GARCÍA-CANO, E., NAVAS-CASTILLO, J., MORIONES, E. & FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. 2010. Resistance to *Tomato chlorosis virus* in wild tomato species that impair virus accumulation and disease symptom expression. *Phytopathology*, 100, 582-592.

GARCÍA-CANO, E., RESENDE, R., BOITEUX, L., GIORDANO, L., FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. & MORIONES, E. 2008. Phenotypic expression, stability, and inheritance of a recessive resistance to monopartite begomoviruses associated with tomato yellow leaf curl disease in tomato. *Phytopathology*, 98, 618-627.

GILBERTSON, R. L., SUDARSHANA, M., JIANG, H., ROJAS, M. R. & LUCAS, W. J. 2003. Limitations on geminivirus genome size imposed by plasmodesmata and virus-encoded movement protein: insights into DNA trafficking. *The Plant Cell Online*, 15, 2578-2591.

GIORDANO, L., SILVA-LOBO, V., SANTANA, F., FONSECA, M. & BOITEUX, L. 2005. Inheritance of resistance to the bipartite Tomato chlorotic mottle begomovirus derived from *Lycopersicon esculentum* cv. 'Tyking'. *Euphytica*, 143, 27-33.

GIORDANO, L. D. B., BEZERRA, I., FERREIRA, P. & BORGES NETO, C. Year. Breeding tomatoes for resistance to whitefly-transmitted geminivirus with bipartite genome in Brazil. *In: VI International Symposium on Processing Tomato & Workshop on Irrigation & Fertigation of Processing Tomato* 487, 1998. 357-360.

GOTTLIEB, Y., GHANIM, M., CHIEL, E., GERLING, D., PORTNOY, V., STEINBERG, S., TZURI, G., HOROWITZ, A. R., BELAUSOV, E. & MOZES-DAUBE, N. 2006. Identification and Localization of a *Rickettsia* sp. in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3646-3652.

GOTTLIEB, Y., ZCHORI-FEIN, E., MOZES-DAUBE, N., KONTSEDALOV, S., SKALJAC, M., BRUMIN, M., SOBOL, I., CZOSNEK, H., VAVRE, F. & FLEURY, F. 2010. The transmission efficiency of *Tomato yellow leaf curl virus* by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. *Journal of virology*, 84, 9310-9317.

GUERRA-PERAZA, O., KIRK, D., SELTZER, V., VELUTHAMBI, K., SCHMIT, A., HOHN, T. & HERZOG, E. 2005. Coat proteins of *Rice tungro bacilliform virus* and *Mungbean yellow mosaic virus* contain multiple nuclear-localization signals and interact with importin  $\alpha$ . *Journal of General Virology*, 86, 1815-1826.

GUEVARA-GONZÁLEZ, R., RAMOS, P. & RIVERA-BUSTAMANTE, R. 1999. Complementation of coat protein mutants of pepper huasteco geminivirus in transgenic tobacco plants. *Phytopathology*, 89, 540-545.

GUTIERREZ, C. 1999. Geminivirus DNA replication. *Cellular and molecular life sciences*, 56, 313-329.

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

HA, C., COOMBS, S., REVILL, P., HARDING, R., VU, M. & DALE, J. 2008. Molecular characterization of *Begomoviruses* and DNA satellites from Vietnam:

additional evidence that the New World geminiviruses were present in the Old World prior to continental separation. *Journal of General Virology*, 89, 312-326.

HALLAN, V. & GAFNI, Y. 2001. *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) capsid protein (CP) subunit interactions: implications for viral assembly. *Archives of virology*, 146, 1765-1773.

HANLEY-BOWDOIN, L., ELMER, J. S. & ROGERS, S. G. 1990. Expression of functional replication protein from *Tomato golden mosaic virus* in transgenic tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 1446-1450.

HANSON, P., GREEN, S. & KUO, G. 2006. *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Tomato Genetics Coop Rep*, 56, 17-18.

HANSON, P. M., BERNACCHI, D., GREEN, S., TANKSLEY, S. D., MUNIYAPPA, V., PADMAJA, A. S., CHEN, H.-M., KUO, G., FANG, D. & CHEN, J.-T. 2000. Mapping a wild tomato introgression associated with *Tomato yellow leaf curl virus* resistance in a cultivated tomato line. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125, 15-20.

HANSSEN, I. M., LAPIDOT, M. & THOMMA, B. P. 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23, 539-548.

HARRISON, B., SWANSON, M. & FARGETTE, D. 2002. *Begomovirus* coat protein: serology, variation and functions. *Physiological and molecular plant pathology*, 60, 257-271.

HASSAN, A., MAZYAD, H., MOUSTAFA, S. & NAKHLA, M. 1982. Assessment of *Tomato yellow leaf curl virus* resistance in the genus *Lycopersicon* [Egypt]. *Egyptian Journal of Horticulture*, 9.

HASSAN, A. A., MAZYAD, H. M., MOUSTAFA, S. E., NAKLA, M. K. & SIMS, W. L. 1984. Inheritance of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* derived from *Lycopersicon cheesmanii* and *Lycopersicon hirsutum*. *Hortscience* 19, 574-575.

HEHNLE, S., WEGE, C. & JESKE, H. 2004. Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. *Journal of virology*, 78, 7698-7706.

HERNÁNDEZ-ZEPEDA, C., VARSANI, A. & BROWN, J. K. 2013. Intergeneric recombination between a new, spinach-infecting curtovirus and a new geminivirus belonging to the genus Becurtovirus: first New World exemplar. *Archives of Virology*, 1-10.

HEYRAUD, F., MATZEIT, V., KAMMANN, M., SCHAEFER, S., SCHELL, J. & GRONENBORN, B. 1993a. Identification of the initiation sequence for viral-strand DNA synthesis of wheat dwarf virus. *The EMBO journal*, 12, 4445.

HEYRAUD, F., MATZEIT, V., SCHAEFER, S., SCHELL, J. & GRONENBORN, B. 1993b. The conserved nonanucleotide motif of the geminivirus stem-loop sequence promotes replicational release of virus molecules from redundant copies. *Biochimie*, 75, 605-615.

HÖFER, P., BEDFORD, I. D., MARKHAM, P. G., JESKE, H. & FRISCHMUTH, T. 1997. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology*, 236, 288-295.

HORMUZDI, S. G. & BISARO, D. M. 1995. Genetic analysis of beet curly top virus: examination of the roles of L2 and L3 genes in viral pathogenesis. *Virology*, 206, 1044-1054.

HOROWITZ, A. & ISHAAYA, I. 1995. Chemical control of Bemisia-management and application. *Gerling D, Mayer RT (eds), Bemisia: Taxonomy, biology, damage, control and management*.

HULL, R. 2002. Induction of disease 1: Virus movement through the plant and effects on plant metabolism. *Matthew's plant virology, 4th edn, Academic Press, San Diego*, 373-436.

HURTADO, F. D., GIL, M. A., ZUBIAUR, Y. M., AGUILERA, J. G., XAVIER, C. A. D., JUNIOR, F. M. Z. & DA SILVA, D. J. H. 2012. Fontes de resistência em tomateiro aos begomovírus bissegmentados *Tomato yellow spot virus* e *Tomato severe rugose virus*. *Hortic. bras*, 30.

HUTTON, S. F., SCOTT, J. W. & SCHUSTER, D. J. 2012. Recessive resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from the tomato cultivar Tyking is located in the same region as *Ty-5* on chromosome 4. *HortScience*, 47, 324-327.

IBGE. 2013. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*. [Online]. Available: <http://www.ibge.gov.br/home/>. [Accessed 20/02/2013.].

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

INOUE-NAGATA, A. K., MARTIN, D. P., BOITEUX, L. S., GIORDANO, L. D. B., BEZERRA, I. C. & ÁVILA, A. C. D. 2006. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 41, 1329-1332.

INOUE-NAGATA, A. K., NAVAS-CASTILLO, J., MELO, P. C. D. & ÁVILA, A. C. D. 2004. Survey on *Tomato yellow leaf curl virus* and *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* in tomatoes. *Horticultura Brasileira*, 22, 799-800.

ISHIKAWA, H. 1984. Characterization of the protein species synthesized *in vivo* and *in vitro* by an aphid endosymbiont. *Insect biochemistry*, 14, 417-425.

JESKE, H. 2009. Geminiviruses. *TT Viruses*, 185-226.

JI, Y., SCHUSTER, D. J. & SCOTT, J. W. 2007. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding*, 20, 271-284.

JI, Y. & SCOTT, J. 2006. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus linked to *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. *Rep. Tomato Genet. Coop*, 56, 22-25.

JI, Y., SCOTT, J. W., SCHUSTER, D. J. & MAXWELL, D. P. 2009. Molecular mapping of *Ty-4*, a new *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus on chromosome 3 of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134, 281-288.

JOHANSEN, I. E., LUND, O. S., HJULSAGER, C. K. & LAURSEN, J. 2001. Recessive resistance in *Pisum sativum* and potyvirus pathotype resolved in a gene-for-cistron correspondence between host and virus. *Journal of virology*, 75, 6609-6614.

JONES, D. R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 195-219.

JUHÁSZ, A. C. P., JÚNIOR, F. M. Z. & HENRIQUES, D. J. Identificação de fonte de resistência ao *Potyvirus* PepYMV em tomateiro.

KASRAWI, M. & MANSOUR, A. 1994. Genetics of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato. *Journal of Horticultural Science*, 69, 1095-1100.

KASRAWI, M., SUWWAN, M. A. & MANSOUR, A. 1988. Sources of resistance to *Tomato yellow leaf curly virus* (TYLCV) in *Lycopersicon* species. *Euphytica*, 37, 61-64.

KASRAWI, M. A. 1989. Inheritance of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* in *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Plant Disease* 73, 435-437.

KASSCHAU, K. D., XIE, Z., ALLEN, E., LLAVE, C., CHAPMAN, E. J., KRIZAN, K. A. & CARRINGTON, J. C. 2003. P1/HC-Pro, a Viral Suppressor of RNA Silencing, Interferes with *Arabidopsis* Development and miRNA Function. *Developmental cell*, 4, 205-217.

KING, A. M. Q., LEFKOWITZ, E., ADAMS, M. J. & CARSTENS, E. B. 2011. *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier.

KLAASSEN, V. A., BOESHORE, M. L., KOONIN, E. V., TIAN, T. & FALK, B. W. 1995. Genome structure and phylogenetic analysis of *Lettuce infectious yellows virus*, a whitefly-transmitted, bipartite *Closterovirus*. *Virology*, 208, 99-110.

KOONIN, E. V. & ILYINA, T. V. 1992. Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. *The Journal of general virology*, 73, 2763.

KUNIK, T., PALANICHELVAM, K., CZOSNEK, H., CITOVSKY, V. & GAFNI, Y. 2002. Nuclear import of the capsid protein of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in plant and insect cells. *The Plant Journal*, 13, 393-399.

KUNIK, T., SALOMON, R., ZAMIR, D., NAVOT, N., ZEIDAN, M., MICHELSON, I., GAFNI, Y. & CZOSNEK, H. 1994. Transgenic tomato plants expressing the *Tomato yellow leaf curl virus* capsid protein are resistant to the virus. *Nature biotechnology*, 12, 500-504.

LANFERMEIJER, F. C., WARMINK, J. & HILLE, J. 2005. The products of the broken *Tm-2* and the durable *Tm-22* resistance genes from tomato differ in four amino acids. *Journal of experimental Botany*, 56, 2925-2933.

LANGE, A., MILLS, R. E., LANGE, C. J., STEWART, M., DEVINE, S. E. & CORBETT, A. H. 2007. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin  $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 282, 5101-5105.

LATERROT, H. 1995. Breeding network to create tomato varieties resistant to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). *Fruits*, 50, 478-480.

LAUFS, J., JUPIN, I., DAVID, C., SCHUMACHER, S., HEYRAUD-NITSCHKE, F. & GRONENBORN, B. 1995. Geminivirus replication: genetic and biochemical characterization of Rep protein function, a review. *Biochimie*, 77, 765-773.

LAZAROWITZ, S. G. & BEACHY, R. N. 1999. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *The Plant Cell Online*, 11, 535-548.

LAZAROWITZ, S. G. & SHEPHERD, D. R. J. 1992. Geminiviruses: genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 11, 327-349.

LE GALL, O., ARANDA, M. A. & CARANTA, C. 2011. Plant resistance to viruses mediated by translation initiation factors. *Recent Advances in Plant Virology*, 177-194.

LEI, J. & AGRIOS, G. 1986. Mechanisms of resistance in corn to *Maize dwarf mosaic virus*. *Phytopathology*, 76, 1034-1040.

LI, Z.-X., LIN, H.-Z. & GUO, X.-P. 2007. Prevalence of *Wolbachia* infection in *Bemisia tabaci*. *Current microbiology*, 54, 467-471.

LIVIERATOS, I., ELIASCO, E., MÜLLER, G., OLSTHOORN, R., SALAZAR, L., PLEIJ, C. & COUTTS, R. 2004. Analysis of the RNA of *Potato yellow vein virus*: evidence for a tripartite genome and conserved 3'-terminal structures among members of the genus *Crinivirus*. *Journal of General Virology*, 85, 2065-2075.

LOURENÇÃO, A. L. & NAGAI, H. 1994. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. *Bragantia*, 53.

LOURENÇÃO, A. L., SIQUEIRA, W. J., MELO, A. M. T., PALAZZO, S. R. L., MELO, P. C. T. & COLARICCIO, A. 2005. Resistência de cultivares e linhagens de tomateiro a *Tomato chlorotic spot virus* ea *Potato virus Y*. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 609-614.

MACIEL-ZAMBOLIM, E., COSTA, H., CAPUCHO, A., ÁVILA, A. C., INOUE-NAGATA, A. K. & KITAGIMA, E. 2004. Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região serrana do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*, 29, 325-327.

MALLORY, A. C., ELY, L., SMITH, T. H., MARATHE, R., ANANDALAKSHMI, R., FAGARD, M., VAUCHERET, H., PRUSS, G., BOWMAN, L. & VANCE, V. B. 2001. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *The Plant Cell Online*, 13, 571-583.

MARÍN, F. M. 2004. *Búsqueda de estrategias de control frente a los Begomovirus que afectan a tomate y judía en España: tesis doctoral*, Universidad de Córdoba.

MARKHAM, P. G., BEDFORD, I. D., LIU, S. & PINNER, M. S. 2006. The transmission of geminiviruses by *Bemisia tabaci*. *Pesticide Science*, 42, 123-128.

MARTELLI, G., AGRANOVSKY, A., BAR-JOSEPH, M., BOSCIA, D., CANDRESSE, T., COUTTS, R., DOLJA, V., FALK, B., GONSALVES, D. & JELKMANN, W. 2002. The family *Closteroviridae* revised. *Archives of Virology*, 147, 2039-2044.

MARTELLI, G., AGRANOVSKY, A., BAR-JOSEPH, M., BOSCIA, D., CANDRESSE, T., COUTTS, R., DOLJA, V., HU, J., JELKMANN, W., KARASEV, A., MARTIN, R., MINAFRA, A., NAMBA, S. & VETTEN, H. 2011. Family *Closteroviridae*. In: KING, A., ADAMS, M., CARSTENS, E. & LEFKOWITZ, E. (eds.) *Virus taxonomy. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. New York: Elsevier,.

MASON, G., CACIAGLI, P., ACCOTTO, G. P. & NORIS, E. 2008. Real-time PCR for the quantitation of *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* in tomato plants and in *Bemisia tabaci*. *Journal of virological methods*, 147, 282-289.

MAXWELL, D. P. 2009. Introgression at 81 cM on chromosome 3 associated with Gc171. in <http://www.plantpath.wisc.edu/GeminivirusResistantTomatoes/Markers/P3-81.pdf> accessed janeiro 2013.

MAYTIS, J., SILVA, D., OLIVEIRA, A. & COSTA, A. 1975. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica*, 1.

MCCULLAGH, P. & NELDER, J. A. 1989. *Generalized linear model*, Chapman & Hall/CRC.

MELO, P. 1992. Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Campinas, SP, Brazil: Asgrow do Brasil Sementes Ltda. *Technical Bulletin*.

MESHI, T., MOTOYOSHI, F., MAEDA, T., YOSHIWOKA, S., WATANABE, H. & OKADA, Y. 1989. Mutations in the tobacco mosaic virus 30-kD protein gene overcome *Tm-2* resistance in tomato. *The Plant Cell Online*, 1, 515-522.

MICHELSON, I., ZAMIR, D. & CZOSNEK, H. 1994. Accumulation and translocation of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gene *Ty-1*. *Phytopathology*, 84, 928-933.

MONCI, F., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. 2002. 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.

MORALES, F. J. & ANDERSON, P. K. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, 146, 415-441.

MORÁN, Y., RAMOS, P., DOMÍNGUEZ, M., FUENTES, A., SÁNCHEZ, Y. & CRESPO, J. 2006. Tobacco leaf curl Cuba virus, a new begomovirus infecting tobacco (*Nicotiana tabacum*) in Cuba. *Plant Pathology*, 55, 570-570.

MOREIRA, S. R., EIRAS, M., CHAVES, A. L. R., GALLETI, S. R. & COLARICCIO, A. 2003. Caracterização de uma nova estirpe do *Tomato mosaic virus* isolada de tomateiro no Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira, Brasília*, 28, 602-607.

MORIN, S., GHANIM, M., SOBOL, I. & CZOSNEK, H. 2000. The GroEL Protein of the Whitefly *Bemisia tabaci* Interacts with the Coat Protein of Transmissible and Nontransmissible Begomoviruses in the Yeast Two-Hybrid System. *Virology*, 276, 404-416.

MORIN, S., GHANIM, M., ZEIDAN, M., CZOSNEK, H., VERBEEK, M. & VAN DEN HEUVEL, J. F. 1999. A GroEL Homologue from Endosymbiotic Bacteria of the Whitefly *Bemisia tabaci* Is Implicated in the Circulative Transmission of Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Virology*, 256, 75-84.

MUHIRE, B., MARTIN, D. P., BROWN, J. K., NAVAS-CASTILLO, J., MORIONES, E., ZERBINI, F. M., RIVERA-BUSTAMANTE, R., MALATHI, V., BRIDDON, R. W. & VARSANI, A. 2013. A genome-wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the genus *Mastrevirus* (family *Geminiviridae*). *Archives of Virology*, 1-14.

MUIGAI, S., BASSETT, M., SCHUSTER, D. & SCOTT, J. 2003. Greenhouse and field screening of wild *Lycopersicon* germplasm for resistance to the whitefly *Bemisia argentifolii*. *Phytoparasitica*, 31, 27-38.

NAGATA, T., DE ÁVILA, A. C., TAVARES, P. C. D. M., BARBOSA, C. D. J., JULIATTI, F. C. & KITAJIMA, E. W. 1995. Occurrence of different tospoviruses in six states of Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 20, 90-95.

NAKHLA, M., SORENSEN, A., MEJÍA, L., RAMÍREZ, P., KARKASHIAN, J. & MAXWELL, D. Year. Molecular characterization of tomato-infecting begomoviruses in Central America and development of DNA-based detection methods. *In: I International Symposium on Tomato Diseases* 695, 2004. 277-288.

NASH, T. E., DALLAS, M. B., REYES, M. I., BUHRMAN, G. K., ASCENCIO-IBANEZ, J. & HANLEY-BOWDOIN, L. 2011. Functional analysis of a novel motif conserved across geminivirus Rep proteins. *Science Signalling*, 85, 1182.

NIEHL, A. & HEINLEIN, M. 2011. Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma*, 248, 75-99.

NIRGIANAKI, A., BANKS, G. K., FROHLICH, D. R., VENETI, Z., BRAIG, H. R., MILLER, T. A., BEDFORD, I. D., MARKHAM, P. G., SAVAKIS, C. & BOURTZIS, K. 2003. *Wolbachia* infections of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Current microbiology*, 47, 93-101.

NOUEIRY, A. O., LUCAS, W. J. & GILBERTSON, R. L. 1994. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, 76, 925-932.

OHNESORGE, S. & BEJARANO, E. 2009. Begomovirus coat protein interacts with a small heat-shock protein of its transmission vector (*Bemisia tabaci*). *Insect molecular biology*, 18, 693-703.

OPARKA, K., ROBERTS, A., ROBERTS, I., PRIOR, D. & CRUZ, S. 1996. Viral coat protein is targeted to, but does not gate, plasmodesmata during cell-to-cell movement of potato virus X. *The Plant Journal*, 10, 805-813.

OROZCO, B. M. & HANLEY-BOWDOIN, L. 1998. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 24448-24456.

PADIDAM, M., BEACHY, R. N. & FAUQUET, C. M. 1996. The role of AV2 (“precoat”) and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology*, 224, 390-404.

PALMER, K. E. & RYBICKI, E. P. 1998. The molecular biology of *Mastreviruses*. *Advances in virus research*, 50, 183-234.

PAPROTKA, T., BOITEUX, L., FONSECA, M., RESENDE, R., JESKE, H., FARIA, J. & RIBEIRO, S. 2010. Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. *Virus Research*, 149, 224-233.

PARRELLA, G., RUFFEL, S., MORETTI, A., MOREL, C., PALLOIX, A. & CARANTA, C. 2002. Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 105, 855-861.

PERALTA, I. E., KNAPP, S. & SPOONER, D. M. 2005. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany*, 30, 424-434.

PERALTA, I. E., KNAPP, S. & SPOONER, D. M. 2006. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *TGC Report*, 56, 6-12.

PEREIRA- CARVALHO, R. C. 2009. Expressão fenotípica e mecanismos de ação de genes envolvidos na resistência ampla e begomovírus monopartidos e bipartidos em tomate: Tesis de Doutorado. Universidade de Brasília.

PEREIRA-CARVALHO, R., BOITEUX, L., FONSECA, M., DÍAZ-PENDÓN, J., MORIONES, E., FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R., CHARCHAR, J. & RESENDE, R. 2010. Multiple resistance to *Meloidogyne* spp. and to bipartite and monopartite *Begomovirus* spp. in wild *Solanum* (*Lycopersicon*) accessions. *Plant Disease*, 94, 179-185.

PEREIRA-CARVALHO, R. C., BOITEUX, L. S., NOGUEIRA, I., FERNANDES-ACIOLI, N. A. N. & FONSECA, M. E. N. 2011. Evaluation of tomato germplasm reaction to *Tomato chlorosis virus*. *XLIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia*. Bento Gonçalves RS: Tropical Plant Pathology (Suplemento),.

PEREZ DE CASTRO, A., BLANCA, J. M., DÍEZ, M. J. & NUEZ VINALS, F. 2007. Identification of a CAPS marker tightly linked to the Tomato yellow leaf curl disease resistance gene *Ty-1* in tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 117, 347-356.

PICO, B., DÍEZ, M. J. & NUEZ, F. 1999. Improved diagnostic techniques for *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato breeding programs. *Plant Disease*, 83, 1006-1012.

PICÓ, B., DÍEZ, M. J. & NUEZ, F. 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The *Tomato yellow leaf curl virus*—a review. *Scientia Horticulturae*, 67, 151-196.

PIETERSEN, G. & SMITH, M. F. 2002. *Tomato yellow leaf curl virus* resistant tomatoes show resistance to *Tomato curly stunt virus*. *Plant Disease*, 86, 528-534.

PILOWSKY, M. & COHEN, S. 1990. Tolerance to *Tomato yellow leaf curl virus* derived from *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Disease*, 74, 248.

PILOWSKY, M. & COHEN, S. 2000. Screening additional wild tomatoes for resistance to the whitefly-borne *Tomato yellow leaf curl virus*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22, 351-353.

PLYUSNIN, A., BEATY, B., ELLIOTT, R., GOLDBACH, R., KORMELINK, R., LUNDKVIST, Å., SCHMALJOHN, C. & TESH, R. 2011. Bunyaviridae. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses—Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, Elsevier, 693-709.

POLSTON, J. E. & ANDERSON, P. K. 1999. Surgimiento y distribución de geminivirus transmitidos por mosca blanca en tomate en el Hemisferio Occidental. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 53.

REZENDE, E., FILGUEIRA, F., ZERBINI, F., MACIEL-ZAMBOLIM, E., FERNANDES, J. & GILBERTSON, R. 1996. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 21, 424.

RIBEIRO, S., AMBROZEVICIUS, L., ÁVILA, A., BEZERRA, I., CALEGARIO, R., FERNANDES, J., LIMA, M., DE MELLO, R., ROCHA, H. & ZERBINI, F. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil\*. *Archives of Virology*, 148, 281-295.

RIBEIRO, S., BEZERRA, I., LIMA, M., ÁVILA, A. & GIORDANO, L. 1996. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. *VIII Encontro Nacional de Virologia (Resumos)*. São Lourenço, MG: SBV.

RIBEIRO, S., INOUE-NAGATA, A., DANIELS, J. & DE AVILA, A. 2006. Potato deforming mosaic disease is caused by an isolate of *Tomato yellow vein streak virus*. *Plant Pathology*, 55, 569-569.

RIBEIRO, S., MELO, L., BOITEUX, L., KITAJIMA, E. & FARIA, J. 1994. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 19, 330.

RIBEIRO, S. G. 2006. *Diversity and host interactions of emerging tomato begomoviruses in Brazil*. PhD, Wageningen University.

RIBEIRO, S. G., LACORTE, C., INOUE-NAGATA, A. K., CARMO, I., ORLANDINI, D., NAGATA, T. & ZERBINI, F. M. 2002. *Tomato chlorotic mottle virus: a novel tomato begomovirus from Brazil / Tomato chlorotic mottle virus: um novo begomovirus em tomateiros no Brasil*. *Fitopatologia Brasileira*, 27, 211-211.

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

RIECHMANN, J. L., LAÍN, S. & GARCÍA, J. A. 1992. Highlights and prospects of *Potyvirus* molecular biology. *Journal of General Virology*, 73, 1-16.

ROBERT, E., BUCK, K. & COUTTS, R. 1986. A new geminivirus infecting potatoes in Venezuela. *Plant Disease*, 70, 603.

ROBERTS, A. & OPARKA, K. 2003. Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant, Cell & Environment*, 26, 103-124.

ROCHA, C. S., XAVIER, C. A. D., LIMA, A. T. M., SILVA, F. N. & ZERVINI, F. M. 2012. . Molecular characterization of the begomovirus *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV). . *virus Reviews and Research*, 16.

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

RODRÍGUEZ-NEGRETE, E., LOZANO-DURÁN, R., PIEDRA-AGUILERA, A., CRUZADO, L., BEJARANO, E. R. & CASTILLO, A. G. 2013. Geminivirus Rep protein interferes with the plant DNA methylation machinery and suppresses transcriptional gene silencing. *New Phytologist*.

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

ROJAS, M. R., HAGEN, C., LUCAS, W. J. & GILBERTSON, R. L. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 361-394.

ROUHIBAKHSH, A. & MALATHI, V. 2005. Severe leaf curl disease of cowpea—a new disease of cowpea in northern India caused by *Mungbean yellow mosaic India virus* and a satellite DNA  $\beta$ . *Plant Pathology*, 54, 259-259.

SANDERFOOT, A. A., INGHAM, D. J. & LAZAROWITZ, S. G. 1996. A Viral Movement Protein as a Nuclear Shuttle (The Geminivirus BR1 Movement Protein Contains Domains Essential for Interaction with BL1 and Nuclear Localization). *Plant Physiology*, 110, 23-33.

SANDERFOOT, A. A. & LAZAROWITZ, S. G. 1995. Cooperation in viral movement: the geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *The Plant Cell Online*, 7, 1185-1194.

SANDERFOOT, A. A. & LAZAROWITZ, S. G. 1996. Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends in cell biology*, 6, 353-358.

SANTANA, F., DA GRAÇA RIBEIRO, S., WILLIAMS MOITA, A., MOREIRA, D. J. & DE BRITO GIORDANO, L. 2001a. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. *Euphytica*, 122, 45-51.

SANTANA, F. M., DA GRAÇA RIBEIRO, S., MOITA, A. W., MOREIRA JR, D. J. & DE BRITO GIORDANO, L. 2001b. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. *Euphytica*, 122, 45-51.

SAUNDERS, K., NORMAN, A., GUCCIARDO, S. & STANLEY, J. 2004 The DNA  $\beta$ - satellite component associated with ageratum yellow vein disease encodes an essential pathogenicity protein ( $\beta$ C1). *Virology*, 324, 37-47.

SCHOLTHOF, K. B. G., ADKINS, S., CZOSNEK, H., PALUKAITIS, P., JACQUOT, E., HOHN, T., HOHN, B., SAUNDERS, K., CANDRESSE, T. & AHLQUIST, P. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 12, 938-954.

SCOTT, J., STEVENS, M., BARTEN, J., THOME, C., POLSTON, J., SCHUSTER, D. & SERRA, C. 1995. Introgression of resistance to whitefly-transmitted geminiviruses from *Lycopersicon chilense* to tomato. *Bemisia*, 357-367.

SEAL, S., VANDENBOSCH, F. & JEGER, M. 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25, 23-46.

SERUBOMBWE, W., BRIDDON, R., BAGUMA, Y., SSEMAKULA, G., BULL, S., BUA, A., ALICAI, T., OMONGO, C., OTIM-NAPE, G. & STANLEY, J. 2008. Diversity of begomoviruses associated with mosaic disease of cultivated cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its wild relative (*Manihot glaziovii* Müll. Arg.) in Uganda. *Journal of General Virology*, 89, 1759-1769.

SILBERSCHMIDT, K. 1937. A doença "vira-cabeca" do fumo. *O Biológico*, 3, 183-184.

SNIPPE, M., WILLEM BORST, J., GOLDBACH, R. & KORMELINK, R. 2007. *Tomato spotted wilt virus* Gc and N proteins interact *in vivo*. *Virology*, 357, 115-123.

SOTO, M. J. & GILBERTSON, R. L. 2003. Distribution and rate of movement of the curtovirus *Beet mild curly top virus* (family *Geminiviridae*) in the beet leafhopper. *Phytopathology*, 93, 478-484.

SOUZA-DIAS, J., SAWAZAKI, H., PERNAMBUCO-FO, P., ELIAS, L. & MALUF, H. 2008. Tomato severe rugose virus: another begomovirus causing leaf deformation and mosaic symptoms on potato in Brazil. *Plant Disease*, 92, 487-487.

SOUZA-DIAS, J., YUKI, V., RIBEIRO, S. & RAVAGNANE, V. 1996. Risca amarela da nervura do tomateiro é causada por geminivirus que infecta batata. *Summa Phytopathologica*, 22.

SOUZA, J. & REIS, P. 2003. Principais pragas do tomate para mesa: bioecologia, dano e controle. *Informe Agropecuário*, 24, 79-92.

STANLEY, J., LATHAM, J. R., PINNER, M. S., BEDFORD, I. & MARKHAM, P. G. 1992. Mutational analysis of the monopartite geminivirus beet curly top virus. *Virology*, 191, 396-405.

STENGER, D. 2002. Genus *Curtovirus*. Springer-Verlag Index of Plant Viruses.

STEVENS, M., SCOTT, S. & GERGERICH, R. 1991. Inheritance of a gene for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica*, 59, 9-17.

SUNTER, G. & BISARO, D. M. 1991. Transactivation in a geminivirus: *AL2* gene product is needed for coat protein expression. *Virology*, 180, 416-419.

SUNTER, G., HARTITZ, M. D. & BISARO, D. M. 1993. *Tomato golden mosaic virus* leftward gene expression: autoregulation of geminivirus replication protein. *Virology*, 195, 275-280.

SUNTER, G., HARTITZ, M. D., HORMUZDI, S. G., BROUGH, C. L. & BISARO, D. M. 1990. Genetic analysis of *Tomato golden mosaic virus*: ORF *AL2* is required for coat protein accumulation while ORF *AL3* is necessary for efficient DNA replication. *Virology*, 179, 69-77.

TAKEDA, A., SUGIYAMA, K., NAGANO, H., MORI, M., KAIDO, M., MISE, K., TSUDA, S. & OKUNO, T. 2002. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS letters*, 532, 75-79.

THAO, M. L. & BAUMANN, P. 2004. Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3401-3406.

TIMMERMANS, M. C., DAS, O. P. & MESSING, J. 1994. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. *Annual review of plant biology*, 45, 79-112.

TOSCANO, L. C., BOIÇA JR, A. L. & MARUYAMA, W. I. 2002. Nonpreference of whitefly for oviposition in tomato genotypes. *Scientia Agricola*, 59, 677-681.

TURGEON, R. 1989. The sink-source transition in leaves. *Annual review of plant biology*, 40, 119-138.

VARMA, A. & MALATHI, V. 2003. Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology*, 142, 145-164.

VARMA, A. & MALATHI, V. 2003 Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* . 142, 145-164.

VERLAAN, M. G., HUTTON, S. F., IBRAHEM, R. M., KORMELINK, R., VISSER, R. G., SCOTT, J. W., EDWARDS, J. D. & BAI, Y. 2013. The *Tomato yellow leaf curl virus* Resistance Genes *Ty-1* and *Ty-3* Are Allelic and Code for DFDGD-Class RNA-Dependent RNA Polymerases. *PLoS genetics*, 9, e1003399.

VIANA, J., CARRIJO, J. & LACORTE, C. 2012. Infiltração de plantas de *Nicotiana Benthamiana* com *Agrobacterium* utilizando vácuo: Expressão de GFP como modelo para a produção de proteínas heterólogas em plantas. . In: *XVII Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*. Brasília - DF. : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

VIDAVSKI, F., CZOSNEK, H., GAZIT, S., LEVY, D. & LAPIDOT, M. 2008. Pyramiding of genes conferring resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from different wild tomato species. *Plant Breeding*, 127, 625-631.

VIEIRA, B. G., FONTENELE, R. S., NOGUEIRA, I., COSTA, F., BLAWID, R., PEREIRA- CARVALHO, R. C., RO, R., BOITEUX, L. S., LACORTE, C., RIBEIRO, S. G. & FONSECA, M. E. N. 2010. Search for molecular markers associated with *Begomovirus* resistance loci in accessions of *Solanum* (Section *Lycopersicon*) inoculated via bombardment with *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV). *6th International Symposium on Geminivirus and the 4th Comparative ssDNA Virology Workshop 2010*. Guanajuato, Mexico.: Program of 6th International Symposium on Geminivirus and the 4th Comparative ssDNA Virology Workshop, 2010.

VIEIRA, B. G., NOGUEIRA, I., COSTA, F., BLAWID, R., PEREIRA-CARVALHO, R. C., RESENDE, R. O., BOITEUX, L. S., LACORTE, C. & ROBEIRO, S. G. 2011. Molecular phenotyping of *Ty-1*, *Ty-2* e *Ty-3* associated markers in new sources of resistance to *Tomato chlorotic mottle virus* in *Solanum* (section *Lycopersicon*) germoplasm. In: III Simposio Brasileiro de Genetica Molecular de Plantas, . *III Simposio de Genetica Molecular de Plantas, 2011*. Ilheus.: Resumos do III Simposio de Genetica Molecular de Plantas, 2011.

VUORINEN, A. L., KELLONIEMI, J. & VALKONEN, J. 2011. Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants? *Plant Science*, 181, 355-363.

WARD, B. M. & LAZAROWITZ, S. G. 1999. Nuclear export in plants: use of geminivirus movement proteins for a cell-based export assay. *The Plant Cell Online*, 11, 1267-1276.

WARD, B. M., MEDVILLE, R., LAZAROWITZ, S. G. & TURGEON, R. 1997. The geminivirus BL1 movement protein is associated with endoplasmic reticulum-derived tubules in developing phloem cells. *Journal of virology*, 71, 3726-3733.

WEEKS, A. R. & BREEUWER, J. A. 2003. A new bacterium from the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides phylum that causes sex ratio distortion. *Insect symbiosis*, 165-176.

WIJKAMP, I., ALMARZA, N., GOLDBACH, R. & PETERS, D. 1995. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology*, 85, 1069-1074.

WIJKAMP, I. & PETERS, D. 1993. Determination of the median latent period of two tospoviruses in *Frankliniella occidentalis*, using a novel leaf disk assay. *Phytopathology-New York and Baltimore then St Paul.*, 83, 986-986.

WIJKAMP, I., VAN LENT, J., KORMELINK, R., GOLDBACH, R. & PETERS, D. 1993. Multiplication of *Tomato spotted wilt virus* in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *The Journal of general virology*, 74, 341.

WILLIAMS, L., LAMBERTINI, P. L., SHOHARA, K. & BIDERBOST, E. 2001. Occurrence and geographical distribution of tospovirus species infecting tomato crops in Argentina. *Plant Disease*, 85, 1227-1229.

WINTERMANTEL, W., WISLER, G., ANCHIETA, A., LIU, H.-Y., KARASEV, A. & TZANETAKIS, I. 2005. The complete nucleotide sequence and genome organization of *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology*, 150, 2287-2298.

WOLFE, D. A. & HOLLANDER, M. 1973. *Nonparametric statistical methods*, New York, John Wiley & Sons.

WRIGHT, E., HECKEL, T., GROENENDIJK, J., DAVIES, J. & BOULTON, M. 1997. Splicing features in maize streak virus virion-and complementary-sense gene expression. *The Plant Journal*, 12, 1285-1297.

YAAKOV, N., LEVY, Y., BELAUSOV, E., GABA, V., LAPIDOT, M. & GAFNI, Y. 2011. Effect of a single amino acid substitution in the NLS domain of *Tomato yellow leaf curl virus* - Israel (TYLCV-IL) capsid protein (CP) on its activity and on the virus life cycle. *Virus Research*, 158, 8-11.

YASSIN, A., GRIGGS, T. & MCLEAN, B. Year. Major disease problems of tomato production and their control in the Sudan. *In: Tomato and pepper production in*

the tropics. Proceedings of the international symposium on integrated management practices, Tainan, Taiwan, 21-26 March 1988., 1989. Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC), 561-565.

ZAKAY, Y., NAVOT, N., ZEIDAN, M., KEDAR, N., RABINOWITCH, H., CZOSNEK, H. & ZAMIR, D. 1991. Screening *Lycopersicon* accessions for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*: presence of viral DNA and symptom development. *Plant Disease*, 75, 279.

ZAMIR, D., EKSTEIN-MICHELSON, I., ZAKAY, Y., NAVOT, N., ZEIDAN, M., SARFATTI, M., ESHED, Y., HAREL, E., PLEBAN, T. & VAN-OSS, H. 1994. Mapping and introgression of a *Tomato yellow leaf curl virus* tolerance gene, *Ty-1*. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 88, 141-146.

ZEIDAN, M. & CZOSNEK, H. 1994. Acquisition and transmission of *Agrobacterium* by the whitefly *Bemisia tabaci*. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 7, 792-798.

ZERBINI, F. & ZAMBOLIM, E. M. 1999. A família *Potyviridae*—Parte I. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 7, 1-67.

ZERBINI, F. M., ZAMBOLIM, E. M., CARRIJO, I. V. & GILBERTSON, R. L. 1996. A new geminivirus isolated from tomatoes from Minas Gerais state, Brazil. . *Phytopathology*.