



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

**DIVERSIDADE GENÔMICA DE BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIROS  
RESISTENTE (BRS SENA) E SUSCEPTÍVEL (H-9553)**

**CAMILA DE MORAES RÊGO**

**BRASÍLIA-DF  
2016**

**CAMILA DE MORAES RÊGO**

**DIVERSIDADE GENÔMICA DE BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIROS  
RESISTENTE (BRS SENA) E SUSCEPTÍVEL (H-9553)**

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.

**Orientadora**

Alice Kazuko Inoue-Nagata

**BRASÍLIA - DISTRITO FEDERAL  
BRASIL  
2016**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Rêgo, Camila de Moraes.

Diversidade genômica de begomovírus em tomateiros resistente (BRS Sena) e susceptível (H-9553). / Camila de Moraes Rêgo.

Brasília, 2016.

p. 101.

Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. Diversidade – Begomovírus.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Diversidade genômica de begomovírus em tomateiros resistente (BRS Sena) e susceptível (H-9553).

***Dedicatória***

*A minha querida mãe, Janety Aparecida de Moraes, pelo amor incondicional e por todos os ensinamentos transmitidos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que me concede.

Agradeço a minha orientadora, Alice Kazuko Inoue-Nagata, que me acolheu com muito carinho e compartilhou ensinamentos valiosos. Obrigada pelo seu otimismo, atenção, paciência, apoio, incentivo e confiança. Agradeço por ter aguçado em mim a vontade de “fazer Ciência”. Sua dedicação e competência me inspiram!

Muito obrigada ao analista do laboratório de Virologia Vegetal da Embrapa-CNPq Erich Yukio Tempel Nakasu, e ao técnico do laboratório Lúcio Flávio Barbosa, pela paciência, ensinamentos e disponibilidade de esclarecer minhas dúvidas. Sempre muito prestativos!

Muito obrigada à equipe do laboratório, Tadeu, Thaís, Pedro, Thiago, Moana, Cristiano e Mônica, por todas as contribuições, amizade e ótimo convívio. A ajuda de vocês foi essencial na realização deste trabalho!

A todos os meus familiares, em especial aos meus irmãos Vinícius, Karina, Kauan, Ezinho, Matheus e Thiago, e à minha avó Maria das Dores, pelo imenso amor e carinho.

Agradeço aos meus pais, Janety e Ézio, em reconhecimento a tudo que já fizeram por mim. Muito obrigada por todo o amor, dedicação, confiança e incentivo. Aos senhores, devo tudo o que sou hoje!

Ao meu querido noivo Phábulo, pelo carinho, companheirismo, apoio e paciência. Obrigada por sempre compreender a minha ausência.

Às minhas velhas amigas Isana, Ananda, Denise e Mariana, que desde a graduação torcem pelo meu sucesso e crescimento profissional. Obrigada!

Aos amigos Cristiano, Bianca, Débora e Carina, sempre muito afetuosos. Obrigada pela amizade sincera e apoio constante.

A todos os colegas do Departamento de Fitopatologia da UnB, em especial aos alunos da turma do primeiro semestre de 2014, Aldemiro, Sérgio, Tadeu, Pimentel, Amanda, Bruna e Leilane, pelos bons e difíceis momentos que compartilhamos.

Muito obrigada a todos os funcionários e professores do Departamento de Pós-Graduação em Fitopatologia, por dividirem experiências e conhecimentos tão preciosos.

Agradeço aos membros da banca examinadora, Rita de Cássia Pereira Carvalho, Leonardo Cunha de Albuquerque e Renato de Oliveira Resende, por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

Ao Departamento de Pós-Graduação em Fitopatologia da UnB, não apenas pela oportunidade de realizar o Mestrado, mas também pelo acolhimento.

À Embrapa-CNPq, pelo excelente espaço e infraestrutura disponibilizados.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

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

**DIVERSIDADE GENÔMICA DE BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIROS  
RESISTENTE (BRS SENA) E SUSCEPTÍVEL (H-9553)**

**CAMILA DE MORAES RÊGO**

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

---

**Dr. Leonardo Cunha de Albuquerque**  
Instituto Federal Goiano (Examinador Externo)

---

**Dra. Rita de Cássia Pereira Carvalho**  
Universidade de Brasília (Examinador Interno)

---

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

---

**Dr. Renato de Oliveira Resende**  
Universidade de Brasília (Suplente)

**BRASÍLIA - DISTRITO FEDERAL  
BRASIL  
2016**

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABELAS .....	v
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
OBJETIVO GERAL .....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	4
1. CULTURA DO TOMATE.....	5
2. DOENÇAS DO TOMATEIRO.....	9
2.1. Viroses do Tomateiro .....	10
2.1.1. Gênero <i>Tospovirus</i> .....	11
2.1.2. Gênero <i>Potyvirus</i> .....	11
2.1.3. Gênero <i>Cucumovirus</i> .....	12
2.1.4. Gênero <i>Tobamovirus</i> .....	13
2.1.5. Gênero <i>Crinivirus</i> .....	13
2.1.6. Gênero <i>Tymovirus</i> .....	14
3. FAMÍLIA <i>GEMINIVIRIDAE</i> .....	15
3.1. Aspectos Taxonômicos da Família <i>Geminiviridae</i> .....	16
3.2. Gênero <i>Begomovirus</i> .....	20
3.2.1. Diversidade de Begomovírus em Tomateiro no Brasil.....	21
3.2.2. Organização Genômica dos Begomovírus .....	23
3.2.3. Replicação dos Begomovírus na Planta Hospedeira.....	27
3.2.4. Variabilidade Genética dos Begomovírus .....	28
3.2.5. Transmissão Natural dos Begomovírus .....	30
3.2.6. Resistência Genética no Controle de Begomovirose .....	32
4. LITERATURA CITADA.....	33
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	55
RESUMO .....	56
ABSTRACT .....	58
1. INTRODUÇÃO .....	60
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	61
2.1. Coleta das Amostras .....	61

2.2. Extração do DNA Total.....	62
2.3. Detecção de Begomovírus por PCR.....	63
2.4. Amplificação do DNA Viral por Círculo Rolante e Avaliação do Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RCA/RFLP).....	63
2.5. Seleção das Enzimas de Restrição para Clonagem.....	64
2.6. Clonagem.....	65
2.7. Sequenciamento e Análise das Sequências.....	66
3. RESULTADOS.....	66
3.1. Detecção de Amostras Positivas a Begomovírus por PCR.....	66
3.2. Análise Preliminar dos Begomovírus por RCA/RFLP.....	67
3.3. Análise da Hibridização por <i>Southern Blot</i> .....	69
3.4. Begomovírus Identificados por Clonagem.....	70
3.5. Análise das Sequências Virais.....	72
3.6. Estrutura Genética das Populações Virais.....	75
3.7. Análise Filogenética.....	79
4. DISCUSSÃO.....	82
4.1. Diferenças nos Sintomas de Begomovirose em Tomateiros Suscetíveis x Resistentes.....	82
4.2. Técnica de RCA/RFLP Possibilita a Análise Prévia dos Isolados Virais.....	83
4.3. Infecções Simples Causadas por ToSRV são Predominantes.....	84
4.4. Evidências Indicam que ToMoLCV é um Begomovírus Monopartido.....	86
4.5. Uso de Plantas Resistentes Interfere na Proximidade entre Isolados de Begomovírus.....	86
4.6. Begomovírus de Plantas Resistentes Possuem Maior Variação Genética.....	88
4.7. Populações de Begomovírus se Agrupam com Base na Localização Geográfica.....	89
5. CONCLUSÕES.....	90
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
7. LITERATURA CITADA.....	93
ANEXOS.....	98

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1: Revisão Bibliográfica

- Figura 1.** Produção (em toneladas) dos dez maiores países produtores de tomate do mundo. Fonte: FAOSTAT (2015).....7
- Figura 2.** Total de área plantada (em hectares) dos principais países produtores de tomate do mundo. Fonte: FAOSTAT (2015).....7
- Figura 3.** Total de área plantada e produção de tomate no Brasil entre os anos de 2005 a 2014. Fonte: IBGE (2015).....8
- Figura 4.** Produção de tomate (em toneladas) (A) nas regiões brasileiras e (B) nos principais estados produtores do país. Fonte: IBGE (2015).....8
- Figura 5.** Representação esquemática da organização genômica de um begomovírus bipartido. Os círculos representam o genoma viral e cada seta corresponde a uma região genômica contendo o gene completo. As siglas dentro dos parênteses representam o produto gênico: CP, *coat protein*; Rep, *replication-associated protein*; Trap, *transcriptional activator protein*; Ren, *replication enhancer protein*; MP, *movement protein*; NSP, *nuclear shuttle protein*. V2\* é a ORF encontrada apenas em begomovírus monopartidos do Velho Mundo. RC corresponde à região comum, onde está inserido o nonanucleotídeo com o sítio de iniciação da replicação (representado pelo símbolo ↓). Ilustração: Fernandes (2010).....24

### CAPÍTULO 2: Diversidade Genômica de Begomovírus em Tomateiros com e sem Resistência a Begomovirose

- Figura 1.** Folhas de tomateiro da cultivar Heinz-9553 (A-B) e BRS Sena (C-D) com sintomas de clorose internerval, bolhosidade, deformação foliar e nanismo, causados pela infecção por begomovírus.....67
- Figura 2.** Géis de eletroforese dos produtos obtidos pela amplificação por círculo rolante (RCA) e polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) com a enzima de restrição MspI, presentes em amostras de tomateiros da cultivar BRS Sena (A) e Heinz-9553 (B). Perfis de restrição distintos estão indicados por diferentes cores. Os somatórios estimados dos genomas (em kb) estão indicados abaixo da coluna de cada amostra. As amostras selecionadas para clonagem estão destacadas em vermelho. M: marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....68
- Figura 3.** Membranas de hibridização por *Southern blot* realizado com sondas específicas para o (A) DNA-A e (B) DNA-B de begomovírus, hibridizando produtos obtidos pela amplificação por círculo rolante (RCA) e polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) com diferentes enzimas de restrição: (1) KpnI, (2) ApaI, (3) BamHI, (4) ClaI e (5) EcoRI. Os perfis de restrição 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem às amostras 90, 93, 23, 12, 88, 87 e 79, respectivamente. ND: DNA viral amplificado por RCA, mas não digerido com as enzimas de restrição. C-: controle negativo.....70

**Figura 4.** Matriz colorida representativa da porcentagem de identidade de nucleotídeos entre as sequências completas do DNA-A de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) obtidas neste trabalho e as sequências de ToSRV retiradas dos bancos de dados públicos, nomeadas conforme seus respectivos números de acesso, seguidos da sigla do estado onde a amostra foi coletada. Consultar Anexo 1 para identificação dos isolados.....73

**Figura 5.** Matriz colorida representativa da porcentagem de identidade de nucleotídeos entre as sequências completas do DNA-B de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) obtidas neste trabalho e as sequências de ToSRV retiradas dos bancos de dados públicos, nomeadas conforme seus respectivos números de acesso, seguidos da sigla do estado onde a amostra foi coletada. Consultar Anexo 1 para identificação dos isolados.....74

**Figura 6.** Matriz colorida representativa da porcentagem de identidade de nucleotídeos entre as sequências completas do DNA-A de *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) obtidas neste trabalho e as sequências de ToMoLCV retiradas dos bancos de dados públicos, nomeadas conforme seus respectivos números de acesso, seguidos da sigla do estado onde a amostra foi coletada. Consultar Anexo 1 para identificação dos isolados.....75

**Figura 7.** Árvore filogenética composta por sequências completas do DNA-A de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) obtidas neste trabalho (destacadas em negrito) e sequências de ToSRV retiradas dos bancos de dados, nomeadas conforme seus respectivos números de acesso (consultar Anexo 1 para identificação dos isolados). Árvore construída pelo método Neighbor-Joining, com 3000 repetições de *bootstrap* e modelo Tamura-Nei. A espécie *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) foi utilizada como *outgroup*. Uma barra vertical agrupa as sequências oriundas do mesmo estado (sigla).....80

**Figura 8.** Árvore filogenética composta por sequências completas do DNA-B de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) obtidas neste trabalho (destacadas em negrito) e sequências de ToSRV retiradas dos bancos de dados, nomeadas conforme seus respectivos números de acesso (consultar Anexo 1 para identificação dos isolados). Árvore construída pelo método Neighbor-Joining, com 3000 repetições de *bootstrap* e modelo Tamura-Nei. A espécie *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) foi utilizada como *outgroup*. Uma barra vertical agrupa as sequências oriundas do mesmo estado (sigla).....81

**Figura 9.** Árvore filogenética composta por sequências completas do DNA-A de *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) obtidas neste trabalho (destacadas em negrito) e sequências de ToMoLCV retiradas dos bancos de dados, nomeadas conforme seus respectivos números de acesso (consultar Anexo 1 para identificação dos isolados). Árvore construída pelo método Neighbor-Joining, com 3000 repetições de *bootstrap* e modelo Tamura-Nei. A espécie *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) foi utilizada como *outgroup*. Uma barra vertical agrupa as sequências oriundas do mesmo estado (sigla).....82

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 2: Diversidade Genômica de Begomovírus em Tomateiros com e sem Resistência a Begomovirose**

**Tabela 1.** Clones correspondentes a isolados de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), com seus respectivos componentes genômicos, obtidos a partir de amostras de tomateiros da cultivar BRS Sena (resistente a begomovirose) e Heinz-9553 (suscetível a begomovirose) coletadas no município de Luziânia-GO. Clones nomeados de acordo com o número da amostra seguido pelo número do clone.....72

**Tabela 2.** Número de mutações silenciosas (S) e não-silenciosas (NS) causadas por substituições de nucleotídeos nas sequências do componente genômico DNA-A de *Tomato severe rugose virus*, obtidas a partir de plantas resistentes (cultivar BRS Sena) e suscetíveis (Heinz-9553) a begomovirose. As mutações foram analisadas em cada ORF: AV1, AC1, AC2, AC3 e AC4. As siglas dentro dos parênteses representam o produto gênico.....77

**Tabela 3.** Número de mutações silenciosas (S) e não-silenciosas (NS) causadas por substituições de nucleotídeos nas sequências do componente genômico DNA-B de *Tomato severe rugose virus*, obtidas a partir de plantas resistentes (cultivar BRS Sena) e suscetíveis (Heinz-9553) a begomovirose. As mutações foram analisadas em cada ORF: BV1 e BC1. As siglas dentro dos parênteses representam o produto gênico.....77

**Tabela 4.** Número de mutações silenciosas (S) e não-silenciosas (NS) causadas por substituições de nucleotídeos nas sequências do componente genômico DNA-A de *Tomato mottle leaf curl virus*, obtidas a partir de plantas resistentes (cultivar BRS Sena) e suscetíveis (Heinz-9553) a begomovirose. As mutações foram analisadas em cada ORF: AV1, AC1, AC2, AC3 e AC4. As siglas dentro dos parênteses representam o produto gênico.....78

## INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das principais hortaliças cultivadas no mundo. A espécie está classificada dentro da família Solanaceae, gênero *Solanum*, seção *Lycopersicon* (Peralta *et al.*, 2005). O seu centro de origem abrange as ilhas Galápagos (Darwin *et al.*, 2003; Peralta *et al.*, 2005), Chile, Peru, Bolívia, Equador e Colômbia (Esquinas-Alcázar & Vinals, 1995; Fontes & Silva, 2002). Atualmente, o tomateiro é cultivado em quase todos os países (Fontes & Silva, 2002).

No Brasil, a tomaticultura tem grande importância econômica. De acordo com os últimos dados disponibilizados pela FAOSTAT (2015), o país ocupa a oitava posição no *ranking* mundial, produzindo aproximadamente 4,1 milhões de toneladas por safra. Os principais estados produtores são: Goiás, com 23,89% da produção nacional, seguido de São Paulo (19,78%), Minas Gerais (15,72%), Bahia (6,72%) e Paraná (6,70%) (IBGE, 2015).

O cultivo do tomate em grande parte das regiões brasileiras e ao longo de quase todo o ano possibilita o desenvolvimento de várias pragas e doenças, tanto em lavouras destinadas à indústria, quanto para consumo *in natura* (Souza & Reis, 2003). Inúmeras viroses são relatadas na cultura, com incidência variando conforme a época, a região, o tipo de cultivo e, principalmente, a multiplicação e disseminação dos vetores (Inoue-Nagata, 2013). A begomovirose é uma das principais doenças virais do tomateiro, causando grandes perdas de produção em várias partes do mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (Bock, 1982; Varma & Malathi, 2003; Seal *et al.*, 2006).

Os begomovírus, família *Geminiviridae*, caracterizam-se pela presença de uma (monopartidos) ou duas (bipartidos) moléculas de DNA circular fita simples. Cada uma das moléculas é encapsidada por uma proteína estrutural que forma dois icosaedros incompletos unidos, o que confere o aspecto geminado das partículas (Lazarowitz & Shepherd, 1992). Estes vírus são divididos em dois grupos de acordo com a organização genômica, diversidade

genética e distribuição geográfica: linhagens do Velho Mundo e do Novo Mundo (Nawaz-ul-Rehman & Fauquet, 2009). Os begomovírus com genoma monopartido são encontrados principalmente em países do Velho Mundo, enquanto os bipartidos estão distribuídos entre o Velho e o Novo Mundo (King *et al.*, 2011).

O primeiro relato formal de begomovírus infectando tomateiro no Brasil foi em 1960 (Flores *et al.*, 1960). Em 1990, com a introdução do biótipo B do seu inseto-vetor *Bemisia tabaci* (mosca-branca), houve um aumento significativo na incidência de begomovirose no país e, sobretudo, na diversidade destes vírus (Ribeiro *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 2008). Atualmente, 14 espécies de begomovírus isoladas de tomateiro no Brasil são consideradas definitivas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (Flores *et al.*, 1960; Matyis *et al.*, 1975; Faria *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2012).

Como o controle químico da mosca-branca apresenta baixa eficiência e tem onerado o custo de produção da cultura, o uso de plantas resistentes tem sido a estratégia mais eficiente e prática para minimizar as perdas causadas pelos begomovírus (Boiteux *et al.*, 2012), tornando-se uma das principais formas de manejo utilizada no país. Diante deste cenário, estudos sobre a diversidade de begomovírus em tomateiros com e sem resistência são importantes para servir de suporte aos programas de melhoramento genético. Estes estudos podem fornecer dados sobre as variantes virais presentes em cultivares resistentes no campo e, conseqüentemente, disponibilizar informações essenciais sobre a durabilidade e eficiência dos genes de resistência.

## **OBJETIVO GERAL**

Estudar a diversidade genômica de begomovírus em amostras de tomateiro rasteiro das cultivares Heinz-9553 (suscetível a begomovirose) e BRS Sena (resistente a begomovirose) coletadas em Goiás, principal estado produtor de tomate do país.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar a intensidade dos sintomas causados pela infecção por begomovírus em plantas das cultivares Heinz-9553 e BRS Sena.
- Verificar se RCA/RFLP é uma técnica útil e confiável para o estudo preliminar da diversidade de begomovírus.
- Analisar quais espécies de begomovírus estão presentes em plantas de Heinz-9553 e BRS Sena, determinando a espécie predominante em cada cultivar.
- Comparar a proximidade entre os isolados de cada espécie identificada a partir da porcentagem de identidade de nucleotídeos entre eles.
- Estudar a variação genética dentro das espécies de cada cultivar pela análise do número de mutações causadas por inserção, deleção e substituição de nucleotídeos.
- Avaliar a relação filogenética das espécies identificadas.

# CAPÍTULO 1

---

---

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1. CULTURA DO TOMATE

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) está classificado na família Solanaceae, gênero *Solanum* e seção *Lycopersicum* (Peralta *et al.*, 2005). Esta espécie tem como centro de origem as ilhas Galápagos (Darwin *et al.*, 2003; Peralta *et al.*, 2005), norte do Chile, regiões andinas do Peru, Bolívia, Equador e sul da Colômbia (Esquinas-Alcázar & Vinals, 1995; Fontes & Silva, 2002). Contudo, a domesticação do tomateiro deu-se no México, considerado o seu centro secundário de origem. No Brasil, foi introduzido por imigrantes europeus no final do século XIX, tornando-se uma das principais hortaliças em importância, com amplo cultivo em vários estados brasileiros (Filgueira, 2003; Alvarenga, 2013).

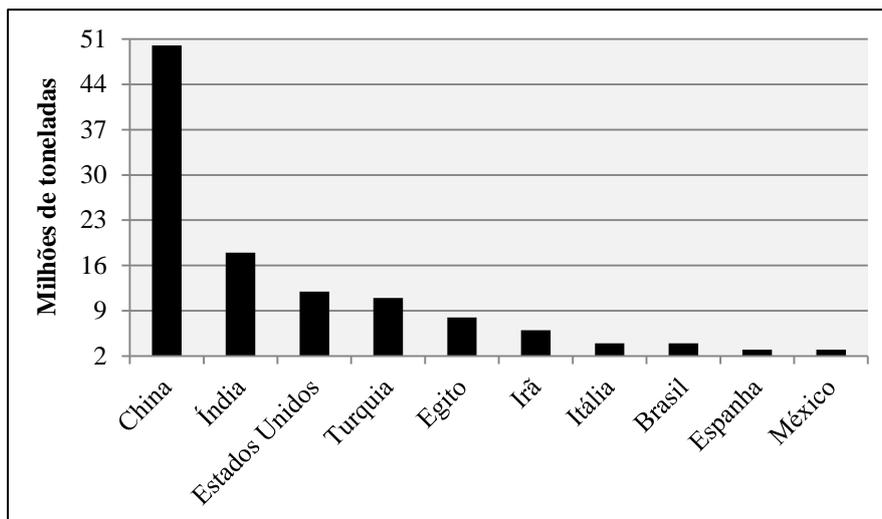
Devido às condições ambientais em sua região de origem, como altitudes superiores a 1.000 metros, temperaturas médias variando de 15°C a 19°C e baixa precipitação pluviométrica, o tomateiro adapta-se melhor ao cultivo em clima tropical de altitude, subtropical ou temperado, embora seja capaz de florescer e frutificar em condições climáticas variáveis. Logo, o seu plantio é possível em diferentes regiões do mundo (Silva *et al.*, 2006).

O manejo da cultura é diversificado, podendo ser utilizados diferentes tratamentos culturais que são escolhidos, sobretudo, de acordo com o hábito de crescimento das plantas, o qual é dividido em dois tipos principais: determinado e indeterminado. No primeiro, as plantas possuem desenvolvimento limitado pela emissão de uma inflorescência terminal (Filgueira, 2003; Clemente *et al.*, 2013). A frutificação ocorre em um período relativamente concentrado, dentro de duas ou três semanas (Naika *et al.*, 2006) e, em geral, a colheita é mecanizada (Jacinto *et al.*, 2012). Estes tomateiros são conhecidos popularmente como rasteiros, sendo a sua produção destinada principalmente à agroindústria (Nascimento *et al.*, 2012), apesar de existir o cultivo de tomate para consumo fresco produzido em tomateiros de crescimento determinado.

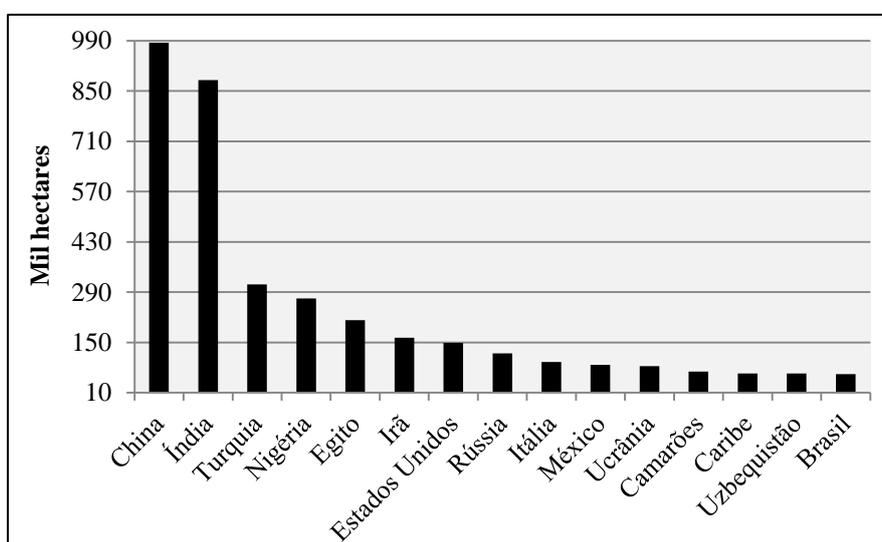
Quanto aos tomateiros com hábito de crescimento indeterminado, as plantas continuam se desenvolvendo após a emissão dos botões florais, sendo necessários o tutoramento e a poda (Naika *et al.*, 2006; Clemente *et al.*, 2013). Como é possível encontrar frutos com diferentes estádios de maturação em uma mesma planta, a colheita manual ocorre de forma parcelada, podendo ser prolongada por 50 a 90 dias. Nesta categoria estão inseridas as cultivares destinadas à produção de frutos para mesa (Filgueira, 2003).

Os diferentes hábitos de crescimento dos tomateiros possibilitaram a formação de duas cadeias produtivas envolvendo a cultura: o segmento de indústria (para processamento) e de mesa (para consumo *in natura*). Estas cadeias têm forte relevância econômica no agronegócio, além de serem importantes fontes geradoras de emprego (ABCSEM, 2008). Segundo o Censo Agropecuário do IBGE (2006), a quantidade de tomate estaqueado produzido no Brasil é de 929.962 toneladas, enquanto a de rasteiro é de 374.893 toneladas. Embora a maior parte da colheita nacional seja de tomate para mesa, a produção para indústria vem se destacando, com uma expansão marcante nos últimos anos, provavelmente devido à industrialização em larga escala (Matos & Moretti, 2012).

A produção mundial de tomate aumentou ao longo dos anos. De acordo com os últimos dados disponibilizados pela FAOSTAT (2015), a safra de 2013 foi superior a 163 milhões de toneladas, com área cultivada total de 4,69 milhões de hectares e produtividade de 34,7 t/ha. O maior país produtor de tomate é a China (30,89% da produção mundial), seguida pela Índia (11,11%), Estados Unidos (7,66%), Turquia (7,20%) e Egito (5,20%) (Fig. 1). O Brasil ocupa a oitava posição (2,55%) (Fig. 1). Em relação à área plantada, os países que se destacam são China (20,83% da área cultivada no mundo), Índia (18,62%), Turquia (6,58%), Nigéria (5,75%) e Egito (4,50%), enquanto o Brasil é o 15º colocado (Fig. 2). Entretanto, a produtividade brasileira foi de 66,8 t/ha em 2013, valor 92,50% superior à média mundial (FAOSTAT, 2015).



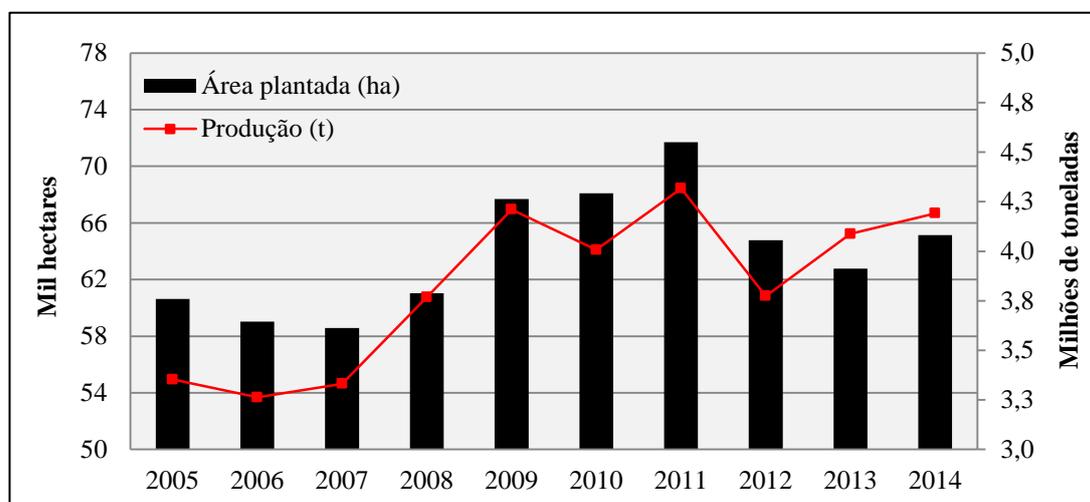
**Figura 1.** Produção (em toneladas) dos dez maiores países produtores de tomate do mundo. Fonte: FAOSTAT (2015).



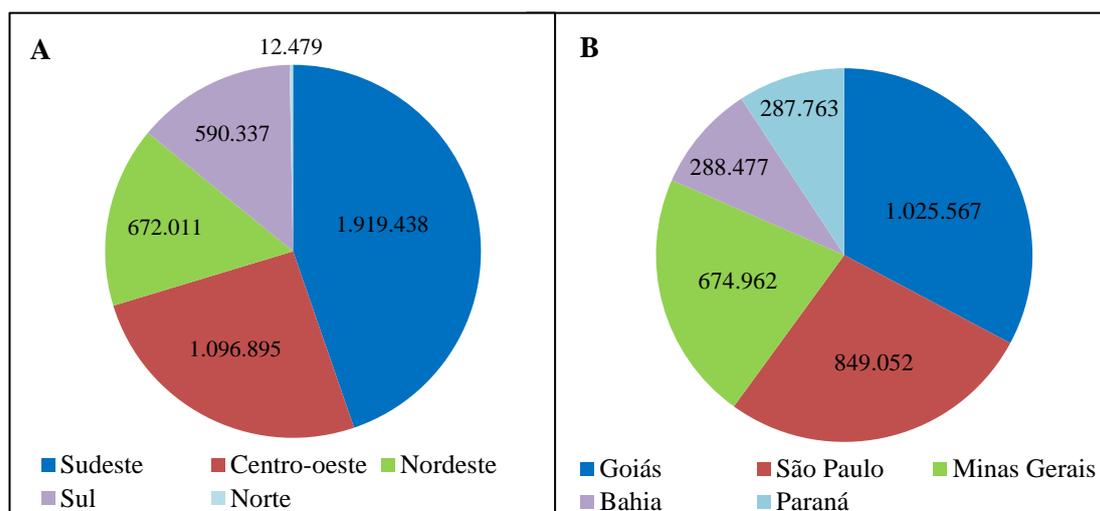
**Figura 2.** Total de área plantada (em hectares) dos principais países produtores de tomate do mundo. Fonte: FAOSTAT (2015).

A produção de tomate no Brasil também cresceu nos últimos anos, apesar de algumas oscilações de um ano para outro. Comparando a produção entre as safras de 2005 e 2014, houve aumento de 24,27%. Este acréscimo deve-se à ampliação da área cultivada, que foi expandida para 65.146 ha em 2014, valor 7,43% maior que a área plantada em 2005 (60.639 ha) (Fig. 3). As principais regiões produtoras do país são Sudeste e Centro-Oeste, respectivamente, com produção superior a 1 milhão de toneladas, seguidas das regiões

Nordeste (672 mil toneladas), Sul (590 mil toneladas) e Norte (12 mil toneladas), como observado na Figura 4A (IBGE, 2015).



**Figura 3.** Total de área plantada e produção de tomate no Brasil entre os anos de 2005 a 2014. Fonte: IBGE (2015).



**Figura 4.** Produção de tomate (em toneladas) (A) nas regiões brasileiras e (B) nos principais estados produtores do país. Fonte: IBGE (2015).

Em 2014, o maior estado brasileiro produtor de tomate foi o Goiás, com 23,89% da produção nacional, seguido de São Paulo (19,78%), Minas Gerais (15,72%), Bahia (6,72%) e Paraná (6,70%) (Fig. 4B). Estes estados também se destacam por possuírem as maiores áreas de cultivo: Goiás (11.653 ha), São Paulo (11.303 ha), Minas Gerais (9.311 ha), Bahia (6.447 ha) e Paraná (4.782 ha) (IBGE, 2015).

## 2. DOENÇAS DO TOMATEIRO

O tomateiro é uma hortaliça muito suscetível à ocorrência de problemas fitossanitários, cujos agentes são de natureza diversa (Filgueira, 2003). Segundo Reis & Lopes (2012), mais de 100 doenças já foram relatadas na cultura, algumas delas capazes de reduzir significativamente a produtividade ou de afetar a qualidade do fruto. Estas doenças podem limitar a tomaticultura em determinadas épocas de cultivo ou em regiões específicas do país, devido à falta de controle ou pela elevação do custo de produção com a aplicação de agrotóxicos (Lopes & Ávila, 2005).

As doenças podem ser transmissíveis, ou seja, causadas por fungos, bactérias, nematoides ou vírus, ou não-transmissíveis, também conhecidas como distúrbios fisiológicos (Lopes *et al.*, 2000; Reis & Lopes, 2012). No tomateiro, a frequência e intensidade das doenças transmissíveis são fortemente influenciadas por diferentes fatores, tais como: forma de implantação e condução da lavoura, cultivar plantada, qualidade da semente, localização da área plantada, estado nutricional das plantas, entre outros (Lopes & Ávila, 2005).

As doenças de origem fúngica são numerosas e frequentes na cultura do tomate, levando ao uso intenso de fungicidas. Dentre estas doenças, destacam-se: requeima (cujo agente etiológico é *Phytophthora infestans*), pinta-preta (*Alternaria* spp.), septoriose (*Septoria lycopersici*), mancha-de-estenfílio (*Stemphylium* spp.), oídio (*Pseudoidium neolycopersici* e *Oidiopsis haplophylli*), murcha-de-fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*), murcha-de-verticílio (*Verticillium albo-atrum* e *V. dahliae*) e mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* e *S. minor*) (Tokeshi & Carvalho, 1980; Lopes *et al.*, 2005; Reis & Lopes, 2012; Vale *et al.*, 2013).

As doenças bacterianas, apesar de serem menos numerosas, também podem causar grandes perdas na produção. As mais frequentes são: mancha-bacteriana (*Xanthomonas* spp.), pinta-bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), murcha-bacteriana (*Ralstonia*

*solanacearum*), cancro-bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) e talo-oco (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) (Tokeshi & Carvalho, 1980; Lopes & Quezado-Duval, 2005; Quezado-Duval & Lopes, 2012; Vale *et al.*, 2013).

Com relação às doenças causadas por nematoides, os patógenos que se destacam pertencem ao gênero *Meloidogyne*, conhecidos como nematoides-das-galhas. Neste gênero, quatro espécies são mais comumente encontradas no país (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. enterolobii*), sendo responsáveis por danos expressivos na tomaticultura (Charchar & Lopes, 2005; Pinheiro & Pereira, 2012; Vale *et al.*, 2013).

Como os vírus pertencem ao grupo de patógenos-alvo deste trabalho, as doenças de origem viral serão detalhadas a seguir.

## **2.1. Viroses do Tomateiro**

Os vírus causam inúmeras doenças em tomateiro, com incidência variando conforme a época, a região, o tipo de cultivo e, principalmente, a multiplicação e disseminação dos vetores. Em geral, as principais doenças que ocorrem em tomateiros rasteiros são begomovirose, crinivirose e tospovirose. Em tomateiros estaqueados a ocorrência é variável, sendo observadas begomovirose, crinivirose, tospovirose, potyvirose, cucumovirose e tobamovirose (Inoue-Nagata, 2013; Macedo *et al.*, 2014). Recentemente, um tymovírus tem sido relatado em lavouras de tomateiro estaqueado (Oliveira *et al.*, 2013). Muitas destas viroses causam perdas significativas na produção de tomate, sendo amplamente distribuídas no país.

A seguir, será apresentada uma revisão sucinta dos vírus citados acima, com enfoque maior à família *Geminiviridae*, onde estão classificados os membros do gênero *Begomovirus*, tema principal deste trabalho.

### **2.1.1. Gênero *Tospovirus***

Os vírus que causam a tospovirose, doença também conhecida como vira-cabeça-do-tomateiro, pertencem ao gênero *Tospovirus*, família *Bunyaviridae* (ICTV, 2015). Estes vírus possuem partículas esféricas e envelopadas, com genoma constituído por três moléculas de RNA fitas simples, senso negativo ou ambisenso (German *et al.*, 1992; Fauquet *et al.*, 2005). No Brasil, há ocorrência de seis espécies de tospovírus, mas somente quatro foram relatadas infectando o tomateiro: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) (Nagata *et al.*, 1995; Ávila *et al.*, 1996; Resende *et al.*, 1996; Bezerra *et al.*, 1999).

A transmissão natural dos tospovírus ocorre de maneira circulativa-propagativa por insetos conhecidos como tripes, pertencentes à ordem Thysanoptera (Wijkamp *et al.*, 1993). Os principais gêneros de tripes transmissores são *Frankliniella* e *Thrips* (Riley *et al.*, 2011). O vetor adquire o vírus nos estádios larvais e a transmissão é observada somente no final do estágio de segundo instar, sendo realizada com maior eficiência pelos adultos virulíferos (Wetering *et al.*, 1996; Moritz *et al.*, 2004). Estes vírus também podem ser transmitidos mecanicamente (Pozzer *et al.*, 1996).

Os sintomas causados pela infecção por diferentes espécies de tospovírus em tomateiro são muito semelhantes. Dentre estes sintomas, os principais são arqueamento do ápice da planta, arroxamento ou bronzeamento das folhas, mosaico, anéis cloróticos ou necróticos em folhas e frutos, necrose de pecíolos e folhas, deformação foliar, nanismo e morte da planta (German *et al.*, 1992; Pozzer *et al.*, 1996).

### **2.1.2. Gênero *Potyvirus***

O genoma dos potyvírus, família *Potyviridae*, é constituído por uma única molécula de RNA fita simples, senso positivo, encapsidada em partículas alongadas e flexuosas (Shukla *et*

*al.*, 1994; Fauquet *et al.*, 2005). A transmissão natural destes vírus ocorre de maneira não-circulativa por diversas espécies de afídeos, podendo ser também facilmente transmitidos mecanicamente (Costa *et al.*, 1960; Hollings & Brunt, 1981).

O *Potato virus Y* (PVY), agente causal da risca do tomateiro, foi por muito tempo considerado o potyvírus de maior importância na cultura (Zerbini & Maciel-Zambolin, 1999). Entretanto, com o desenvolvimento de tomateiros resistentes ao PVY, este vírus deixou de se destacar nas lavouras, dando lugar um novo potyvírus, o *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), o qual foi inicialmente identificado em pimentão (Inoue-Nagata *et al.*, 2002) e, posteriormente, em tomate (Ávila *et al.*, 2004; Dianese *et al.*, 2008).

Os membros da família *Potyviridae* podem causar diferentes sintomas, que incluem desde mosqueado, mosaico, clorose, necrose, deformações foliares, deformações nos frutos ou até mesmo infecções latentes (Shukla *et al.*, 1994). Em tomateiro, os sintomas típicos são escurecimento ou necrose das nervuras (na parte abaxial das folhas), deformação foliar, manchas cloróticas, mosqueado ou mosaico (Inoue-Nagata *et al.*, 2005).

### **2.1.3. Gênero *Cucumovirus***

Os cucumovírus são classificados dentro da família *Bromoviridae* (ICTV, 2015). Estes vírus possuem partículas icosaédricas, com genoma constituído por três moléculas de RNA fitas simples, senso positivo, encapsidadas separadamente (Palukaitis *et al.*, 1992; Fauquet *et al.*, 2005). A principal espécie do gênero é *Cucumber mosaic virus* (CMV), agente causal da doença chamada de mosaico do pepino. O CMV foi inicialmente detectado no Brasil em cultivo de banana no estado de São Paulo (Silberschmidt & Nóbrega, 1941) e, posteriormente, passou a ser relatado em outras espécies vegetais (Duarte *et al.*, 1994; Colariccio *et al.*, 1996; Araujo *et al.*, 2001; Frangioni *et al.*, 2001).

A transmissão natural de CMV ocorre por meio de espécies de afídeos-vetores, sendo a relação vírus-vetor do tipo não-circulativa, podendo ser também transmitido mecanicamente (Chen & Francki, 1990; Nault, 1997; Costa, 1998). Em tomateiro, os principais sintomas de CMV são mosqueamento e deformação do limbo foliar, com a formação de folhas afiladas, conhecidas como “cordão de sapato” (Inoue-Nagata *et al.*, 2005).

#### **2.1.4. Gênero *Tobamovirus***

Os tobamovírus, família *Virgaviridae*, possuem partículas cilíndricas, alongadas e rígidas, com genoma constituído por uma molécula de RNA fitas simples, senso positivo (Lewandowski & Dawson, 1994; Fauquet *et al.*, 2005). Estes vírus são eficientemente transmitidos por contato mecânico decorrente do atrito entre plantas, manuseio humano, ferramentas ou utensílios usados nos tratamentos culturais (Zaitilin & Israel, 1975). Também podem ser transmitidos por sementes, consideradas a principal fonte de disseminação dos tobamovírus a longa distância (Demski, 1981; Erkan & Delen, 1985). Não há, até o momento, vetores conhecidos para estes vírus.

A espécie de tobamovírus mais importante na cultura do tomate é *Tomato mosaic virus* (ToMV). Os principais sintomas foliares de ToMV em tomateiro são mosaico e deformação, com folhas finas e alongadas. Os frutos geralmente apresentam deformação, manchas verdes e necrose, além de aspermia (Jones *et al.*, 1991; Inoue-Nagata *et al.*, 2005).

#### **2.1.5. Gênero *Crinivirus***

Os membros do gênero *Crinivirus* pertencem à família *Closteroviridae* (ICTV, 2015). Estes vírus possuem partículas longas e flexuosas, com genoma bipartido consistido de duas moléculas de RNA fitas simples, senso positivo (Fauquet *et al.*, 2005). Duas espécies de crinivírus já foram relatadas infectando tomateiros, *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV)

(Duffus *et al.*, 1994) e *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (Wisler *et al.*, 1998), mas apenas ToCV tem ocorrência no Brasil. O primeiro relato de ToCV no país foi em 2008, no estado de São Paulo (Barbosa *et al.*, 2008), sendo posteriormente detectado em outros estados brasileiros (Barbosa *et al.*, 2011).

A transmissão de ToCV depende exclusivamente do seu inseto-vetor, a mosca-branca. Três espécies de moscas-brancas são vetores deste vírus: *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum* e *T. abutiloneus*, esta última ainda não encontrada no país (Wintermantel & Wisler, 2006; Barbosa *et al.*, 2008). A relação vírus-vetor é do tipo semi-persistente (Wintermantel & Wisler, 2006).

Infecções causadas por TICV e ToCV em tomateiro são difíceis de serem distinguidas com base na sintomatologia, apesar dos sintomas de ToCV serem ligeiramente menos severos do que os de TICV em algumas cultivares (Wisler *et al.*, 1998). Os sintomas são manchas cloróticas internervais que aparecem primeiro nas folhas inferiores e avançam progressivamente para as folhas superiores, podendo ocorrer também enrolamento foliar. Não há desenvolvimento de sintomas evidentes em frutos (Wisler *et al.*, 1998; Barbosa *et al.*, 2008).

#### **2.1.6. Gênero *Tymovirus***

Os vírions dos tymovírus, família *Tymoviridae*, são isométricos, com genoma monopartido, composto por uma única molécula de RNA fita simples, senso positivo (Koenig & Lesemann, 1981; Fauquet *et al.*, 2005). O primeiro tymovírus relatado no Brasil foi detectado em berinjela (Kitajima, 1965). Nos anos seguintes, novos isolados foram encontrados em outras espécies vegetais (Crestani *et al.*, 1986; Ribeiro *et al.*, 1996;), incluindo o tomate (Colariccio *et al.*, 2008; Batista *et al.*, 2012). Recentemente, um novo

tymovírus foi isolado de tomateiros no estado de Santa Catarina, tentativamente designado como Tomato blistering mosaic virus (ToBMV) (Oliveira *et al.*, 2013).

Estes vírus são facilmente transmitidos mecanicamente. A transmissão natural ocorre por espécies de coleópteros vetores e, eventualmente, através de sementes (Koenig & Lesemann, 1981; Martelli *et al.*, 2002). Os principais sintomas causados pelos tymovírus em tomateiros são mosaico ou mosqueado, necrose branca, faixa das nervuras, clareamento de nervuras e bolhosidade (Batista *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013).

### **3. FAMÍLIA GEMINIVIRIDAE**

Existem várias especulações sobre a origem dos geminivírus. Entretanto, a que ganhou maior aceitação sugere que estes vírus evoluíram a partir de bacteriófagos ou de plasmídeos bacterianos (Koonin & Ilyina, 1992). Replicons extracromossomais de DNA fita simples (ssDNA) circular presentes em procariotos ou eucariotos primitivos, que se replicavam por meio do mecanismo de círculo rolante, podem estar envolvidos no processo de evolução destes vírus. Esta teoria baseia-se, entre outros fatores, na natureza da proteína Rep dos geminivírus, por ser muito parecida com a Rep de procariotos e replicons de DNA (Frischmuth *et al.*, 1990).

O nome da família *Geminiviridae* foi criado com base na morfologia geminada das partículas virais, que possuem aproximadamente 18 x 30 nm. Estes vírus caracterizam-se pela presença de uma (monopartidos) ou duas (bipartidos) moléculas de ssDNA circular. As moléculas (2500 a 3000 nucleotídeos) são encapsidadas separadamente por uma proteína estrutural que forma dois icosaedros incompletos unidos, atribuindo o aspecto geminado das partículas (Lazarowitz & Shepherd, 1992).

Os geminivírus estão entre os principais vírus de planta, sendo capazes de infectar tanto monocotiledôneas, quanto dicotiledôneas, incluindo diversas espécies economicamente

importantes (Scholthof *et al.*, 2011). Estes vírus são responsáveis por grandes perdas de produção em várias partes do mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (Bock, 1982; Varma & Malathi, 2003).

### 3.1. Aspectos Taxonômicos da Família *Geminiviridae*

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, *International Committee on Taxonomy of Viruses*), inicialmente nomeado como Comitê Internacional de Nomenclatura dos Vírus, foi criado em 1966, objetivando organizar a classificação e nomenclatura dos vírus (ICTV, 2015). Em 1979, no terceiro relatório do ICTV, os geminivírus foram incluídos pela primeira vez em um grupo, à época constituído por quatro espécies: *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Cassava latent virus* (CLV), *Chloris striate mosaic virus* (CSMV) e *Maize streak virus* (MSV) (Matthews, 1979). Em 1982, a espécie *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) também foi incluída (Matthews, 1982).

Em 1991, no quinto relatório do ICTV, o grupo foi dividido em três subgrupos (I, II e III), cada um com uma espécie-tipo: MSV, *Beet curly top virus* (BCTV) e BGMV, respectivamente (Francki *et al.*, 1991). Os geminivírus foram finalmente incluídos na categoria de família no sexto relatório, em 1995. Além disso, os subgrupos anteriores (I, II e III) passaram a ser classificados como gêneros (Murphy *et al.*, 1995), mas somente em 2000 foram nomeados como *Mastrevirus*, *Curtovirus* e *Begomovirus*, respectivamente (Regenmortel *et al.*, 2000). Em 2005, no oitavo relatório, o gênero *Topocuvirus* foi incluído à família *Geminiviridae* (Fauquet *et al.*, 2005).

Atualmente, a família é constituída por sete gêneros: *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, *Becurtovirus*, *Eragrovirus* e *Turncurtovirus*, os três últimos aceitos pelo ICTV em 2012 (Varsani *et al.*, 2014; ICTV, 2015). Os critérios utilizados na classificação dos quatro primeiros gêneros da família (*Begomovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus*,

*Topocuvirus*) foram organização genômica, inseto vetor e gama de hospedeiras (Fauquet & Stanley, 2003; Brow *et al.*, 2012).

Os curtovírus, espécie-tipo *Beet curly top virus* (BCTV), possuem apenas um componente genômico com sete *open reading frames* (ORFs) e são transmitidos por cigarrinhas a plantas dicotiledôneas. Os mastrevírus, espécie-tipo *Maize streak virus* (MSV), também são monopartidos e transmitidos por cigarrinhas, porém, possuem quatro ORFs e infectam predominantemente monocotiledôneas. O gênero *Topocuvirus* é constituído por apenas uma espécie, *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), que possui genoma monopartido (com seis ORFs) e é transmitida por membracídeos a plantas dicotiledôneas. Já os begomovírus, espécie-tipo *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), possuem um ou dois componentes genômicos, infectam dicotiledôneas e são transmitidos por moscas-brancas (Fauquet *et al.*, 2000; Fauquet & Stanley, 2003).

Acredita-se que estes vírus evoluíram de um ancestral comum (Rybicki, 1994). Comparando os mastrevírus com os curtovírus e begomovírus, os primeiros são mais divergentes entre si e, portanto, parecem ter evoluído por um período de tempo mais longo. Posteriormente, a partir do mesmo ancestral, divergências evolutivas resultaram no surgimento dos curtovírus e begomovírus. Depois de estabelecidos os três gêneros, processos de especiação deram origem a diferentes espécies (Rybicki, 1994; Faria & Zerbini, 2000).

O gênero *Becurtovirus*, recentemente aceito pelo ICTV dentro da família *Geminiviridae*, possui dois membros: *Beet curly top Iran virus* (BCTIV), a espécie-tipo, e *Spinach curly top Arizona virus* (SCTAV) (ICTV, 2015). A diferença entre os becurtovírus e as outras espécies presentes dentro da família está no sítio de origem da replicação. Nos demais geminivírus, a sequência de nucleotídeos desta região é TAATATT/AC, mas BCTIV e SCTAV possuem uma sequência distinta (TAAGATT/CC) (Yazdi *et al.*, 2008). Outra característica do gênero é a presença de duas regiões intergênicas que separam as ORFs do

sentido viral e complementar (Yazdi *et al.*, 2008; Heydarnejad *et al.*, 2013). Estes vírus infectam plantas dicotiledôneas (Varsani *et al.*, 2014). BCTIV é transmitido por cigarrinha (Abhari *et al.*, 2005).

O gênero *Eragrovirus*, também incluído à família recentemente, possui uma única espécie, *Eragrostis curvula streak virus* (ECSV), que foi encontrada infectando capim (*Eragrostis curvula*). Assim como os becurtovírus, ECSV possui duas regiões intergênicas separando as ORFs do sentido viral e complementar e o nonanucleotídeo com a sequência TAAGATT/CC (Varsani *et al.*, 2009). Ainda não se conhece o vetor de eragrovírus.

Outro gênero incluído à família foi o *Turncurtovirus*, que também possui apenas uma espécie, *Turnip curly top virus* (TCTV). Análises das sequências virais de diferentes isolados deste vírus mostraram que a espécie é parecida às do gênero *Curtovirus*, com um arranjo no sentido-complementar do genoma semelhante, consistindo em quatro ORFs, embora tenham apresentado baixa identidade. Contudo, há diferenças no sentido-viral, existindo apenas duas ORFs (curtovírus possuem três ORFs) (Briddon *et al.*, 2010). TCTV é transmitido por cigarrinha a plantas dicotiledôneas (Varsani *et al.*, 2014).

Apesar da recente aprovação dos três novos gêneros à família *Geminiviridae*, novas espécies, que não se adequam a nenhum dos sete gêneros mencionados, estão sendo descobertas (Bernardo *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015). Bernardo e colaboradores (2013), por exemplo, identificaram e caracterizaram uma nova espécie encontrada em *Euphorbia caput-medusae*, tentativamente chamada de *Euphorbia caput-medusae latent virus* (EcmLV). Segundo os autores, EcmLV é claramente um geminivírus, mas com organização genômica altamente divergente, motivo pelo qual propuseram a sua colocação dentro de um novo gênero, tentativamente nomeado como *Capulavirus*.

Pesquisadores que compõem o grupo de estudos de geminivírus do ICTV publicaram critérios para a classificação taxonômica de isolados dentro da família (Fauquet *et al.*, 2008). Em nível de gênero, usa-se 42% de identidade de nucleotídeos do genoma completo dos vírus monopartidos ou do DNA-A de bipartidos, e em nível de espécie, 89% de identidade. Para classificar todos os isolados de geminivírus de forma semelhante e, portanto, obter uma classificação homogênea, foram propostas as seguintes diretrizes, levando em consideração os conceitos de espécie, estirpe e variante (utilizando o programa ClustalV, DNASTar): (a) se a identidade de nucleotídeos do novo isolado for < 88%, considera-se uma nova espécie; (b) se a identidade de nucleotídeos for entre 88 - 89%, considera-se tentativamente uma espécie próxima; (c) se a identidade de nucleotídeos for > 89%, considera-se um isolado da mesma espécie; (d) se a identidade de nucleotídeos for < 93%, considera-se uma nova estirpe da espécie; (e) se a identidade de nucleotídeos for > 94%, considera-se como uma variante daquela estirpe da espécie (Fauquet *et al.*, 2008).

Um novo grupo de estudos, que avaliou especificamente genomas de begomovírus, publicou recentemente outros parâmetros para a delimitação de novas espécies e estirpes (Brown *et al.*, 2015). Neste trabalho, a identidade de nucleotídeos de 91% e 94% são consideradas como limiares de demarcação para begomovírus pertencentes a diferentes espécies e estirpes, respectivamente, mediante os seguintes critérios (utilizando o programa SDT v1.2) (Brown *et al.*, 2015):

(a) O novo isolado deve ser classificado como pertencente à espécie que inclui qualquer isolado com o qual partilha  $\geq 91\%$  de identidade de nucleotídeos do genoma completo (begomovírus monopartidos) ou DNA-A (begomovírus bipartidos), mesmo que tenha < 91% de identidade com todos os outros isolados desta mesma espécie.

(b) O novo isolado deve ser classificado como pertencente à estirpe que inclui qualquer isolado com o qual partilha  $\geq 94\%$  de identidade de nucleotídeos, mesmo que tenha  $< 94\%$  de identidade com todos os outros isolados desta mesma estirpe.

### 3.2. Gênero *Begomovirus*

Os begomovírus infectam diversas espécies de dicotiledôneas, incluindo várias culturas economicamente importantes, como tomate, feijão, algodão e soja. Assim, estes vírus representam uma ameaça à agricultura, pois podem causar doenças severas, particularmente nos trópicos e subtropicais, mas também em regiões temperadas, onde têm prejudicado a produção de hortaliças em estufas nos últimos anos (Varma & Malathi, 2003).

O primeiro relato formal de begomovírus infectando tomateiro no Brasil foi em 1960, quando se registrou a ocorrência de plantas com sintomas de “mosaico dourado” e “clorose infecciosa” em São Paulo (Flores *et al.*, 1960). Posteriormente, *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) foi a espécie de begomovírus caracterizada como sendo o agente causal destas doenças, transmitida pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Matyis *et al.*, 1975).

Após a detecção inicial de TGMV em 1960, houve poucos relatos de begomovírus infectando tomateiros no Brasil nos anos seguintes, possivelmente porque o biótipo A de *B. tabaci*, o único que ocorria no país, não colonizava plantas de tomate com eficiência (Bedford *et al.*, 1994). Entretanto, a incidência de doenças causadas por estes vírus cresceu rapidamente a partir da década de 90. O aumento de begomovirose foi justificado pela introdução de um novo biótipo de *B. tabaci* no país, o biótipo B, capaz de colonizar plantas daninhas e silvestres, transferindo vírus nativos destas plantas para o tomateiro (Ribeiro *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2008).

Simultaneamente à proliferação do biótipo B de *B. tabaci* a partir do início da década de 1990, relatos de sintomas típicos de begomovirose em tomateiro passaram a ocorrer em

diversas regiões produtoras do país, como no Distrito Federal (Ribeiro *et al.*, 1994), em Minas Gerais (Rezende *et al.*, 1996; Zerbini *et al.*, 1996), no submédio do São Francisco (Bezerra *et al.*, 1997) e em São Paulo (Faria *et al.*, 1997).

Atualmente, os begomovírus são divididos em dois grupos de acordo com a diversidade genética, organização genômica e distribuição geográfica: linhagens do Velho Mundo e do Novo Mundo (Nawaz-ul-Rehman & Fauquet, 2009). Os vírus com genoma monopartido são encontrados principalmente em países do Velho Mundo, enquanto os bipartidos estão distribuídos entre o Velho e o Novo Mundo (King *et al.*, 2011), sugerindo que a evolução do genoma bipartido provavelmente ocorreu antes da deriva continental (Rojas *et al.*, 2005). Em geral, os begomovírus descritos nas Américas não são isolados em outros continentes (Rocha *et al.*, 2013), indicando que estes vírus são nativos e seus prováveis ancestrais são plantas não cultivadas.

### **3.2.1. Diversidade de Begomovírus em Tomateiro no Brasil**

O gênero *Begomovirus* sempre foi o mais numeroso da família *Geminiviridae* e contém, atualmente, 288 espécies (ICTV, 2015). O primeiro begomovírus isolado de tomateiro no Brasil foi *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Matyis *et al.*, 1975), detectado inicialmente em 1960 (Flores *et al.*, 1960). Em 1996, uma nova espécie encontrada em tomateiro foi proposta, nomeada como *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (Faria *et al.*, 1997). Com a introdução do biótipo B de *B. tabaci* no país na década de 90, o número de novas espécies cresceu rapidamente (Ribeiro *et al.*, 1998). A análise de isolados encontrados em tomateiros coletados entre 1994 e 1999 em diferentes estados brasileiros resultou na detecção de sete possíveis novas espécies (Ribeiro *et al.*, 2003).

Em amostras de tomateiro e ervas daninhas coletadas na região Sudeste do país nos anos de 2005 e 2007, mais seis novas espécies de begomovírus foram identificadas (Castillo-

Urquiza *et al.*, 2008). Fernandes e colaboradores (2008), estudando isolados obtidos a partir de diferentes regiões do Brasil, concluíram que três espécies de begomovírus eram predominantes, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato golden vein virus* (TGVV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), sendo que TGVV e ToMoLCV ainda não constavam no grupo de espécies já descritas (Ribeiro *et al.*, 2003; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008).

Atualmente, 14 espécies de begomovírus isoladas de tomateiro no Brasil são consideradas definitivas pelo ICTV: *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV), *Tomato leaf distortion virus* (ToLDV), *Tomato mild mosaic virus* (ToMiMV), *Tomato golden vein virus* (TGVV), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Chino del tomate Amazonas virus* (CdTAV), *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) e *Sida mottle virus* (SiMoV) (Flores *et al.*, 1960; Matyis *et al.*, 1975; Faria *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2012). Há outras espécies relatadas no país que ainda não foram totalmente caracterizadas (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Inoue-Nagata *et al.*, 2006).

Mundialmente, “tomato yellow leaf curl disease” (TYLC) é a principal begomovirose do tomateiro, sendo um fator limitante para a tomaticultura em várias regiões. Esta doença é causada por um complexo de espécies de *Begomovirus*, cuja principal é *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Moriones & Navas-Castillo, 2000). Até o momento não há relatos da ocorrência de TYLCV no Brasil.

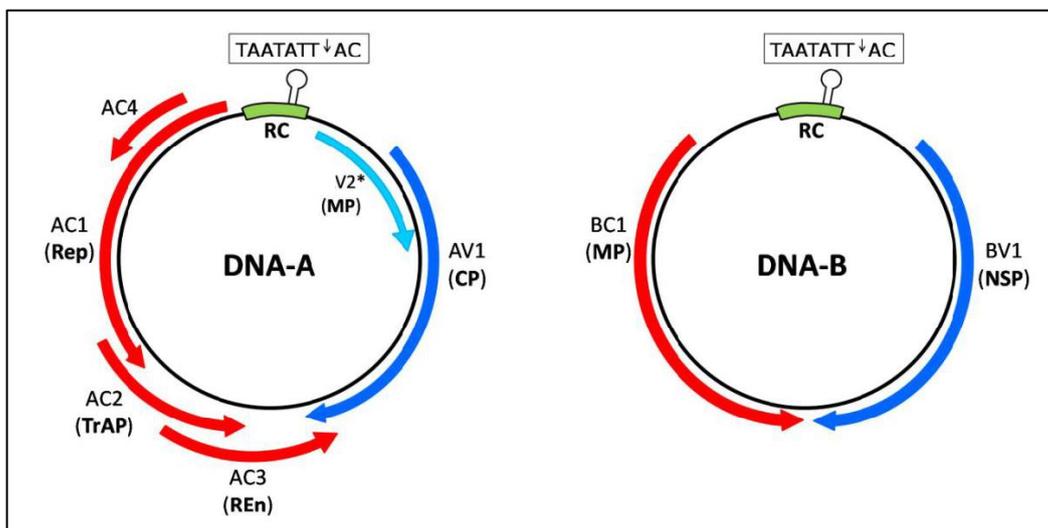
### 3.2.2. Organização Genômica dos Begomovírus

A maioria dos begomovírus possui genoma bipartido, isto é, constituído por duas moléculas de DNA (DNA-A e DNA-B), cada uma com aproximadamente 2500 a 2600 nucleotídeos (Lazarowitz & Shepherd, 1992). De um modo geral, o DNA-A codifica as proteínas necessárias para a replicação e encapsidação do genoma viral, enquanto o DNA-B contém os genes relacionados com o movimento do vírus na planta (Palmer & Rybicki, 1998; Rojas *et al.*, 2005).

Inicialmente acreditava-se que ambos os componentes genômicos eram essenciais para a ocorrência de infecção sistêmica (Hamilton *et al.*, 1983). Contudo, tem-se demonstrado que é possível haver infecção com apenas o DNA-A de begomovírus bipartidos. Galvão e colaboradores (2003) constataram a infecção sistêmica pelo DNA-A de ToCMoV em *Nicotiana benthamiana* na ausência do DNA-B. Posteriormente, Fontenelle e colaboradores (2007) demonstraram que este mesmo vírus é capaz de infectar sistemicamente outras hospedeiras, incluindo o tomateiro, com apenas a presença do DNA-A.

Os dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) compartilham identidade de sequências apenas em uma região intergênica de aproximadamente 200 nucleotídeos, chamada região comum (RC), que é altamente conservada entre DNA-A e DNA-B (Hamilton *et al.*, 1984). A RC contém elementos importantes para a replicação e transcrição do genoma viral (Revington *et al.*, 1989; Lazarowitz & Shepherd, 1992; Arguello-Astorga *et al.*, 1994;). Dentro da RC há uma sequência de 30 nucleotídeos capaz de formar uma estrutura estável em forma de grampo (*stem-loop*). Nesta estrutura encontra-se um nonanucleotídeo (5'-TAATATT/AC-3') onde está inserido o sítio de iniciação da replicação (Heyraud *et al.*, 1993) (Fig. 5). A partir da RC os genes divergem no sentido viral e complementar (Lazarowitz & Shepherd, 1992).

O DNA-A de begomovírus bipartidos é homólogo ao genoma dos monopartidos. No sentido viral, existem duas ORF's (V1 e V2), enquanto no sentido complementar há quatro ORF's (C1, C2, C3 e C4) (Fig. 5). A ORF V1 (ou AV1 em begomovírus bipartidos) codifica a capa proteica (CP, *coat protein*), proteína estrutural dos geminivírus. A CP, além de proteger o genoma viral, também é essencial para a especificidade da transmissão pelo inseto-vetor (Bridson *et al.*, 1990). Existem controvérsias quanto à função da CP no movimento sistêmico dos begomovírus. Ensaio experimentais com TGMV demonstraram que a CP não é necessária para a ocorrência de infecção sistêmica (Gardiner *et al.*, 1988). Em contrapartida, Fontenelle e colaboradores (2007) observaram que o movimento sistêmico do DNA-A de ToCMoV é dependente da CP quando o DNA-B está ausente. Em outro experimento, com TYLCV, também foi concluído que a CP é essencial para o vírus infectar sistemicamente a planta (Noris *et al.*, 1998). Em begomovírus monopartidos, a CP também desempenha função no transporte intracelular (Unselde *et al.*, 2001).



**Figura 5.** Representação esquemática da organização genômica de um begomovírus bipartido. Os círculos representam o genoma viral e cada seta corresponde a uma região genômica contendo o gene completo. As siglas dentro dos parênteses representam o produto gênico: CP, *coat protein*; Rep, *replication-associated protein*; Trap, *transcriptional activator protein*; Ren, *replication enhancer protein*; MP, *movement protein*; NSP, *nuclear shuttle protein*. V2\* é a ORF encontrada apenas em begomovírus monopartidos do Velho Mundo. RC corresponde à região comum, onde está inserido o nonanucleotídeo com o sítio de iniciação da replicação (representado pelo símbolo ↓). Ilustração: Fernandes (2010).

A ORF V2 é encontrada somente em begomovírus monopartidos do Velho Mundo. A função da proteína codificada por esta ORF ainda não foi bem elucidada, mas acredita-se que esteja envolvida no movimento do vírus na planta (Padidam *et al.*, 1996). Além disso, existem evidências de que o produto gênico de V2 esteja relacionado à supressão de silenciamento gênico (Zrachya *et al.*, 2007; Glick *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012).

A proteína codificada pela ORF C1 (AC1 ou AL1 em begomovírus bipartidos), a Rep (*replication-associated protein*), é essencial para a replicação viral, apresentando posição e função conservadas entre os geminivírus (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Faria & Zerbini, 2000). A principal função da Rep é se ligar ao sítio de iniciação da replicação e clivar o DNA, iniciando o processo replicativo (Fontes *et al.*, 1992). Com exceção da Rep, as proteínas necessárias para a replicação do vírus são originárias da célula vegetal infectada. Assim, outra função da Rep é induzir a expressão de proteínas responsáveis pela síntese de DNA da hospedeira, criando condições favoráveis à replicação viral (Nagar *et al.*, 1995; Gutierrez, 2002).

A ORF C2 (AC2 ou AL2) codifica a proteína ativadora de transcrição, a Trap (*transcriptional activator protein*), necessária para ativar a expressão da CP e NSP (Sunter *et al.*, 1990; Sunter & Bisaro, 1991; Groning *et al.*, 1994). A Trap pode também estar relacionada com a inativação de kinases, que são enzimas associadas ao sistema de defesa da hospedeira (Wang *et al.*, 2003). Esta proteína atua ainda como supressora de silenciamento gênico (Trinks *et al.*, 2005) e na patogenicidade do vírus (Sunter *et al.*, 2001).

REn (*replication enhancer protein*) é a proteína codificada pela ORF C3 (AC3 ou AL3), cuja função é intensificar a replicação, tornando-a mais eficiente. Embora a presença desta proteína não seja essencial para que a replicação ocorra, a sua expressão aumenta o acúmulo do DNA viral (Sunter *et al.*, 1990). O mecanismo de ação da REn ainda é desconhecido, mas acredita-se que ela pode aumentar a afinidade da Rep à origem de

replicação (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999) ou que estabiliza o complexo de replicação formado pela Rep e fatores acessórios da hospedeira (Settlage *et al.*, 1996). Experimentos com mutações nesta proteína resultaram em atenuação de sintomas nas plantas (Elmer *et al.*, 1988; Etessami *et al.*, 1991).

A ORF C4 (AC4 ou AL4), a menos conservada entre os begomovírus, está inserida dentro da C1, mas em uma fase de leitura diferente. Em begomovírus monopartidos, esta ORF pode determinar a severidade dos sintomas e atuar no movimento do vírus na planta (Jupin *et al.*, 1994; Rigden *et al.*, 1994). Em bipartidos, não é essencial à infectividade (Fontenelle *et al.*, 2007). Outra função da C4 é na supressão de silenciamento gênico pós-transcricional, tanto em vírus monopartidos, quanto em bipartidos (Vanitharani *et al.*, 2004; Gopal *et al.*, 2007).

O DNA-B dos begomovírus bipartidos contém apenas duas ORFs, uma no sentido viral (BV1) e outra no sentido complementar (BC1) (Fig. 5). As duas codificam proteínas responsáveis pelo movimento do vírus na planta (NSP e MP, respectivamente). A NSP (*nuclear shuttle protein*), proteína de transporte nuclear, atua no tráfego intracelular do DNA viral do núcleo, local de replicação dos vírus, para o citoplasma (Noueiry *et al.*, 1994). Em begomovírus monopartidos, o transporte intracelular é realizado pela CP (Unselde *et al.*, 2001). A proteína de movimento (MP, *movement protein*) é codificada pela ORF BC1 em begomovírus bipartidos ou pela V2 em monopartidos, embora as duas ORFs não compartilhem identidade de sequências (Etessami *et al.*, 1988). Esta proteína é responsável pelo movimento viral célula-a-célula, aumentando o limite de exclusão dos plasmodesmos (Noueiry *et al.*, 1994).

Alguns begomovírus monopartidos são encontrados associados a moléculas satélites, chamadas de alfa e beta. Estas moléculas podem ser definidas como vírus satélites, quando codificam sua própria capa proteica, ou ácidos nucleicos satélites, quando são encapsidados

pela capa proteica de um vírus auxiliar (Fauquet *et al.*, 2005). Os betasatélites possuem aproximadamente a metade do tamanho do genoma de seus vírus auxiliares, mas apresentam pouca ou nenhuma similaridade de sequência com estes vírus e precisam deles para sua replicação e movimento na planta (Briddon *et al.*, 2003). Já os alfasatélites, inicialmente chamados de DNA-1, conseguem se autorreplicar na planta hospedeira, porém, também necessitam dos vírus auxiliares para o seu movimento (Saunders & Stanley, 1999). As moléculas satélites podem interferir, em diferentes graus, na replicação e patogenicidade dos vírus, expressão de sintomas (Saunders *et al.*, 2000; Mansoor *et al.*, 2003; Nawaz-UI-Rehman & Fauquet, 2009) e supressão de silenciamento gênico (Cui *et al.*, 2005).

### **3.2.3. Replicação dos Begomovírus na Planta Hospedeira**

Os begomovírus, assim como todos os outros geminivírus, se replicam no núcleo da célula hospedeira através do mecanismo de círculo rolante (RCR, *rolling circle replication*) (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Os vírions penetram nas células da planta durante o processo de alimentação do inseto-vetor virulífero. Dentro da célula, o material genético é encaminhado ao núcleo. Não se sabe, ao certo, se o vírus move-se para o núcleo encapsado ou desencapsado, mas acredita-se que a CP está envolvida neste processo, interagindo com a cadeia de transporte da hospedeira (Gafni & Epel, 2002).

Dentro do núcleo, a partir do ssDNA é formado um DNA fita dupla (dsDNA) intermediário, conhecido como forma replicativa (RF, *replicative form*), o qual atua como molde para a replicação e transcrição do genoma viral (Donson *et al.*, 1984). Como a Rep não desempenha a função de DNA polimerase, esta atividade é proporcionada exclusivamente por enzimas da hospedeira (Laufs *et al.*, 1995; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004). Logo, a síntese da RF e de novas moléculas de ssDNA depende do sistema enzimático da planta (Faria & Zerbini, 2000).

A replicação, via RCA, inicia-se quando a proteína Rep cliva uma das fitas do dsDNA na origem de replicação. As novas moléculas de ssDNA podem ser utilizadas de duas formas: pela maquinaria da hospedeira, sendo convertidas em moléculas de dsDNA; ou, em um estágio mais tardio (após a expressão das proteínas CP e NSP), podem ser encapsidadas e transportadas para o citoplasma da célula (Jeske *et al.*, 2001).

Com a produção das proteínas NSP e MP, inicia-se o movimento do vírus na planta. Estas proteínas possibilitam o tráfego viral do núcleo para o citoplasma (através dos poros da membrana nuclear) e do citoplasma para as células adjacentes (via plasmodesmos), respectivamente (Carrington *et al.*, 1996; Sanderfoot & Lazarowitz, 1996). O movimento sistêmico do vírus (isto é, à longa distância) ocorre via floema. O mecanismo pelo qual o vírus chega ao floema ainda não foi bem elucidado. Acredita-se que a CP está envolvida nesta etapa do movimento viral em alguns casos: o movimento sistêmico CP-independente ocorre em hospedeiras que o vírus é bem adaptado, enquanto o movimento sistêmico CP-dependente ocorre em relações de pouca adaptação entre vírus e hospedeira (Pooma *et al.*, 1996).

#### **3.2.4. Variabilidade Genética dos Begomovírus**

Os begomovírus emergiram, e continuam emergindo, como um grave problema à produção agrícola nacional e internacional. O aumento no número de infecções por estes vírus é decorrente, em parte, da grande variabilidade genética encontrada entre espécies e estirpes, conferindo-lhes alta capacidade de adaptação a novas hospedeiras e a diferentes condições do ambiente (Faria & Zerbini, 2000). Os mecanismos que proporcionam a variabilidade genética dos begomovírus são mutação, recombinação e pseudorecombinação.

Taxas de mutação são geralmente mais altas em vírus de RNA, uma vez que, ao contrário da DNA polimerase, a RNA polimerase é incapaz de corrigir erros de leitura durante a replicação (Jenkins *et al.*, 2002; Malpica *et al.*, 2002). No entanto, alguns trabalhos mostram

que a rápida evolução dos begomovírus pode ser viabilizada pelo mecanismo de mutação. Duffy e Holmes (2008) analisaram diversas sequências genômicas de TYLCV e constataram que a taxa média de mutação no genoma viral é tão alta quanto à dos vírus de RNA ( $10^{-4}$  substituições/sítio/ano), com os maiores valores no gene que codifica a CP e na região intergênica. Ge e colaboradores (2007), estudando clones infecciosos de *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCV), detectaram taxas de  $10^{-4}$  substituições/sítio/ano na região intergênica e no gene da Rep.

A recombinação, que consiste na troca de fragmentos do material genético entre genomas, é considerada o principal mecanismo de variabilidade dos geminivírus (Zhou *et al.*, 1997; Padidam *et al.*, 1999), sendo responsável pelo surgimento de espécies importantes em diferentes partes do mundo (Zhou *et al.*, 1997; Monci *et al.*, 2002; Garcia-Andres *et al.*, 2006). Por este mecanismo, os vírus adquirem novas informações genéticas que podem possibilitar a sua rápida adaptação e evolução (Padidam *et al.*, 1999).

Existem alguns fatores principais que contribuem para a ocorrência dos eventos de recombinação entre espécies de begomovírus. Estes fatores são: as infecções mistas (Umaharan *et al.*, 1998); os altos níveis de replicação viral, com a produção de um grande número de cópias de dsDNA (Kanevski *et al.*, 1992; Accotto *et al.*, 1993); e o biótipo B de *B. tabaci*, que possui um amplo círculo de hospedeiras (Bedford *et al.*, 1994), possibilitando a infecção viral de novas espécies vegetais.

Os sítios “preferenciais” de recombinação no genoma viral são chamados de *hot spots*. Alguns estudos mostram que existem três *hot spots* de recombinação nos begomovírus, localizados na região intergênica, na ORF AC1 e na interface AV1/AC3 (Garcia-Andres *et al.*, 2007; Lefeuvre *et al.*, 2007a; Lefeuvre *et al.*, 2007b; Lefeuvre *et al.*, 2009). Inoue-Nagata e colaboradores (2006), analisando sequências da região intergênica, porção 5' do gene associado à Rep e da CP, constataram a emergência de novas espécies via recombinação entre

isolados de begomovírus brasileiros. Também no Brasil, Galvão e colaboradores (2003) demonstraram que uma variante de ToCMoV (ToCMoV-[MG-Bt]) surgiu como resultado de um evento de recombinação entre espécies (ToCMoV-[BA-Se1] e ToRMV).

A presença de DNA-A e DNA-B nos begomovírus bipartidos viabiliza a ocorrência do mecanismo de pseudorecombinação (ou rearranjo), que consiste na troca de um componente genômico inteiro entre espécies ou isolados (Stanley *et al.*, 1985). Em 2006, Andrade e colaboradores demonstraram que é possível ocorrer eventos de pseudorecombinação entre espécies de begomovírus, como entre o DNA-A de ToYSV e o DNA-B de Tomato crinkle leaf yellows virus (TCrLYV), fato que pode proporcionar o surgimento de espécies mais adaptadas.

### **3.2.5. Transmissão Natural dos Begomovírus**

A transmissão natural dos begomovírus ocorre exclusivamente pelo inseto-vetor, a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (Costa, 1998). Até o início da década de 1990, o biótipo A de *B. tabaci* era predominante no Brasil, quando foi relatada a introdução do biótipo B, possivelmente através de plantas ornamentais (Lourenção & Nagai, 1994; França *et al.*, 1996). O biótipo B, comparado ao A, é mais polífago, possui alta capacidade reprodutiva, maior facilidade de adaptação e elevada taxa de dispersão, tornando-se facilmente predominante nas áreas onde é introduzido (Bedford *et al.*, 1994).

Antigamente, acreditava-se na existência de uma única espécie de *B. tabaci*, sendo esta diferenciada em biótipos. Contudo, estudos recentes utilizando o gene mitocondrial citocromo oxidase I demonstraram que *B. tabaci* não é composta por biótipos, mas sim por um complexo de espécies (Dinsdale *et al.*, 2010; Barro *et al.*, 2011). Estas espécies se subdividem em 11 grupos genéticos, dentre eles: Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), Mediterranean

(MED), New World (NW) e New World 2 (NW2). MEAM1 inclui o biótipo B, o de maior distribuição mundial e predominante no Brasil (Dinsdale *et al.*, 2010; Alemandri *et al.*, 2012).

A transmissão dos begomovírus por mosca-branca é do tipo persistente-circulativa (Cohen & Nitzany, 1996; Morin *et al.*, 1999). Neste tipo de relação, as partículas virais presentes na seiva do floema de plantas infectadas são ingeridas através do estilete do vetor durante a sua alimentação e transportadas pelo esôfago até alcançarem o intestino. Estas partículas são deslocadas para a hemolinfa pela parede da câmara de filtro e do intestino, passando a interagir com proteínas produzidas por endossimbiontes presentes no corpo do inseto (Morin *et al.*, 2000). Após alcançarem as glândulas salivares acessórias, as partículas são translocadas para o ducto salivar, a partir do qual são excretadas com a saliva durante a alimentação do inseto (Hunter *et al.*, 1998; Ghanim *et al.*, 2001).

Os parâmetros de aquisição, retenção e inoculação viral podem variar conforme a espécie. Porém, em geral, os vírus são adquiridos pelas moscas-brancas em períodos curtos, como em 10 min, sendo que a probabilidade de transmissão é maior com o aumento do tempo de alimentação na planta infectada. Igualmente, a probabilidade de transmissão também é maior com tempos mais prolongados de alimentação. O período de latência do vírus no vetor pode variar de 4 a 21 horas (Costa, 1998).

Há controvérsias quanto à hipótese de que os begomovírus se replicam no corpo da mosca-branca. No entanto, Pakkianathan e colaboradores (2015), após experimentos com TYLCV, concluíram que o vírus consegue se replicar no inseto quando este é submetido a condições de estresse. Segundo os autores, em condições normais, a mosca-branca é capaz de prevenir a acumulação viral utilizando o seu sistema imune, através de um mecanismo ainda não conhecido.

### 3.2.6. Resistência Genética no Controle de Begomovirose

O uso de cultivares com resistência genética é a estratégia mais efetiva para minimizar as perdas causadas por doenças virais. No caso específico dos begomovírus, o controle químico da mosca-branca geralmente não é eficiente, devido, principalmente, à migração de grandes populações do inseto de lavouras mais velhas para lavouras mais novas e à possibilidade do vetor se tornar resistente aos inseticidas (Gerling, 1990), dificultando ainda mais o controle da begomovirose.

Os programas de melhoramento de *S. lycopersicum* baseiam-se especialmente na busca por genes/alelos de resistência em espécies selvagens de *Solanum* (Pilowsky & Cohen, 1974; Lapidot *et al.*, 2000; Boiteux *et al.*, 2012). Pesquisas destinadas à busca por fontes de resistência à begomovírus começaram por volta de 1970 (Pilowsky & Cohen, 1974). Desde então, várias espécies selvagens de tomateiro foram estudadas como potenciais fontes de resistência, tais como: *S. pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. habrochaites* e *S. cheesmaniae* (Pilowsky & Cohen, 1974; Ji *et al.*, 2007b). A partir de estudos com estas espécies, um amplo conjunto de genes/loci de resistência foi caracterizado e/ou mapeado (*Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4*, *Ty-5*, *Ty-6*, *ty-5*, *tcm-1* e *tgr-1*).

O gene *Ty-1* é um dos mais estudados atualmente e tem se mostrado eficiente contra diferentes espécies de begomovírus monopartidos e bipartidos (Zamir *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1996; Santana *et al.*, 2001; Boiteux *et al.*, 2007). Este gene foi introgridido na espécie comercial de tomate através do cruzamento interespecífico com *S. chilense*, conferindo resistência com dominância parcial. Sua expressão fenotípica de tolerância é potencializada em linhagens homozigotas (Zamir *et al.*, 1994). A ação de *Ty-1*, cuja localização é no cromossomo 6, está relacionada com a inibição do movimento viral, sendo mais eficiente em condições de baixa pressão de inóculo (Michelson *et al.*, 1994; Zamir *et al.*, 1994).

O gene *Ty-2* foi obtido de *S. habrochaites*, localizado ao longo do cromossomo 11 (Kalloo & Banerjee, 1990; Hanson *et al.*, 2000; Hanson *et al.*, 2006). *Ty-3* foi identificado no cromossomo 6 de *S. chilense*, sendo alélico à *Ty-1* (Ji *et al.*, 2007a; Verlaan *et al.*, 2013). *Ty-4* também foi obtido a partir de *S. chilense*, mas diferente de *Ty-1* e *Ty-3*, está presente no cromossomo 3 (Ji *et al.*, 2009). *Ty-5* foi introgridido em *S. lycopersicum* a partir de *S. peruvianum* e mapeado no cromossomo 4 (Anbinder *et al.*, 2009). *Ty-6* foi recentemente identificado no cromossomo 10 de *S. chilense* (Hutton & Scott, 2013). Outros genes, de natureza recessiva, também têm sido descritos como fontes de resistência a geminivírus: *ty-5*, alélico à *Ty-5* (Hutton *et al.*, 2012), *tcm-1* (Giordano *et al.*, 2005) e *tgr-1* (Bian *et al.*, 2007).

É importante destacar que estes genes não conferem imunidade às plantas, isto é, proporcionam apenas resistência parcial/tolerância. No Brasil, existem várias opções de híbridos destinados ao mercado fresco com resistência a begomovírus, como Dominador, Ellen, Portinari, Colossus, entre outros. Quanto aos tomateiros destinados à indústria, o desenvolvimento de híbridos é recente e, portanto, ainda há poucas opções, as quais têm sido utilizadas somente nos últimos anos (TY 2006 e BRS Sena, por exemplo).

#### 4. LITERATURA CITADA

- ABCSEM. 2008. *Tomate lidera crescimento e lucratividade no setor de hortaliças*. Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas. <<http://www.abcsem.com.br/releases/284/tomate-lidera-crescimento-e-lucratividade-no-setor-de-hortaliças->>. Acesso em 06 de agosto de 2015.
- ACCOTTO, G.P.; MULLINEAUX, P.M.; BROWN, S.C. & MARIE, D. 1993. Digitaria streak geminivirus replicative forms are abundant in Sphase nuclei of infected cells. *Virology* 195: 257-259.
- ALBUQUERQUE, L.C.; VARSANI, A.; FERNANDES, F.R.; PINHEIRO, B.; MARTIN, D.P.; FERREIRA, P.T.O.; LEMOS, T.O. & INOUE-NAGATA, A.K. 2012. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 157: 747-752.

- ALEMANDRI, V.; DE BARRO, P.; BEJERMAN, N.; ARGUELLO CARO, E.B.; DUMON, A.D.; MATTIO, M.F.; RODRIGUEZ, S.M. & TRUOLI, G. 2012. Species within the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) complex in soybean and bean crops in Argentina. *Journal of Economic Entomology* 105: 48-53.
- ALVARENGA, M.A.R. 2013. *Origem, botânica e descrição da planta*. In: Alvarenga, M.A.R. (ed.). *Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia*. 2<sup>a</sup> ed. Editora Universitária de Lavras. Lavras-MG. p. 13-21.
- AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; CARVALHO, M.G. & ZERBINI, F.M. 2002. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 27: 372-377.
- ANBINDER, I.; REUVENI, M.; AZARI, R.; PARAN, I.; NAHON, S.; SHLOMO, H.; CHEN, L.; LAPIDOT, M. & LEVIN, I. 2009. Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 519-530.
- ANDRADE, E.C.; MANHANI, G.G.; ALFENAS, P.F.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P. & ZERBINI, F.M. 2006. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology* 87: 3687-3696.
- ARAÚJO, J.; EIRAS, M.; COLARICCIO, A.; CHAVES, A.L.R.; HAKAKAVA, R.; BRAUN, M.R. & CHAGAS, C.M. 2001. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Cucumber mosaic virus* passion-fruit isolates in São Paulo State, Brazil. *Virus Research* 6: 151-152.
- ARGUELLO-ASTORGA, G.R.; GUEVARA-GONZALEZ, R.G.; HERRERA-ESTRELLA, L.R. & RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. 1994. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology* 203: 90-100.
- 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.
- ÁVILA, A.C.; LIMA, M.F.; RESENDE, R.O.; POZZER, L.; FERRAZ, E.; MARANHÃO, E.A.A.; CANDEIA, J.A. & COSTA, N.D. 1996. Identificação de tospovírus em hortaliças no sub-médio São Francisco utilizando DAS-ELISA e Dot-ELISA. *Fitopatologia Brasileira* 21: 503-508.

- BARBOSA, J.C.; COSTA, H.; GIORIA, R. & REZENDE, J.A.M. 2011. Occurrence of *Tomato chlorosis virus* in tomato crops in five Brazilian states. *Tropical Plant Pathology* 36: 256-258.
- BARBOSA, J.C.; TEIXEIRA, A.P.M.; MOREIRA, A.G.; CAMARGO, L.E.A.; BERGAMIN FILHO, A.; KITAJIMA, E.W. & REZENDE, J.A.M. 2008. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Brazil. *Plant Disease* 92: 1709-1709.
- 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.
- BATISTA, I.C.; EIRAS, M.; HARAKAVA, R. & COLARICCIO, A. 2012. Caracterização parcial de um *Tymovirus* isolado de tomateiros. *Bragantia* 71: 226-234.
- BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; ROSELL, R.C. & MARKHAM, P.G. 1994. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology* 125: 311-325.
- BERNARDO, P.; GOLDEN, M.; AKRAM, M.; NADARAJAN, N.; FERNANDEZ, E.; GRANIER, M.; REBELO, A.G.; PETERSCHMITT, M.; MARTIN, D.P. & ROUMAGNAC, P. 2013. Identification and characterisation of a highly divergent geminivirus: evolutionary and taxonomic implications. *Virus Research* 177: 35-45.
- BEZERRA, I.C.; LIMA, M.F.; RIBEIRO, S.G.; GIORDANO, L.B. & ÁVILA, A.C. 1997. Occurrence of geminivirus in tomato producing areas in Submedio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira* 22: 331-331.
- BEZERRA, I.C.; RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; KORMELINK, R. & ÁVILA, A.C. 1999. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from *Chrysanthemum* and one from *Zucchini*. *Phytopathology* 89: 823-830.
- BIAN, X.; THOMAS, M.R.; RASHEED, M.S.; SAEED, M.; HANSON, P.; 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.
- BOCK, K.R. 1982. Geminivirus diseases in tropical crops. *Plant Disease* 66: 266-270.
- BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; GIORDANO, L.B. & MELO, P.C.T. 2012. *Melhoramento genético*. In: Clemente, F.M.V.T & Boiteux, L.S. (eds.). Produção de tomate para processamento industrial. 1ª ed. Embrapa. Brasília-DF. p. 31-50.

- BOITEUX, L.S.; OLIVEIRA V.R.; SILVA C.H.; MAKISHIMA, N.; INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N. & GIORDANO L.B. 2007. Reaction of tomato hybrids carrying the *Ty-1* locus to Brazilian bipartite *Begomovirus* species. *Horticultura Brasileira* 25: 20-23.
- BRIDDON, R.W.; BULL-SIMON, E.; AMIN, I.; IDRIS, A.M.; MANSOOR, S.; BEDFORD, I.D.; DHAWAN, P.; RISHI, N.; SIWATCH, S.S.; ABDEL-SALAM, A.M.; BROWN, J.K.; ZAFAR, Y. & MARKHAM, P.G. 2003. Diversity of DNA beta, a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology* 312: 106-121.
- BRIDDON, R.W.; HEYDARNEJAD, J.; KHOSROWFAR, F.; MASSUMI, H.; MARTIN, D.P. & VARSANI, A. 2010. Turnip curly top virus, a highly divergent geminivirus infecting turnip in Iran. *Virus Research* 152: 169-175.
- BRIDDON, R.W.; PINNER, M.S.; STANLEY, J. & MARKHAM, P.G. 1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177: 85-94.
- BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; ZERBINI, F.M.; MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2012. *Family Geminiviridae*. In: King, A.M.Q.; Adams, M.J.; Carstens, E.B. & Lefkowitz, E.J. (eds.). *Virus Taxonomy*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. London. p 351-373.
- BROWN, J.K.; ZERBINI, F.M.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; RAMOS-SOBRINHO, R.; SILVA, J.C.F.; FIALLO-OLIVÉ, E.; BRIDDON, R.W.; HERMÁNDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.; MALATHI, V.G.; MARTIN, D.P.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; UEDA, S. & VARSANI, A. 2015. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology* 160: 1593-1619.
- 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.; KASSACHAU, K.D.; MAHAJAN, S.K. & SCHAAD, M. 1996. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* 8: 1669-1681.
- CASTILLO-URQUIZA, G.P.; BESERRA JUNIOR, J.E.A.; BRUCKNER, F.P.; LIMA, A.T.M.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P. & ZERBINI, F. 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology* 153: 1985-1989.

- CHARCHAR, J.M. & LOPES, C.A. 2005. *Nematoïdes*. In: Lopes, C.A. & Ávila, A.C. (eds.). Doenças do tomateiro. 2ª ed. Embrapa. Brasília-DF. p. 97-99.
- CHEN, B. & FRANCKI, R.I.B. 1990. Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *Journal of General Virology* 71: 939-944.
- CLEMENTE, F.M.V.T.; MENDONÇA, J.L. & ALVARENGA, M.A. 2013. *Tomate - Tratos culturais*. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tomate/arvore/CONT000fa2qor2r02wx5eo01xezlschwkfx5.html>>. Acesso em 04 de agosto de 2015.
- COHEN, S. & NITZANY, F.E. 1996. Transmission and host range of the tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology* 56: 1127-1131.
- COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; VICENTE, M.; CHAGAS, C.M. & HARAKAVA, R. 1996. Caracterização parcial de um isolado do vírus do mosaico do pepino de *Musa* sp. "nanicão". *Fitopatologia Brasileira* 21: 268-274.
- COLARICCIO, A.; LIMA, F.A.; EIRAS, M.; CHAVES, A.L.R.; LOMBARDI, R.; GALETTI, S.R.; CHAGAS, C.M. & PEIXOTO, A. 2008. Detecção do *Eggplant mosaic virus* em plantações de tomateiro no Rio Grande do Sul, Brasil. *Summa Phytopathologica* 34: 80-80.
- COSTA, A.S.; CARVALHO, A.M.B. & KITAJIMA, E.W. 1960. Risca do tomateiro em São Paulo causada por estirpe do vírus Y. *Bragantia* 19: 1111-1128.
- COSTA, C.L. 1998. Vetores de vírus de plantas - Insetos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)* 6: 103-171.
- COTRIM, M.A.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; NARITA, N.; ZERBINI, F.M. & PAVAN, M.A. 2007. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica* 33: 300-303.
- CRESTANI, O.A.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T. & MARINHO, V.L.A. 1986. *Passion fruit yellow mosaic*: a new tymovirus. *Phytopathology* 76: 951-955.
- CUI, X.; LI, G.; WANG, D.; HU, D. & ZHOU, X. 2005. A begomovirus DNAbeta-encoded protein binds DNA, functions as a suppressor of RNA silencing, and targets the cell nucleus. *Journal of Virology* 79: 10764-10775.
- DARWIN, S.C.; KNAPP, S. & PERALTA, I.E. 2003. Tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). *Systematics and Biodiversity* 1: 29-53.

- DEMSKI, J.W. 1981. *Tabacco mosaic virus* is seedborne in pimiento peppers. *Plant Disease* 65: 723-724.
- DIANESE, E.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.
- DINSDALE, A.; COOK, L.; RIGINOS, C.; BUCKLEY, Y.M. & BARRO, P.D. 2010. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. *Annals of the Entomological Society of America* 103: 196-208.
- DONSON, J.; MORRIS-KRSINICH, B.A.; MULLINEAUX, P.M.; BOULTON, M.I. & DAVIES, J.W. 1984. A putative primer for second-strand DNA synthesis of maize streak virus is virion-associated. *EMBO Journal* 3: 3069-3073.
- DUARTE, L.M.L.; RIVAS, E.B.; ALEXANDRE, M.A.V. & FERRARI, J.T. 1994. Detection of CMV isolates from Commelinaceae species. *Fitopatologia Brasileira* 19: 248-253.
- DUFFUS, J.E.; LIU, H.Y. & WISLER, G.C. 1994. A new closterovirus of tomato in southern California transmitted by the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). *Phytopathology* 84: 1072-1073.
- DUFFY, S. & HOLMES, E.C. 2008. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus*. *Journal of Virology* 82: 957-965.
- ELMER, J.S.; SUNTER, G.; GARDINER, W.; BRAND, L.; BROWNING, C.; BISARO, D. & ROGERS, S. 1988. Agrobacterium-mediated inoculation of plants with tomato golden mosaic virus DNAs. *Plant Molecular Biology* 10: 225-234.
- ERKAN, S. & DELEN, N. 1985. Seed treatments to eliminate seed-borne *Tobacco mosaic virus* in pepper seeds. *Capsicum and Eggplant Newsletter* 4: 50-50.
- ESQUINAS-ALCÁZAR, J. & VINALS, F.N. 1995. *Situaci n taxon mica, domesticaci n y difusi n del tomate*. In: Nuez Vinals, F. (ed.). El cultivo del tomate. Ediciones Mundiprensa. Madrid. p. 14-42.
- ETESSAMI, P.; CALLIS, R.; ELLWOOD, S. & STANLEY, J. 1988. Delimitation of essential genes of cassava latent virus DNA 2. *Nucleic Acids Res* 16: 4811-4829.
- ETESSAMI, P.; SAUNDERS, K.; WATTS, J. & STANLEY, J. 1991. Mutational analysis of complementary-sense genes of African cassava mosaic virus DNA A. *Journal of General Virology* 72: 1005-1012.

- FAOSTAT. 2015. *Database results*. FAOSTAT/FAO. <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. Acesso em 06 de agosto de 2015.
- FARIA, J.C. & ZERNIBI, F.M. 2000. Família *Geminiviridae*: taxonomia, replicação e movimento. *Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)* 8: 27-57.
- FARIA, J.C.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; SLACK, S.A. & MAXWELL, D.P. 1997. A new geminivirus associated with tomato in the state of São Paulo, Brazil. *Plant Disease* 81: 423-423.
- FAUQUET, C.M. & STANLEY, J. 2003. Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems. *Annals of Applied Biology* 142: 165-189.
- FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; MORIONES, E.; STANLEY, J.; ZERBINI, M. & ZHOU, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* 153: 783-821.
- FAUQUET, C.M.; MAXWELL, D.P.; GRONENBORN, B. & STANLEY, J. 2000. Revised proposal for naming geminiviruses. *Archives of Virology* 145: 1743-1761.
- FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U. & BALL, L.A. 2005. *Virus taxonomy - Classification and nomenclature of viruses*. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. San Diego.
- FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUE, L.C.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; ÁVILA, A.C. & INOUE-NAGATA, A.K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36: 251-258.
- FERNANDES, J.J.; CARVALHO, M.G.; ANDRADE, E.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B. & ZERBINI, F.M. 2006. Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology* 55: 513-522.
- FILGUEIRA, F.A.R. 2003. *Solanáceas II - Tomate: a hortaliça cosmopolita*. In: Filgueira, F.A.R. (ed.). Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2ª ed. Editora UFV. Viçosa-MG. p.193-238.
- FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K. & KRAMER, M. 1960. Observações de "clorose infecciosa" das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico* 26: 65-69.
- FONTENELLE, M.R.; LUZ, D.F.; GOMES, A.P.S.; FLORENTINO, L.H.; ZERBINI, F.M. & FONTES, E.P.B. 2007. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus Tomato chlorotic mottle virus. *Virus Research* 126: 262-267.

- FONTES, E.P.; LUCKOW, V.A. & HANLEY-BOWDOIN, L. 1992. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *The Plant Cell Online* 4: 597-608.
- FONTES, P.C.R. & SILVA, D.J.H. 2002. *Produção de tomate de mesa*. 1ª ed. Aprenda Fácil. Viçosa-MG.
- FRANÇA, F.H.; VILAS-BOAS, G.L. & CASTELO-BRANCO, M. 1996. Occurrence of *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) in the Federal District. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 25: 369-372.
- FRANCKI, R.I.B.; FAUQUET, C.M.; KNUDSON, D.L. & BROWN, F. 1991. *Virus taxonomy - Classification and nomenclature of viruses*. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses/Virology division of the International Union of Microbiological Societies. Springer-Verlag. Wien.
- FRANGIONI, D.S.S.; PAVAN, M.A. & COLARICCIO, A. 2001. Identification of CMV subgroup I in plants of *Capsicum annuum* L. 'Magali R' in São Paulo State, Brazil. *Virus Research* 6: 155-156.
- FRISCHMUTH, T.; ZIMMAT, G. & JESKE, H. 1990. The nucleotide sequence of *Abutilon mosaic virus* reveals prokaryotic as well as eukaryotic features. *Virology* 178: 461-468.
- GAFNI, Y. & EPEL, B.L. 2002. The role of host and viral proteins in intra- and intercellular 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.B. 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-ANDRES, S.; MONCI, F.; NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. 2006. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology* 350: 433-442.
- GARCIA-ANDRES, S.; TOMAS, D.M.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; NAVASCASTILLO, J. & MORIONES, E. 2007. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. *Virology* 365: 210-219.
- GARDINER, W.E.; SUNTER, G.; BRAND, L.; ELMER, J.S.; ROGERS, S.G. & BISARO, D.M. 1988. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: the coat protein is not required for systemic spread or symptom development. *EMBO Journal* 7: 899-904.

- GE, L.; ZHANG, J.; ZHOU, X. & LI, H. 2007. Genetic structure and population variability of Tomato yellow leaf curl China virus. *Journal of Virology* 81: 5902-5907.
- GERLING, D. 1990. *Whiteflies: their bionomics, pest status and management*. 1<sup>a</sup> ed. Intercept. England.
- GERMAN, T.L.; ULLMAN, D.E. & MOYER, J.W. 1992. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annual Review of Phytopathology* 30: 315-348.
- GHANIM, M.; MORIN, S. & CZOSNEK, H. 2001. Rate of *Tomato yellow leaf curl virus* translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology* 91: 188-196.
- GIORDANO, L.B.; SILVA-LOBO, V.L.; SANTANA, F.M.; FONSECA, M.E.N. & BOITEUX, L.S. 2005. Inheritance of resistance to the bipartite Tomato chlorotic mottle begomovirus derived from *Lycopersicon esculentum* cv. 'Tyking'. *Euphytica* 143: 27-33.
- GLICK, E.; ZRACHYA, A.; LEVY, Y.; METT, A.; GIDONI, D.; BELAUSOV, E.; CITOVSKY, V. & GAFNI, Y. 2008. Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proceedings of the National Academy Sciences* 105: 157-161.
- GOPAL, P., PRAVIN KUMAR, P., SINILAL, B., JOSE, J., KASIN YADUNANDAM, A. & USHA, R. 2007. Differential roles of C4 and  $\beta$ C1 in mediating suppression of post-transcriptional gene silencing: evidence for transactivation by the C2 of Bhendi yellow vein mosaic virus, a monopartite begomovirus. *Virus Research* 123: 9-18.
- GRONING, B.R.; HAYES, R.J. & BUCK, K.W. 1994. Simultaneous regulation of tomato golden mosaic virus coat protein and AL1 gene expression: expression of the AL4 gene may contribute to suppression of the AL1 gene. *Journal of General Virology* 75: 721-726.
- GUTIERREZ, C. 2002. Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60: 219-230.
- HAMILTON, W.D.; STEIN, V.E.; COUTTS, R.H. & BUCK, K.W. 1984. Complete nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of tomato golden mosaic virus: potential coding regions and regulatory sequences. *EMBO Journal* 3: 2197-205.
- HAMILTON, W.D.O.; BISARO, D.M.; COUTTS, R.H.A. & BUCK, K.W. 1983. Demonstration of the bipartite nature of the genome of a single-stranded DNA plant virus by infection with the cloned DNA components. *Nucleic Acids Research* 11: 7387-7396.

- HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B. & ROBERTSON, D. 2004. Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. *Molecular Plant Pathology* 5: 149-156.
- HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR, S. & ROBERTSON, D. 1999. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription and cell cycle regulation. *Critical Review in Plant Sciences* 18: 71-106.
- 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.
- HANSON, P.M.; GREEN, S.K. & KUO, G. 2006. *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Tomato Genetics Cooperative* 56: 17-18.
- HEYDARNEJAD, J.; KEYVANI, N.; RAZAVINEJAD, S.; MASSUMI, H. & VARSANI, A. 2013. Fulfilling Koch's postulates for beet curly top Iran virus and proposal for consideration of new genus in the family *Geminiviridae*. *Archives of Virology* 158: 435-443.
- HEYRAUD, F.; MATZEIT, V.; SCHAEFER, S.; SCHELL, J. & GRONENBORN, B. 1993. The conserved nonanucleotide motif of the geminivirus stem-loop sequence promotes replicational release of virus molecules from redundant copies. *Biochimie* 75: 605-615.
- HOLLINGS, M. & BRUNT, A.A. 1981. *Potyvirus*. In: Kurstak, E. (ed.). Handbook of plant virus infections: Comparative diagnosis. 1<sup>a</sup> ed. Elsevier. Amsterdam. p. 731-807.
- HUNTER, W.B.; HIEBERT, E.; WEBB, S.E.; TSAI, J.H. & POLSTON, J.E. 1998. Location of geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Plant Disease* 82: 1147-1151.
- HUTTON, S.F. & SCOTT, J.W. 2013. Fine-mapping and cloning of *Ty-1* and *Ty-3*; and mapping of a new TYLCV resistance locus, “*Ty-6*”. <<http://tgc.ifas.ufl.edu/2013/abstracts/SamOrchardAbstract%20TBRT%202013.pdf>>. Acesso em 01 de outubro de 2015.
- 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. 2006. *Censo agropecuário*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro-RJ.

- IBGE. 2015. *Levantamento sistemático da produção agrícola - Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas (Junho/2015)*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro-RJ.
- ICTV. 2015. *International Committee on Taxonomy of Viruses*. <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em 03 de setembro de 2015.
- INOUE-NAGATA, A.K. 2013. *Doenças viróticas*. In: Alvarenga, M.A.R. (ed.). *Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia*. 2ª ed. Editora Universitária de Lavras. Lavras-MG. p. 329-344.
- INOUE-NAGATA, A.K.; ÁVILA, A.C. & LOPES, C.A. 2005. *Doenças viróticas*. In: Lopes, C.A. & Ávila, A.C. (eds.). *Doenças do tomateiro*. 2ª ed. Embrapa. Brasília-DF. p. 77-94.
- INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; RESENDE, R.O.; BOITEUX, L.S.; MONTE, D.C.; DUSI, A.N.; ÁVILA, A.C. & VLUGT, R.A.A. 2002. *Pepper yellow mosaic virus*, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. *Archives of Virology* 147: 849-855.
- 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.
- JACINTO, L.U.; SOARES, B.B.; RANGEL, R. & JACINTO, A.F.V.U. 2012. *Transplântio e colheita mecanizada*. In: Clemente, F.M.V.T & Boiteux, L.S. (eds.). *Produção de tomate para processamento industrial*. 1ª ed. Embrapa. Brasília-DF. p. 315-327.
- JENKINS, G.M.; RAMBAUT, A.; PYBUS, O.G. & HOLMES, E.C. 2002. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Evolution* 54: 156-165.
- JESKE, H.; LUETGEMEIER, M. & PREISS, W. 2001. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of *Abutilon mosaic virus*. *EMBO Journal* 20: 6158-6167.
- JI, Y.; SCHUSTER, D.J. & SCOTT, J.W. 2007a. *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.W.; HANSON, P.; GRAHAM, E. & MAXWELL, D.P. 2007b. *Sources of resistance, inheritance, and location of genetic loci conferring resistance to members of the tomato-infecting begomoviruses*. In: Czosnek, H. (ed.). *Tomato yellow leaf curl*

- virus disease: management, molecular biology, breeding for resistance. 1<sup>a</sup> ed. Springer. Dordrecht. p. 343-362.
- 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.
- JONES, J.P.; STALL, R.E. & ZITTER, T.A. 1991. *Compendium of tomato diseases*. 1<sup>a</sup> ed. APS Press. Saint Paul.
- JUPIN, I.; KOUCHKOVSKY, F.; JOUANNEAU, F. & GRONENBORN, B. 1994. Movement of Tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): involvement of the protein encoded by ORF C4. *Virology* 204: 82-90.
- KALLOO, G. & BANERJEE, M.K. 1990. Transfer of tomato leaf curl virus resistance from *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to *L. esculentum*. *Plant Breeding* 105: 156-159.
- KANEVSKI, I.F.; THAKUR, S.; COSOWSKY, L.; SUNTER, G.; BROUGH, C.; BISARO, D. & MALIGA, P. 1992. Tobacco lines with high copy number of replicating recombinant geminivirus vectors after biolistic DNA delivery. *Plant Journal* 2: 457-463.
- KING, A.M.Q.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M.J. & CARSTENS, E.B. 2011. *Virus taxonomy - Classification and nomenclature of viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Science. San Diego.
- KITAJIMA, E.W. 1965. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. *Journal of Electron Microscopy* 14: 119-121.
- KOENIG, R. & LESEMANN, D.E. 1981. *Tymoviruses*. In: Kurstak, E. (ed.). Comparative diagnosis of viral diseases. 1<sup>a</sup> ed. Elsevier. Amsterdam. p. 33-60.
- KOONIN, E.V. & ILYINA, T.V. 1992. Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. *Journal of General Virology* 73: 2763-2766.
- LAPIDOT, M.; GOLDRAY, O.; BEN-JOSEPH, R.; COHEN, S.; FRIEDMANN, M.; SHLOMO, A.; NAHON, S.; CHEN, L. & PILOWSKY, M. 2000. Breeding tomatoes for resistance to Tomato yellow leaf curl begomovirus. *EPPO Bulletin* 30: 317-321.
- LAUFS, J.; TRAUT, W.; HEYRAUD, F.; MATZEIT, V.; ROGERS, S.G.; SCHELL, J. & GRONENBORN, B. 1995. In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 3879-3883.

- LAZAROWITZ, S.G. & SHEPHERD, R.J. 1992. Geminiviruses: genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11: 327-349.
- LEFEUVRE, P.; LETT, J.M.; REYNAUD, B. & MARTIN, D.P. 2007a. Avoidance of protein fold disruption in natural virus recombinants. *Plos Pathogens* 3: e181.
- LEFEUVRE, P.; LETT, J.M.; VARSANI, A. & MARTIN, D.P. 2009. Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *Journal of Virology* 83: 2697-2707.
- LEFEUVRE, P.; MARTIN, D.P.; HOAREAU, M.; NAZE, F.; DELATTE, H.; THIERRY, M.; VARSANI, A.; BECKER, N.; REYNAUD, B. & LETT, J.M. 2007b. Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: molecular diversity and evolution through recombination. *Journal of General Virology* 88: 3458-3468.
- LEWANDOWSKI, D. J. & DAWSON, W.O. 1994. *Tobamoviruses*. In: Webster, R.G. & Granoff, A. (eds.). *Encyclopedia of virology*. 1<sup>a</sup> ed. Academic Press. New York. p. 1436-1441.
- LIANG, P.; NAVARRO, B.; ZHANG, Z.; WANG, H.; LU, M.; XIAO, H.; WU, Q.; ZHOU, X.; DI SERIO, F. & LI, S. 2015. Identification and characterization of a novel geminivirus with a monopartite genome infecting apple trees. *Journal of General Virology* 96: 2411-2420.
- LOPES, C.A. & ÁVILA, A.C. 2005. *Doenças do tomateiro*. 2<sup>a</sup> ed. Embrapa. Brasília-DF.
- LOPES, C.A. & QUEZADO-DUVAL, A.M. 2005. *Doenças bacterianas*. In: Lopes, C.A. & Ávila, A.C. (eds.). *Doenças do tomateiro*. 2<sup>a</sup> ed. Embrapa. Brasília-DF. p. 55-73.
- LOPES, C.A.; REIS, A. & BOITEUX, L.S. 2005. *Doenças fúngicas*. In: Lopes, C.A. & Ávila, A.C. (eds.). *Doenças do tomateiro*. 2<sup>a</sup> ed. Embrapa. Brasília-DF. p. 19-51.
- LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CHARCHAR, J.M. & QUEZADO-DUVAL, A.M. 2000. *Doenças: identificação e controle*. In: Silva, J.B.C & Giordano, L.B. (eds.). *Tomate para processamento industrial*. 1<sup>a</sup> ed. Embrapa. Brasília-DF. p. 88-111.
- LOURENÇÃO, A.L. & NAGAI, H. 1994. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. *Bragantia* 53: 53-59.
- LU, Q.Y.; WU, Z.J.; XIA, Z.S. & XIE, L.H. 2015. Complete genome sequence of a novel monopartite geminivirus identified in mulberry (*Morus alba* L.). *Archives of Virology* 160: 2135-2138.
- MA, Y.; NAVARRO, B.; ZHANG, Z.; LU, M.; ZHOU, X.; CHI, S.; DI SERIO, F. & LI, S. 2015. Identification and molecular characterization of a novel monopartite geminivirus

- associated with mulberry mosaic dwarf disease. *Journal of General Virology* 96: 2421-2434.
- MACEDO, M.A.; BARRETO, S.S.; HALLWASS, M. & INOUE-NAGATA, A.K. 2014. High incidence of *Tomato chlorosis virus* alone and in mixed infection with begomoviruses in two tomato fields in the Federal District and Goiás state, Brazil. *Tropical Plant Pathology* 39: 449-452.
- MALPICA, J.M.; FRAILE, A.; MORENO, I.; OBIAS, C.I.; DRAKE, J.W. & GARCIAARENAL, F. 2002. The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. *Genetics* 162: 1505-1511.
- MANSOOR, S.; BRIDDON, R.W.; BULL, S.E.; BEDFORD, I.D.; BASHIR, A.; HUSSAIN, M.; SAEED, M.; ZAFAR, Y.; MALIK, K.A.; FAUQUET, C. & MARKHAM, P.G. 2003. Cotton leaf curl disease is associated with multiple monopartite begomoviruses supported by single DNA beta. *Arch Virology* 148: 1969-1986.
- MARTELLI, G.P.; SABANADZOVIC, S.; SABANADZOVIC, N.A.; EDWARDS, M.C. & DREHER, T. 2002. The family *Tymoviridae*. *Archives of Virology* 147: 1837-46.
- MATOS, L.M. & MORETTI C.L. 2012. *Qualidade e segurança alimentar na cadeia produtiva*. In: Clemente, F.M.V.T & Boiteux, L.S. (eds.). Produção de tomate para processamento industrial. 1ª ed. Embrapa. Brasília-DF. p. 303-312.
- MATTHEWS, R.E.F. 1979. Classification and nomenclature of viruses. Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 12: 129-296.
- MATTHEWS, R.E.F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 17: 1-199.
- MATYIS, J.C.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R. & COSTA, A.S. 1975. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica* 1: 267-275.
- MICHELSON, I.; ZAMIR, D. & CHOSNEK, 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* 34: 928-933.
- MONCI, F.; SANCHEZ-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.
- 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, H.; CZOSNEK, H.; VERBEEK, M. & HEUVELT, J.F.J.M. 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.
- MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2000. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research* 71: 123-134.
- MORITZ, G.; KUMM, S. & MOUND, L. 2004. Tospovirus transmission depends on thrips ontogeny. *Virus Research* 100: 143–149.
- MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A. & SUMMERS, M.D. 1995. *Virus taxonomy - Classification and nomenclature of viruses*. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag. Wien.
- NAGAR, S.; PEDERSEN, T.J.; CARRICK, K.M.; HANLEY-BOWDOIN, L. & ROBERTSON, D. 1995. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* 7: 705-719.
- NAGATA, T.; ÁVILA, A.C.; TAVARES, P.C.T.; BARBOSA, C.J.; JULIATTI, F.C. & KITAJIMA, E.W. 1995. Occurrence of different tospoviruses in six states of Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 20: 90-95.
- NAIKA, S.; JEUDE, J.V.L.; GOLFAU, M.; HILMI, M. & VAN DAM, B. 2006. *A cultura do tomate*. 1ª ed. Agromisa/CTA. Wageningen.
- NASCIMENTO, W.M.; MELO, P.C.T & FREITAS, R.A. 2012. *Produção de sementes*. In: Clemente, F.M.V.T & Boiteux, L.S. (eds.). *Produção de tomate para processamento industrial*. 1ª ed. Embrapa. Brasília-DF. p. 53-75.
- NAULT, L.R. 1997. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Annals of the Entomological Society of America* 90: 521-541.
- NAWAZ-UL-REHMAN, M.S. & FAUQUET, C.M. 2009. Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Letters* 583: 1825-1832.
- NORIS, E.; VAIRA, A.M.; CACIAGLI, P.; MASENGA, V.; GRONENBORN, B. & ACCOTTO, G.P. 1998. Amino acids in the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus that are crucial for systemic infection, particle formation, and insect transmission. *Journal of Virology* 72: 10050-10057.

- 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.
- OLIVEIRA, V.C.; NAGATA, T.; GUIMARÃES, F.C.; FERREIRA, F.A.; KITAJIMA, E.W.; NICOLINI, C.; RESENDE, R.O. & INOUE-NAGATA, A.K. 2013. Characterization of a novel tymovirus on tomato plants in Brazil. *Virus Genes* 46: 190-194.
- PADIDAM, M.; BEACHY, R.N. & FAUQUET, C.M. 1996. The role of AV2 ("Precoat") and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology* 224: 390-404.
- PADIDAM, M.; SAWYER, S. & FAUQUET, C.M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265: 218-225.
- PAKKIANATHAN, B.C.; KONTSEDALOV, S.; LEBEDEV, G.; MAHADAV, A.; ZEIDAN, M.; CZOSNEK, H. & GHANIMA, M. 2015. Replication of *Tomato yellow leaf curl virus* in its whitefly vector, *Bemisia tabaci*. *Journal of Virology* 89: 9791-9803.
- PALMER, K.E. & RYBICKI, E.P. 1998. The molecular biology of mastreviruses. *Advances in Virus Research* 50: 183-234.
- PALUKAITIS, P.; ROOSSINCK, M.J.; DIETZGEN, R.G. & FRANCKI, R.I.B. 1992. *Cucumber mosaic virus*. *Advances in Virus Research* 41: 281-348.
- PERALTA, E.R.; KNAPP, S. & SPOONER, D.M. 2005. New species of wild tomatoes (*Solanum* Section: *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany* 30: 424-434.
- PILOWSKY, M. & COHEN, S. 1974. Inheritance of resistance of *Tomato yellow leaf curl virus* in tomatoes. *Phytopathology* 64: 632-635.
- PINHEIRO, J.B. & PEREIRA, R.B. 2012. *Nematoides*. In: Clemente, F.M.V.T & Boiteux, L.S. (eds.). *Produção de tomate para processamento industrial*. 1ª ed. Embrapa. Brasília-DF. p. 243-262.
- POOMA, W.; GILLETTE WILLIAM, K.; JEFFREY JERRY, L. & PETTY IAN, T.D. 1996. Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus systemic movement. *Virology* 218: 264-268.
- POZZER, L.; RESENDE, R.O.; LIMA, M.I.; KITAJIMA, E.W.; GIORDANO, L.B. & ÁVILA, A.C. 1996. Tosspovírus: uma revisão atualizada. *Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)* 4: 95-148.
- QUEZADO-DUVAL, A.M. & LOPES, C.A. 2012. *Doenças bacterianas*. In: Clemente, F.M.V.T & Boiteux, L.S. (eds.). *Produção de tomate para processamento industrial*. 1ª ed. Embrapa. Brasília-DF. p. 205-222.

- REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R. & WICKNER, R.B. 2000. *Virus taxonomy - Classification and nomenclature of viruses*. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press. San Diego.
- REIS, A. & LOPES, C.A. 2012. *Doenças causadas por fungos e distúrbios fisiológicos*. In: Clemente, F.M.V.T & Boiteux, L.S. (eds.). Produção de tomate para processamento industrial. 1ª ed. Embrapa. Brasília-DF. p. 179-202.
- RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; BEZERRA, I.C.; LIMA, M.I.; KITAJIMA, E.W. & ÁVILA, A.C. 1996. New tospoviruses found in Brazil. *Acta Horticulturae* 431: 78-89.
- REVINGTON, G.N.; SUNTER, G. & BISARO, D.M. 1989. DNA sequences essential for replication of the B genome component of tomato golden mosaic virus. *The Plant Cell Online* 1: 985-992.
- REZENDE, E.A.; FILGUEIRA, F.A.R.; ZERBINI, F.M.; ZAMBOLIM, E.M.; FERNANDES, J.J. & GILBERTSON, R.L. 1996. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 21: 424-424.
- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVÍCIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H. & ZERBINI, F.M. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 148: 281-295.
- RIBEIRO, S.G.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; FERNANDES, J.J.; FARIA, J.C.; LIMA, M.F.; GILBERTSON, R.L.; ZAMBOLIM, E.M. & ZERBINI, F.M. 1998. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. *Plant Disease* 82: 830-830.
- RIBEIRO, S.G.; KITAJIMA, E.W.; OLIVEIRA, C.R.B. & KOENING, R. 1996. A strain of *Eggplant mosaic virus* isolated from naturally infected tobacco plants in Brazil. *Plant Disease* 80: 446-449.
- RIBEIRO, S.G.; MARTIN, D.P.; LACORTE, C.; SIMOES, I.C.; ORLANDINI, D.R. & INOUE-NAGATA, A.K. 2007. Molecular and biological characterization of Tomato chlorotic mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology* 97: 702-711.

- RIBEIRO, S.G.; MELLO, L.V.; BOITEUX, L.S.; KITAJIMA, E.W. & FARIA, J.C. 1994. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 19: 330-330.
- RIGDEN, J.E.; KRAKE, L.R.; REZAIAN, M.A. & DRY, I.B. 1994. ORF C4 of Tomato leaf curl geminivirus is a determinant of symptom severity. *Virology* 204: 847-850.
- RILEY, D.G.; JOSEPH, S.V.; SRINIVASAN, R. & DIFFIE, S. 2011. Thrips vectors of tospoviruses. *Journal of Integrated Pest Management* 1: 1-10.
- ROCHA, C.S.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; LIMA, A.T.M.; SILVA, F.N.; XAVIER, C.A.D.; HORA-JUNIOR, B.T.; BESERRA-JUNIOR, J.E.A.; MALTA, A.W.O.; MARTIN, D.P.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; MIZUBUTI, E.S.G. & ZERBINI, F.M. 2013. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving and segregated based on geographical location. *Journal of Virology* 87: 5784-5799.
- ROJAS, M.R.; HAGEN, C.; LUCAS, W.J. & GILBERTSON, R.L. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* 43: 361-394.
- RYBICKI, E.P. 1994. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Archives of Virology* 139: 49-77.
- 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.M.; RIBEIRO, S.G.; MOITA, A.W.; MOREIRA JÚNIOR, D.J. & GIORDANO, L.B. 2001. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. *Euphytica* 122: 45-51.
- SAUNDERS, K. & STANLEY, J. 1999. A nanovirus-like DNA component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology* 264:142-152.
- SAUNDERS, K.; BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; MARKHAM, P.G.; WONG, S.M. & STANLEY, J. 2000. A unique virus complex causes *Ageratum* yellow vein disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 6890-6895.
- SCHOLTHOF, K.G.; ADKINS, S.; CZOSNEK, H.; PALUKAITIS, P.; JACQUOT, E.; HOHN, T.; HOHN, B.; SAUNDERS, K.; CANDRESSE, T.; AHLQUIST, P.; HEMENWAY, C. & FOSTER, G.D. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 12: 938-954.

- SCOTT, J.W.; STEVEN, M.R.; BARTEN, J.H.M.; THOME, C.R.; POLSTON, J.E.; SCHUSTER, D.J. & SERRA C.A. 1996. *Introgression of resistance to whitefly-transmitted geminiviruses from *Lycopersicon chilense* to tomato*. In: Gerling, D. & Mayer, R.T. (eds.). Bemisia 1995: Taxonomy, biology, damage, control and management. Intercept. Andover. p. 357-377.
- SEAL, S.E.; VANDENBOSCH, F. & JEGER, M.J. 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25: 23-46.
- SETTLAGE, S.B.; MILLER, A.B. & HANLEY-BOWDOIN, L. 1996. Interactions between geminivirus replication proteins. *Journal of Virology* 70: 6790-6795.
- SHUKLA, D.D.; WARD, C.W. & BRUNT, A.A. 1994. *The Potyviridae*. 1<sup>a</sup> ed. CAB International. Wallingford.
- SILBERSCHMIDT, K.M. & NÓBREGA, N.R. 1941. Sobre uma doença de vírus em bananeira. *Biológico* 7: 216-219.
- SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B.; FURUMOTO, O.; BOITEUX, L.S.; FRANÇA, F.H.; VILLAS-BÔAS, G.L.; CASTELO-BRANCO, M.; MEDEIROS, M.A.; MAROUELLI, W.; SILVA, W.L.C.; LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C.; NASCIMENTO, W.M. & PEREIRA, W. 2006. *Cultivo de tomate para industrialização*. Embrapa Hortaliças. <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial\\_2ed/clima.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial_2ed/clima.htm)>. Acesso em 04 de agosto de 2015.
- SOUZA, J.C. & REIS, P.R. 2003. *Principais pragas do tomate para mesa: bioecologia, dano e controle*. In: Lacerda, V. (ed.). Tomate para mesa. Informe Agropecuário EPAMIG. Belo Horizonte-MG. p. 79-92.
- STANLEY, J.; TOWNSEND, R. & CURSON, S.J. 1985. Pseudorecombinants between cloned DNAs of two isolates of Cassava latent virus. *Journal of General Virology* 66: 1055-1061.
- SUNTER, G. & BISARO, D.M. 1991. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology* 180: 416-419.
- SUNTER, G.; HARTITZ, M.D.; HORMUZDI, S.G.; BROUGH, C.L. & BISARO, D.M. 1990. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology* 179: 69-77.

- SUNTER, G.; SUNTER, J.L. & BISARO, D.M. 2001. Plants expressing Tomato golden mosaic virus AL2 or beet curly top virus L2 transgenes show enhanced susceptibility to infection by DNA and RNA viruses. *Virology* 285: 59-70.
- TOKESHI, H. & CARVALHO, P.C.T. 1980. *Doenças do tomateiro*. In: Galli, F.; Carvalho, P.C.T.; Tokeshi, H.; Balmer, E.; Kimati, H.; Cardoso, C.O.N.; Salgado, C.L.; Krüger, T.L.; Cardoso, E.J.B.N.; Bergamin Filho, A. (eds.). Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. 2ª ed. Agronômica Ceres. São Paulo-SP. p. 511-552.
- TRINKS, D.; RAJESWARAN, R.; SHIVAPRASAD, P.V.; AKBERGENOV, R.; OAKELEY, E.J.; VELUTHAMBI, K.; HOHN, T. & POOGGIN, M.M. 2005. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *Journal of Virology* 79: 2517-2527.
- UMAHARAN, P.; PADIDAM, M.; PHELPS, R.H.; BEACHY, R.N. & FAUQUET, C.M. 1998. Distribution and diversity of geminiviruses in Trinidad and Tobago. *Phytopathology* 88: 1262-1268.
- UNSELD, S.; HOHNLE, M.; RINGEL, M. & FRISCHMUTH, T. 2001. Subcellular targeting of the coat protein of African cassava mosaic geminivirus. *Virology* 286: 373-383.
- VALE, F.X.R.; LOPES, C.A. & ALVARENGA, M.A.R. 2013. *Doenças fúngica, bacterianas e causadas por nematoides*. In: Alvarenga, M.A.R. (ed.). Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia. 2ª ed. Editora Universitária de Lavras. Lavras-MG. p. 277-325.
- VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J.S. & FAUQUET, C.M. 2004. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* 78: 9487-9498.
- VARMA, A. & MALATHI, V.G. 2003. Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* 142: 145-164.
- VARSANI, A.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; HERNANDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.; BROWN, J.K.; ZERBINI, F.M. & MARTIN D.P. 2014. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. *Archives of Virology* 159: 2193-2203.
- VARSANI, A.; SHEPHERD, D.N.; DENT, K.; MONJANE, A.L.; RYBICKI, E.P. & MARTIN, D.P. 2009. A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. *Virology Journal* 6: 1-12.
- 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.
- WANG, H.; HAO, L.; SHUNG, C.Y.; SUNTER, G. & BISARO, D.M. 2003. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell* 15: 3020-3032.
- WETERING, F.; GOLDBACH, R. & PETERS, D. 1996. Tomato spotted wilt Tospovirus ingestion by first instar larvae of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission. *Phytopathology* 86: 900-905.
- WIJKAMP, I.; LENT, J.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R. & PETERS, D. 1993. Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of General Virology* 74: 341-349.
- WINTERMANTEL, W.M. & WISLER, G.C. 2006. Vector specificity, host range and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Disease* 90: 814-819.
- WISLER, G.C.; LI, R.H.; LIU, H.Y.; LOWRY, D.S. & DUFFUS, J.E. 1998. Tomato chlorosis virus: a new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology* 88:402-409.
- YAZDI, H. R.; HEYDARNEJAD, J. & MASSUMI, H. 2008. Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus Genes* 36: 539-545.
- ZAITILIN, M. & ISRAEL, H.M. 1975. Tobacco mosaic virus (type strain). *Descriptions of Plant Viruses* 151: 1-5.
- ZAMIR, D.; EKSTEIN-MICHELSON, I.; ZAKAY, Y.; NAVOT, N.; ZEIDAN, M.; SARFATTI, M.; ESHED, Y.; HAREL, E.; PLEBAN, T.; VAN-OSS, H.; KEDAR, N.; RABINOWITCH, H.D. & CZOSNEK, H. 1994. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-1*. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 141-146.
- ZERBINI, F.M. & MACIEL-ZAMBOLIN, E. 1999. A família *Potyviridae* - Parte I. *Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)* 7: 1-66.
- ZERBINI, F.M.; ZAMBOLIM, E.M.; FERNANDES, J.J.; GILBERTSON, R.L. & CARRIJO, I.V. 1996. Geminivírus isolado de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.). *Fitopatologia Brasileira* 21: 430-430.
- ZHANG, J.; DONG, J.; XU, Y. & WU, J. 2012. V2 protein encoded by tomato yellow leaf curl China virus is an RNA silencing suppressor. *Virus Research* 163: 51-58.
- ZHOU, X.; LIU, Y.; CALVERT, L.; MUNOZ, C.; OTIM-NAPE, G.W.; ROBINSON, D.J. & HARRISON, B.D. 1997. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe

cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology* 78: 2101-2111.

ZRACHYA, A.; GLICK, E.; LEVY, Y.; ARAZI, T.; CITOVSKY, V. & GAFNI, Y. 2007. Suppressor of RNA silencing encoded by Tomato yellow leaf curl virus-Israel. *Virology* 358: 159-165.

# CAPÍTULO 2

---

---

**DIVERSIDADE GENÔMICA DE BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIROS  
COM E SEM RESISTÊNCIA A BEGOMOVIROSE**

## DIVERSIDADE GENÔMICA DE BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIROS COM E SEM RESISTÊNCIA A BEGOMOVIROSE

### RESUMO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma das principais hortaliças cultivadas no mundo. Entre as doenças que ocorrem nesta cultura, as viroses destacam-se pela dificuldade do seu controle. A begomovirose é uma das principais doenças virais do tomateiro, com alta incidência nas áreas produtoras do país. O uso de plantas resistentes é a estratégia mais eficiente e de baixo custo para minimizar as perdas causadas pelos begomovírus. Contudo, o crescente plantio de cultivares com resistência pode resultar na seleção de isolados virais específicos, acelerar a alteração da composição populacional dos begomovírus e culminar na quebra da resistência. Como ainda não há informações se essa seleção realmente ocorre nas condições brasileiras, este trabalho foi desenvolvido objetivando analisar e comparar as espécies de begomovírus presentes em amostras de tomateiro rasteiro das cultivares Heinz-9553 (suscetível a begomovirose) e BRS Sena (resistente a begomovirose) coletadas em Luziânia-GO, além de avaliar a diversidade genômica dentro de cada espécie encontrada. Verificou-se que nas plantas de BRS Sena a severidade da doença é menor e os sintomas são pouco evidentes. A diversidade de begomovírus nas amostras foi inicialmente analisada através da técnica de RCA/RFLP e os resultados obtidos foram confirmados por PCR específica e clonagem. Duas espécies de begomovírus foram detectadas em ambas as cultivares estudadas, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), sendo ToSRV a mais predominante. Comparações entre as sequências mostraram que isolados virais (ToSRV ou ToMoLCV) obtidos de uma mesma planta são mais próximos, enquanto que isolados obtidos de cultivares diferentes são mais distantes. Nos dados de variação genética, avaliados pela ocorrência de mutações nos isolados de cada espécie, constatou-se a presença de inserções e deleções de nucleotídeos apenas em regiões

intergênicas/não-codificantes do genoma de ToSRV e ToMoLCV. Mutações causadas por substituição de nucleotídeos foram observadas ao longo das ORFs do genoma de ambas as espécies. Um maior número de mutações por substituição ocorreu nas sequências do DNA-A de ToSRV e ToMoLCV obtidas de plantas resistentes. As ORFs AC1 (Rep) e AV1 (CP) das duas espécies de begomovírus apresentaram maior número de substituições de nucleotídeos. Quanto às análises filogenéticas, verificou-se que os begomovírus se agrupam com base na localização geográfica. O conjunto dos resultados indica que, possivelmente, os isolados virais obtidos da cultivar resistente estão passando por um processo inicial de variação genética decorrente da pressão seletiva imposta pelo uso de plantas resistentes. Contudo, para confirmar esta hipótese, novas análises precisam ser realizadas em populações maiores de ToSRV e ToMoLCV.

**Palavras-chave:** *Geminivirus*, adaptação viral, pressão seletiva.

## GENOME DIVERSITY OF BEGOMOVIRUSES IN TOMATOES WITH AND WITHOUT BEGOMOVIRUS RESISTANCE

### ABSTRACT

Tomato plant (*Solanum lycopersicum*) is one of the main vegetables grown in the world. Among the diseases that affect this culture, virus infections are particularly important due to the difficulty in their control. From these, a begomovirus disease is one of the major diseases of tomato plants, occurring in high incidence in the growing areas of the country. The use of resistant plants is the most efficient and cost-effective strategy to minimize losses caused by begomoviruses. However, an increasing cultivation of resistant cultivars may result in selection of specific viral isolates, accelerate changes in the begomovirus population composition, and lead to the breakdown of resistance. Since it is not known whether this selection actually occurs in our conditions, the aim of this work was to analyze and compare the begomovirus species present in processing tomato plants on two cultivars, Heinz-9553 (susceptible to begomovirus infection) and BRS Sena (resistant to begomovirus infection) collected in Luziânia-GO, and to evaluate the genome diversity within each species. It was observed that infected BRS Sena plants are less severely infected, and symptoms are mild. The diversity of begomoviruses in the samples was initially analyzed by RCA/RFLP and the results were confirmed by species-specific PCR and cloning. Two begomovirus species were detected in both cultivars, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) and *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), being ToSRV the most prevalent. Based on sequence comparisons, it was observed that the viral isolates (ToSRV or ToMoLCV) are closer when isolated from the same plant, whereas isolates from different cultivars are more distant. In the genetic variation analyses, measured by mutation occurrence in the isolates of each species, the presence of nucleotide insertions and deletions was only found in intergenic/non-coding regions of both ToSRV and ToMoLCV genome, while mutations caused by nucleotide substitution were

observed throughout the ORFs in the genome of both species. A higher number of substitutions was found in DNA-A sequences of ToSRV and ToMoLCV from resistant plants. Most of the nucleotide substitutions were seen in AC1 (Rep) and AV1 (CP) ORFs of the two begomoviruses. Following phylogenetic analysis, it was clear that the begomoviruses are grouped together based on their geographical origin. The results indicate that most possibly viral isolates present in a resistant cultivar are going through an initial process of genetic variation due to the selective pressure imposed by the use of resistant plants. However, to confirm this hypothesis, further analyses are needed on larger populations of ToSRV and ToMoLCV.

**Keywords:** *Geminivirus*, viral adaptation, selective pressure.

## 1. INTRODUÇÃO

Os begomovírus, membros da família *Geminiviridae*, infectam uma ampla variedade de plantas economicamente importantes, sendo responsáveis pela ocorrência de doenças em várias partes do mundo, principalmente nos trópicos e subtropicais (Bock, 1982; Varma & Malathi, 2003). Estes vírus são relatados em tomateiro no Brasil desde a década de 1960 (Flores *et al.*, 1960). Contudo, somente a partir de 1990, com a introdução de um novo biótipo do inseto-vetor *Bemisia tabaci* (mosca-branca), o biótipo B, houve um aumento drástico no número de doenças causadas pelos begomovírus no país (Lourenção & Nagai, 1994).

A hipótese mais aceita para explicar as epidemias de begomovirose em tomateiros no Brasil considera que os vírus foram transferidos de plantas nativas para os tomateiros após a introdução e disseminação do biótipo B de *B. tabaci*, o qual é mais polífago que o biótipo A (Bedford *et al.*, 1994; Rocha *et al.*, 2013). Em geral, os begomovírus presentes nas Américas são bipartidos e não são isolados em outros continentes (Rocha *et al.*, 2013), indicando que estes vírus são realmente nativos, sendo as plantas não cultivadas suas prováveis hospedeiras originais.

Atualmente, são descritas 14 espécies de begomovírus que infectam tomateiro no país: *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV), *Tomato leaf distortion virus* (ToLDV), *Tomato mild mosaic virus* (ToMiMV), *Tomato golden vein virus* (TGVV), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Chino del tomate Amazonas virus* (CdTAV), *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) e *Sida mottle virus* (SiMoV) (Flores *et al.*, 1960; Matyis *et al.*, 1975; Faria *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2012).

É possível que exista um padrão de distribuição geográfica dos begomovírus encontrados no Brasil. ToSRV parece ser predominante na região Centro-Sul (Fernandes *et al.*, 2008; Naito, 2012; Rocha *et al.*, 2013), enquanto que ToMoLCV predomina na região Nordeste (Fernandes *et al.*, 2008; Souza, 2014), sendo também comumente encontrado na região Centro-Oeste (Albuquerque *et al.*, 2012). Estes trabalhos, que avaliaram a diversidade de begomovírus, são importantes e devem ser realizados periodicamente, considerando que estes vírus possuem uma alta taxa de variabilidade (Lima *et al.*, 2013), resultando em flutuações genéticas constantes e elevada possibilidade de surgimento de novas espécies.

As informações geradas pelos estudos de diversidade viral são fundamentais para orientar os programas de melhoramento genético e possibilitar o entendimento dos mecanismos evolutivos associados com o aparecimento de novas espécies, estirpes ou variantes. O crescente plantio de cultivares com resistência no país pode oferecer um componente a mais para a seleção de isolados virais específicos, acelerar a alteração da composição populacional dos begomovírus e culminar na quebra da resistência. Contudo, ainda não existem dados que mostrem se essa seleção realmente ocorre nas condições brasileiras. Baseado neste déficit de informações, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de analisar e comparar as espécies de begomovírus presentes em duas cultivares de tomateiros rasteiros, com e sem resistência a begomovirose, bem como estudar a diversidade genômica dentro de cada espécie encontrada.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Coleta das Amostras**

Um total de 117 amostras foliares de tomateiro rasteiro foi coletado (com 90 dias de idade após o plantio) em uma lavoura com irrigação por pivô central da Fazenda Village, localizada no município de Luziânia, estado de Goiás (16°26'05,5" e 47°36'07,7"). Deste

total, 45 amostras foram obtidas de plantas sintomáticas da cultivar Heinz-9553 (H-9553, suscetível a begomovirose) e 72 da BRS Sena (resistente a begomovirose). As duas cultivares estavam plantadas lado a lado, separadas por aproximadamente 50 cm de distância. Todas as amostras foram coletadas em plantas que apresentavam sintomas semelhantes às aquelas causados pela infecção por begomovírus. Porém, como os sintomas em BRS Sena são suaves e menos frequentes, coletou-se um maior número de amostras desta cultivar.

## **2.2. Extração do DNA Total**

O DNA total das folhas foi extraído usando o método CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide), conforme Doyle & Doyle (1991), com algumas adaptações. Aproximadamente 100 mg de tecido foliar foi macerado em tubos de microcentrífugas de 2 mL contendo cinco esferas metálicas de 1 mm de diâmetro (para auxiliar na maceração) e 750 µL do tampão CTAB (2% CTAB, 100 mM de Tris-HCl/pH 8, 20 mM de EDTA e 50 mM de NaCl), com adição de 0,2% de β-mercaptoetanol. As amostras foram maceradas em agitador (Precellys - Bertin Technologies) programado para dois ciclos de 30 seg a 1.500 rpm e, posteriormente, incubadas a 65°C por 15 min. Em seguida, adicionou-se 750 µL de clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico - 24:1) aos tubos, os quais foram vigorosamente agitados e centrifugados por 10 min a 10.000 rpm. Aproximadamente 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL contendo 400 µL de isopropanol. Os tubos foram agitados levemente, mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos para precipitação do DNA e, então, centrifugados por 10 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 400 µL de etanol 70% gelado a 13.000 rpm por 5 min. Após as lavagens, o *pellet* foi seco em temperatura ambiente por 30 min e ressuspendido com 300 µL de água Milli-Q. Os tubos, contendo o DNA total extraído, foram armazenados a -20°C para as análises posteriores.

### **2.3. Detecção de Begomovírus por PCR**

O DNA total extraído das folhas coletadas foi utilizado para confirmação das infecções por reações de PCR (*polymerase chain reaction*) usando *primers* degenerados universais para begomovírus: pAL1v1978 e pAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993). Cada reação de PCR foi realizada em um volume final de 10 µL, contendo 1 µL de DNA total, 1 µL de tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (10X, Invitrogen), 0,8 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen), 0,4 µL de dNTP's (2,5 mM cada, GE Healthcare), 0,1 µL de cada *primer* (10 µM), 0,1 µL da enzima *Taq* DNA polimerase (5 U/µL, Invitrogen) e 6,5 µL de água Milli-Q.

O DNA viral foi amplificado em termociclador programado para 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, nas seguintes condições: 94°C por 5 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min 30 seg, respectivamente, finalizando a reação a 72°C por 5 min. Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% preparado com Tris-borato-EDTA (TBE, 0,5X). O marcador molecular utilizado foi 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

### **2.4. Amplificação do DNA Viral por Círculo Rolante e Avaliação do Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RCA/RFLP)**

O DNA total das amostras positivas nas reações de PCR foi submetido à amplificação por círculo rolante (RCA, *rolling circle amplification*). Esta técnica possibilita a amplificação de genomas circulares, como o DNA-A e DNA-B dos begomovírus (Inoue-Nagata *et al.*, 2004). Cada reação de RCA foi realizada com 0,5 µL de DNA total, 1 µL de tampão da enzima *Phi-29* DNA polimerase (10X, NEB), 1 µL de BSA (100X, NEB), 1 µL de dNTP's (10 mM, GE Healthcare), 2,5 µL de *primer* hexanucleotídeo randômico (10 µM), 0,15 µL da enzima *Phi-29* DNA polimerase (10.000 U/mL, NEB) e 3,85 µL de água Milli-Q. A reação foi incubada a 30°C por 24 h. Após este período, a enzima foi inativada a 65°C por 10 min.

Para analisar o perfil de restrição dos isolados de begomovírus presentes nas amostras, o DNA amplificado por RCA foi digerido com a enzima de restrição MspI. A reação da digestão, cujo volume final foi de 10 µL, consistiu de 1 µL de DNA viral amplificado (concentração de aproximadamente 100 ng/µL), 1 µL de tampão da enzima (10X, NEB), 0,2 µL da enzima (20.000 U/mL, NEB) e 7,8 µL de água Milli-Q. A reação foi incubada a 37°C por 12 h. Os fragmentos de DNA resultantes da digestão foram separados em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5X. O marcador molecular utilizado foi 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). A análise do gel baseou-se nos diferentes perfis de restrição. A partir destas análises, foram selecionadas uma a duas amostras de cada perfil, pertencentes tanto aos tomateiros suscetíveis, quanto aos resistentes. Posteriormente, as amostras selecionadas foram clonadas.

## **2.5. Seleção das Enzimas de Restrição para Clonagem**

Para a clonagem dos genomas virais completos presentes nas amostras escolhidas, o DNA amplificado por RCA foi digerido com cinco enzimas de restrição: KpnI, ApaI, BamHI, ClaI e EcoRI (20.000 U/mL, NEB). As reações foram realizadas seguindo o mesmo protocolo descrito no item anterior (item 2.4.) e os produtos das digestões foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5X. Em seguida, o gel contendo os fragmentos de DNA foi utilizado para hibridização por *Southern blot*, conforme protocolo descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Utilizou-se sondas não radioativas específicas para o DNA-A e DNA-B de begomovírus. Estas sondas foram sintetizadas por PCR (Santana *et al.*, 2007) usando os *primers* CP1 (CCCGTCGACATGYCTAAGMGKGAKGCCCC) e CP2 (CCCCTGCAGAACTTCCAAGTCTGGACG) para o DNA-A, B1150F (CATGTAATGGNGTWTATG) e B1850R (AAAGACCCDATWCCNTGG) para o DNA-B, e como molde utilizou-se um isolado de ToSRV. Após a análise dos resultados da

hibridização, foram escolhidas as enzimas capazes de clivar os dois componentes genômicos dos begomovírus (DNA-A e DNA-B) em um único ponto, gerando um fragmento de aproximadamente 2,6 kb.

## 2.6. Clonagem

As enzimas de restrição selecionadas foram utilizadas para realizar uma nova digestão com volume final de 40  $\mu\text{L}$ , contendo 4  $\mu\text{L}$  de DNA amplificado por RCA (concentração de aproximadamente 100 ng/ $\mu\text{L}$ ), 4  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima, 0,8  $\mu\text{L}$  da enzima e 31,2  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q. A reação foi mantida a 37°C por 12 h. O volume total da reação foi aplicado em gel de agarose a 0,8% preparado com TBE 0,5X. Os fragmentos virais de interesse (insertos) foram extraídos do gel e purificados com o kit Illustra PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante.

O vetor pBlueScript SK+ (Stratagene), após ter sido digerido com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para digestão dos insertos, foi desfosforilado e precipitado conforme protocolo descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Em seguida, procedeu-se à etapa de ligação vetor-inserto, considerando a proporção 1:5 (vetor:inserto), na presença da enzima T4 DNA ligase (400 U/mL, NEB) e do seu tampão (NEB). As reações de ligação foram incubadas a 16°C por 12 h e, após este período, foram dialisadas em água Milli-Q. Posteriormente, 5  $\mu\text{L}$  de cada reação foram adicionados a 50  $\mu\text{L}$  de células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  para transformação por eletroporação. As células transformadas foram plaqueadas e incubadas a 37°C por 12 h.

A extração do DNA plasmidial das células transformadas foi realizada de acordo com Sambrook e colaboradores (1989). Confirmou-se a presença dos insertos através da digestão com as respectivas enzimas de restrição utilizadas no processo de clonagem, resultando em dois fragmentos analisados em gel de agarose, um correspondente ao vetor (tamanho de 3 kb)

e o outro ao inserto (aproximadamente 2,6 kb). Os clones que continham os insertos foram, então, digeridos com a enzima MspI, e aqueles com perfis de restrição distintos foram selecionados e submetidos à purificação plasmidial com o kit Illustra PlasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. As colônias contendo os clones foram preservadas em glicerol e armazenadas a -80°C (Sambrook *et al.*, 1989).

## **2.7. Sequenciamento e Análise das Sequências**

O processo de sequenciamento foi realizado pela empresa Macrogen (Coréia do Sul). Um par de *primers* do vetor (M13F e M13R) e dois *primers* internos, desenhados para o DNA-A e DNA-B de cada espécie encontrada, foram suficientes para obtenção de sequências completas de ambos os componentes genômicos dos begomovírus presentes nas amostras. Os *primers* internos foram desenhados com o programa Oligo Analyzer (Integrated DNA Technologies) e sintetizados pela Macrogen.

Os contigs foram montados e analisados no programa Geneious 9.0.5 (Biomatters Ltd). Todas as sequências foram submetidas à pesquisa BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) para comparação com espécies de begomovírus depositadas nos bancos de dados públicos. Múltiplos alinhamentos e comparações das sequências foram feitos com os programas Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) e SDT v1.2 (Muhire *et al.*, 2014), respectivamente. As árvores filogenéticas foram construídas no Geneious 9.0.5 pelo método de Neighbor-Joining, com 3000 repetições de *bootstrap*.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Detecção de Amostras Positivas a Begomovírus por PCR**

Para a realização deste trabalho, 45 amostras foliares de tomateiros da cultivar H-9553 (suscetível a begomovirose) e 72 de BRS Sena (resistente a begomovirose) foram coletadas

em Luziânia-GO. Todas as amostras obtidas estavam sintomáticas, porém, os sintomas eram mais severos e evidentes nas plantas suscetíveis, com presença de clorose internerval, bolhosidade, deformação foliar e nanismo (Fig. 1 A e B), enquanto que nas plantas resistentes observou-se apenas clareamento de nervuras, pequenas manchas cloróticas e uma leve bolhosidade (Fig. 1 C e D).

Do total de 117 amostras coletadas, 44 de H-9553 (98%) e 56 de BRS Sena (78%) foram positivas na reação de PCR com os *primers* universais para begomovírus pAL1v1978 e pAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993). Estas amostras positivas foram submetidas às técnicas de RCA e RFLP e, posteriormente, foram clonadas.



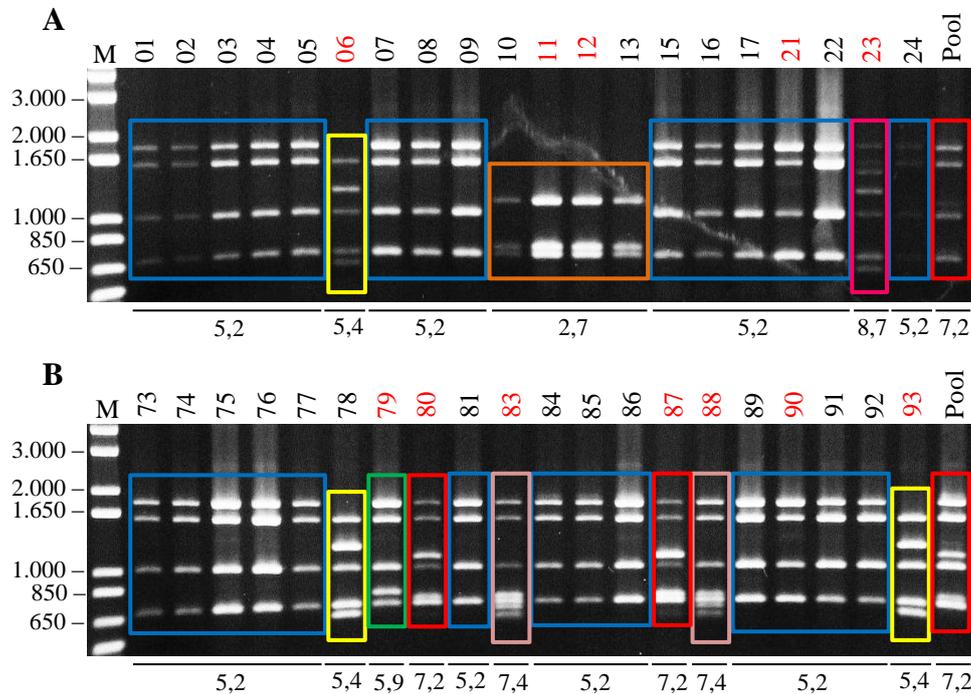
**Figura 1.** Folhas de tomateiro da cultivar Heinz-9553 (A-B) e BRS Sena (C-D) com sintomas de clorose internerval, bolhosidade, deformação foliar e nanismo, causados pela infecção por begomovírus.

### 3.2. Análise Preliminar dos Begomovírus por RCA/RFLP

Utilizou-se 20 amostras de cada cultivar, selecionadas ao acaso, do grupo que apresentou resultado positivo na detecção de begomovírus por PCR. As amostras restantes foram misturadas (pool) separadamente, isto é, fez-se um pool de H-9553 e outro de BRS

Sena. O DNA viral das amostras selecionadas e dos dois pools foi amplificado por RCA e, em seguida, digerido com a enzima de restrição MspI para análise do tamanho estimado dos genomas de begomovírus presentes nas plantas e dos perfis de restrição, os quais foram comparados com perfis de espécies conhecidas.

Através do somatório estimado dos fragmentos de DNA digeridos, que variou de 2,7 a 8,7 kb (Fig. 2A e 2B), é possível inferir a presença de um ou mais isolados virais nas amostras. Assim, acredita-se que a maioria das plantas estava infectada com apenas um begomovírus, pois o genoma completo destes vírus possui aproximadamente 5 kb, correspondente a ~ 2,5 kb do DNA-A e ~ 2,5 do DNA-B. As amostras com tamanho mensurado em 2,7 kb provavelmente possuem um único componente genômico viral (DNA-A), enquanto aquelas com somatório superior a 7 kb possivelmente estão infectadas com mais de um isolado de begomovírus de uma mesma espécie ou de espécies diferentes.



**Figura 2.** Géis de eletroforese dos produtos obtidos pela amplificação por círculo rolante (RCA) e polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) com a enzima de restrição MspI, presentes em amostras de tomateiros da cultivar BRS Sena (A) e Heinz-9553 (B). Perfis de restrição distintos estão indicados por diferentes cores. Os somatórios estimados dos genomas (em kb) estão indicados abaixo da coluna de cada amostra. As amostras selecionadas para clonagem estão destacadas em vermelho. M: marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Sete perfis de restrição distintos foram observados após a digestão (destacados em cores), alguns mais frequentes, ocorrendo tanto nas plantas suscetíveis, quanto nas resistentes (Fig. 2A e 2B). Em contrapartida, dois perfis (cores verde e rosa claro) foram observados exclusivamente em plantas de H-9553 (Fig. 2B), enquanto outros dois (cores laranja e rosa escuro) foram visualizados apenas nas amostras de BRS Sena (Fig. 2A). O padrão de bandas destacado em azul na Figura 2 foi o predominante, aparecendo em 27 plantas de ambas as cultivares. Acredita-se que este padrão seja da espécie *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), pois o número e tamanho dos fragmentos gerados são característicos desta espécie.

Quanto ao perfil de restrição obtido nos dois pools, este também foi identificado em amostras isoladas (Fig. 2A e 2B), sugerindo que não há, entre os materiais misturados, nenhum begomovírus diferente daqueles presentes nas amostras analisadas separadamente. Uma a duas amostras de cada padrão de bandas foram selecionadas para serem clonadas, totalizando 12 amostras, as quais estão destacadas em vermelho na Figura 2.

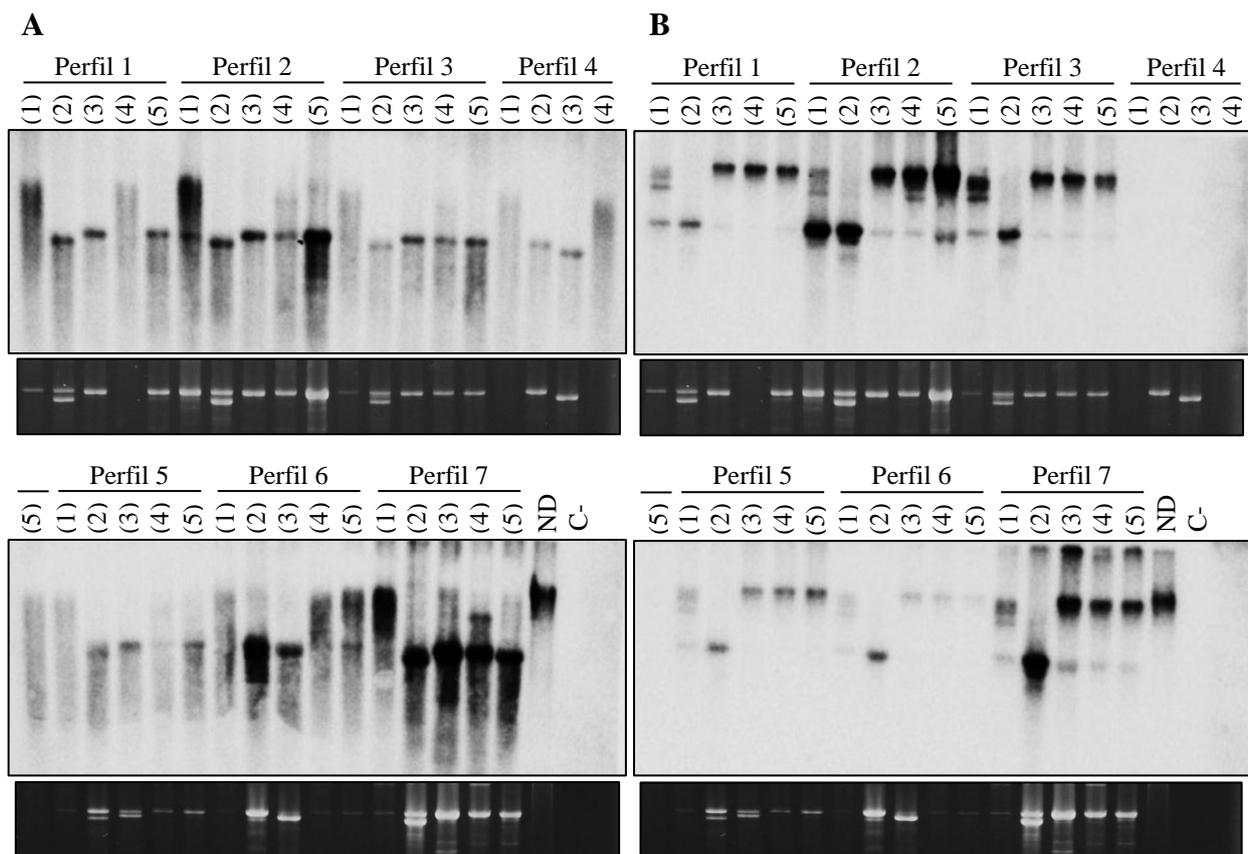
### **3.3. Análise da Hibridização por *Southern Blot***

Para cada perfil de restrição viral, o DNA amplificado por RCA das amostras correspondentes foi digerido com cinco enzimas de restrição (KpnI, ApaI, BamHI, ClaI e EcoRI) e os produtos da digestão foram hibridizados por *Southern blot*, utilizando sondas não radioativas específicas para o DNA-A e o DNA-B de begomovírus (molde de ToSRV). Com a análise dos resultados da hibridização, foram selecionadas duas enzimas, ApaI e BamHI, por serem capazes de clivar o DNA-A e o DNA-B em um único ponto, gerando um fragmento de aproximadamente 2,6 kb (Fig. 3A e 3B).

Conforme anteriormente mencionado, nas amostras com somatório do genoma viral estimado em 2,7 kb, que na Figura 3 correspondem ao perfil de restrição de número 4, os fragmentos resultantes da digestão com as enzimas de restrição não hibridizaram com a sonda

específica para o DNA-B (Fig. 3B), corroborando a afirmativa prévia de que nestas amostras provavelmente há isolados de begomovírus que possuem apenas um componente genômico (DNA-A).

O DNA das 12 amostras selecionadas foi digerido com as enzimas de restrição escolhidas (ApaI ou BamHI) e separado em gel de agarose. Por fim, os fragmentos de interesse foram eluídos do gel e clonados em vetor pBlueScript.



**Figura 3.** Membranas de hibridização por *Southern blot* realizado com sondas específicas para o (A) DNA-A e (B) DNA-B de begomovírus, hibridizando produtos obtidos pela amplificação por círculo rolante (RCA) e polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) com diferentes enzimas de restrição: (1) KpnI, (2) ApaI, (3) BamHI, (4) ClaI e (5) EcoRI. Os perfis de restrição 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem às amostras 90, 93, 23, 12, 88, 87 e 79, respectivamente. ND: DNA viral amplificado por RCA, mas não digerido com as enzimas de restrição. C-: controle negativo.

### 3.4. Begomovírus Identificados por Clonagem

Um par de *primers* universais do vetor (M13F e M13R) foi utilizado para a determinação das sequências dos insertos. Posteriormente, dois *primers* internos, um do

DNA-A e outro do DNA-B de cada espécie encontrada, foram desenhados para completar as sequências de ambos os componentes genômicos dos begomovírus presentes nas amostras.

Ao total, 31 clones foram sequenciados, porém, seis foram desconsiderados, pois não foi possível obter seus genomas completos. Este problema ocorreu devido à presença de dois sítios de restrição da enzima *ApaI* nas amostras, gerando mais de um fragmento, sendo um deles muito pequeno (aproximadamente 40 nucleotídeos), motivo pelo qual não foi visualizado no gel de agarose. Portanto, foram analisados 25 clones, 8 de tomateiros resistentes e 17 de tomateiros suscetíveis (Tabela 1). O número total de clones obtidos da cultivar suscetível foi superior ao da resistente devido a maior quantidade de padrões de bandas [resultantes da digestão com a enzima de restrição *MspI*] nas plantas suscetíveis, uma vez que este foi o critério utilizado para seleção das amostras.

Análises BLASTn resultaram na identificação de clones correspondentes a duas espécies: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV). Quinze sequências são de ToSRV (8 do DNA-A e 7 do DNA-B), enquanto 10 são do DNA-A de ToMoLCV (Tabela 1).

A obtenção de clones de ToSRV e ToMoLCV a partir de uma mesma amostra (Tabela 1) confirma a hipótese anterior de que há mais de um isolado viral nas plantas que apresentaram o somatório estimado dos fragmentos provenientes da digestão com a enzima de restrição *MspI* superior a 7 kb. Reações de PCR com *primers* específicos para as espécies ToSRV (AAGGCGACGTCTTTGGAAGG e CTCAGCGGCCTTGTTATATTT) e ToMoLCV (CATCTTCRTGKAATTCTCTGG e TGGACCACARAGTAAAAGAC) confirmaram a ocorrência de infecções mistas em quatro amostras da cultivar H-9553 (suscetível) que foram utilizadas para clonagem: 80, 83, 87 e 88. Na PCR, ToSRV foi detectado em todas as amostras clonadas, com exceção da 11 e 12, onde detectou-se somente ToMoLCV. Este último vírus, por sua vez, foi encontrado em seis amostras: 11 e 12 (cultivar

resistente) em infecção simples, 80, 83, 87 e 88 (cultivar suscetível) em infecção mista. Apesar de inúmeras tentativas, nenhum clone correspondente ao DNA-B de ToMoLCV foi obtido.

**Tabela 1.** Clones correspondentes a isolados de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), com seus respectivos componentes genômicos, obtidos a partir de amostras de tomateiros da cultivar BRS Sena (resistente a begomovirose) e Heinz-9553 (suscetível a begomovirose) coletadas no município de Luziânia-GO. Clones nomeados de acordo com o número da amostra seguido pelo número do clone.

Clone	Caráter de Resistência <sup>a</sup>	Enzima Clonagem <sup>b</sup>	Genoma (nt)
<b>ToSRV/DNA-A</b>			
06-036	R	BamHI	2.593
06-204	R	BamHI	2.594
23-043	R	BamHI	2.591
79-217	S	BamHI	2.593
79-255	S	BamHI	2.593
83-215	S	BamHI	2.592
90-221	S	BamHI	2.593
90-226	S	BamHI	2.593
<b>ToSRV/DNA-B</b>			
06-278	R	ApaI	2.570
23-109	R	ApaI	2.570
79-292	S	ApaI	2.569
88-116	S	ApaI	2.569
90-082	S	ApaI	2.570
93-095	S	ApaI	2.569
93-096	S	ApaI	2.569
<b>ToMoLCV/DNA-A</b>			
11-158	R	ApaI	2.632
11-160	R	ApaI	2.632
12-156	R	ApaI	2.632
80-143	S	ApaI	2.630
80-174	S	ApaI	2.630
83-125	S	ApaI	2.631
87-132	S	ApaI	2.630
87-165	S	ApaI	2.630
87-166	S	ApaI	2.630
88-120	S	ApaI	2.631

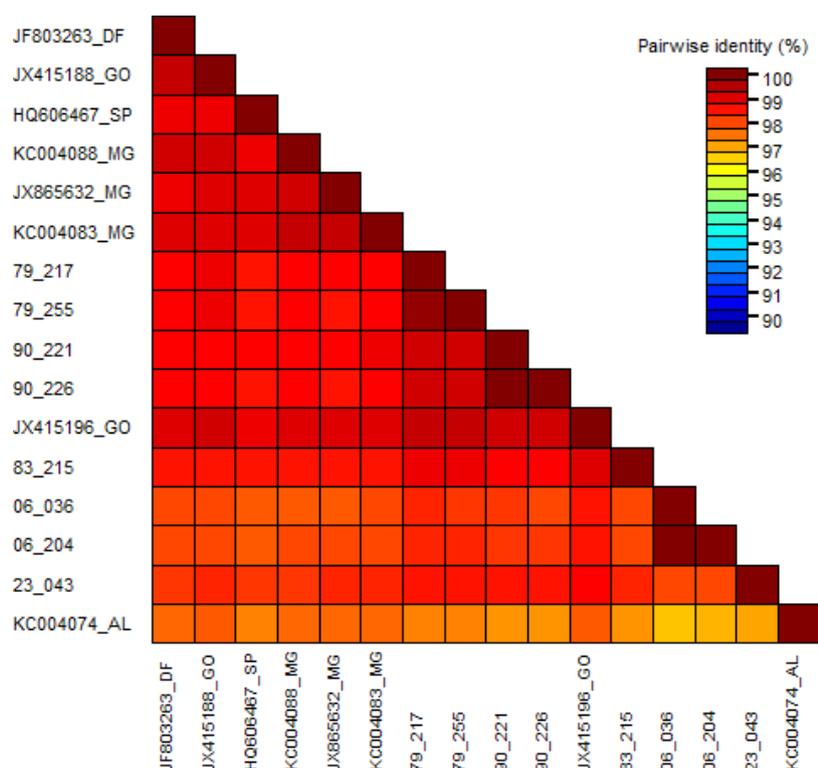
<sup>a</sup>Amostras de tomateiros resistente (R) ou suscetível (S) a begomovirose.

<sup>b</sup>Enzimas de restrição utilizadas para a clonagem.

### 3.5. Análise das Sequências Virais

Avaliou-se a identidade de nucleotídeos das sequências identificadas entre si e destas com sequências representativas de ToSRV e ToMoLCV retiradas do GenBank (Anexo 1).

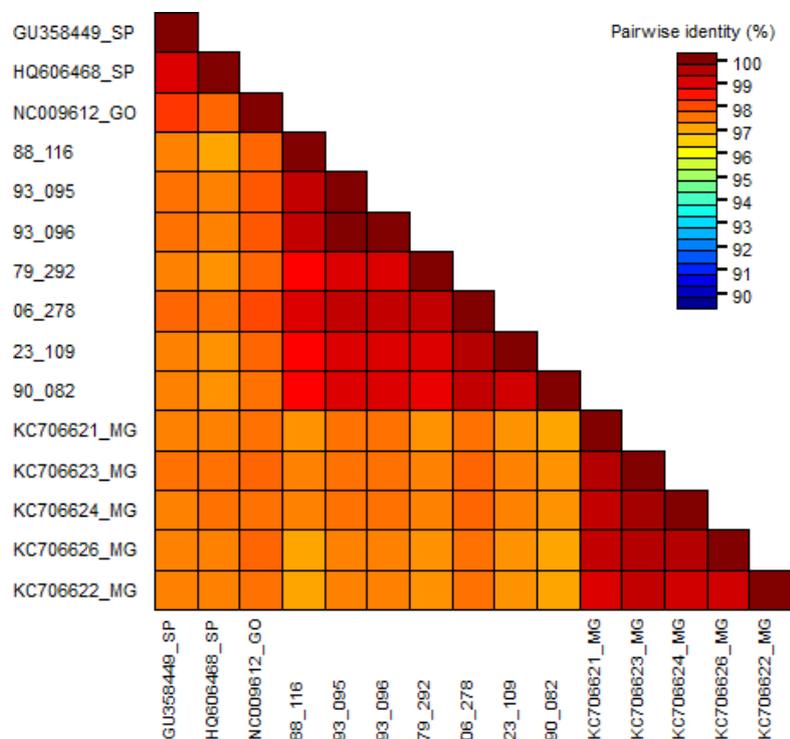
Sequências referentes ao componente genômico DNA-A de ToSRV apresentaram identidade entre 98,03 a 99,96%, sendo que os isolados mais próximos foram 06-036 e 06-204, bem como 90-221 e 90-226, ambos com 99,96% de identidade; e os mais distantes foram 06-036 e 83-215 (98,03%) (Fig. 4).



**Figura 4.** Matriz colorida representativa da porcentagem de identidade de nucleotídeos entre as sequências completas do DNA-A de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) obtidas neste trabalho e as sequências de ToSRV retiradas dos bancos de dados públicos, nomeadas conforme seus respectivos números de acesso, seguidos da sigla do estado onde a amostra foi coletada. Consultar Anexo 1 para identificação dos isolados.

Ao comparar a identidade das sequências do DNA-A de ToSRV deste trabalho com aquelas retiradas dos bancos de dados, as porcentagens mais altas foram de 99,30% (79-255 e JX415196) e 99,34% (79-217 e JX415196) (Fig. 4). Esta sequência do GenBank (JX415196) é proveniente de um isolado de ToSRV de Luziânia-GO, local onde foram coletadas as amostras utilizadas nesta pesquisa. As menores porcentagens de identidade foram de 96,87% (06-036 e KC004074) e 96,91% (06-204 e KC004074) (Fig. 4). O vírus correspondente ao número de acesso KC004074 é oriundo de Alagoas.

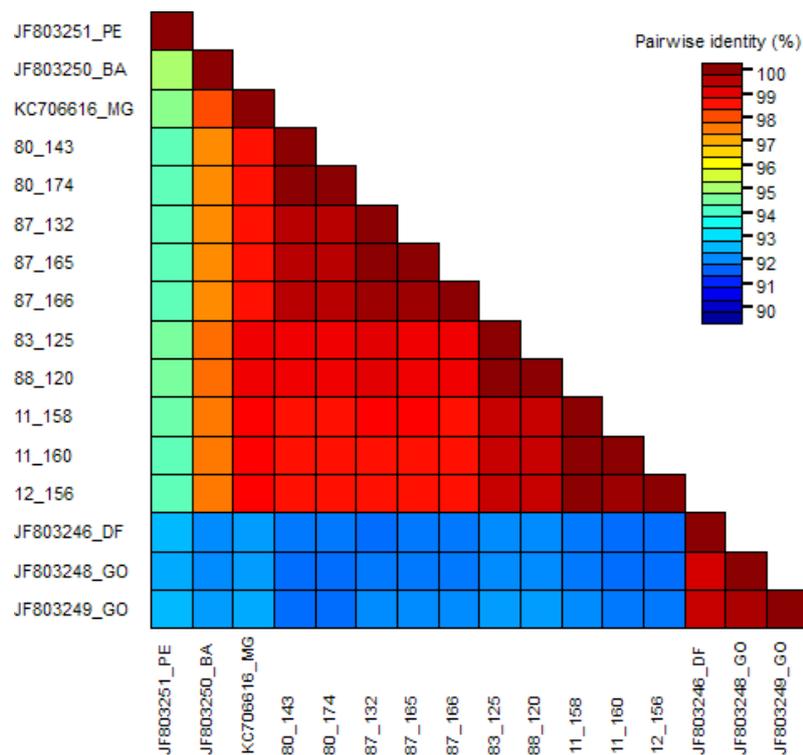
Quanto ao DNA-B de ToSRV, a identidade de nucleotídeos entre as sequências também foi alta. O maior valor observado foi de 99,99% (93-095 e 93-096), e os menores foram 98,71% (79-292 e 88-116, 90-082 e 88-116) e 98,79% (23-109 e 88-116) (Fig. 5). Comparando as sequências obtidas com outras dos bancos de dados, as porcentagens de identidade variaram de 97,11% a 98,05%. O isolado dos bancos de dados mais próximo aos do trabalho foi NC009612, proveniente de Petrolina de Goiás-GO, e os mais distantes foram KC706622 e KC706626, ambos de Minas Gerais (Fig. 5).



**Figura 5.** Matriz colorida representativa da porcentagem de identidade de nucleotídeos entre as sequências completas do DNA-B de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) obtidas neste trabalho e as sequências de ToSRV retiradas dos bancos de dados públicos, nomeadas conforme seus respectivos números de acesso, seguidos da sigla do estado onde a amostra foi coletada. Consultar Anexo 1 para identificação dos isolados.

A identidade mais alta entre as sequências da espécie ToMoLCV foi de 99,99% (80-143 e 80-174), enquanto a mais baixa foi de 98,51% (11-160 e 80-143, 12-156 e 80-143, 11-160 e 80-174, 12-156 e 80-174) (Fig. 6). De todos os dados referentes à identidade de nucleotídeos encontrados neste trabalho, os menores valores foram resultantes da comparação entre as

sequências de ToMoLCV obtidas e algumas dos bancos de dados. Neste caso, as menores porcentagens foram de 92,04% (80-143 e JF803248, 80-174 e JF803248) e 92,08% (11-160 e JF803246, 12-156 e JF803246) (Fig. 6). Os números de acesso JF803248 e JF803246 são de sequências virais do Goiás e Distrito Federal, respectivamente. A maior porcentagem de identidade foi de 98,93% (83-125 e KC706616 - isolado de Minas Gerais) (Fig. 6).



**Figura 6.** Matriz colorida representativa da porcentagem de identidade de nucleotídeos entre as sequências completas do DNA-A de *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) obtidas neste trabalho e as sequências de ToMoLCV retiradas dos bancos de dados públicos, nomeadas conforme seus respectivos números de acesso, seguidos da sigla do estado onde a amostra foi coletada. Consultar Anexo 1 para identificação dos isolados.

### 3.6. Estrutura Genética das Populações Virais

Os isolados encontrados nas plantas suscetíveis e resistentes a begomovirose foram avaliados quanto à presença de mutações (inserção, deleção e substituição), bem como a posição dessas mutações e suas conseqüentes alterações nas sequências de aminoácidos. Para tanto, todas as sequências virais foram alinhadas e suas *open reading frames* (ORFs) foram analisadas no programa Geneious 9.0.5.

Os dois vírus identificados (ToSRV e ToMoLCV) apresentaram uma organização genômica típica dos begomovírus do Novo Mundo, com cinco ORFs no componente DNA-A e duas ORFs no DNA-B, apesar do DNA-B de ToMoLCV não ter sido encontrado. Conforme mostrado na Tabela 1 (item 3.4.), os segmentos genômicos de ToSRV e ToMoLCV possuem números variáveis de tamanho do genoma. Esta variação deve-se à presença de inserções ou deleções de nucleotídeos (indels) nas sequências. No entanto, todos os indels estão localizados em regiões intergênicas/não-codificantes (dados não mostrados). Em contrapartida, várias mutações causadas por substituições foram observadas em diferentes ORFs de ambas as espécies.

A presença de substituições de nucleotídeos não significa, necessariamente, que há alterações nas sequências de aminoácidos. Algumas mutações são silenciosas e não modificam o produto gênico, enquanto outras são não-silenciosas e, como resultado, alteram as sequências de aminoácidos. De um modo geral, as mutações silenciosas em ToSRV e ToMoLCV, incluindo os clones obtidos de plantas resistentes e suscetíveis, ocorreram com maior frequência que as não-silenciosas (Tabelas 2, 3 e 4).

Analisando o número total de mutações por substituição (silenciosas e não-silenciosas), a maior quantidade foi encontrada nos vírus obtidos a partir de plantas resistentes. Comparando as médias, foram localizadas 32 e 13 mutações nas sequências do DNA-A de ToSRV das cultivares resistente e suscetível, respectivamente (Tabela 2). De forma similar, detectou-se 17 e 12 mutações, respectivamente, no DNA-A de ToMoLCV (Tabela 4). A única exceção ocorreu com as sequências do DNA-B de ToSRV, em que o número médio total de substituições foi maior nos vírus da cultivar suscetível (Tabela 3).

No componente genômico DNA-A de ToSRV, a ORF que codifica a Rep (AC1) foi a que apresentou maior número total de mutações (silenciosas e não-silenciosas), tanto nos isolados da cultivar resistente (54 substituições), quanto nos da suscetível (23 substituições)

(Tabela 2). Todas as mutações não-silenciosas encontradas no trabalho resultaram em alterações das sequências de aminoácidos, exceto uma substituição localizada na ORF AC1 (Rep) de duas sequências de ToSRV, onde foram formados novos *stop codons*, eliminando nove nucleotídeos da extremidade 3'.

**Tabela 2.** Número de mutações silenciosas (S) e não-silenciosas (NS) causadas por substituições de nucleotídeos nas sequências do componente genômico DNA-A de *Tomato severe rugose virus*, obtidas a partir de plantas resistentes (cultivar BRS Sena) e suscetíveis (Heinz-9553) a begomovirose. As mutações foram analisadas em cada ORF: AV1, AC1, AC2, AC3 e AC4. As siglas dentro dos parênteses representam o produto gênico.

Clone	AV1 (CP)		AC1 (Rep)		AC2 (Trap)		AC3 (Ren)		AC4		Total	
	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS
<b>TOMATEIROS RESISTENTES</b>												
06-036	6	4	9	9	1	0	2	0	0	3	18	16
06-204	6	3	11	9	1	0	2	0	0	3	20	15
23-043	4	1	11	5	0	0	1	0	0	5	16	11
<b>Total</b>	16	8	31	23	2	0	5	0	0	11	54	42
<b>Média</b>											18	14
<b>TOMATEIROS SUSCETÍVEIS</b>												
79-217	2	1	0	2	0	1	0	2	0	1	2	7
79-255	2	0	0	1	0	2	0	3	0	1	2	7
83-215	4	0	6	1	1	2	2	1	0	2	13	6
90-221	2	0	4	2	3	0	2	1	0	0	11	3
90-226	2	0	4	3	3	0	2	1	0	0	11	4
<b>Total</b>	12	1	14	9	7	5	6	8	0	4	39	27
<b>Média</b>											8	5

**Tabela 3.** Número de mutações silenciosas (S) e não-silenciosas (NS) causadas por substituições de nucleotídeos nas sequências do componente genômico DNA-B de *Tomato severe rugose virus*, obtidas a partir de plantas resistentes (cultivar BRS Sena) e suscetíveis (Heinz-9553) a begomovirose. As mutações foram analisadas em cada ORF: BV1 e BC1. As siglas dentro dos parênteses representam o produto gênico.

Clone	BV1 (NSP)		BC1 (MP)		Total	
	S	NS	S	NS	S	NS
<b>TOMATEIROS RESISTENTES</b>						
06-278	0	0	0	0	0	0
23-109	0	0	2	0	2	0
<b>Total</b>	0	0	2	0	2	0
<b>Média</b>					1	0
<b>TOMATEIROS SUSCETÍVEIS</b>						
79-292	3	3	0	0	3	3
88-116	2	2	1	1	3	3
90-082	0	0	3	2	3	2
93-095	4	3	1	0	5	3
93-096	4	3	1	0	5	3
<b>Total</b>	13	11	6	3	19	14
<b>Média</b>					4	3

**Tabela 4.** Número de mutações silenciosas (S) e não-silenciosas (NS) causadas por substituições de nucleotídeos nas sequências do componente genômico DNA-A de *Tomato mottle leaf curl virus*, obtidas a partir de plantas resistentes (cultivar BRS Sena) e suscetíveis (Heinz-9553) a begomovirose. As mutações foram analisadas em cada ORF: AV1, AC1, AC2, AC3 e AC4. As siglas dentro dos parênteses representam o produto gênico.

Clone	AV1 (CP)		AC1 (Rep)		AC2 (Trap)		AC3 (Ren)		AC4		Total		
	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	
<b>TOMATEIROS RESISTENTES</b>													
11-158	5	2	2	4	0	0	0	1	1	1	8	8	
11-160	5	3	2	4	0	1	0	2	1	1	8	11	
12-156	5	2	3	4	0	0	0	1	1	1	9	8	
<b>Total</b>	15	7	7	12	0	1	0	4	3	3	25	27	
<b>Média</b>												8	9
<b>TOMATEIROS SUSCETÍVEIS</b>													
80-143	1	1	3	5	1	1	0	0	0	0	5	7	
80-174	1	1	3	5	1	1	0	0	0	0	5	7	
83-125	5	0	2	0	2	0	1	1	0	0	10	1	
87-132	1	1	4	3	1	1	1	0	0	0	7	5	
87-165	1	1	3	3	1	1	1	1	0	0	6	6	
87-166	1	2	3	3	1	1	1	0	0	0	6	6	
88-120	5	0	2	0	2	0	2	1	0	0	11	1	
<b>Total</b>	15	6	20	19	9	5	6	3	0	0	50	33	
<b>Média</b>												7	5

No DNA-A de ToSRV também foi observada uma grande quantidade de mutações na CP (AV1) (24 e 13 substituições totais em plantas resistentes e suscetíveis, respectivamente) (Tabela 2). Na cultivar resistente, as ORFs do DNA-A com menos mutações foram AC2 (Trap) e AC3 (Ren), enquanto na suscetível foi o AC4 (Tabela 2). No DNA-B, foram localizadas mais mutações em BV1 (NSP) das sequências de plantas suscetíveis (24 substituições totais). Inversamente, não foi observada nenhuma mutação nesta mesma ORF (BV1) dos isolados de plantas resistentes (Tabela 3).

As análises de ToMoLCV levaram aos mesmos resultados encontrados para o DNA-A de ToSRV. Detectou-se uma maior quantidade de mutações (silenciosas e não-silenciosas) na Rep (AC1) e CP (AV1), tanto em plantas resistentes (19 e 22 substituições totais, respectivamente), quanto em suscetíveis (39 e 21 substituições totais, respectivamente) (Tabela 4). O menor número de mutações foi igualmente observado nas ORFs AC2 (Trap) e AC3 (Ren) (cultivar resistente) e na AC4 (cultivar suscetível). Nesta última ORF (AC4),

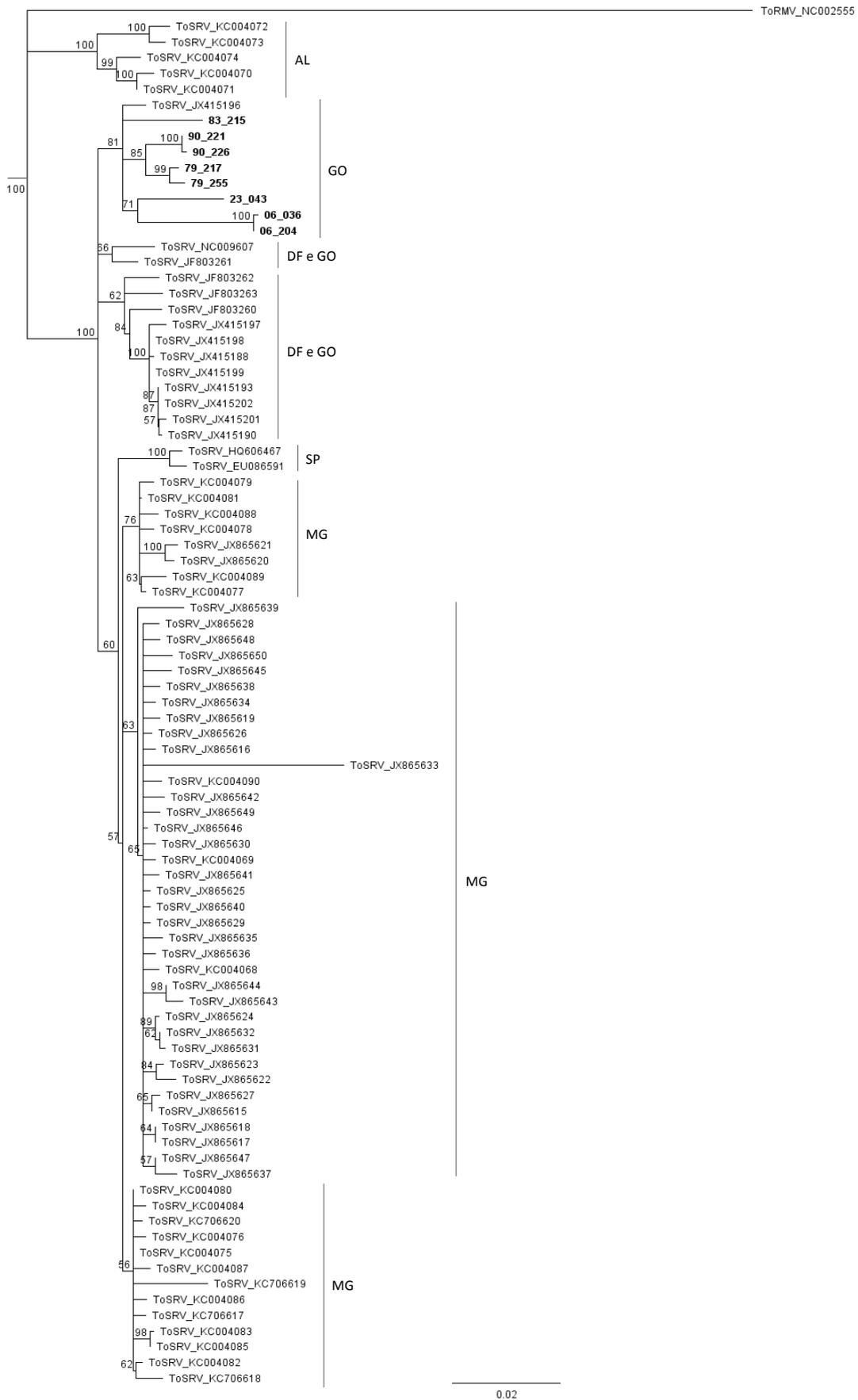
nenhuma substituição de nucleotídeos foi identificada nas sequências virais obtidas a partir de plantas suscetíveis (Tabela 4).

### 3.7. Análise Filogenética

Os vírus foram analisados quanto às suas relações filogenéticas de acordo com a espécie e segmento (DNA-A e DNA-B). As árvores foram construídas pelo método Neighbor-Joining, com 3000 repetições de *bootstrap* e modelo Tamura-Nei, incluindo todas as sequências completas de ToSRV e ToMoLCV disponíveis nos bancos de dados (Anexo 1). As espécies *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) e *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) foram utilizadas como *outgroup* para a construção das árvores de ToSRV e ToMoLCV, respectivamente.

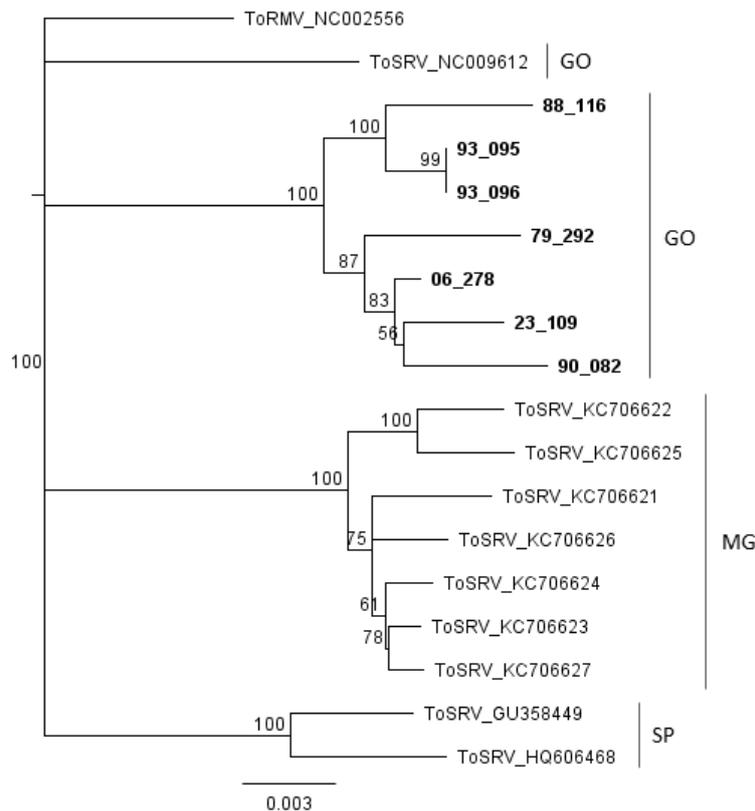
Em todas as árvores, os isolados obtidos neste trabalho ficaram agrupados em ramos claramente distintos, suportados por altos valores de *bootstrap*. Na árvore construída com as sequências do componente genômico DNA-A de ToSRV, oito clados principais formaram-se com base na localização geográfica dos vírus, os quais foram obtidos em Alagoas, Distrito Federal, Goiás, São Paulo e Minas Gerais (Fig. 7). Corroborando a análise de comparação da identidade de nucleotídeos, os vírus de Alagoas formaram o clado mais distante de todos os demais (Fig. 7).

Apenas uma sequência do DNA-A de ToSRV (número de acesso é JX415196), cuja origem também é da região de Goiás, agrupou-se com as sequências desta pesquisa (Fig. 7). Internamente, os isolados do trabalho formaram pequenos subgrupos de acordo com as amostras de onde foram retirados, isto é, aqueles obtidos a partir de uma mesma planta (indicados pelo mesmo número da amostra) se aproximaram, havendo, ainda, o agrupamento das sequências obtidas de plantas resistentes (06-036, 06-204 e 23-043) em um mesmo subgrupo (Fig. 7).



**Figura 7.** Árvore filogenética composta por sequências completas do DNA-A de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) obtidas neste trabalho (destacadas em negrito) e sequências de ToSRV retiradas dos bancos de dados, nomeadas conforme seus respectivos números de acesso (consultar Anexo 1 para identificação dos isolados). Árvore construída pelo método Neighbor-Joining, com 3000 repetições de *bootstrap* e modelo Tamura-Nei. A espécie *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) foi utilizada como *outgroup*. Uma barra vertical agrupa as sequências oriundas do mesmo estado (sigla).

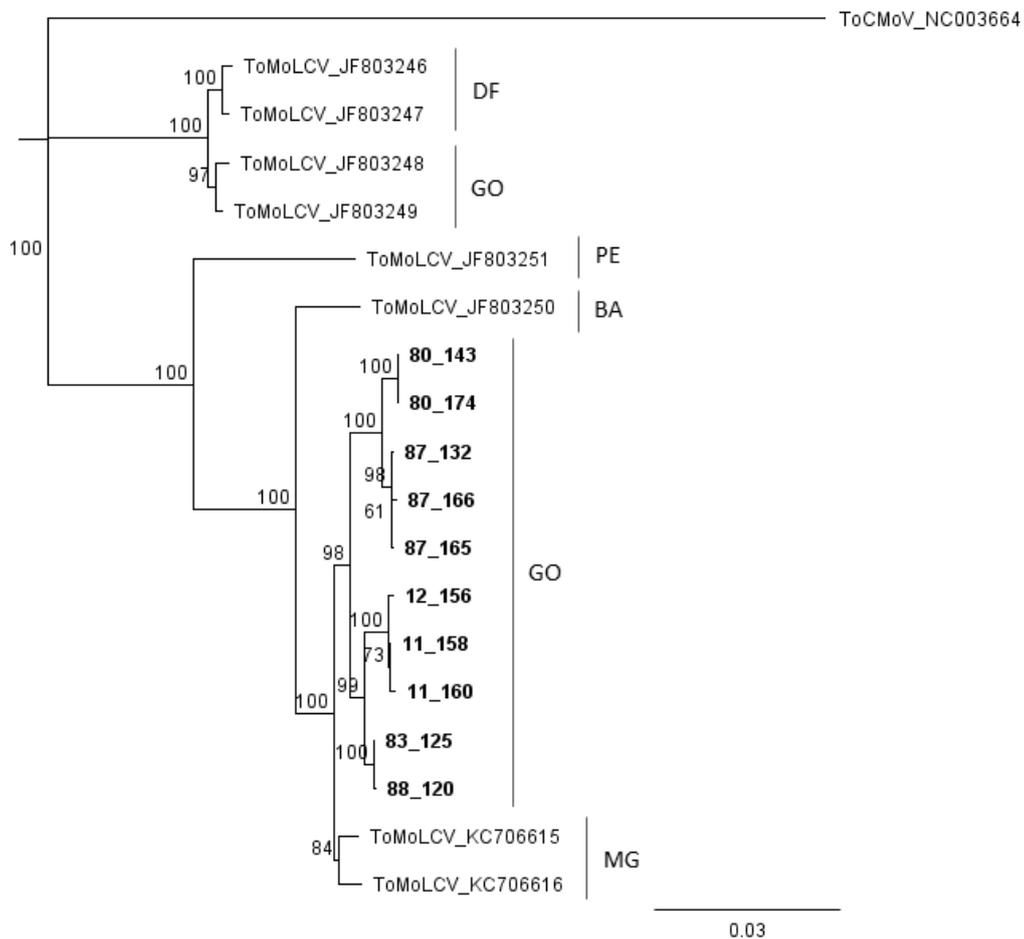
Assim como ocorreu com as sequências do DNA-A de ToSRV, as do DNA-B também foram agrupadas com base na localização geográfica (Goiás, Minas Gerais e São Paulo) (Fig. 8). Além disso, os isolados obtidos no trabalho igualmente agruparam-se em um clado independente, estando fortemente suportado pelo valor de *bootstrap* igual a 100 (Fig. 8).



**Figura 8.** Árvore filogenética composta por sequências completas do DNA-B de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) obtidas neste trabalho (destacadas em negrito) e sequências de ToSRV retiradas dos bancos de dados, nomeadas conforme seus respectivos números de acesso (consultar Anexo 1 para identificação dos isolados). Árvore construída pelo método Neighbor-Joining, com 3000 repetições de *bootstrap* e modelo Tamura-Nei. A espécie *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) foi utilizada como *outgroup*. Uma barra vertical agrupa as sequências oriundas do mesmo estado (sigla).

A árvore construída com as sequências de ToMoLCV gerou dois clados principais. O primeiro é constituído por isolados do Distrito Federal e Goiás, e o segundo por isolados de Pernambuco, Bahia e Minas Gerais (Fig. 9). Curiosamente, no segundo clado, em um ramo destacado dos demais (com valor de *bootstrap* de 100), estão presentes as sequências deste trabalho. Neste ramo, os clones obtidos a partir de uma mesma amostra formaram subgrupos, sendo um deles constituído apenas por clones de plantas resistentes (11-158, 11-160 e 12-

156). Todos os cladogramas da árvore de ToMoLCV estão suportados por altos valores de *bootstrap* (Fig. 9).



**Figura 9.** Árvore filogenética composta por sequências completas do DNA-A de *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) obtidas neste trabalho (destacadas em negrito) e sequências de ToMoLCV retiradas dos bancos de dados, nomeadas conforme seus respectivos números de acesso (consultar Anexo 1 para identificação dos isolados). Árvore construída pelo método Neighbor-Joining, com 3000 repetições de *bootstrap* e modelo Tamura-Nei. A espécie *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) foi utilizada como *outgroup*. Uma barra vertical agrupa as sequências oriundas do mesmo estado (sigla).

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Diferenças nos Sintomas Begomovirose em Tomateiros Suscetíveis x Resistentes

Cultivares de tomateiros consideradas resistentes a begomovirose possuem graus diversos de resistência/tolerância, porém, nenhuma apresenta imunidade. Logo, os vírus infectam a hospedeira, mas a replicação e translocação viral geralmente ocorrem com baixa eficiência, resultando na produção de sintomas atenuados e/ou tardios (Rom *et al.*, 1993; Picó

*et al.*, 1996; Nizio *et al.*, 2008). Neste trabalho, as observações no campo possibilitaram a confirmação clara da maior severidade dos sintomas na cultivar suscetível (H-9553), quando comparada com a cultivar resistente (BRS Sena) (Fig. 1).

Os tipos de sintomas visualizados nas plantas do pivô onde se coletou as amostras variaram entre clorose internerval, clareamento de nervuras, bolhosidade, deformação foliar e nanismo (Fig. 1). Entretanto, não foi possível relacionar a presença de um ou mais destes sintomas com as infecções [simples ou mista] causadas pelas espécies de begomovírus encontradas (ToSRV e ToMoLCV).

#### **4.2. Técnica de RCA/RFLP Possibilita a Análise Prévia dos Isolados Virais**

O uso do método de amplificação por círculo rolante (RCA, *rolling circle amplification*) tem facilitado imensamente o processo de clonagem dos geminivírus. As principais vantagens desta técnica são a possibilidade de clonagem a partir de pequenas quantidades de DNA viral e a redução da incorporação de erros que frequentemente ocorrem durante a PCR, devido ao uso de enzimas que não possuem atividade *proof-reading* (Inoue-Nagata *et al.*, 2004).

Para a observação inicial da diversidade de begomovírus, utilizou-se a técnica de RCA/RFLP. Análises dos perfis de restrição com a enzima de corte frequente MspI e o somatório estimado dos fragmentos de DNA possibilitaram o diagnóstico prévio da quantidade de isolados virais em cada amostra (Fig. 2). Além disso, através da comparação entre os padrões de banda encontrados e o padrão característico da espécie ToSRV, foi possível inferir que esta espécie está presente na maioria plantas coletadas. Todos os dados inicialmente obtidos por RCA/RFLC foram corroborados por PCR específica e clonagem. Outros estudos também demonstram que RCA/RFLP é uma técnica simples e confiável para a detecção e caracterização preliminar de isolados virais (Haible *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2010; Wyant *et al.*, 2011).

### 4.3. Infecções Simples Causadas por ToSRV são Predominantes

Com os resultados iniciais baseados nos perfis de restrição, confirmados pelos ensaios de PCR com *primers* específicos e clonagem, concluiu-se que ToSRV está presente em maior frequência do que ToMoLCV tanto em plantas da cultivar resistente, quanto em suscetível. Estas espécies (ToSRV e ToMoLCV), juntamente com *Tomato golden vein virus* (TGVV), foram relatadas como os begomovírus mais prevalentes e de maior importância econômica para a cultura do tomate no Brasil, sendo detectadas em diferentes regiões do país (Fernandes *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2012).

É importante destacar que TGVV, embora já tenha sido relatado no estado de Goiás (Fernandes *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2012), não foi encontrado no presente trabalho. A ausência do vírus pode ser explicada pela redução da sua incidência no campo, sendo mais fácil, portanto, detectar os vírus de maior incidência; ou, por motivo desconhecido, a espécie não está mais presente em algumas áreas produtoras. Acredita-se que a segunda alternativa seja a mais coerente, pois em resultados de sequenciamento massal por NGS (Next Generation Sequencing) de várias amostras de tomateiros da mesma região onde foi feita a amostragem deste trabalho (Luziânia-GO), TGVV também não foi encontrado (Camila Rêgo, resultados não publicados).

Recentemente, Macedo e colaboradores (2015) constataram que a porcentagem de infecção por ToSRV em plantas de tomate inoculadas pelo vetor *B. tabaci* é superior à taxa de infecção por TGVV. Os autores concluíram que a eficiência de transmissão mais elevada de ToSRV por mosca-branca nas condições agrícolas de cultivo no Brasil pode estar contribuindo para a predominância desta espécie no campo.

Neste trabalho, verificou-se que as infecções simples causadas por ToSRV ou ToMoLCV foram mais frequentes (64% das amostras), havendo poucos casos de plantas com infecção mista (36%). Enquanto ToSRV foi o único begomovírus presente em várias plantas

das duas cultivares (71%), infecções simples por ToMoLCV foram detectadas em apenas duas amostras (29%), ambas de plantas resistentes. O fato de ToMoLCV ter sido encontrado isoladamente apenas na cultivar resistente provavelmente trata-se de uma casualidade, pois em ensaios de agroinoculação também realizados com tomateiros de H-9553 e BRS Sena, um clone infeccioso deste vírus causou infecções simples nas plantas suscetíveis e resistentes (Camila Rêgo, resultados não publicados).

As poucas infecções mistas (36%) foram detectadas exclusivamente na cultivar suscetível. Sabe-se que a ocorrência deste tipo de infecção é comum no campo e que, muito frequentemente, os vírus presentes em uma mesma planta se interagem. Porém, se esta interação é de competição, apenas um deles torna-se o predominante (Roossinck, 2005). Além da competitividade, a ausência de infecções mistas na cultivar resistente pode também estar relacionada ao sistema de defesa da hospedeira, dificultando a sobrevivência de espécies menos adaptadas. O mecanismo de resistência do gene *Ty-1*, por exemplo, baseia-se na interferência da ação de proteínas que controlam o movimento dos vírus, limitando-os à folha onde foram inoculados e, conseqüentemente, garantindo a baixa acumulação viral (Michelson *et al.*, 1994; Zamir *et al.*, 1994).

A alta incidência de ToSRV em cultivos de tomate (como observado neste trabalho; Fernandes *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2013) provavelmente está relacionada à eficiência de colonização do vírus (além da eficiência de transmissão pelo vetor), indicando que esta espécie é bem adaptada ao tomateiro. Portanto, supondo que uma infecção mista artificial por ToSRV e ToMoLCV em cultivares de tomate com e sem resistência seja monitorada temporalmente, espera-se que, a longo prazo, ToSRV se adapte melhor às hospedeiras, de tal forma que a infecção simples por ToSRV torne-se predominante; embora, eventos de recombinação e mutação, frequentes em espécies de begomovírus, possam interferir na adaptação de ambas as espécies.

#### **4.4. Evidências Indicam que ToMoLCV é um Begomovírus Monopartido**

Os resultados baseados nos perfis de restrição indicaram que em algumas amostras (10, 11, 12 e 13), cujo somatório estimado do genoma viral foi de aproximadamente 2,7 kb, há somente um componente genômico de begomovírus (Fig. 2). Estes dados iniciais foram reforçados com o ensaio de *Southern blot*, em que os fragmentos de DNA resultantes da digestão com diferentes enzimas de restrição hibridizaram eficientemente com a sonda específica para o DNA-A (Fig. 3A), mas não houve hibridização com a sonda para o DNA-B (Fig. 3B, perfil de restrição 4). Além disso, apesar de inúmeros esforços, nenhum clone do DNA-B de ToMoLCV foi obtido. De forma similar, Souza (2014) sequenciou 22 clones deste mesmo vírus, todos do componente genômico DNA-A. Este conjunto de dados indica que ToMoLCV é monopartido.

Recentemente, um begomovírus monopartido nativo do Novo Mundo, nomeado como *Tomato leaf deformation virus* (ToLDeV), foi descoberto infectando tomateiros no Peru (Márquez-Martín *et al.*, 2011; Melgarejo *et al.*, 2013). Existem indícios de que isolados de ToMoLCV coletados no Nordeste brasileiro são monopartidos (Gilbertson *et al.*, 2015). Testes com clones infecciosos do DNA-A do vírus mostraram que ele é capaz de infectar tomate e feijão eficientemente, sem a presença de DNA-B (Vu *et al.*, 2015).

Apesar das evidências mencionadas, Albuquerque *et al.* (2012) conseguiram obter o DNA-B de um isolado de ToMoLCV do Distrito Federal. Portanto, existe a hipótese de que o DNA-B estava presente nas lavouras, mas, por motivo ainda desconhecido, foi extinto. A organização genômica de ToMoLCV, típica de um begomovírus bipartido (com ausência da ORF V2), pode justificar esta hipótese.

#### **4.5. Uso de Plantas Resistentes Interfere na Proximidade entre Isolados de Begomovírus**

As análises da identidade de nucleotídeos entre as sequências revelaram que os isolados dentro cada espécie (ToSRV e ToMoLCV) são muito próximos. Contudo, apesar desta

proximidade, foi possível verificar que eles se agruparam de acordo com suas origens. De um modo geral, as maiores porcentagens de identidade foram entre clones obtidos de uma mesma planta/amostra. Por exemplo, 99,96% de identidade entre 06-036 e 06-204 (sequências do DNA-A de ToSRV), 99,99% entre 93-095 e 93-096 (DNA-B de ToSRV) e 99,99% entre 80-143 e 80-174 (DNA-A de ToMoLCV) (Fig. 4, 5 e 6). Estes dados indicam que os clones encontrados são resultantes da replicação de uma população viral inicial de baixa diversidade genômica em cada planta.

Em contrapartida, as menores porcentagens de identidade geralmente ocorreram entre clones de cultivares diferentes (um da resistente e outro da suscetível), tais como: 98,03% de identidade entre 06-036 e 83-215 (ToSRV-A), 98,79% entre 23-109 e 88-116 (ToSRV-B) e 98,51% entre 11-160 e 80-143 (ToMoLCV-A) (Fig. 4, 5 e 6). Isso sugere que, embora os isolados sejam muito parecidos, as pequenas diferenças que os separam podem ser resultantes de uma pressão seletiva inicial imposta pelo uso de plantas resistentes.

Comparando a identidade de nucleotídeos das sequências do trabalho com outras externas, verificou-se que os vírus encontrados na cultivar H-9553 (suscetível) são geralmente mais próximos aos dos bancos de dados (99,34% de identidade com sequências de ToSRV-A, 98,05% ToSRV-B e 98,93% ToMoLCV-A), enquanto aqueles da cultivar BRS Sena (resistente) são mais distantes (96,87% ToSRV-A, 97,11% ToSRV-B e 92,08% ToMoLCV-A) (Fig. 4, 5 e 6).

O uso de híbridos de tomate rasteiro com resistência a begomovirose é uma atividade recente no Brasil, com crescimento significativo apenas nos últimos cinco anos (comunicação pessoal de produtores de diferentes regiões do país). Portanto, acredita-se que a maior parte das sequências de ToSRV e ToMoLCV depositadas nos bancos de dados sejam provenientes de cultivares suscetíveis, justificando a maior proximidade com os isolados do trabalho obtidos a partir de plantas de H-9553.

#### **4.6. Begomovírus de Plantas Resistentes Possuem Maior Variação Genética**

Populações virais são geneticamente heterogêneas. Em todos os organismos vivos, a reprodução [replicação, no caso dos vírus] pode dar origem a uma prole geneticamente diferente dos seus parentais, sendo chamada de mutante ou variante. A frequência com que estas variações genéticas ocorrem em uma população é alterada com o tempo, sendo este processo chamado de evolução (García-Arenal *et al.*, 2003). Uma importante fonte de variação genética dos vírus são as mutações (Drake *et al.*, 1998).

Neste trabalho, várias mutações (inserção, deleção e substituição) foram observadas ao longo dos componentes genômicos de ToSRV e ToMoLCV, com ocorrência aleatória. Todas as inserções e deleções foram localizadas em regiões intergênicas, incluindo a região comum, que é um fragmento de aproximadamente 200 nucleotídeos compartilhado com alta identidade entre o DNA-A e DNA-B dos begomovírus. Estas regiões intergênicas não codificam nenhuma proteína e, portanto, não interferem no produto gênico.

Mutações causadas por substituições foram detectadas nas ORFs de ToSRV e ToMoLCV. Alguns trabalhos mostram que a substituição de nucleotídeos é um dos principais mecanismos de mutação que ocorrem nos geminivírus, podendo interferir diretamente na sua evolução (Duffy & Holmes, 2008; Walt *et al.*, 2008; Duffy & Holmes, 2009). De um modo geral, a maior parte das mutações por substituição observadas nas sequências de ToSRV e ToMoLCV são silenciosas (Tabelas 2, 3 e 4).

As médias do número total de substituições (silenciosas e não-silenciosas) foram superiores nos isolados de ToSRV e ToMoLCV da cultivar resistente (Tabelas 2 e 4), com exceção de algumas poucas sequências do DNA-B de ToSRV (Tabela 3). Tal fato indica que a quantidade de mutações virais pode ser influenciada pelo uso de plantas resistentes. De acordo com García-Arenal e colaboradores (2001), o processo de seleção, muito utilizado para explicar a evolução dos vírus, está associado com diferentes fatores do ciclo replicativo

viral que funcionam como “pressões de seleção”, como a planta hospedeira, por exemplo. Assim, a maior quantidade de variações genéticas observada nos isolados da cultivar resistente possivelmente é resultante de uma adaptação inicial dos vírus às condições impostas pela hospedeira.

Comparando a quantidade de mutações entre os componentes genômicos DNA-A e DNA-B de ToSRV, o DNA-A foi mais variável (Tabelas 2 e 3). Inversamente, Rocha e colaboradores (2013), analisando a estrutura genética de várias espécies de begomovírus (*Blainvillea yellow spot virus* (BIYSV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCmMV), *Tomato common mosaic virus* (ToCMoV), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e ToSRV) detectaram que o DNA-B de todos os vírus apresenta maior número de variações que o DNA-A. Sequências adicionais de ambos os componentes genômicos de ToSRV precisam ser incluídas às análises para a obtenção de dados mais consistentes.

Ao comparar o DNA-A de ToSRV e o de ToMoLCV, novamente o DNA-A de ToSRV destacou-se por apresentar maior número de mutações (Tabelas 2 e 4). Nestas duas espécies, as ORFs que codificam as proteínas Rep e CP foram as mais variáveis (Tabelas 2 e 4). AC1 (Rep) e AV1(CP) são geralmente as principais ORFs dos begomovírus analisadas em estudos de variabilidade genética e, com frequência, estão associadas a eventos de recombinação e/ou mutação (Silva *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2013).

#### **4.7. Populações de Begomovírus se Agrupam com Base na Localização Geográfica**

Nas análises filogenéticas, os vírus claramente agruparam-se com base na localização geográfica (Fig. 7, 8 e 9). Segundo Brown e colaboradores (2012), a filogenia dos geminivírus como um todo é altamente estruturada pela distribuição geográfica dos vírus que compõem a família. Esta ideia também é corroborada pelo trabalho de Rocha e colaboradores (2013), no

qual isolados de diferentes espécies de begomovírus foram agrupados de acordo com os locais de amostragem.

Embora a maior parte dos resultados deste trabalho tenham sido consistentes com a hipótese de subdivisão geográfica dos begomovírus, uma exceção ocorreu com a espécie ToMoLCV. Esperava-se, inicialmente, que os isolados de ToMoLCV fossem mais próximos daqueles registrados no Distrito Federal e Goiás, porém, eles agruparam-se no clado de Minas Gerais, Bahia e Pernambuco (Fig. 9). As sequências de ToMoLCV de Minas Gerais depositadas no banco de dados são originárias do município de Jaíba, o qual está localizado no extremo Norte do estado, justificando o fato destes vírus serem mais parecidos com os do Nordeste e mais distantes aos do Centro-Oeste.

Albuquerque e colaboradores (2012) sequenciaram seis clones de ToMoLCV obtidos de tomateiros e os separaram em dois grupos: ToMoLCV-DF (provenientes do Distrito Federal e Goiás) e ToMoLCV-PE (Pernambuco e Bahia). Segundo estes autores, ToMoLCV-DF são recombinantes entre ToMoLCV-PE-[BR:Bez2665:04] e *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV)-[BR:Bet1:96]. Logo, os isolados de ToMoLCV provavelmente possuem um ancestral em comum nativo do Nordeste brasileiro e, após a migração do vírus para a região Centro-Oeste do país, eventos de recombinação deram origem a novas estirpes (ToMoLCV-DF). No entanto, baseado nas análises filogenéticas do presente trabalho, pode-se deduzir que estas novas estirpes recombinantes possivelmente não se adaptaram às condições do ambiente e foram suprimidas, deixando de ser encontradas no campo.

## 5. CONCLUSÕES

- Plantas com resistência parcial/tolerância a begomovirose não são imunes e, portanto, não impedem que os vírus causem a infecção. Entretanto, a severidade da doença em plantas resistentes é menor e os sintomas são pouco evidentes.

- RCA/RFPL é uma técnica muito útil em trabalhos com begomovírus, pois seus resultados possibilitam a análise prévia da diversidade dos isolados.

- Duas espécies de begomovírus foram encontradas nas cultivares estudadas: ToSRV e ToMoLCV. ToSRV é a espécie predominante em ambas as cultivares.

- A ocorrência de infecções simples por ToSRV ou ToMoLCV são mais frequentes que as infecções mistas.

- O DNA-B de ToMoLCV não foi encontrado e evidências indicam que esta espécie é o primeiro begomovírus monopartido nativo do Novo Mundo relatado no Brasil.

- Isolados de ToSRV e ToMoLCV obtidos de uma mesma planta são mais próximos, enquanto isolados obtidos de cultivares diferentes são mais distantes.

- Sequências de ToSRV e ToMoLCV encontradas em plantas suscetíveis são mais próximas das sequências depositadas nos bancos de dados.

- Mutações causadas por inserção e deleção de nucleotídeos foram observadas apenas em regiões intergênicas/não-codificantes do genoma de ToSRV e ToMoLCV.

- Mutações silenciosas causadas por substituição de nucleotídeos nas ORFs de ToSRV e ToMoLCV foram mais frequentes que as não-silenciosas.

- Um maior número de mutações por substituição ocorreu nas sequências do DNA-A de ToSRV e ToMoLCV obtidas de plantas resistentes.

- As ORFs AC1 (Rep) e AV1 (CP) de ToSRV e ToMoLCV possuem maior número de substituições de nucleotídeos.

- Os isolados de begomovírus agrupam-se com base na localização geográfica.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As informações geradas pelos estudos de diversidade viral são fundamentais para o entendimento dos mecanismos evolutivos associados com o aparecimento de novas espécies,

estirpes ou variantes. Apesar de já existir um considerável número de pesquisas publicadas sobre a diversidade de begomovírus em tomateiros no Brasil, o presente trabalho diferencia-se dos demais por ter analisado esta diversidade entre cultivares resistente e suscetível.

Sabe-se que a utilização de híbridos de tomate rasteiro com resistência parcial a begomovirose está se tornando uma prática cada vez mais frequente no país. O conhecimento sobre as espécies de begomovírus que infectam esses híbridos e o quanto essas espécies se diversificam geneticamente são ferramentas importantes para os programas de melhoramento genético, pois dados sobre as variantes virais presentes em plantas resistentes no campo podem fornecer informações essenciais sobre a durabilidade e eficiência dos genes de resistência.

Os resultados deste trabalho mostram que os isolados de ToSRV e ToMoLCV obtidos da cultivar resistente são geneticamente mais variáveis que aqueles encontrados na cultivar suscetível. Uma vez que estes vírus foram coletados na mesma área, estando sob as mesmas condições do ambiente, a hospedeira é o único fator que explica porque parte dos isolados possui maior variação genética. Logo, existe a possibilidade destes vírus estarem passando por um processo inicial de alterações decorrente da pressão seletiva imposta pela resistência das plantas hospedeiras. Vale a pena salientar que, historicamente, o uso de cultivar resistente na área amostral não é significativo, restringindo-se a poucos hectares dentro de pivôs predominantemente plantados com materiais suscetíveis.

Diante desta hipótese de que os vírus estão sofrendo uma pressão seletiva devido ao uso de plantas resistentes, surge uma nova pergunta: em longo prazo, a utilização de cultivares com resistência pode resultar em mudanças na composição das populações de begomovírus no campo? Para assumir a hipótese como verdadeira e responder a esta pergunta, será necessário ampliar a população de estudo. Além disso, pretende-se realizar ensaios de

evolução dirigida, os quais irão gerar (produzir) respostas mais precisas sobre as possíveis mudanças populacionais dos begomovírus em longo prazo.

## 7. LITERATURA CITADA

- ALBUQUERQUE, L.C.; VARSANI, A.; FERNANDES, F.R.; PINHEIRO, B.; MARTIN, D.P.; FERREIRA, P.T.O.; LEMOS, T.O. & INOUE-NAGATA, A.K. 2012. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 157: 747-752.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, D.L.; SCHAFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z. MILLER, W. & LIPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; ROSELL, R.C. & MARKHAM, P. 1994. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology* 125: 311-325.
- BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; ZERBINI, F.M.; MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2012. *Family Geminiviridae*. In: King, A.M.Q.; Adams, M.J.; Carstens, E.B. & Lefkowitz, E.J. (eds.). *Virus Taxonomy*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. London. p 351-373.
- 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.
- CASTILLO-URQUIZA, G.P.; BESERRA JUNIOR, J.E.A.; BRUCKNER, F.P.; LIMA, A.T.M.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P. & ZERBINI, F. 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology* 153: 1985-1989.
- COTRIM, M.A.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; NARITA, N.; ZERBINI, F.M. & PAVAN, M.A. 2007. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica* 33: 300-303.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

- DRAKE, J.W.; CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D. & CROW, J.F. 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148:1667-1686.
- DUFFY, S. & HOLMES, E.C. 2008. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus*. *Journal of Virology* 82: 957-965.
- DUFFY, S. & HOLMES, E.C. 2009. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *Journal of General Virology* 90: 1539-1547.
- FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUE, L.C.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; ÁVILA, A.C. & INOUE-NAGATA, A.K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36: 251-258.
- FERNANDES, J.J.; CARVALHO, M.G.; ANDRADE, E.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B. & ZERBINI, F.M. 2006. Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology* 55: 513-522.
- FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K. & KRAMER, M. 1960. Observações de "clorose infecciosa" das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico* 26: 65-69.
- GARCÍA-ARENAL, F.; FRAILE, A. & MALPICA, J.M. 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology* 39: 157-186.
- GARCÍA-ARENAL, F.; FRAILE, A. & MALPICA, J.M. 2003. Variation and evolution of plant virus populations. *International Microbiology* 6: 225-232.
- GILBERTSON, R.L.; BATUMAN, O.; WEBSTER, C.G. & ADKINS, S. 2015. Role of the insect supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. *Annual Review of Virology* 2: 67-93.
- HAIBLE, D.; KOBER, S. & JESKE, H. 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods* 135: 9-16.
- INOUE-NAGATA, A.K.; ALBUQUERQUE, L.C.; ROCHA, W.B. & NAGATA, T. 2004. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage  $\Phi$ 29 DNA polymerase. *Journal of Virology Methods* 116: 209-211.
- LIMA, A.T.M.; SOBRINHO, R.R.; GONZÁLEZ-AGUILERA, J.; ROCHA, C.S.; SILVA, S.J.C.; XAVIER, C.A.D.; SILVA, F.N.; DUFFY, S. & ZERBINI, F.M. 2013. Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. *Journal of General Virology* 94: 418-431.

- LOURENÇÃO, A.L. & NAGAI, H. 1994. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. *Bragantia* 53: 53-59.
- MACEDO, M.A.; MICHEREFF FILHO, M.; NAVAS-CASTILLO, J.; INOUE-NAGATA, A.K. 2015. Host range and whitefly transmission efficiency of *Tomato severe rugose virus* and *Tomato golden vein virus* in tomato plants. *Tropical Plant Pathology* 40: 405-409.
- MÁRQUEZ-MARTÍN, B.; ARAGÓN-CABALLERO, L.; FIALLO-OLIVÉ, E.; NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. 2011. Tomato leaf deformation virus, a novel begomovirus associated with a severe disease of tomato in Peru. *European Journal of Plant Pathology* 129: 1-7.
- MELGAREJO, T.A.; KON, T.; ROJAS, M.R.; PAZ-CARRASCO, L.; ZERBINI, F.M. & GILBERTSON, R.L. 2013. Characterization of a New World monopartite begomovirus causing leaf curl disease of tomato in Ecuador and Peru reveals a new direction in geminivirus evolution. *Journal of Virology* 87: 5397-5413.
- MICHELSON, I.; ZAMIR, D. & CHOSNEK, 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* 34: 928-933.
- MUHIRE, B.M.; VARSANI, A. & MARTIN, D.P. 2014. SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLOS ONE* 9: e108277.
- NAITO, F.Y.B. 2012. *Avaliação da diversidade de Begomovirus em tomateiro em três pólos de produção de tomate para processamento do Brasil*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.
- NIZIO, D.A.C.; MALUF, W.R.; FIGUEIRA, A.R.; NOGUEIRA, D.W.; SILVA, V.F. & GONÇALVES NETO, A.C. 2008. Caracterização de genótipos de tomateiro resistentes a begomovírus por marcador molecular co-dominante ligado ao gene *Ty-1*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 12: 1699-1705.
- 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.
- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVÍCIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H. & ZERBINI, F.M. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 148: 281-295.

- RIBEIRO, S.G.; MARTIN, D.P.; LACORTE, C.; SIMOES, I.C.; ORLANDINI, D.R. & INOUE-NAGATA, A.K. 2007. Molecular and biological characterization of Tomato chlorotic mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology* 97: 702-711.
- ROCHA, C.S.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; LIMA, A.T.M.; SILVA, F.N.; XAVIER, C.A.D.; HORA-JUNIOR, B.T.; BESERRA-JUNIOR, J.E.A.; MALTA, A.W.O.; MARTIN, D.P.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; MIZUBUTI, E.S.G. & ZERBINI, F.M. 2013. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving and segregated based on geographical location. *Journal of Virology* 87: 5784-5799.
- 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* 36: 222-227.
- ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L.; RUSSELL, D.R. & MAXWELL, D.P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77: 340-347.
- ROM, M.; ANTIGNUS, Y.; GIDONI, D.; PILOWSKY, M. & COHEN, S. 1993. Accumulation of *Tomato yellow leaf curl virus* DNA in tolerant and susceptible tomato lines. *Plant Disease* 77:253-257.
- ROOSSINCK, M.J. 2005. Symbiosis versus competition in plant virus evolution. *Nature Reviews Microbiology* 3: 917-924.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIAT, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- SANTANA, F.M.; INOUE-NAGATA, A.K.; NAGATA, T.; RIBEIRO, S.G.; ÁVILA, A.C. & GIORDANO, L.B. 2007. Detecção de um begomovírus em amostras foliares de tomateiro com sondas não-radioativas. *Ciência Rural* 37: 269-272.
- SILVA, S.J.C.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; HORA JÚNIOR, B.T.; ASSUNÇÃO, I.P.; LIMA, G.S.A.; PIO-RIBEIRO, G.; MIZUBUTI, E.S.G. & ZERBINI, F.M. 2011. High genetic variability and recombination in a begomovirus population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil. *Archives of Virology* 156: 2205-2213.
- SILVA, S.J.C.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; HORA-JUNIOR, B.T.; ASSUNÇÃO, I.P.; LIMA, G.S.A.; PIO-RIBEIRO, G.; MIZUBUTI, E.S.G. & ZERBINI, F.M. 2012.

- Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. *Plant Pathology* 61: 457-467.
- SOUZA, J.O. *Análise da diversidade de begomovírus em tomateiros (Solanum lycopersicum) da região Nordeste do Brasil*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A. & KUMAR, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- VARMA, A. & MALATHI, V.G. 2003. Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* 142: 145-164.
- VU, S.; MELGAREJO, T.; CHEN, L.F.; SOUZA, J.O.; MACEDO, M.A.; INOUE-NAGATA, A.K. & GILBERTSON, R.L. 2015. *Evidence that Tomato mottle leaf curl virus from Northeastern Brazil is an indigenous New World monopartite begomovirus*. In: Amecian Phytopathological Society Annual Meeting. Pasadena.
- WALT, E.; MARTIN, D.P.; VARSANI, A.; POLSTON, J.E. & RYBICKI, E.P. 2008. Experimental observations of rapid *Maize streak virus* evolution reveal a strand-specific nucleotide substitution bias. *Virology Journal* 5: 1-11.
- WYANT, P.S.; GOTTHARDT, D.; SCHAFER, B.; KRENZ, B. & JESKE, H. 2011. The genomes of four novel begomoviruses and a new *Sida micrantha mosaic virus* strain from Bolivian weeds. *Archives of Virology* 156: 347-352.
- ZAMIR, D.; EKSTEIN-MICHELSON, I.; ZAKAY, Y.; NAVOT, N.; ZEIDAN, M.; SARFATTI, M.; ESHED, Y.; HAREL, E.; PLEBAN, T.; VAN-OSS, H.; KEDAR, N.; RABINOWITCH, H.D. & CZOSNEK, H. 1994. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, TY-1. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 141-146.

ANEXOS

---

---

**Anexo 1.** Sequências virais do DNA-A e DNA-B de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e do DNA-A de *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) que foram utilizadas nos alinhamentos e construção de árvores filogenéticas, disponíveis em bancos de dados. Cada sequência está informada quanto ao nome do isolado, hospedeira, local de coleta da amostra e número de acesso.

<b>Isolado</b>	<b>Hospedeira</b>	<b>Origem do Isolado</b>	<b>Acesso</b>
<b>ToSRV/DNA-A</b>			
BR:GO:Goi1646:03	<i>Nicandra physaloides</i>	Goianápolis - GO	JX415188
BR:768Cro3a:08	<i>Crotalaria juncea</i>	Luziânia - GO	JX415190
BR:768Tom8b:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Luziânia - GO	JX415193
BR:780Tom3:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Luziânia - GO	JX415196
BR:1646Nic1:08	<i>Nicandra physaloides</i>	Goianápolis - GO	JX415197
BR:1646Tom4a:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Goianápolis - GO	JX415198
BR:1646Tom4b:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Goianápolis - GO	JX415199
BR:3539Tom8a:09	<i>Solanum lycopersicum</i>	Acreúna - GO	JX415201
BR:3539Tom8b:09	<i>Solanum lycopersicum</i>	Acreúna - GO	JX415202
BR:Vic01:09	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865615
BR:Vic02:09	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865616
BR:Vic03:09	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865617
BR:Vic04:09	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865618
BR:Vic05:09	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865619
BR:Vic06:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865620
BR:Vic07:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865621
BR:Vic08:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865622
BR:Vic09:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865623
BR:Vic10:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865624
BR:Vic11:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865625
BR:Vic12:09	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865626
BR:Vic13:09	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865627
BR:Vic14:09	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865628
BR:Vic15:09	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865629
BR:Vic17:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865630
BR:Vic18:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865631
BR:Vic19:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865632
BR:Vic20:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865633
BR:Vic21:09	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865634
BR:Vic22:09	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865635
BR:Vic23:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865636
BR:Vic24:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865637
BR:Vic25:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865638
BR:Vic26:09	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865639
BR:Vic27:09	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865640
BR:Vic28:09	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865641
BR:Vic29:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865642
BR:Vic30:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865643
BR:Vic31:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865644
BR:Vic32:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865645

<b>Isolado</b>	<b>Hospedeira</b>	<b>Origem do Isolado</b>	<b>Acesso</b>
BR:Vic33:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865646
BR:Vic34:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865647
BR:Vic35:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865648
BR:Vic36:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865649
BR:Vic40:10	<i>Solanum lycopersicum</i>	Viçosa - MG	JX865650
BR:Jai125:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Jaíba - MG	KC004068
BR:Jai127:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Jaíba - MG	KC004069
BR:Flo165:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Olho d'Água das Flores - AL	KC004070
BR:Flo202:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Olho d'Água das Flores - AL	KC004071
BR:Flo203:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Olho d'Água das Flores - AL	KC004072
BR:Flo206:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Olho d'Água das Flores - AL	KC004073
BR:Flo208:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Olho d'Água das Flores - AL	KC004074
BR:Car214:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC004075
BR:Car218.1:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC004076
BR:Car219.10:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC004077
BR:Car220:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC004078
BR:Car224:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC004079
BR:Car226.3:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC004080
BR:Car227:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC004081
BR:Car228:08	<i>Sida</i> sp.	Carandaí - MG	KC004082
BR:Car230:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC004083
BR:Car232:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC004084
BR:Car233:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC004085
BR:Car235:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC004086
BR:Car236.1:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC004087
BR:Car237.6:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC004088
BR:Car238:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC004089
BR:Vic25:10	<i>Sida</i> sp.	Viçosa - MG	KC004090
BR:Car218.3:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC706617
BR:Car221:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC706618
BR:Car226.5:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC706619
BR:Car237:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC706620
BR:Pip1696:03	<i>Solanum lycopersicum</i>	Distrito Federal - DF	JF803260
BR:Pip1792:03	<i>Solanum lycopersicum</i>	Distrito Federal - DF	JF803261
BR:Ind2857:04	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indiara - GO	JF803262
BR:PADFM:04	<i>Solanum lycopersicum</i>	Distrito Federal - DF	JF803263
Baccatum-9	<i>Capsicum baccatum</i>	Petrolina de Goiás - GO	NC009607
Sumare	<i>Nicandra physaloides</i>	Sumaré - SP	EU086591
Pi-1	<i>Solanum lycopersicum</i>	Piracicaba - SP	HQ606467
<b>ToSRV/DNA-B</b>			
BR:Car217.6:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC706621
BR:Car223:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC706622
BR:Car234.5:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC706623
BR:Car237:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC706624

<b>Isolado</b>	<b>Hospedeira</b>	<b>Origem do Isolado</b>	<b>Acesso</b>
BR:Car235:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC706625
BR:Car237.6:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC706626
BR:Car238:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Carandaí - MG	KC706627
Sumare	<i>Nicandra physaloides</i>	Sumare - SP	GU358449
Pi-1	<i>Solanum lycopersicum</i>	Piracicaba - SP	HQ606468
Baccatum-9	<i>Capsicum baccatum</i>	Petrolina de Goiás - GO	NC009612
<b>ToMoLCV/DNA-A</b>			
BR:PADFM:04	<i>Solanum lycopersicum</i>	PAD DF - DF	JF803246
BR:PA2143:04	<i>Solanum lycopersicum</i>	Paranoá - DF	JF803247
BR:Turv2911:04	<i>Solanum lycopersicum</i>	Turvânia - GO	JF803248
BR:Turv2904:04	<i>Solanum lycopersicum</i>	Turvânia - GO	JF803249
BR:Juaz2586:04	<i>Solanum lycopersicum</i>	Juazeiro - BA	JF803250
BR:Bez2665:04	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bezerros - PE	JF803251
BR:Jai13:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Jaíba - MG	KC706615
BR:Jai56:08	<i>Solanum lycopersicum</i>	Jaíba - MG	KC706616