



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

**VARIABILIDADE GENÔMICA E GEOGRÁFICA
DE ESPÉCIES DE *BEGOMOVIRUS* EM TOMATEIRO E
EM DOIS GÊNEROS DE PLANTAS DANINHAS NO BRASIL**

NIDAY ALLINE NUNES FERNANDES

BRASÍLIA

2010

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

**VARIABILIDADE GENÔMICA E GEOGRÁFICA
DE ESPÉCIES DE BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIRO E
EM DOIS GÊNEROS DE PLANTAS DANINHAS NO BRASIL**

Niday Alline Nunes Fernandes

Orientador: Dr. Leonardo Silva Boiteux

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Fitopatologia, do
Departamento de Fitopatologia da
Universidade de Brasília, como requisito
para a obtenção do grau de Mestre em
Fitopatologia.**

BRASÍLIA

2010

Dissertação de Mestrado realizada junto ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Pesquisador Dr. Leonardo Silva Boiteux. Apoio institucional da Embrapa Hortaliças e financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Banca examinadora:

Dr. Leonardo Silva Boiteux (Orientador)

Universidade de Brasília - UnB

Embrapa Hortaliças - CNPH

Dr. Renato de Oliveira Resende

Universidade de Brasília - UnB

Dr. Elliot Watanabe Kitajima

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP

Aos meus pais Carmosa e Jorge (*in memoriam*),
ao meu noivo Claudio e à minha irmã Pherla,

Dedico.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, pela força renovada a cada dificuldade que se apresenta e pelos sonhos que se concretizam... Agradeço por tornar tudo possível.

Ao Dr. Leonardo Silva Boiteux pela orientação e à Dra. Maria Esther de Noronha Fonseca pela co-orientação e pelos valiosos ensinamentos, transferência de conhecimento, incentivo, atenção, otimismo, confiança e amizade. Obrigada por terem me propiciado essa enorme oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À Universidade de Brasília, especialmente ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização deste curso.

À Embrapa Hortaliças – CNPH, por oferecer o espaço e a infra-estrutura necessária para a execução deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Renato de Oliveira Resende, Elliot Watanabe Kitajima e Rita de Cássia Pereira Carvalho, pela atenção dispensada na avaliação deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Fitopatologia que contribuíram para minha formação profissional: Adalberto Café Filho, Alice Nagata, Armando Takatsu, Carlos Inácio, Carlos Uesugi, Cláudio Lúcio Costa, Denise Vilela, José Carmine Dianese, Juvenil Cares, Luís Eduardo Blum, Marisa Ferreira, Marisa Sanchez, Paulo de Tarso e Renato Resende.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Fitopatologia, especialmente Ribamar, Silene, Kamila e Leila.

Aos meus amigos de curso, Dina Marcia Ferraz, Celso Santana, Cristiane Oliveira, Daniel Diego Carvalho, Edivânio Araújo, Fabiane Mota, Fernanda Espíndola, Leila Terezinha dos Santos, Maria do Desterro dos Santos, Pablo Oliveira, Priscila, Roberta Pereira e Thiago Santos de Oliveira. Obrigada pela amizade e companheirismo, principalmente nas noites de “serão” no laboratório de Micologia da UnB.

À amiga Ednalva de Andrade, pela sincera amizade, pelos sábios conselhos e por compartilhar um pouco de sua experiência.

Aos amigos do Laboratório de Melhoramento Vegetal do CNPH, Bruna, Carlos Ragassi, Getúlio, Mayte e Rita Carvalho. Aos amigos e companheiros do CNPH, Cléia, Edivânio, Jô, Maurício e Roberta. Obrigada pelo agradável ambiente de trabalho.

Ao técnico de laboratório e meu grande amigo de bancada, Antonio Francisco Costa (Chico Bucha). Obrigada por toda paciência, dedicação e ensinamentos transmitidos a mim durante todo o tempo de trabalho. Agradeço também ao William, por toda colaboração, dedicação, amizade e incentivo.

À minha grande amiga Roberta Pereira, por dividir comigo não apenas os sonhos desde a graduação no Rio de Janeiro, mas também a casa, a comida, a roupa lavada, as contas e os estresses de estar morando longe da família em uma cidade desconhecida... Minha eterna gratidão por ser minha “mãe e irmã” em Brasília.

À minha amiga Fabiane Mota, ao Cleiton e a tia Maria do Carmo, por nos apresentar Brasília e por terem se tornado nossa “família” neste lugar. Obrigada por todo “socorro” prestado nos momentos de dificuldade, pelo apoio, dedicação e amizade.

À amiga Ana Paula Castro e seus pais Dona Dalva e Seu Osvaldo, por terem nos acolhido em sua casa de forma tão calorosa quando chegamos em Brasília. Obrigada por toda hospitalidade, confiança e amizade.

Aos mestres e amigos do Departamento de Fitopatologia da UFRRJ, Helena Montano, João Pedro Pimentel, Jadier Cunha, Enia Mara Carvalho e Rhadyson, por me apresentarem a Fitopatologia, por toda confiança, apoio e por me incentivarem a “ir até o fim”. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos, pelos momentos de descontração e pela amizade sincera.

Aos meus queridos amigos de UFRRJ, Monique, Juliana, Mauro, Jayro, Joice, Aparecida e Cinthya, pela amizade sincera e constante, por todo apoio, pelas palavras de incentivo e por estarem sempre presentes mesmo que fisicamente distantes.

Por fim, minha sincera gratidão a minha grande família e a todos os amigos que deixei “morrendo de saudades” no Rio de Janeiro, em especial, minhas “tias-mães” Ester, Dodô e Lídia. Obrigada por terem confiado na minha escolha e por estarem sempre ao meu lado.

À minha mãe Carmosa, grande mulher batalhadora na qual me espelho. Obrigada pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos de minha vida, por acreditar nos meus sonhos e lutar ao meu lado pela realização de cada um deles.

À minha irmã Pherla, pelos conselhos, incentivo, paciência e por tentar me confortar nos momentos de estresse.

Ao meu noivo Claudio, por todo amor, carinho, cumplicidade, paciência e compreensão. Por estar ao meu lado em todos os momentos decisivos, por todas as palavras de força e conforto quando a saudade de casa e o desespero me invadiam, pela força a cada nova barreira encontrada e pelas palavras de incentivo que me deixaram confiante para vencer mais essa etapa na minha vida.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, minha sincera gratidão.

ÍNDICE

RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. A CULTURA DO TOMATEIRO	5
1.1 Tomate para consumo <i>in natura</i> no Brasil	6
1.2 Tomate para processamento industrial no Brasil	7
2. VÍRUS E VIROSES DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA INFECTANDO TOMATEIRO NO BRASIL	9
2.1 <i>Tospovirus</i>	9
2.2 <i>Tobamovirus</i>	9
2.3 <i>Potyvirus</i>	10
2.4 <i>Luteovirus</i>	10
2.5 <i>Begomovirus</i> e as begomoviroses	11
3. FAMÍLIA <i>GEMINIVIRIDAE</i>	11
3.1 Gêneros da família <i>Geminiviridae</i>	11
3.1.1 Os vírus pertencentes ao gênero <i>Mastrevirus</i>	12
3.1.2 Os vírus pertencentes ao gênero <i>Curtovirus</i>	12
3.1.3 Os vírus pertencentes ao gênero <i>Topocuvirus</i>	12
3.1.4 Os vírus pertencentes ao gênero <i>Begomovirus</i>	13
3.2 Organização genômica das espécies de <i>Begomovirus</i>	13
3.2.1 Organização genômica do DNA-A: genes, produtos gênicos, estrutura e função	16
3.2.2 Organização genômica do DNA-B: genes, produtos gênicos, estrutura e função	18
3.2.3 Região Comum (RC)	18
3.2.4 Organização genômica de espécies de <i>Begomovirus</i> com genoma monopartido	19
3.3 Demarcação de espécies, estirpes (“strains”) e variantes de sequência de <i>Begomovirus</i>	21
3.4 Transmissão natural dos geminivírus	21
3.5 Replicação dos geminivírus na planta hospedeira	23
3.6 Mecanismos de geração de diversidade genética em <i>Begomovirus</i>	24
3.6.1 Mutações	24
3.6.2 Recombinação	25

3.6.3 Pseudo-recominação	25
3.6.7 DNA Satélites	27
4. GÊNERO <i>BEGOMOVIRUS</i> NO BRASIL	28
4.1 Importância econômica	28
4.2 Diversidade de <i>Begomovirus</i> em tomateiro no Brasil	31
4.2.1 Pesquisa sobre a diversidade de espécies de <i>Begomovirus</i> no Brasil após 1990	31
4.2.2 Natureza da diversidade genética de <i>Begomovirus</i> reportados no Brasil	34
4.3 <i>Begomovirus</i> em plantas invasoras no Brasil	35
HIPÓTESES	37
OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO	38
CAPÍTULO 2 - Diversidade de isolados de <i>Begomovirus</i> obtidos em plantas de tomateiro para consumo <i>in natura</i> no Brasil: Panorama de espécies virais em uma década de surtos epidêmicos (2001-2010)	39
Resumo	39
Abstract	40
Introdução	41
Materiais e Métodos	45
Resultados e Discussão	47
CAPÍTULO 3 - Caracterização de variantes de sequência de <i>Tomato yellow spot virus</i> infectando <i>Leonurus sibiricus</i> (Lamiaceae) no Brasil	67
Resumo	67
Abstract	68
Introdução	69
Materiais e Métodos	70
Resultados e Discussão	72
CAPÍTULO 4 - Caracterização de um complexo de espécies de <i>Begomovirus</i> de genoma bipartido infectando plantas do gênero <i>Cleome</i> (Capparaceae) no Brasil	87
Resumo	87
Abstract	88
Introdução	89
Materiais e Métodos	91
Resultados e Discussão	93
CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

ÍNDICE

FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** – Representação esquemática do genoma de um begomovírus de genoma bipartido. Os círculos representam o genoma viral, dividido em dois componentes, DNA-A e DNA-B. Cada seta representa a região genômica contendo o gene completo. A transcrição é bidirecional nos dois componentes. As setas azuis são as ORFs com transcrição no sentido viral (“virion sense”) e as setas vermelhas indicam as ORFs com transcrição no sentido complementar (“complementary-sense”). A sigla dentro dos parêntesis representa a sinonímia do gene e/ou do produto gênico correspondente. A região comum (RC) está representada pela caixa de cor verde. A sequência dentro da RC é conservada para todos os membros da família *Geminiviridae*. Dentro da RC localiza-se um “stem-loop motif” com sequência altamente conservada de nove nucleotídeos (5’-TAATATT↓AC-3’), contendo o sítio que é clivado pela proteína Rep (representado pelo símbolo ↓) para iniciar a replicação do DNA (= domínio funcional da origem de replicação). A seta em azul clara (sentido viral) representa AV2* que é uma ORF presente apenas em espécies de *Begomovirus* de genoma monopartido da Europa, Ásia e África (“Velho Mundo”) 15
- Tabela 1** – Sumária sobre localização genômica e função dos genes e proteínas de espécies de *Begomovirus* com genoma bipartido (modificada de Rojas, 2004) 20
- Tabela 2** - Lista de espécies e isolados de *Begomovirus* caracterizados a nível molecular infectando tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) no Brasil. Os nomes das espécies estão escritos em negrito e itálico; os nomes dos isolados e os sinônimos estão logo abaixo dos nomes das espécies. Os números de acesso das sequências e as abreviações assinaladas também estão listados (Fauquet *et al.*, 2008) 30
- Figura 2** – Diagrama do DNA-A linearizado de espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido. A régua indica a ordem numérica dos nucleotídeos compreendidos entre a origem de replicação e o final do genoma viral. As ORFs AV1 (CP), AC1, AC2, AC3 e AC4 estão representadas por barras vermelhas. As barras em azul representam as regiões amplificadas por três pares de ‘primers’ universais: PALv1978/PARc496 – PALPAR (Rojas *et al.* 1993); região ‘Core CP’ englobando um segmento do gene codificador da capa protéica que é amplificada pelo par de ‘primers’ AV494/AC1048 (Brown *et al.*, 2001) e o segmento genômico analisado (SGA) no presente trabalho correspondendo a região amplificada pelos ‘primers’ BegoAFor1/BegoARev1 (Ha *et al.*, 2006). O bloco RIG representa a região intergênica que contém a região comum 33
- Figura 3** – Diagrama do DNA-B linearizado de espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido. A régua indica a ordem numérica dos nucleotídeos compreendidos entre a origem de replicação e o final do genoma viral. As ORFs BV1 e BC1 estão representadas por barras vermelhas. As barras em azul representam a região amplificada pelo par de ‘primers’ universais: PBL1v2040/PCRC1– PBLPCR (Rojas *et al.*, 1993). A região PBLPCR foi caracterizada via sequenciamento no presente trabalho. O bloco ‘Intergenic’ representa a região intergênica que contém a região comum 33

CAPÍTULO 2 - Diversidade de isolados de *Begomovirus* obtidos em plantas de tomateiro para consumo *in natura* no Brasil: Panorama de espécies virais em uma década de surtos epidêmicos (2001-2010)

- Figura 1** – Diversidade de sintomas induzidos pela infecção por isolados de begomovírus em tomateiro: (A) Planta coletada no Estado do Tocantins – TO, exibindo sintomas de amarelecimento e distorção foliar; (B) planta de tomate em campo aberto em Brasília-DF com mosaico; (C) clorose apical, dobramento de borda, redução do tamanho dos folíolos e leve distorção foliar em planta conduzida sob casa plástica em Brasília-DF 57
- Figura 2** – Diagrama do DNA-A linearizado de espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido. A régua indica a ordem numérica dos nucleotídeos compreendidos entre a origem de replicação e o final do genoma viral. As ORFs AV1 (CP), AC1, AC2, AC3 e AC4 estão representadas por barras vermelhas. As barras em azul representam as regiões amplificadas por três pares de ‘primers’ universais: PALv1978/PARc496 – PALPAR (Rojas *et al.* 1993); 58

região ‘Core CP’ englobando um segmento do gene codificador da capa protéica que é amplificada pelo par de ‘primers’ AV494/AC1048 (Brown *et al.*, 2001) e o segmento genômico analisado (SGA) no presente trabalho correspondendo a região amplificada pelos ‘primers’ BegoAFor1/BegoARev1 (Ha *et al.*, 2006). O bloco RIG representa a região intergênica que contém a região comum

Figura 3 – Diagrama do DNA-B linearizado de espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido. A régua indica a ordem numérica dos nucleotídeos compreendidos entre a origem de replicação e o final do genoma viral. As ORFs BV1 e BC1 estão representadas por barras vermelhas. As barras em azul representam a região amplificada pelo par de ‘primers’ universais: PBL1v2040/PCRC1– PBLPCR (Rojas *et al.* 1993). A região PBLPCR foi caracterizada via sequenciamento no presente trabalho. O bloco ‘Intergenic’ representa a região intergênica que contém a região comum 58

Tabela 1 – Lista do código do isolado, local, data de coleta (mês / ano), espécie viral com maior nível de identidade; BLASTn (% de identidade) e número de acesso no GenBank correspondente a espécie viral. Os isolados de tomateiro foram analisados via sequenciamento de um segmento de aproximadamente 1060 pares da base do DNA-A. Cada espécie e suas respectivas estirpes estão com uma diferente combinação de cor/preenchimento de célula 59

Tabela 2 – Resumo geral da diversidade genética de **252** isolados, estirpes e espécies de *Begomovirus* de tomateiro identificados nas principais regiões produtoras do Brasil (cinco regiões, **12** estados e o Distrito Federal) 63

Figura 4 – Árvore filogenética baseada em um alinhamento múltiplo de algumas das seqüências de cerca de 1100 pares de bases de um segmento do DNA-A flanqueado pelo par de ‘primers’ universais (BegoAFor1 / BegoARev1). Estes ‘primers’ foram desenhados para anelar com regiões conservadas presentes na região 5’-terminus do gene AV1 (CP) e na região 3’-terminus do gene AC1 (Rep). Foram escolhidos nove isolados de tomateiro para análise: **TO-045; TO-092; TO-093; BA-045; CE-003; SP-002; SP-003; DF-034 e RJ-019**. Estes isolados foram escolhidos por apresentarem, em análises via BLASTn, baixa identidade com os *Begomovirus* depositados no GenBank. O alinhamento foi feito pelo método CLUSTAL W do programa Megalign (Lasergene, Madison-WI). A árvore filogenética foi construída usando análise de parcimônia do programa PAUP e a consistência de cada ramo da árvore foi determinada pelo método Bootstrap com 2000 repetições (valores de suporte são indicados em cada ramo da árvore). Os seguintes vírus foram utilizados para comparação com um subgrupo de isolados obtidos no presente levantamento: AbMV, *Abutilon mosaic virus* (GenBank accession number **NC_001928**); ACMV, *African cassava mosaic virus* (**NC_001467**); BCTV, *Beet curly top virus* (**NC_001412**) = **outgroup**; BDMV, *Bean dwarf mosaic virus* (**NC_001931**); BGYMV, *Bean golden yellow mosaic virus* (**NC_001439**); CdTV, *Chino del tomate virus* (**NC_003830**); MSV, *Maize streak virus* (**NC_001346**); PHYVV, *Pepper huasteco yellow vein virus* (**NC_001359**); PYMV, *Potato yellow mosaic virus* (**NC_001934**); SGMV, *Sida golden mosaic virus* (**NC_002046**); SGMCRV, *Sida golden mosaic Costa Rica virus* (**NC_004657**); SGMHoV, *Sida golden mosaic Honduras virus* (**NC_004659**); SiMoV, *Sida mottle virus* (**NC_004637**; **isolate A1, AJ557450**); SiYMV, *Sida yellow mosaic virus* (**NC_004639**); SimMV, *Sida micrantha mosaic virus* (**NC_005330 e AJ557450**); SqLCV, *Squash leaf curl virus* (**NC_001936**); TGMV, *Tomato golden mosaic virus* (**NC_001507**); ToCMoV, *Tomato chlorotic mottle virus* (**MG-Bt1 e AY090557**); ToSRV, *Tomato severe rugose virus* (**Petrolina, DQ207749, Sumaré, EU086591 e Piraju-PJU, FJ 824808**); ToRMV, *Tomato rugose mosaic virus* – [Ube] (**AF291705 = NC_002555**); ToMoV, *Tomato mottle virus* (**NC_001938**); TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus* (**NC_004005**); TYLCSV, *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (**NC_003828**); ToGMV, *Tomato golden mottle virus* (**AF132852 e DQ520943**); SBMV, *Soybean blistering mosaic virus* isolado NOA (**EF016486**); ToYVS, *Tomato yellow vein streak virus* isolado Ba-3 (**EF417915**); ToLDV, *Tomato leaf distortion virus* isolado BR:Co13:07 (**EU710749**); SYLCV, *Sida yellow leaf curl virus* isolado BR:Co13:07 (**EU710750**); TCMV, *Tomato common mosaic virus* isolate BR:Co12:07(**EU710754**); TYSV, *Tomato yellow spot virus* from Argentina (**FJ538207**); EYMV, *Euphorbia yellow mosaic virus* (**FJ619507**); SimMV, *Sida micrantha mosaic virus* strain BR:Sag3:Soy:08 (**FJ686693**); OMV, *Okra mottle virus* strain BR:Sag8:Soy:08 (**FJ686695**); ToYSV, *Tomato yellow spot virus* (**NC_007726**) 65

CAPÍTULO 3 - Caracterização de variantes de sequência de *Tomato yellow spot virus* infectando *Leonurus sibiricus* (Lamiaceae) no Brasil

- Figura 1** – Plantas de *Leonurus sibiricus* coletadas ao lado de um campo de produção de tomateiro em Marilândia do Sul (PR) exibindo sintomas típicos de infecção por espécies de *Begomovirus* 76
- Tabela 1** – Lista de 13 isolados de *Begomovirus* obtidos de plantas de *Leonurus sibiricus* [local e data de coleta (mês/ano), espécie viral, nível de identidade BLASTn (%) e número de acesso no GenBank] que foram caracterizados para um segmento em torno de 1070 pares da base do DNA-A e seus níveis de identidade com espécies virais cujas sequências foram depositadas no GenBank 77
- Tabela 2** – Lista de 10 isolados de *Begomovirus* obtidos de plantas de *Leonurus sibiricus* [local, data de coleta (mês/ano), espécie viral, nível de identidade BLASTn e número de acesso no GenBank] que foram caracterizados para um segmento de cerca de 500 pares da base do DNA-B e seus níveis de identidade com espécies virais cujas sequências foram depositadas no GenBank 77
- Figura 2** – Diagrama do DNA-A linearizado de espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido. A régua indica a ordem numérica dos nucleotídeos compreendidos entre a origem de replicação e o final do genoma viral. As ORFs AV1 (CP), AC1, AC2, AC3 e AC4 estão representadas por barras vermelhas. As barras em azul representam as regiões amplificadas por três pares de ‘primers’ universais: PALv1978/PARc496 – PALPAR (Rojas *et al.* 1993); região ‘Core CP’ englobando um segmento do gene codificador da capa protéica que é amplificada pelo par de ‘primers’ AV494/AC1048 (Brown *et al.*, 2001) e o segmento genômico analisado (SGA) no presente trabalho correspondendo a região amplificada pelos ‘primers’ BegoAFor1/BegoAREv1 (Ha *et al.*, 2006). O bloco RIG representa a região intergênica que contém a região comum 78
- Figura 3** – Diagrama do DNA-B linearizado de espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido. A régua indica a ordem numérica dos nucleotídeos compreendidos entre a origem de replicação e o final do genoma viral. As ORFs BV1 e BC1 estão representadas por barras vermelhas. As barras em azul representam a região amplificada pelo par de ‘primers’ universais: PBL1v2040/PCRC1– PBLPCR (Rojas *et al.* 1993). A região PBLPCR foi caracterizada via sequenciamento no presente trabalho. O bloco ‘Intergenic’ representa a região intergênica que contém a região comum 78
- Figura 4** – Matriz de identidade genética obtida entre os isolados virais utilizando-se a informação de uma sequência comum de cerca de 1070 pares de base de um segmento do **DNA-A** amplificado com o par de ‘primers’ BegoAFor1/BegoAREv1 (Ha *et al.*, 2006). Dez isolados de *Begomovirus* obtidos de plantas de *Leonurus sibiricus* (PR-012, PR-013, PR-014, PR-028, PR-029, PR-033, PR-034, PR-035, PR-049 e PR-087) foram comparados entre si e com isolados de *Tomato yellow spot virus* – ToYSV (GenBank **FJ538207**) registrado em feijoeiro na Argentina; isolado ToYSV (**NC_007726 = DQ336350**), originalmente descrito em tomateiro em Minas Gerais; um isolado de *Sida micrantha mosaic virus* (**EU908733**) e um isolado de *Sida mottle virus* (SiMoV) (**AY09055**). A fração acima da diagonal superior representa a porcentagem de identidade entre os isolados. A fração abaixo da diagonal representa a porcentagem de divergência 79
- Figura 5** – Árvore filogenética utilizando o programa CLUSTAL-W (Megalign/ Lasergene) obtida entre os isolados virais utilizando-se a informação de uma sequência comum de cerca de 1070 pares de base de um segmento do DNA-A amplificado com o par de ‘primers’ BegoAFor1/BegoAREv1 (Ha *et al.*, 2006). Dez isolados de *Begomovirus* obtidos de plantas de *Leonurus sibiricus* (PR-012, PR-013, PR-014, PR-034, PR-029, PR-033, PR-028, PR-035, PR-049 e PR-087) foram comparados entre si e com isolados de *Tomato yellow spot virus* – ToYSV (GenBank **FJ538207**) registrado em feijoeiro na Argentina; isolado ToYSV (**NC_007726 = DQ336350**), originalmente descrito em tomateiro em Minas Gerais; um isolado de *Sida micrantha mosaic virus* (**EU908733**) e um isolado de *Sida mottle virus* (SiMoV) (**AY09055**). A barra abaixo indica o número de substituições observadas nas diferentes sequências 80
- Figura 6** – Matriz de identidade genética obtida entre os isolados virais utilizando-se a informação de uma sequência comum de cerca de 550 pares de base de um segmento do **DNA-B** 81

amplificado com o par de ‘primers’ universais: PBL1v2040/PCRC1– PBLPCR (Rojas *et al.*, 1993). Dez isolados de *Begomovirus* obtidos de plantas de *Leonurus sibiricus* (PR-012, PR-013, PR-014, PR-029, PR-033, PR-034, PR-049, PR-087 e PR-088) foram comparados entre si e com isolados de *Sida micrantha mosaic virus* (GenBank **FN557523**) e o isolado *Tomato yellow spot virus* (**NC_007726 = DQ336350**) reportado em tomateiro em Minas Gerais, Brasil. A fração acima da diagonal superior representa a percentagem de identidade entre os isolados. A fração abaixo da diagonal representa a percentagem de divergência

Figura 7 – Árvore filogenética utilizando o programa CLUSTAL-W (Megalign / Lasergene) obtida utilizando-se a informação de uma sequência comum de cerca de 500 pares de base de um segmento do DNA-B amplificado com o par de ‘primers’ universais: PBL1v2040/PCRC1– PBLPCR (Rojas *et al.* 1993). Dez isolados de *Begomovirus* obtidos de plantas de *Leonurus sibiricus* (PR-12, PR-13, PR-14, PR-29, PR-33, PR-34, PR-49, PR-87 e PR-88) foram comparados entre si e com isolados de *Sida micrantha mosaic virus* (GenBank **FN557523**) e *Tomato yellow spot virus* (**NC_007726 = DQ336350**) reportado em tomateiro em Minas Gerais, Brasil. A barra abaixo indica o número de substituições verificadas nas diferentes sequências 82

Figura 8 – Alinhamento de uma sequência comum de cerca de 1070 pares de base de um segmento do DNA-A amplificado com o par de ‘primers’ BegoAFor1/BegoARev1 (Ha *et al.*, 2006) de quatro isolados de *Begomovirus* de *Leonurus sibiricus* (PR-012, PR-013, PR-014, PR-034, PR-029, PR-033, PR-028, PR-035, PR-049 e PR-087) usando o algoritmo CLUSTAL W (Megalign program-Lasergene). Os isolados foram comparados entre si e com isolados de *Tomato yellow spot virus* – ToYSV (GenBank **FJ538207**) registrado em feijoeiro na Argentina; um isolado de ToYSV (**DQ336350**), descrito em tomateiro em Minas Gerais e com isolados de *Sida micrantha mosaic virus* (**EU908733**) e *Sida mottle virus* (SiMoV) (**AY09055**) 83

CAPÍTULO 4 - Caracterização de um complexo de espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido infectando plantas do gênero *Cleome* (Capparaceae) no Brasil

Tabela 1 – Lista de 32 isolados de *Begomovirus* obtidos de plantas do gênero *Cleome* (isolado, local, data de coleta, espécie viral com o nível de identidade mais alto usando o algoritmo BLASTn) que foram caracterizados para um segmento de cerca de 1100 pares da base do DNA-A e seus níveis de identidade com espécies virais cujas sequências foram depositadas no GenBank e o respectivo número de acesso 98

Tabela 2 – Lista de 36 isolados (isolado, local, data de coleta, espécie viral, nível de identidade BLASTn e número de acesso no GenBank) de *Begomovirus* obtidos de plantas do gênero *Cleome* que foram caracterizados via sequenciamento de um segmento de cerca de 550 pares da base do DNA-B. Níveis de identidade com espécies virais cujas sequências foram depositadas no GenBank são expressos em percentagem 99

Figura 1 – (A) Plantas de *Cleome affinis* exibindo sintomas de infecção pelo isolado **TO-003** [obtido no município de Alvorada (TO)] após transmissão controlada com moscas-brancas virulíferas em condições de casa de vegetação. Plantas apresentaram sintomas iniciais de clorose e redução de tamanho dos folíolos 20 dias após infestação com moscas-brancas viruríferas; (B) Sintomas de *Begomovirus* de um isolado de plantas do gênero *Cleome* (**GO-432**) obtido na região urbana de Cavalcante, Estado de Goiás (GO) 100

Figura 2 – Amplificação via PCR de um segmento do DNA-A e amplificação via PCR de um segmento do DNA-B de 23 isolados obtidos de plantas do gênero *Cleome* (sojinha) no Estado do Amazonas (AM), Bahia (BA), Goiás (GO), Mato Grosso (MT), Pernambuco (PE) e Estado do Tocantins (TO). O padrão de amplicons obtido com um segmento do DNA-B do isolado GO-443 apresenta sinais de potencial infecção mista 101

Figura 3 – Árvore filogenética baseada em um alinhamento múltiplo de sequências de cerca de 1100 pares de bases correspondendo a um segmento do DNA-A flanqueado pelo par de ‘primers’ universais (BegoAFor1 / BegoARev1). Estes ‘primers’ foram desenhados para anelar com regiões conservadas presentes na região 5’-terminal do gene AV1 (CP) e na região 3’-terminal do gene AC1 (Rep). Foram escolhidos 28 isolados de *Cleome* para análise (**para os detalhes de cada isolado ver Tabela 1**). O alinhamento foi feito pelo método CLUSTAL-W do programa Megalign (Lasergene, Madison-WI). A árvore 102

filogenética foi construída usando análise de parcimônia do programa PAUP e a consistência de cada ramo da árvore foi determinada pelo método Bootstrap com 2000 repetições (valores de suporte são indicados em cada ramo da árvore). Os seguintes vírus foram utilizados para comparação com um subgrupo de isolados obtidos no presente levantamento: AbMV, *Abutilon mosaic virus* (GenBank accession number **NC_001928**); ACMV, *African cassava mosaic virus* (**NC_001467**); BCTV, *Beet curly top virus* (**NC_001412**) = **outgroup**; BDMV, *Bean dwarf mosaic virus* (**NC_001931**); BGYMV, *Bean golden yellow mosaic virus* (**NC_001439**); CdTV, *Chino del tomate virus* (**NC_003830**); MSV, *Maize streak virus* (**NC_001346**); PHYVV, *Pepper huasteco yellow vein virus* (**NC_001359**); PYMV, *Potato yellow mosaic virus* (**NC_001934**); SGMV, *Sida golden mosaic virus* (**NC_002046**); SGMCRV, *Sida golden mosaic Costa Rica virus* (**NC_004657**); SGMHoV, *Sida golden mosaic Honduras virus* (**NC_004659**); SiMoV, *Sida mottle virus* (**NC_004637**; **isolate A1, AJ557450**); SiYMV, *Sida yellow mosaic virus* (**NC_004639**); SimMV, *Sida micrantha mosaic virus* (**NC_005330 e AJ557450**); SqLCV, *Squash leaf curl virus* (**NC_001936**); TGMV, *Tomato golden mosaic virus* (**NC_001507**); ToCMoV, *Tomato chlorotic mottle virus* (**MG-Bt1 e AY090557**); ToSRV, *Tomato severe rugose virus* (**Petrolina, DQ207749, Sumaré, EU086591 e Piraju-PRJ, FJ 824808**); ToRMV, *Tomato rugose mosaic virus* – [Ube] (**AF291705 = NC_002555**); ToMoV, *Tomato mottle virus* (**NC_001938**); TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus* (**NC_004005**); TYLCSV, *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (**NC_003828**); ToGMV, *Tomato golden mottle virus* (**AF132852 e DQ520943**); SoyBMV, *Soybean blistering mosaic virus* isolado NOA (**EF016486**); ToYVS, *Tomato yellow vein streak virus* isolado Ba-3 (**EF417915**); ToLDV, *Tomato leaf distortion virus* isolado BR:Co3:07 (**EU710749**); SYLCV, *Sida yellow leaf curl virus* isolado BR:Co3:07 (**EU710750**); TCMV, *Tomato common mosaic virus* isolate BR:Co22:07(**EU710754**); TYSV, *Tomato yellow spot virus* from Argentina (**FJ538207**); EYMV, *Euphorbia yellow mosaic virus* (**FJ619507**); SimMV, *Sida micrantha mosaic virus* strain BR:Sag3:Soy:08 (**FJ686693**); OMV, *Okra mottle virus* strain BR:Sag8:Soy:08 (**FJ686695**); ToYSV, *Tomato yellow spot virus* from tomato (**NC_007726**)

RESUMO

Até o início da década de 1990 as begomoviroses apresentavam ocorrência esporádica e sem importância econômica no tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). No entanto, um complexo de espécies de *Begomovirus* foi identificado no Brasil após a introdução no país de *Bemisia tabaci* biótipo B. Um elevado grau de relacionamento genético tem sido observado entre algumas espécies de *Begomovirus* reportadas em tomateiro e aquelas registradas em plantas invasoras associadas com o cultivo desta hortaliça. Desta forma, existem fortes evidências de transferência natural de segmentos genômicos entre as espécies virais presentes nestas diferentes plantas hospedeiras. O cultivo de tomateiro para consumo *in natura* no Brasil é conduzido em uma grande amplitude de condições agroclimáticas incluindo a região Amazônica, a Zona da Mata e o Semi-árido nordestino, a região do ‘Cerrado’ (no Centro-Oeste) e, principalmente, as condições subtropicais do Sudeste e Sul do país. O objetivo deste trabalho foi prospectar e caracterizar a variabilidade genética das espécies de *Begomovirus* registradas na cultura do tomateiro para consumo *in natura* no Brasil (no período entre 2001 e 2010) e em duas plantas daninhas dos gêneros *Cleome* (presente em regiões de clima quente) e *Leonurus* (presente em regiões subtropicais). Os isolados foram caracterizados via PCR com primers universais para segmentos conservados do DNA-A e DNA-B e via sequenciamento de um segmento do DNA-A. Estes ‘primers’ foram desenhados para anelar com sequências conservadas presentes na região 5’-terminal do gene AV1 (CP) e na região 3’-terminal do gene AC1 (Rep), englobando uma região com 1100 pares de base. Duzentas e cinquenta e duas amostras foliares de tomateiro foram coletadas nas principais áreas produtoras nas cinco regiões do Brasil. Os resultados indicaram que todos os isolados de tomateiro apresentam genoma bipartido, não havendo ainda nenhum registro de espécies de genoma monopartido. Existe uma aparente regionalização das espécies virais, com algumas sendo predominantes em condições de clima mais quente e outras em condições de clima subtropical. As espécies *Tomato golden mosaic virus* (descrita antes do ingresso do biótipo B no Brasil) e *Tomato yellow spot virus* não foram detectadas neste levantamento. Sete potenciais novas espécies, ainda não descritas anteriormente, estão emergindo no país, sendo que algumas já apresentam ampla distribuição geográfica enquanto que outras ainda vêm se mantendo de maneira endêmica. Existem algumas estirpes que estão divergindo dos isolados das

espécies originais a ponto de representarem potenciais novas espécies. Estirpes de espécies de *Begomovirus* reportadas inicialmente em outras plantas cultivadas e/ou plantas daninhas estão aparentemente se adaptando e infectando tomateiro. No gênero *Cleome* foi identificado um complexo de isolados contendo pelo menos três novas espécies filogeneticamente relacionadas com vírus presentes infectando plantas do gênero *Sida* (Malvaceae) e com a espécie *Tomato yellow spot virus* (ToYSV). Os isolados de *L. sibiricus* apresentaram elevada identidade (95,1 a 97,1%) com estirpes de ToYSV (previamente descritas infectando tomateiro e feijoeiro). Desta forma, *L. sibiricus* é uma hospedeira de isolados de begomovírus que apresentam estreita relação genética com espécies infectando plantas cultivadas no Brasil. De modo geral, os resultados obtidos confirmam a extraordinária variabilidade de *Begomovirus* de genoma bipartido do Novo Mundo e o complexo cenário que ainda permanece na etiologia das begomoviroses do tomateiro. Este estudo ainda reforça a importância das plantas daninhas e nativas da flora como fontes de material genético viral necessário para a emergência de novas espécies com diferentes características biológicas, ecológicas e moleculares.

ABSTRACT

In Brazil, the begomoviruses in tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) were minor diseases up to the 1990's. However, an extremely diverse complex of *Begomovirus* species has arisen after the introduction into the country of the whitefly *Bemisia tabaci* biotype B. The high degree of relationship of some tomato and weed-infecting begomoviruses suggests a natural transfer of genetic material among these viral isolates. In Brazil, fresh-market tomatoes are grown under a wide array of agroclimatic conditions ranging from warm and humid equatorial area in the Amazon River Basin to the semi-arid Northeast region. It is also cultivated in the dry and mild climates of the Brazilian Savannah ("Cerrado") in Center-West region and mainly in the subtropical mild climates of Southeast and South regions. The main objective of the present work was to evaluate the nation-wide genetic variability of *Begomovirus* species infecting fresh-market tomatoes during the years 2001 and 2010 and also in two genera of weed plants: *Cleome* (present in warm regions) and *Leonurus* (present in subtropical areas). This survey was done via PCR with universal primers targeting conserved regions of both DNA-A and DNA-B components and via sequencing analysis of a PCR amplicon of 1100 base pairs encompassing a region of the DNA-A component between the 5'-end of the AV1 (CP) gene and the 3'-end of the AC1 (Rep) gene. Two-hundred-fifty two leaf samples were collected in the main tomato production areas in all Five Brazilian regions. All isolates had bipartite genome with no report of monopartite species. Some viral species formerly described in Brazil were not detected in this survey, including *Tomato golden mosaic virus* (described before the entrance of the biotype B) and *Tomato yellow spot virus*. There is a geographic distribution of some viral species displayed a regional pattern, with one group of species being prevalent in warm conditions and other group being prevalent in subtropical areas. Seven potential new viral species are emerging in tomatoes, with some of them already showing a wide geographic distribution, whereas others are yet endemic and restricted to some specific areas. A group of strains are diverging from the original viral species and many isolates might represent new species according to the current taxonomic rules. Strains of *Begomovirus* species originally reported on other cultivated plant species and weeds are also moving into tomatoes. A complex of at least three viral species was characterized in the genus *Cleome* with species genetically related to *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) and with

viruses reported infecting the genus *Sida* (Malvaceae). *Leonurus sibiricus* isolates displayed high identity levels (from 95.1 a 97.1%) with ToYSV strains previously reported infecting tomatoes and beans. Therefore, *L. sibiricus* is an alternative host of viral species closely related to viruses able to infect cultivated crops in Brazil. In general, the results indicated the extraordinary diversity of the bipartite *Begomovirus* species from the New World area. The scenario of tomato-infecting begomoviruses remains extremely diverse in Brazil, difficulting the precise diagnosis of particular members within this species complex. The present study also reinforces the importance of native flora and weed species as sources of viral genetic material necessary for the intense upsurge of new species with distinct biological, ecological, and molecular properties.

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a cultura do tomateiro para mesa ou para consumo *in natura* (*Solanum lycopersicum* L., família Solanaceae) é uma importante fonte de emprego em todos os segmentos de sua cadeia produtiva (ABCSEM, 2009). O Brasil apresenta uma grande diversidade de sistemas de cultivo do tomateiro para consumo *in natura* variando desde pequenos produtores de base familiar até grandes fazendas com estrutura empresarial. A área cultivada tem variado, nos últimos anos, entre 38 e 42 mil hectares (Tavares, 2002; ABCSEM, 2009). Atualmente, a produção de tomate para mesa distribui-se entre as regiões Sudeste (59,3%), Centro-Oeste (7,1%), Sul (18,2%), Nordeste (15,1%) e Norte (0,3%). O rendimento da cultura do tomateiro de mesa no Brasil apresentou significativo incremento desde o final da década de 1980, atribuído à introdução de híbridos (mais produtivos e com maior número de genes de resistência) e à adoção de novas tecnologias de produção (Boiteux *et al.*, 2008). Como resultado, a tomaticultura brasileira tem apresentado um crescimento acima da média mundial. Segundo dados da FAO, a Europa e nos Estados Unidos apresentaram crescimento médio de 30% e 45%, respectivamente, enquanto a produção brasileira quase duplicou em 20 anos. O Brasil ocupa atualmente o posto de 8º maior produtor de tomate do mundo (FAO, 2010).

Por sua vez, a cadeia produtiva do tomateiro para processamento industrial tem passado por profundas modificações e fases de reorganização de sua base logística desde o início da década de 1990. Como resultado, foi observado uma mudança na distribuição geográfica das áreas de cultivo. Em 1990, o pólo de produção de Pernambuco, Bahia e Paraíba ocupava 12,5 mil hectares enquanto São Paulo ocupava 8,3 mil hectares e a região do “Cerrado” (Goiás e Minas Gerais) 6,4 mil hectares. Nos últimos anos, a área de produção do tomate para processamento tem permanecido, historicamente, entre 15 e 17 mil hectares, estando concentrada nos Estados de Goiás (60,9%), São Paulo (20,6%) e Minas Gerais (18,5%).

Dentre as inúmeras doenças que afetam o tomateiro, aquelas causadas por begomovírus têm sido as mais limitantes à produção comercial de tomate em diversas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (Polston & Anderson, 1997; Moriones & Navas-Castillo, 2000). Os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) são caracterizados por infectarem plantas dicotiledôneas, apresentarem partículas icosaédricas geminadas, com genoma composto por uma ou duas moléculas

de DNA circular (componentes DNA-A e DNA-B), de fita simples, covalentemente fechada e com aproximadamente 2600 bases cada (Lazarowitz, 1992). Estes vírus são transmitidos por um complexo de biótipos da mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) (Stanley *et al.*, 2005). Mais de uma centena de diferentes espécies/estirpes de begomovírus já foram relatadas infectando naturalmente o tomateiro no mundo (Jones, 2003; Fauquet *et al.*, 2008). Perdas significativas de produção vêm sendo registradas desde as décadas 1970/1980 em diferentes regiões produtoras de tomate na Europa, Ásia e Américas (Polston & Anderson, 1997).

A ocorrência de begomovírus em tomateiro no Brasil pode ser dividida em duas fases. Até o início da década de 1990 as begomoviroses eram de ocorrência esporádica e sem importância econômica. Por esta razão, nenhum esforço de melhoramento genético para resistência a begomovírus foi estabelecido, estando todo o trabalho concentrado na busca por resistência a tospovírus e potyvírus (para revisão ver Boiteux *et al.*, 2008). Nesta primeira fase, os relatos de infecções por begomovírus foram feitos entre as décadas de 1960 e 1970 (Flores *et al.*, 1960; Costa, 1974; Costa *et al.*, 1975; Matyis *et al.*, 1975). No entanto, na década de 1990, um complexo extremamente diverso de begomovírus emergiu no Brasil, coincidindo com a introdução e dispersão do biótipo B do vetor *B. tabaci* no país (Ambrozevícius *et al.*, 2002). Este complexo viral tem sido devastador na produção de tomate, sendo considerado o principal fator limitante na produção dessa hortaliça no Brasil (Tavares, 2002; Fernandes *et al.*, 2008). Os sintomas típicos de infecção viral incluem nanismo, clorose restrita às nervuras, mosaico amarelo, clorose generalizada, mosqueado, rugosidade e enrolamento das folhas.

O primeiro registro formal de uma epidemia de begomovírus associada com a presença da mosca-branca *B. tabaci* biótipo B foi feito em 1993 em Brasília-DF (Ribeiro *et al.*, 1994). Em seguida, um novo begomovírus, denominado *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) foi relatado no Estado de São Paulo (Faria *et al.*, 1997). O hábito alimentar polífago de *B. tabaci* biótipo B favoreceu sua rápida disseminação e epidemias de begomoviroses passaram a ser observadas em muitas áreas produtoras de tomateiro no Brasil (Ribeiro *et al.*, 1998). Posteriormente as begomoviroses foram observadas em lavouras de tomateiro nos Estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Paraíba, Rio de Janeiro, Goiás e Ceará (Ribeiro *et al.*, 2003). O biótipo B coloniza o tomateiro e outras solanáceas com alta eficiência. Este inseto também coloniza um grande número de espécies de plantas dicotiledôneas presente na vegetação espontânea e na maioria das ervas daninhas associadas com a cultura do tomateiro (Lourenção &

Nagai, 1994; Brown *et al.*, 1995; Ambrozevícius *et al.*, 2002). O controle químico do vírus é difícil uma vez que a transmissão pela mosca branca é do tipo circulativa (Czosnek *et al.*, 2002; Lapidot & Friedmann, 2002). Quando a infecção é precoce, as perdas podem ser elevadas (Giordano *et al.*, 2005). No Submédio do Vale São Francisco, as infecções por geminivírus em tomateiro causaram perdas estimadas em até 100% em algumas áreas (Lima & Haji, 1998).

Alguns dos estudos mais abrangentes de prospecção da diversidade dos begomovírus no Brasil utilizaram a combinação das técnicas de PCR (com primers universais) e o sequenciamento parcial do genoma desses vírus (Ribeiro *et al.*, 2003). No entanto, estudos recentes têm fortalecido cada vez mais a noção de que a sequência completa do genoma (principalmente do componente DNA-A) é indispensável para uma definição mais precisa das espécies (Fauquet *et al.*, 2005). Uma intensa recombinação de segmentos genômicos ocorre naturalmente neste gênero viral. Desta forma, dois isolados podem ser idênticos ou muito similares em um dado segmento genômico, mas representar um recombinante para as outras regiões. Esta característica pode levar a conclusões incorretas sobre o verdadeiro status taxonômico de isolados caracterizados apenas para um determinado segmento do genoma viral (Fauquet *et al.*, 2005).

Até o presente, foram caracterizadas cinco espécies definitivas de begomovírus infectando tomateiro no Brasil [*Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV)]. Além disso, 12 espécies tentativas foram descritas [*Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Tomato yellow mosaic virus* (ToYMV), *Tomato severe mosaic virus* (ToSMV), *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), *Tomato infectious yellows virus* (ToIYV), *Tomato golden vein virus* (ToGVV), *Tomato crinkle virus* (ToCrV), *Tomato crinkle yellow leaf virus* (ToCYLV), *Tomato chlorotic vein virus* (ToCIVV), *Tomato mild mosaic virus* (ToMIMV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) e *Tomato leaf distortion virus* (ToLDV)] (Calegario *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Fauquet *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2010).

Plantas daninhas, plantas da flora nativa e plantas de ocorrência espontânea têm merecido, mais recentemente, estudos detalhados, uma vez que estas plantas podem servir como potenciais reservatórios de várias espécies de *Begomovirus* e, assim, atuar como hospedeiros adequados para recombinação e emergência de novas espécies virais.

Como muitas plantas daninhas são perenes ou semi-perenes, elas podem manter populações virais entre as estações de cultivo, permitindo a permanência e/ou fixação de isolados virais em condições naturais.

Espécies de plantas invasoras das famílias Malvaceae, Sterculiaceae, Capparaceae, Fabaceae, Euphorbiaceae (Ambrozevícius *et al.*, 2002; Assunção *et al.*, 2006) e mais recentemente Amaranthaceae e Asteraceae (Arnaud *et al.*, 2007; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008) têm sido relatadas como hospedeiras alternativas de begomovírus em várias regiões produtoras e/ou geográficas e representam, supostamente, fontes permanentes de inóculo dos vírus que podem ser transmitidos (via mosca-branca) para o tomateiro e outras espécies cultivadas (Assunção *et al.*, 2006). Além disso, estas plantas podem estar potencialmente associadas à emergência de novas espécies de *Begomovirus* em condições naturais (Ambrozevícius *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2002).

Uma das epidemias virais de destaque no Brasil envolve a ocorrência natural de espécies de *Begomovirus* em plantas do gênero *Sida* e *Sidastrum* (família Malvaceae). Estas plantas são encontradas com sintomas de infecção de begomovírus em virtualmente todo o país, tendo este patossistema uma amplitude geográfica e ecológica sem paralelo dentro do gênero *Begomovirus* no Brasil (Jovel *et al.*, 2007). Espécies do gênero *Sida* também estão amplamente distribuídas pela América Latina e outras regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde servem como hospedeiras alternativas para diversos geminivírus de importância econômica. Além disso, elas estão frequentemente associadas com várias culturas hortícolas tipicamente afetadas por geminivirose, incluindo o tomateiro (Jovel *et al.*, 2007).

Neste contexto, estudar os aspectos da diversidade genética de *Begomovirus* no tomateiro e em plantas naturalmente ou agriculturalmente associadas com o seu cultivo é de suma relevância. Este conhecimento pode ajudar no controle das doenças gerando informações sobre espécies virais predominantes, hospedeiras alternativas relevantes e amplitude geográfica de ocorrência.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. A CULTURA DO TOMATEIRO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma planta fanerógama, angiosperma e dicotiledônea (Rick & Butler, 1956). Esta espécie é endêmica da região ocidental da América do Sul, sendo nativa das regiões dos Andes e também em faixas litorâneas que englobam o Chile, Bolívia, Peru e Equador. Esta hortaliça foi amplamente cultivada e consumida pelos povos pré-colombianos. O tomateiro cultivado foi, muito provavelmente, levado da região ocupada pelos Incas até a região do sul do México, dominada pelos Aztecas (Pazinato & Galhardo, 1997). O México, em especial as regiões de Puebla e Vera Cruz, é considerado o provável centro de domesticação do tomateiro (Jenkins, 1948; Monaco, 1964). Levada para a Europa pelos colonizadores espanhóis, a tomaticultura gradativamente espalhou-se pelos diferentes países daquele continente. Um fato curioso é que, durante um longo tempo, o tomateiro foi considerado como uma planta de uso medicinal ou ornamental. A utilização como alimento foi difundida apenas dois séculos depois do tomateiro ser levado para a Europa (Gardê & Gardê, 1993). Posteriormente, o hábito de cultivo do tomateiro para consumo humano foi gradativamente se difundindo, tendo hoje uma utilização global (Fontes & Silva, 2002).

A cadeia produtiva de tomate tem forte relevância econômica no agronegócio brasileiro, movimentado R\$ 2 bilhões por ano (aproximadamente 16% do PIB do segmento de hortaliças). Na safra 2006, foram colhidas cerca de 2,2 milhões de toneladas de tomate de mesa em uma área aproximada de 41,7 mil hectares, com rendimento de 50,7 t/ha. O tomate de mesa representa 66,5% da produção e ocupa 73,7% da área total. O restante da produção e da área cultivada corresponde ao tomate utilizado como matéria-prima para processamento industrial. Um levantamento recente indicou um total de 55 mil hectares ocupados com o cultivo de tomateiro para consumo *in natura* e para processamento no país (ABCSEM, 2009). A produção nacional em 2007 foi de 3.200.846 toneladas, sendo que aproximadamente 65% são cultivados para o consumo *in natura* e 35% produzidos para processamento industrial (AGRIANUAL, 2007).

1.1 Tomate para consumo *in natura* no Brasil

No Brasil, a cultura do tomateiro para mesa ou para consumo *in natura* tem sido uma importante fonte de emprego ao longo de toda sua cadeia produtiva (representando uma oferta de serviços para cerca de 300 mil pessoas) (ABCSEM, 2008). O cultivo do tomate para consumo *in natura* é, normalmente, conduzido em sistema estaqueado ou tutorado, gerando uma intensa demanda por mão-de-obra que se inicia na fase de pré-plantio, passando pelos diversos tratamentos culturais, colheita e acondicionamento de frutos em caixas, carregamento, transporte e abastecimento de armazéns de classificação e embalagem (Boiteux *et al.*, 2008). No âmbito da cadeia produtiva, a cultura movimenta diversos setores, incluindo as empresas produtoras de insumos, empresas de máquinas e equipamentos agrícolas, centrais de abastecimento, atacadistas, feiras-livres, redes de supermercados até atingir o mercado consumidor (Boiteux *et al.*, 2008).

Com um crescimento acima da média mundial, o Brasil é atualmente o 8º maior produtor de tomate do mundo (FAO, 2010). Segundo dados da FAO, enquanto na Europa e nos Estados Unidos o crescimento médio foi de 30% e 45%, respectivamente, a produção brasileira de tomate quase duplicou em 20 anos. A posição do país foi conquistada devido ao aumento de produtividade. O rendimento da cultura do tomateiro de mesa no Brasil apresentou significativo incremento desde o final da década de 1980, atribuído à introdução de híbridos e à adoção de novas tecnologias de produção. Dados recentes sobre a produtividade brasileira apontam valores em torno de 59 t/ha (cerca de 5 kg/planta ou 245 caixas/mil pés de tomate). Alguns produtores mais tecnificados têm alcançado rendimento superior a 100 t/ha (9 kg por planta ou mais de 400 caixas/ 1000 plantas) (ABCSEM, 2009). Produtores de tomate em estufa (média de 350 m²) têm alcançado rendimentos expressivos, acima de 500 caixas de 22 kg. O custo de produção do tomate é um dos maiores em toda a atividade agrícola e apresenta grande variabilidade, ficando entre R\$ 30 mil e R\$ 55 mil por cada hectare plantado, dependendo do pacote tecnológico utilizado (ABCSEM, 2009).

A produção de tomate para mesa distribui-se entre as regiões Sudeste (59,3%), Centro-Oeste (7,1%), Sul (18,2%), Nordeste (15,1%) e Norte (0,3%). Minas Gerais (20%), São Paulo (19,1%), Rio de Janeiro (9,7%), Bahia (9%), Paraná (8,2%), Goiás (6,3%) Santa Catarina (6%) e Rio Grande do Sul (4%) são os principais Estados produtores (Boiteux *et al.*, 2008; ABCSEM, 2009). O incremento de áreas de cultivo com lavouras de médio a grande porte, administradas por produtores com estrutura

empresarial e com forte adoção de tecnologia também resultou em um impacto positivo na produtividade da cultura (Boiteux *et al.*, 2008).

O Brasil apresenta uma grande diversidade de sistemas de cultivo de tomate para consumo *in natura* ocupando historicamente entre 38 a 42 mil hectares (Tavares, 2002; ABCSEM, 2009). O atual consumo *per capita* do tomate está em torno 18 kg/ano, o que representa um incremento de consumo acima de 35% nos últimos 10 anos. O consumo de tomate está concentrado nos grandes centros urbanos, onde a estrutura de atacado e de varejo oferta diferentes tipologias de tomate para os consumidores. Os tomates para consumo *in natura* podem ser divididos em diferentes grupos varietais, de acordo com o formato de seus frutos e sua finalidade de uso. Os segmentos varietais de maior importância no país são: (1) Salada Indeterminado e Determinado; (2) ‘Santa Cruz’; (3) Italiano/Saladete; e (4) ‘Cereja’ (ABCSEM, 2009). Os tomates do grupo ‘Santa Cruz’ (de formato oblongo) são tradicionais na culinária brasileira, sendo utilizados em saladas e molhos. Os tomates do grupo ‘Caqui’ (de formato redondo) são utilizados em saladas e lanches e os tomates do grupo ‘Saladete’ ou ‘Italiano’ (de formato tipicamente alongado) são utilizados principalmente para molhos, podendo ainda fazer parte de saladas. O grupo varietal ‘Cereja’ (de tamanho pequeno) é utilizado como aperitivo e em saladas.

Atualmente existe a preocupação com a qualidade, sabor e apresentação do produto, aspectos percebidos e valorizados pelo consumidor. O tomate também apresenta um enorme impacto alimentar sendo uma das mais importantes fontes de vitamina C, pró-vitamina A (beta-caroteno) e antioxidantes (principalmente o licopeno e outros carotenóides), compondo a dieta de diferentes classes sociais em todas as regiões do Brasil (Boiteux *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2009). Em torno de 84% da área cultivada atualmente emprega híbridos F1, tendo estas sementes maior valor de revenda (ABCSEM, 2009). O mercado de sementes de tomate para mesa é estimado em US\$ 12 milhões, representando em torno de 27% do total das sementes de hortaliças comercializadas no Brasil (Boiteux *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2009).

1.2 Tomate para processamento industrial no Brasil

A cadeia agro-industrial brasileira de tomate para processamento industrial é, atualmente, eficiente e competitiva (Melo & Vilela, 2005). A incorporação vigorosa de avanços tecnológicos fez a produtividade aumentar de 35 t/ha na década de 1990 para

uma média atual próxima a 80 t/ha. Em 2005, a produção brasileira de tomate para processamento alcançou 1,24 milhões de toneladas, em uma área de 16 mil hectares (produtividade 77,5 t/ha). A produção em 2006 foi de 1.160.000 toneladas em uma área de 14.900 hectares (produtividade 77,8 t/ha) (Melo *et al.*, 2008).

Desde o início da década de 1990, a distribuição geográfica das áreas de cultivo do tomateiro para processamento industrial sofreu profunda modificação. Em 1990, o pólo de produção de Pernambuco, Bahia e Paraíba ocupava 12500 hectares, enquanto São Paulo ocupava 8300 hectares e a região do “Cerrado” (Goiás e Minas Gerais) 6400 hectares. Atualmente a produção do tomateiro para processamento concentra-se nos Estados de Goiás (60,9%), São Paulo (20,6%) e Minas Gerais (18,5%). A participação do Nordeste reduziu drasticamente após sucessivos problemas gerenciais combinados problemas de manejo da cultura verificados a partir do final da década de 1980. Problemas causados inicialmente pela traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*), seguido de epidemias de *Tospovirus* e, mais recentemente, pela infestação pela mosca-branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) e a contaminação por espécies de *Begomovirus* levaram o setor a um colapso das empresas processadoras que fecharam suas fábricas e abandonaram a região (Melo *et al.*, 2008). A partir do ano 2000/2001 as áreas de cultivo para processamento no Nordeste não conseguiram ultrapassar a marca dos 2000 hectares. Atualmente, a área plantada com tomate industrial no Nordeste gira em torno de 400 ha. No Nordeste, uma parte significativa das áreas de processamento industrial migrou para produção visando consumo *in natura*. O cultivo predominante é do tipo não tutorado (segmento mesa rasteiro) que ocupa, na atualidade, cerca de 2000 ha.

A partir de 1997 o ‘Cerrado’ brasileiro consolidou sua liderança em termos de área plantada e produtividade, permanecendo em um patamar superior aos 10000 ha após 1999. Os dados de 2008 indicaram que o tomate para processamento tem 62% de sua área em Goiás, 20%, em São Paulo e 16%, em Minas Gerais (Melo *et al.*, 2008). As lavouras do ‘Cerrado’ brasileiro são, em sua quase totalidade, de grande porte e administradas por produtores com estrutura empresarial e com forte adoção de tecnologia e providos de assistência técnica fornecida pelas agroindústrias. O resultado disso é o aumento do número de lavouras atingindo níveis de produtividade acima de 120t/ha de tomate na região (Melo *et al.*, 2008).

2. VÍRUS E VIROSES DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA INFECTANDO TOMATEIRO NO BRASIL

Os vírus mais comuns na cultura do tomateiro no Brasil pertencem aos gêneros *Begomovirus*, *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Tospovirus* e *Tobamovirus* (Resende & Cupertino, 1996; Faria *et al.*, 2000).

2.1 *Tospovirus*

A doença vira-cabeça do tomateiro é causada por várias espécies de tospovírus, da família Bunyaviridae. Dentre elas, seis ocorrem no Brasil, mas somente quatro foram reportadas infectando o tomateiro: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV). As espécies TSWV, TCSV, GRSV e CSNV possuem um amplo círculo de hospedeiros, abrangendo mais de mil espécies botânicas, principalmente nas famílias Solanaceae e Compositae (Nagata *et al.*, 1995; Ávila *et al.*, 1998). No Brasil, as espécies de tripses, *Frankliniella occidentalis* e *F. shultzei* são importantes vetores dessas espécies de tospovírus (Mound, 1996). Uma particularidade da transmissão do vírus pelo tripses é que o vetor somente pode adquirir o vírus na fase de larva, tornando-se posteriormente apto a transmiti-lo por toda a sua vida. Outra particularidade na transmissão é que também o vírus se multiplica no vetor; portanto, a relação de transmissão é do tipo circulativa/propagativa. Os sintomas observados em plantas doentes são: arroxamento ou bronzeamento das folhas, ponteiro virado para baixo, redução geral do porte da planta e lesões necróticas nas hastes. Quando maduros, os frutos de tomate apresentam lesões anelares concêntricas. Existem atualmente no mercado muitas variedades de tomate para mesa e para processamento com resistência aos tospovírus, todas portadoras do gene/locus de resistência *Sw-5* (Matos *et al.*, 2003; Dianese *et al.*, 2010).

2.2 *Tobamovirus*

A virose do mosaico-do-fumo, causada pelo TMV (*Tobacco mosaic virus*) e a virose mosaico-do-tomateiro, causada pelo ToMV (*Tomato mosaic virus*), infectam diversas plantas cultivadas. No tomateiro, esses vírus causam frequentemente infecção

latente (sem sintomas), mas estirpes severas podem induzir mosaico suave alternado com embolhamento foliar. No campo, a transmissão desses vírus é exclusivamente mecânica, por meio do contato direto entre plantas e mãos dos lavradores. Outra forma de transmissão muito eficiente é por meio de sementes contaminadas (Jones *et al.*, 1991). Os sintomas do ToMV no tomateiro são: mosaico foliar; machas enbranquiçadas nos frutos, enrolamento, redução e afilamento de folíolos, além de apresentar aspecto bolhoso nas folhas e aspermia nos frutos (Jones *et al.*, 1991).

2.3 Potyvirus

Duas espécies de potyvirus foram descritas infectando o tomateiro no Brasil: estirpes do vírus Y da batata (*Potato virus Y – PVY*) e o mosaico amarelo causado pelo *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) descrito inicialmente em *Capsicum* (Inoue-Nagata *et al.*, 2002). A transmissão desses vírus se dá por meio de várias espécies de pulgões ou afídeos através de picadas de prova (transmissão não persistente); portanto, a transmissão do vírus ocorre em curtos períodos de tempo. O sintoma do PVY no tomateiro manifesta-se como mosaico e necrose generalizada das nervuras das folhas, ficando a planta com aparência de “Pinheirinho de Natal”. No tomateiro PepYMV induz mosaico e deformação foliar (Dianese *et al.*, 2008).

2.4 Luteovirus

As doenças conhecidas como “Topo-amarelo” e “Amarelo-baixeiro” são causadas por vírus de um mesmo grupo (*Luteovirus*), ao qual também pertence o vírus-do-enrolamento-da-folha da batata. A doença topo-amarelo caracteriza-se pela presença de folíolos pequenos, com bordas amareladas e enroladas para cima, assemelhando-se a pequenas colheres. As plantas com amarelo-baixeiro apresentam as folhas de baixo geralmente amareladas e cloróticas. A transmissão é exclusivamente por pulgão, que, uma vez tendo adquirido o vírus, pode transmiti-lo por toda a vida, de modo persistente (Maia *et al.*, 2000).

2.5 *Begomovirus* e as begomoviroses

No Brasil, sem dúvida, geminivírus são os patógenos que mais causam danos econômicos à cultura do tomate (Ribeiro *et al.*, 2003). No início da década de 1990, a introdução da mosca-branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) na região de Campinas (SP) resultou em mudanças bruscas no sistema de produção e no panorama varietal do tomateiro no Brasil (Melo, 1992; Lourenção & Nagai, 1994; França *et al.*, 1996). O hábito alimentar polífago de *B. tabaci* biótipo B favoreceu sua rápida disseminação em todas as áreas produtoras de tomate. O biótipo B é um eficiente vetor de geminiviroses ou begomoviroses (vírus do gênero *Begomovirus*) e primeiras epidemias foram verificadas já a partir de 1993 no Brasil central (Ribeiro *et al.*, 1994). Em geral, os sintomas manifestam-se como clorose das nervuras, a partir da base da folha, seguido de mosaico amarelo, rugosidade e até mesmo enrolamento das folhas. Quando a infecção é precoce, as perdas são totais e o controle é muito difícil, em razão da alta população de mosca branca presente no campo. A transmissão do vírus pela mosca branca é do tipo persistente ou circulativa, isto é, uma vez adquirido o vírus, a mosca passa a transmiti-lo por toda a sua vida. Perdas de produção de até 60% podem ocorrer em cultivares suscetíveis (Giordano *et al.*, 2005).

3. FAMÍLIA GEMINIVIRIDAE

3.1 Gêneros da Família *Geminiviridae*

Os *Geminivirus* são caracterizados, basicamente, pela morfologia da partícula do vírion, que é geminada, com aproximadamente 18-30 nm de tamanho e pela a natureza do seu material genético, consistindo em uma (monopartidos) ou duas (bipartidos) moléculas de DNA circular de fita simples (ssDNA). Cada componente genômico, com aproximadamente 2,5 a 3,0 kb em extensão, é encapsidado separadamente em partículas compostas por 22 capsômeros pentaméricos, com a aparência de dois icosaedros incompletos, o que confere o aspecto geminado às partículas virais (Gutierrez, 1999). Geminivírus não são transmitidos pela semente ou por contato manual. A dispersão natural destes vírus ocorre via insetos vetores (Dhar & Singh, 1995). A transmissão é do tipo persistente, circulativa envolvendo a passagem de partículas virais do intestino para a hemolinfa do inseto, da hemolinfa para as glândulas salivares e da saliva para outras

plantas. Os vetores de geminivírus são insetos sugadores classificados na ordem Homoptera, e incluem as moscas-brancas (Homoptera: Aleyrodidae) e cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae e Homoptera: Auchenorrhyncha) (Lazarowitz, 1992). Os begomovírus são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Faria & Zerbini, 2000). A organização genômica, o inseto vetor (mosca-branca, cigarrinha ou membracídeo) e o círculo de hospedeiros (mono ou dicotiledôneas) dos geminivírus permitem que eles sejam divididos em quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* (Fauquet et al., 2000).

3.1.1 Os vírus pertencentes ao gênero *Mastrevirus*

Maize streak virus (MSV) é a espécie-tipo deste gênero viral. Outros representantes são o *Wheat dwarf virus* (WDV) ou *Digitaria streak virus* (DSV). Estes vírus apresentam genoma monopartido, sendo transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) para a maioria das plantas monocotiledôneas. No entanto, algumas espécies também foram identificadas infectando hospedeiras dicotiledôneas, tais como *Tobacco yellow dwarf virus* (TYDV) e *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV) (Gutierrez et al., 2004). Estes vírus são economicamente mais importantes no “velho mundo” especialmente na África, Europa e Ásia (Rojas et al., 2005).

3.1.2 Os vírus pertencentes ao gênero *Curtovirus*

Beet curly top virus (BCTV) é a espécie-tipo deste gênero. Este grupo de vírus apresenta genoma circular monopartido, sendo transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae). A distribuição geográfica deste gênero é ampla, sendo encontrados tanto no “Novo Mundo” quanto no “Velho Mundo”. Este gênero é composto por cinco espécies caracterizadas: *Beet curly top virus* (BCTV), *Beet mild curly top virus* (BMCTV), *Beet severe curly top virus* (BSCTV), *Horseradish curly top virus* (HrCTV) e *Spinach curly top virus* (SpCTV) (Fauquet & Stanley, 2005). O sintoma típico deste grupo é o encrespamento apical (“curly top disease”), sendo, momentaneamente, registrados apenas infectando plantas dicotiledôneas (Fauquet & Stanley, 2005).

3.1.3 Os vírus pertencentes ao gênero *Topocuvirus*

Tomato pseudo-curly top virus (TPCTV), sendo um gênero monotípico. O genoma é circular, monopartido, sendo que o vírus é transmitido entre hospedeiras

dicotiledôneas por membracídeos (Homoptera: Auchenorrhyncha). Análises do genoma de TPCTV revelaram características típicas de dois gêneros distintos (*Mastrevirus* e *Begomovirus*), representando, desta forma, um recombinante natural (Briddon *et al.*, 1996).

3.1.4 Os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus*

Este é o gênero mais numeroso dentro da família Geminiviridae. Mais de 80% dos geminivírus conhecidos pertencem ao gênero *Begomovirus* (Stanley *et al.*, 2005). O gênero *Begomovirus* apresenta espécies tanto genoma monopartido quanto bipartido, são transmitidos por biótipos da mosca-branca *B. tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) e infetam uma ampla gama de dicotiledôneas tanto no “novo” quanto no “velho mundo” (Rojas *et al.*, 2005). A espécie tipo do gênero é o *Bean golden yellow mosaic virus*, BGYMV (Fauquet *et al.*, 2000). Outros membros frequentemente usados em estudos de replicação de DNA são *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Squash leaf curl virus* (SqLCV) and *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Eles apresentam o genoma mais complexo entre todos os geminivírus descritos (Gutierrez, 1999). Comparações nas sequências nucleotídicas desempenham um papel fundamental como ferramenta na determinação taxonômica das espécies. A estrutura genômica do DNA-A tem sido utilizada e considerada como a informação mais relevante para uma análise taxonômica, especialmente devido ao fato que algumas espécies virais possuem apenas este componente genômico. O DNA-B é mais variável e pode, ocasionalmente, ser intercambiado entre algumas espécies de *Begomovirus*, dificultando determinações taxonômicas utilizando exclusivamente informações deste componente genômico. O alto índice de recombinação entre espécies de begomovirus invalida a utilização de pequenos fragmentos de DNA-A para comparação, sendo recomendado para tal a informação obtida a partir do genoma completo deste segmento (Fauquet *et al.*, 2008).

3.2 Organização genômica das espécies de *Begomovirus*

O genoma de um *Begomovirus* típico é formado por duas moléculas de DNA circular de fita simples (DNA-A e DNA-B), cada uma com aproximadamente 2600 bases, encapsidadas por uma única proteína estrutural que se arranja na forma de 22 capsômeros, formando dois icosaedros incompletos com cerca de 18-30 nm

(Lazarowitz, 1992; Briddon & Markham, 2000). Os dois componentes não possuem homologia de sequência, exceto por uma região intergênica de aproximadamente 200 nucleotídeos denominada região comum (RC), que é altamente conservada entre os dois componentes de uma determinada espécie viral (acima de 90% de homologia) (Stanley & Gay, 1983; Lazarowitz, 1992). O componente DNA-A é responsável pela replicação e encapsidamento do genoma viral, enquanto o componente DNA-B contém os genes requeridos para o movimento célula-a-célula e a longa distância, gama de hospedeiros e desenvolvimento de sintomas (Timmermans *et al.*, 1994; Palmer & Rybicki, 1998). A transcrição é bidirecional tanto no componente DNA-A quanto no componente DNA-B e ambos os componentes são necessários para a infecção sistêmica em plantas (Timmermans *et al.*, 1994). O esquema da organização genômica de um *Begomovirus* bipartido está ilustrado na **Figura 1**.

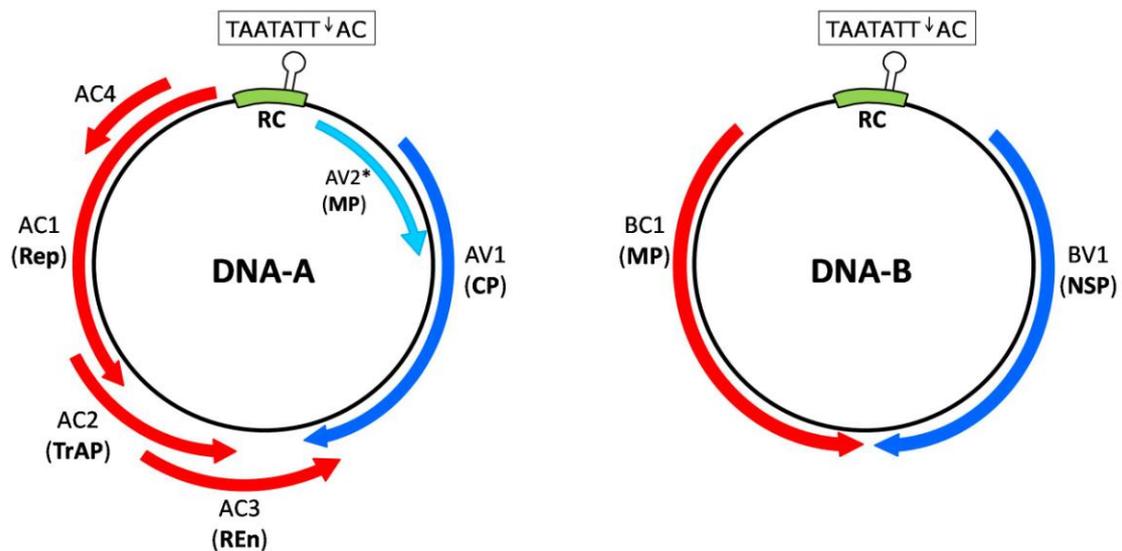


Figura 1 – Representação esquemática do genoma de um begomovírus de genoma bipartido. Os círculos representam o genoma viral, dividido em dois componentes, DNA-A e DNA-B. Cada seta representa a região genômica contendo o gene completo. A transcrição é bidirecional nos dois componentes. As setas azuis são as ORFs com transcrição no sentido viral (“virion sense”) e as setas vermelhas indicam as ORFs com transcrição no sentido complementar (“complementary-sense”). A sigla dentro dos parêntesis representa a sinonímia do gene e/ou do produto gênico correspondente. A região comum (RC) está representada pela caixa de cor verde. A sequência dentro da RC é conservada para todos os membros da família *Geminiviridae*. Dentro da RC localiza-se um “stem-loop motif” com sequência altamente conservada de nove nucleotídeos (5’-TAATATT↓AC-3’), contendo o sítio que é clivado pela proteína Rep (representado pelo símbolo ↓) para iniciar a replicação do DNA (= domínio funcional da origem de replicação). A seta em azul clara (sentido viral) representa AV2* que é uma ORF presente apenas em espécies de *Begomovirus* de genoma monopartido da Europa, Ásia e África (“Velho Mundo”).

3.2.1 Organização genômica do DNA-A: genes, produtos gênicos, estrutura e função.

O DNA-A de vírus bipartido é similar em termos de organização genômica com os begomovírus de genoma monopartido (Czosnek *et al.*, 2002). O DNA-A possui quatro “open reading frames” – “ORFs” (AC1, AC2, AC3 e AV1). A ORF AV1, no sentido viral, corresponde ao gene *cp* codificando a proteína capsidial (CP = “coat protein”). As ORFs AC1, AC2 e AC3, no sentido complementar, correspondem aos genes *rep*, *trap* e *ren*, as quais codificam respectivamente para a proteína associada à replicação (Rep = “replication-associated protein”), a proteína ativadora da transcrição (TrAP = “transactivating protein”) e a proteína amplificadora da replicação do genoma viral (Ren = “replication-enhancer protein”) (Palmer & Rybicki, 1998; Harrison & Robinson, 1999; Faria & Zerbini, 2000).

A capa protéica (CP) desempenha funções relacionadas com a proteção do genoma contra degradação, aquisição e transmissão do vírus pelos insetos vetores, infectividade e movimento sistêmico (Guevara-González *et al.*, 1999). A CP é necessária a alguns geminivírus para a infecção sistêmica de seus hospedeiros, e dispensável para a maioria dos outros (Qin *et al.*, 1998). Embora a CP não seja necessária para o movimento célula-a-célula ou a longa distância, é essencial para a transmissão do vírus pelo inseto vetor (Gardiner *et al.*, 1988; Azzam *et al.*, 1994). Entretanto, quando se propaga um geminivírus via inoculação mecânica, mutantes incapazes de sintetizar CP não são selecionados, mesmo que a propagação ocorra por várias gerações, sugerindo que a CP provavelmente possui alguma função adicional ainda não determinada (Faria *et al.*, 2000). A importância da capa protéica na transmissão dos vírus foi demonstrada em experimentos envolvendo a troca do gene *cp* do ACMV, um begomovírus transmitido por mosca-branca, pelo correspondente do BCTV, um curtovírus transmitido por cigarrinha; observou-se uma alteração na especificidade do vetor, onde o ACMV passou a ser transmitido por cigarrinha (Bridson *et al.*, 1990). No caso de begomovírus monopartido (TYLCV), a CP funcional é essencial para a infecção sistêmica do hospedeiro e para a transmissão pelo vetor (Noris *et al.*, 1998).

A proteína Rep é conservada em sequência, posição e função, sendo essencial para a replicação viral (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Faria & Zerbini, 2000; Fauquet *et al.*, 2008). A síntese de DNA propriamente dita deve ser realizada por enzimas do hospedeiro. A função da Rep é se ligar ao sítio de iniciação da replicação viral e cortar

uma das fitas de DNA, iniciando o processo (Laufs *et al.*, 1995). A proteína Rep é uma proteína multifuncional, que atua na regulação da replicação e transcrição do DNA viral (Eagle *et al.*, 1994; Sunter *et al.*, 1993). O sítio de ligação para Rep está localizado na região comum (RC), sendo requerido não só para o reconhecimento da origem de replicação, mas também para regulação negativa da transcrição do gene *rep* (Eagle *et al.*, 1994). Outra função da proteína Rep é induzir indiretamente a expressão de proteínas responsáveis pela síntese de DNA do hospedeiro em células totalmente diferenciadas, criando um ambiente que permite a replicação viral de forma eficiente (Nagar *et al.*, 1995).

A ORF AV2 (“precoat”), presente somente em begomovírus do “Velho Mundo”, está associada ao movimento sistêmico dos vírus. Plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas com DNA infeccioso do TYLCV contendo mutações no gene *av1* desenvolveram sintomas atenuados e apresentaram baixo acúmulo de DNA viral, tanto de fita simples quanto de fita dupla. Porém, protoplastos inoculados com essa mesma construção apresentaram acúmulo normal de DNA viral, sugerindo que AV2 está envolvida no movimento sistêmico do vírus (Padidam *et al.*, 1996).

A proteína TrAP é um fator de transcrição, que atua *in trans* no promotor de genes de sentido viral (*cp* e *ns*) (Sunter & Bisaro, 1991). Na presença de TrAP, a expressão do promotor da proteína capsidial é aumentada em cerca de 60 a 90 vezes. A TrAP também parece atuar como supressora de silenciamento gênico (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

A proteína REn é um fator de amplificação da replicação viral encontrado apenas nos begomovírus e curtovírus. Embora não seja essencial para que a replicação ocorra, o acúmulo de DNA viral é muito maior quando esta proteína está presente (Sunter *et al.*, 1990). A REn é direcionada para o núcleo e está envolvida na regulação da replicação interagindo com a Rep e provavelmente desempenha um papel no reconhecimento da origem de replicação. Settlage *et al.* (1996) sugerem que Ren estabiliza o complexo de replicação formado por Rep e fatores do hospedeiro, mas o seu mecanismo de atuação ainda não foi elucidado completamente.

A ORF AC4 se encontra inserida dentro do gene *rep*, mas é codificada em uma fase de leitura distinta. Ela está envolvida na determinação da gama de hospedeiras, na severidade de sintomas e no movimento viral (Jupin *et al.*, 1994; Rigden *et al.*, 1994). Além disso, a AC4 está relacionada à resposta da hospedeira à Rep viral (Fauquet *et al.*, 2005).

3.2.2 Organização genômica do DNA-B: genes, produtos gênicos, estrutura e função.

O DNA-B possui duas ORFs (BC1 e BV1). A BV1, no sentido viral, corresponde ao gene *ns*, que codifica para a proteína que controla o tráfego nuclear (NSP = “nuclear shuttle protein”). A BC1, no sentido complementar, corresponde ao gene *mp*, que codifica para a proteína que controla o movimento célula-a-célula (MP = “movement protein”) (Palmer & Rybicki, 1998). Para que o DNA dos begomovírus se movimente célula-a-célula há necessidade da interação entre as proteínas NSP e MP. A proteína NSP é necessária para o tráfego intracelular do DNA viral do núcleo para o citoplasma, enquanto a MP está envolvida no movimento do DNA viral célula-a-célula, via plasmodesmas. A proteína MP move-se extensivamente célula-a-célula, provavelmente aumentando o limite de exclusão dos plasmodesmas e assim potencializando o movimento de DNA célula-a-célula (Noueiry *et al.*, 1994; Pascal *et al.*, 1994).

3.2.3 Região Comum (RC)

Entre as unidades de transcrição AC1 e AV1 reside uma região intergênica de cerca de 300 nucleotídeos, que contem elementos cruciais para a replicação e transcrição do genoma viral, tendo uma organização genômica do tipo interativa (Arguello-Astorga *et al.*, 1994). Na RC estão localizadas a origem de replicação e os promotores da síntese dos mRNAs virais (Lazarowitz, 1992; Fontes *et al.*, 1994; Pilartz & Jeske, 2003). Dentro da região comum localiza-se uma sequência de nove nucleotídeos (5'-TAATATT↓AC-3') altamente conservada entre todos geminivírus, contendo o sítio de iniciação da replicação (↓), onde se localiza o domínio funcional da origem de replicação (Stanley *et al.*, 1995; Orozco & Hanley-Bowdoin *et al.*, 1996). Este nonanucleotídeo, localizado num contexto de 30 nucleotídeos capazes de formar uma estrutura em forma de grampo (“stem-loop”), é clivado durante o início da replicação viral, a qual ocorre pelo mecanismo de círculo rolante. Embora a sequência de 30 nucleotídeos apresente variações entre diferentes espécies de geminivírus, a estrutura em forma de grampo está sempre presente, sendo esta estrutura considerada como um elemento estruturalmente conservado (“structurally-conserved element”, SCE) (Faria & Zerbini, 2000). A partir dessa região intergênica divergem os genes virais, no sentido viral e complementar (Howart *et al.*, 1985). A transcrição é bidirecional tanto no componente A, quanto no componente B (Faria *et al.*, 2000).

3.2.4 Organização genômica de espécies de *Begomovirus* com genoma monopartido

Os isolados de genoma monopartido (que apresentam apenas um componente) não possuem DNA-B e suas ORFs são denominadas, respectivamente, V1, V2, C1, C2, C3 e C4. Apesar de não apresentarem DNA-B, estes vírus não apresentam comprometimento do movimento dentro do hospedeiro e na infectividade. Nestes casos, os produtos das ORFs V1 e C4 são responsáveis pelo movimento e desenvolvimento de sintomas (Faria & Zerbini, 2000). Um sumário sobre as funções de genes e proteínas de espécies de *Begomovirus* é apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Sumária sobre localização genômica e função dos genes e proteínas de espécies de *Begomovirus* com genoma bipartido (modificada de Rojas, 2004).

ORF/Genoma	Proteína/Gene	Função
DNA-A		
AV1 (Sentido viral)	CP (<i>cp</i>)	Transmissão mediada por mosca-branca e montagem da partícula (vírion). Movimento da partícula viral via interações com rede de transporte celular do hospedeiro. Codifica uma proteína de 30 kDa.
AC1 (Sentido complementar)	Rep (<i>rep</i>)	Iniciador da replicação do DNA viral durante o estágio de amplificação via círculo rolante ('rolling-circle'). A Rep é responsável pela reação de iniciação que envolve uma clivagem (↓) dentro do nonanucleotídeo conservado (5'-TAATATT↓AC-3'). Maior proteína viral (41 kDa).
AC2 (Sentido complementar)	TrAP (<i>trap</i>)	Codifica uma proteína de 15.7 kDa com localização nuclear que contribui para a patogenicidade viral. Ativador transcricional para genes com sentido viral; supressor de silenciamento gênico pos-transcricional (mediado por RNA) bem como outras respostas de defesa do hospedeiro.
AC3 (Sentido complementar)	REn (<i>ren</i>)	Intensifica a replicação viral ("replication enhancer protein").
AC4 (Sentido complementar)	—	Controla reação do tipo hipersensível iniciada pela Rep. Pode afetar círculo de hospedeiras e severidade de sintomas. Proteína de 11 kDa. Em begomovírus monopartidos: envolvida junto com AV2 no movimento célula-a-célula.
DNA-B		
BV1 (Sentido viral)	NSP (<i>ns</i>)	Transporte do DNA viral entre o núcleo e o citoplasma; define círculo de hospedeiras do vírus.
BC1 (Sentido complementar)	MP (<i>mp</i>)	Modula o movimento célula-célula do vírus; está associado com as características de patogenicidade do vírus. Altera a eficiência da aquisição do vírus pelo vetor.

3.3 Demarcação de espécies, estirpes (“strains”) e variantes de sequência de *Begomovirus*

Foi recentemente publicada uma detalhada revisão do status de demarcação de espécies, estirpes e variantes de geminivirus bem como a descrição de 672 isolados de begomovirus (Fauquet *et al.*, 2008). Este conjunto de novos critérios propõe que quando a identidade entre duas sequências correspondendo ao genoma completo do componente DNA-A for menor que 88% o isolado em questão pertence a uma nova espécie viral. Se o alinhamento apresentar níveis de identidade entre 88 ou 89%, o isolado pertence tentativamente à espécie mais relacionada. Por sua vez, quando a identidade nucleotídica entre as sequências for maior que 89%, o isolado em questão pertence definitivamente à espécie usada para comparação. Com relação à classificação ao nível intra-espécífico, as proposições são as seguintes: identidade de sequência abaixo de 93% caracteriza nova estirpe (‘strain’) dentro da espécie, enquanto níveis de identidade acima de 94% caracterizam uma variante de sequência daquela estirpe. Como consequência desta nova demarcação, alguns isolados foram classificados como estirpes, enquanto outros, previamente classificados como estirpes, foram elevados ao nível de espécie (Fauquet *et al.*, 2008).

3.4 Transmissão natural dos geminivírus

A mosca-branca (*Bemisia tabaci*) é uma espécie cosmopolita, sendo provável centro de origem o Paquistão. É provável que tenha sido introduzido pela ação humana na Europa, África e Américas, através de material vegetal infestado (Brown & Bird, 1992; Melo, 1992). A mosca-branca é encontrada geralmente nos trópicos e subtropicais e em todos os continentes (França *et al.*, 2000). Sua distribuição está estreitamente relacionada à expansão da monocultura da maioria das espécies cultivadas, às condições dos sistemas agrícolas modernos, ao aumento da utilização de agrotóxicos e principalmente, à grande facilidade em se adaptar aos diversos hospedeiros (Brown, 1994).

No Brasil, o biótipo A de *B. tabaci* era predominante até 1990/1991, quando foi relatada a introdução do biótipo B, provavelmente via plantas ornamentais importadas dos EUA (Lourenção & Nagai, 1994; França *et al.*, 1996). As fêmeas do biótipo B de *B. tabaci* possuem taxas maiores de ovoposição, alta capacidade reprodutiva, baixa

mortalidade em novos hospedeiros e uma gama de hospedeiros muito mais ampla em comparação com o biótipo A, incluindo o tomateiro e outras solanáceas. Essas características indicam uma grande capacidade de adaptação e elevada taxa de dispersão deste biótipo, que geralmente desloca populações do biótipo A tornando-se predominante nas áreas onde é introduzido (Bedford *et al.*, 1994).

A transmissão de begomovírus por mosca-branca é do tipo circulativa (Brown, 1997; Rubinstein & Czosnek, 1997; Ghanin *et al.*, 1998; Morin *et al.*, 1999), onde as partículas virais presentes na seiva do floema de plantas infectadas são ingeridas através do estile e transportadas pelo esôfago. As partículas virais são transportadas através da parede do intestino para a hemocele, alcançando as glândulas salivares. O vírus é então translocado pelo ducto da glândula salivar e, finalmente, excretados juntamente com a saliva durante a alimentação (Ghanin *et al.*, 2001).

Parâmetros de aquisição, retenção e transmissão de um isolado de *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) pela mosca-branca foram investigados em Bangalore, Índia. Moscas-brancas solitárias foram capazes de adquirir ToLCV-Ban4 de plantas de tomate infectadas e transmitir o vírus para plantas teste de tomate, mas cinco insetos foram necessários para atingir 100% de transmissão. Os períodos de acesso de aquisição (PAA) e inoculação (PAI) mínimos foram de 10 e 20 minutos, respectivamente. Um período latente de 6 horas foi requerido para *B. tabaci* infectar plantas teste de tomate eficientemente. Após 24 horas do PAA, os insetos reteram sua habilidade de infectar plantas teste de tomate por 12 dias, mas não por toda sua vida (Muniyappa *et al.*, 2000). Estudos da interação de um begomovírus isolado de tomateiro no estado de Goiás com *B. tabaci* biótipo B revelaram que houve a passagem transtadial em 100% dos adultos testados que transmitiram o vírus em 33% dos casos. Evidenciou-se ainda, a transmissão à progênie pela detecção do vírus em ovos, ninfas e adultos provenientes de fêmeas virulíferas, contudo, a transmissão do vírus pelos adultos não foi observada. Estes resultados sugerem que a interação vírus-vetor é estabelecida desde a fase inicial do desenvolvimento do inseto (Santos *et al.*, 2003). O surgimento de novas espécies de begomovírus infectando o tomateiro deve-se à distribuição do biótipo B de *B. tabaci* por áreas cada vez maiores ao longo das Américas (Polston & Anderson, 1997).

3.5 Replicação dos geminivírus na planta hospedeira

A replicação de todos os membros da família Geminiviridae ocorre no núcleo da célula hospedeira infectada via o mecanismo de círculo rolante (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Em linhas gerais, o DNA de fita simples (ssDNA) é convertido em DNA de fita dupla concataméricos (dsDNA intermediário, conhecido como forma replicativa – RF). Os dsDNA intermediários são posteriormente convertidos em fragmentos de DNA de tamanho equivalente ao genoma viral. Os dsDNA intermediários são transcritos no núcleo da células infectadas. Esta estratégia semelhante à utilizada pelos bacteriófagos ϕ X174 e M13 (Saunders *et al.*, 1991; Stanley, 1995).

O ciclo replicativo dos geminivírus pode ser subdividido em diversos estádios funcionalmente distintos, caracterizados por eventos específicos. Ao se alimentar, o inseto vetor deposita as partículas virais (dsDNA), provavelmente sem a CP, nas células floemáticas do hospedeiro (Lazarowitz, 1992). A presença das partículas virais ativa o sistema enzimático do hospedeiro, que libera as proteases, as quais degradam a capa protéica, expondo o genoma viral. O genoma viral é transportado até o núcleo das células do hospedeiro com o auxílio da proteína de tráfego nuclear (NS). Uma vez dentro do núcleo, a amplificação do genoma viral, que envolve um processo eficiente de replicação do DNA, ocorre em três estádios distintos (Saunders *et al.*, 1991; Stanley, 1995).

O primeiro estádio do ciclo infectivo envolve a conversão do ssDNA genômico circular em um intermediário de dsDNA “supercoiled” circular covalentemente fechado, denominado forma replicativa I (RFI) (Gutierrez, 1999). Durante esse estádio, o ssDNA é convertido em um produto de dsDNA que se associa a histonas celulares formando mini cromossomos virais (Pilartz & Jeske, 1992). Esta parte do ciclo replicativo é completada com participação exclusiva das proteínas das células infectadas desde que o dsDNA é o molde transcricionalmente ativo (Gutierrez, 2000).

O segundo estádio consiste da utilização do dsDNA como molde para a amplificação do ssDNA pelo mecanismo do círculo rolante, no qual a proteína viral Rep é absolutamente necessária (Gutierrez, 1999; 2000). A Rep é a proteína responsável pela reação de iniciação que envolve a introdução de um corte (\downarrow) dentro do nonanucleotídeo conservado (5'-TAATATT \downarrow AC-3') em todos os geminivírus, localizado no “loop” da estrutura em forma de grampo presente na região intergênica. Após o estádio inicial, os

fatores necessários para completar a fase de círculo rolante são de origem celular (Gutierrez, 2000). O último estágio é a produção e a encapsidação do ssDNA genômico circular maduro em partículas virais (Gutierrez, 1999).

O geminivírus mais estudado quanto à replicação é o TGMV. Este vírus codifica a Rep e a REn, duas proteínas que atuam na replicação. A região comum do TGMV inclui repetições em ordem direta de sequências específicas de cinco nucleotídeos, onde se liga a Rep. Após a ligação da Rep ao DNA viral e estabilização do complexo formado por Rep, REn e fatores do hospedeiro, a proteína Rep executa a clivagem do nonanucleotídeo localizado na SCE (Faria & Zerbini, 2000). Estudos utilizando plantas transgênicas expressando Rep de TGMV confirmaram que o efeito de acumulação de um fator de processividade na replicação do DNA vegetal é mediado por Rep. Isto implica que Rep induz a replicação do DNA em células que normalmente não poderiam realizar síntese de DNA (Palmer & Rybicki, 1998).

3.6 Mecanismos de geração de diversidade genética em *Begomovirus*

Os geminivírus são considerados um grupo emergente de vírus de plantas, devido à alta incidência e severidade das doenças causadas por eles nas últimas três décadas, em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Polston & Anderson, 1997; Morales & Anderson, 2001; Briddon *et al.*, 2003). Em parte, esse aumento de epidemias nas lavouras deve-se a grande variabilidade genética encontrada entre espécies e estirpes de geminivírus, resultado da alta taxa de recombinação entre esses vírus (Faria & Zerbini, 2000). A notável geração de diversidade genética em populações virais fornece novas oportunidades para a adaptação a novas hospedeiras e mudanças das condições ambientais. Essa diversidade genética é gerada através de diferentes mecanismos: mutações, recombinações e pseudo-recombinações (Monci *et al.*, 2002). A variabilidade genética em begomovírus ocorre por meio de mecanismos de ação que possibilitam o surgimento de novas estirpes e até mesmo, de novas espécies (Padidam *et al.*, 1999).

3.6.1 Mutações

Mutações são diferentes tipos de modificações que ocorrem nos genes resultando em modificações hereditárias com perda e/ou ganho ou mesmo com inalteração (mutação silenciosa) de uma característica fenotípica. Em *Begomovirus*, isso

acontece muito provavelmente por causa da não correção de erros de leitura durante a replicação (“proof-reading”). Este reparo de erros durante a replicação é realizada pela DNA polimerase (Roossinck, 1997).

3.6.2 Recombinação

A recombinação é considerada o principal mecanismo gerador de variabilidade genética nos geminivírus e, conseqüentemente, maior a capacidade de evolução e adaptação a novos hospedeiros (Zhou *et al.*, 1997; Padidam *et al.*, 1999). Na recombinação segmentos de uma fita nucleotídica se incorporam a fita de outro componente durante a replicação. Ela pode ocorrer não somente entre variantes de um mesmo vírus, mas também entre vírus da mesma espécie e de mesmo gênero, resultando no rápido surgimento de variantes virais (Seal *et al.*, 2006). As infecções mistas, comuns em geminivirose, os altos níveis de replicação atingidos com a forma replicativa de dsDNA e o aumento da gama de hospedeiros com a emergência do biótipo B da mosca-branca são alguns dos fatores que podem contribuir significativamente para a recombinação. Por recombinação, os vírus podem adquirir novas informações genéticas de outros vírus ou até mesmo das plantas hospedeiras, facilitando sua rápida evolução (Padidam *et al.*, 1999). A função primária da recombinação pode ser a de repassar ssDNA defectivos que são originados através de mutações, resultando em recombinantes que podem vir a ser prevalentes em populações onde a recombinação resultou em vantagem adaptativa (Seal *et al.*, 2006).

3.6.3 Pseudo-recombinação

A existência de dois componentes genômicos na maioria dos begomovírus possibilita um mecanismo alternativo para obtenção de variabilidade genética, a troca de componentes entre vírus distintos (pseudo-recombinação) (Stanley *et al.*, 1985). Embora diferentes espécies de begomovírus possuam organização genômica similar, a produção de pseudo-recombinantes viáveis exige uma interação altamente específica da proteína Rep com a região em torno da origem de replicação. O DNA-A e DNA-B de um mesmo vírus apresentam reduzidos níveis de identidade de sequência, sendo a única exceção a região comum [‘common region’ (CR)] que apresenta níveis de identidade superiores a 90% ao longo dos seus 200 pares de base. A CR possui a origem de replicação (ori) e diversos outros motivos necessários para a replicação do DNA viral. Pelos menos dois fatores são primordiais para garantir a viabilidade de pseudo-

recombinantes: (1) conservação da sequência dos iterons (Arguello-Astorga *et al.*, 1994) e (2) a conservação estrutural da proteína Rep nos aminoácidos envolvidos no pareamento com o iterons (Arguello-Astorga & Ruiz-Medrano, 2001). Os iterons são duas sequências repetidas em tandem localizadas próximas da ori. Estes elementos são fundamentais, pois representam sítios de ligação virus-específicos para a Rep correspondente (cognata) iniciar o processo de replicação viral. Por esta razão, a especificidade da interação Rep-iteron é o principal fator determinante na formação de pseudorecombinantes viáveis. Da mesma forma, os produtos dos genes codificados pelo componente DNA-B (MP e NS) devem ser capazes de mediar o movimento do DNA-A heterólogo, e esta habilidade parece ser dependente da origem geográfica dos vírus (Novo ou Velho Mundo) (Frischmuth *et al.*, 2000). A viabilidade do pseudo-recombinante indica que fatores envolvidos na replicação e movimentação são intercambiáveis e a eficiência na formação de pseudo-recombinantes viáveis indica também proximidades filogenéticas. Neste caso, tanto as sequências da RC quanto do gene *rep* devem ser altamente conservadas (Schaffer *et al.*, 1995). As diferenças observadas de viabilidade e eficiência de replicação entre pseudo-recombinantes recíprocos indicam que a pseudo-recombinação entre begomovírus é um fenômeno complexo que envolve interações entre fatores do vírus e do hospedeiro.

Cassava mosaic disease (CMD) é a doença mais importante da mandioca na África. Análises de plantas de mandioca naturalmente infectadas, coletadas de plantações em diferentes áreas geográficas do país, revelaram vários arranjos de DNA-A e DNA-B dos vírus de Uganda [*African cassava mosaic virus* (ACMV) e *East African cassava mosaic virus* (EACMV)]. Estes dados sugerem a ocorrência natural de pseudo-recombinações inter- e intra-específicas e um padrão de CMD mais complexo do que o relatado anteriormente. O DNA-A de EACMV-UG2, que contém um fragmento recombinante entre ACMV e EACMV-UG1 no gene da capa protéica, foi amplamente distribuído no país e está sempre associado com o DNA-B de uma nova estirpe viral isolada em Uganda, a EACMV-UG3, que provavelmente resultou de outro evento de recombinação natural. Este pseudo-recombinante é considerado o agente causal de CMD em Uganda (Pita *et al.*, 2001).

Tomato yellow spot virus (ToYSV) é filogeneticamente próximo aos vírus de *Sida* sp. (SiMoV, SimMV e SiYMV). Estudos para determinar a viabilidade de pseudo-recombinantes formados entre componentes de DNA de ToYSV e outros begomovírus que infectam tomate e plantas daninhas no Brasil revelaram que ToYSV foi capaz de

formar pseudo-recombinantes viáveis com vírus de tomate, mas não com os vírus de *Sida* sp., apesar de ser filogeneticamente mais próximos a estes. Um pseudo-recombinante infeccioso formado entre o DNA-A de ToYSV e o DNA-B de tomate crinkle leaf yellows virus (TCrLYV) induziu sintomas severos em *Nicotiana benthamiana*. Isto foi atribuído, em parte, ao fato de que a origem de replicação de ambos os componentes possuíam sequências idênticas (íterons) de ligação com a Rep. Entretanto, este não foi o caso de outro pseudo-recombinante infeccioso formado entre o DNA-A de tomate golden mosaic virus (TGMV) e o DNA-B de ToYSV, que possuíam diferentes sequências de ligação com a Rep. Estes resultados reforçaram a noção de que a formação de um pseudo-recombinante não pode ser explicada apenas com base na relação filogenética e nas sequências conservadas de íterons e sugere que a proteína Rep de TGMV pode ser mais versátil em termos de reconhecimento de componentes de DNA heterólogos do que as de ToYSV (Andrade *et al.*, 2006).

No sul da Espanha, *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) e *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) são duas espécies distintas de begomovírus que coexistem no campo e contribuem para a epidemia do “tomato yellow leaf curl disease” (TYLCD). Um recombinante natural entre TYLCSV e TYLCV foi detectado e a análise de seu genoma demonstrou que os sítios de recombinação estão localizados na região intergênica. Esse recombinante exibiu um novo fenótipo patogênico que pode proporcioná-lo uma vantagem seletiva sobre os genótipos parentais, uma vez que esse recombinante prevalece na região onde foi detectado (Monci *et al.*, 2002).

3.6.4 DNA Satélites

Plantas de algodão afetadas pela “Cotton leaf curl disease” foram encontradas contendo o componente de DNA-A, mas desprovidas do componente de DNA-B (Liu *et al.*, 1998; Mansoor *et al.*, 1999). Entretanto, algumas plantas teste experimentalmente infectadas e outras plantas de algodão naturalmente infectadas apresentavam, junto com o DNA-A, moléculas de DNA circular de fita simples, com cerca de 1,4 kb e derivadas do DNA-A após diferentes combinações de deleção, inversão, duplicação e rearranjo de sequências (Liu *et al.*, 1998; Sanz *et al.*, 2000). Essas moléculas defectivas se assemelham a um componente genômico de nanovírus que codificam uma proteína associada à replicação (Rep). Porém, essas moléculas foram encapsidadas na capa protéica dos begomovírus e foram transmitidas, juntamente com o DNA-A, via enxertia e via *B. tabaci* (Mansoor *et al.*, 1999).

4. GÊNERO *BEGOMOVIRUS* NO BRASIL

4.1 Importância econômica

Os geminivírus transmitidos por mosca branca (*B. tabaci*) têm causado sérios prejuízos em culturas como tomate, feijão, cucurbitáceas, pimentão, algodão e mandioca em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, constituindo-se em fator limitante à produção. Na década de 1960 foram observados sintomas de begomovirose em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil (Costa, 1965). Foi demonstrado que o *Bean golden mosaic virus* (BGMV-Br) era transmitido pela mosca-branca *B. tabaci*. Inicialmente essa doença causou pequenas perdas nas lavouras de feijão. Com o crescimento da área plantada com soja no país observou-se aumento populacional do inseto vetor de geminivírus. Como consequência, nos anos 1970 essa doença tornou-se fator limitante para a produção de feijão no Brasil (Faria, 1994).

Em tomateiro, perdas significativas vêm sendo registradas desde os anos 1980 em países do continente americano, onde cerca de 20 diferentes geminivírus já foram relatados (Polston & Anderson, 1997). No Brasil, o primeiro relato de geminivírus em tomateiro foi feito em 1960 (Flores *et al.*, 1960), sendo identificado mais tarde como *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). Os begomovírus que infectam tomateiro no Brasil encontram-se distribuídos nas principais regiões produtoras do Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste do Brasil desde a década de 1990, quando causaram sérios prejuízos, com subsequente comprometimento da indústria de processamento de tomate (Faria *et al.*, 2000). A incidência de doenças causadas por begomovírus em tomate cresceu dramaticamente nos últimos anos. Os primeiros relatos de infecções por begomovírus em tomateiro no país datam da década de 1960 (Flores *et al.*, 1960; Costa *et al.*, 1975; Matyis *et al.*, 1975). Entretanto, no final da década de 1980 e início de 1990, um complexo extremamente diverso de begomovírus emergiu no Brasil, coincidindo com a introdução e dispersão de um novo biótipo do vetor mosca-branca, *Bemisia tabaci* biótipo B (Ambrozevicius *et al.*, 2002), que de maneira circulativa transmite o vírus para plantas dicotiledôneas (Jones, 2003). Atualmente, este complexo apresenta cinco espécies conhecidas [*Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV)] (Fauquet *et al.*, 2008) e ainda envolve, pelo menos, outras doze espécies tentativas e um número de formas

recombinantes circulantes desses vírus, que ainda não foram completamente caracterizadas (Ribeiro *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008) (**Tabela 2**). Este complexo viral tem sido devastador em tomate e a situação tem progressivamente deteriorado ao ponto onde já é considerado o maior fator limitante na produção dessa cultura no Brasil (Fernandes *et al.*, 2008).

Tabela 2. Lista de espécies e isolados de *Begomovirus* caracterizados a nível molecular infectando tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) no Brasil. Os nomes das espécies estão escritos em negrito e itálico; os nomes dos isolados e os sinônimos estão logo abaixo dos nomes das espécies. Os números de acesso das sequências e as abreviações assinaladas também estão listados (Fauquet *et al.*, 2008).

VÍRUS (Espécies validadas)	Acesso no GenBank	Acrônimo
<i>Sida micrantha mosaic virus</i>		
Sida micrantha mosaic virus-[Brazil:A2B2]	AJ557451	SimMV
Sida micrantha mosaic virus-[Brazil:B1]		
<i>Sida mottle virus</i>		
Sida mottle virus-Micrantha [Brazil:A1B3]	AJ557450	SiMoV
Sida mottle virus-Rhombifolia [Brazil:Vicosa1:1999]	AY090555	
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>		
Tomato chlorotic mottle virus-Bahia [Brazil:Seabra1:1996]	AF490004	ToCMoV
Tomato chlorotic mottle virus-Minas Gerais [Brazil:Betim1:1996]	AY090557	
Tomato chlorotic mottle virus-Minas Gerais [Brazil:Igarape1:1996]	DQ336353	
<i>Tomato golden mosaic virus</i>		
Tomato golden mosaic virus-[Brazil:Common;1984]	K02029	TGMV
Tomato golden mosaic virus-[Brazil:Yellow Vein]		
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>		
Tomato rugose mosaic virus-[Brazil:Uberlandia 1:1996]	AF291705	ToRMV
<i>Tomato severe rugose virus</i>		
Tomato severe rugose virus-[Brazil:Petrolina de Goias 1:Pepper:2003]	DQ207749	ToSRV
<i>Tomato yellow spot virus</i>		
Tomato yellow spot virus-[Brazil:Bicas 2:1999]	DQ336350	ToYSV
VÍRUS (Espécies tentativas)	Acesso no GenBank	Acrônimo
Tomato chlorotic vein virus-[Brazil:Brasilia 1:1994]	AY049205	ToCIVV
Tomato crinkle yellow leaf virus-[Brazil:Vicosa 3:1999]	AY090556	ToCYLV
Tomato crinkle virus-[Brazil:Pesqueira 3:1998]	AY049218	ToCrV
Tomato golden vein virus-[Brazil:Anapolis 1:2003]	AY751742	ToGVV
Tomato infectious yellows virus-[Brazil:Bicas 1:1999]	AY049208	ToIYV
Tomato mottle leaf curl virus-[Brazil:Mossoro 1:1999]	AY049227	ToMoLCV
Tomato severe mosaic virus-[Brazil:Igarape 2:1999]	AY049207	ToSMV

<i>Tomato yellow mosaic virus</i>		
Tomato yellow mosaic virus-[Brazil:1]	-	ToYMV
Tomato yellow mosaic virus-[Brazil:2]		
<i>Tomato yellow vein streak virus- [Brazil:Campinas2:1995]</i>		
	U79998, U80042	ToYVSV
<i>Tomato yellow vein streak virus (Tomato yellow vein streak virus-Brazil)</i>		
	U79998, U80042	ToYVSV
<i>Tomato common mosaic virus</i>		
	EU710754	ToCmMV
<i>Tomato leaf distortion virus</i>		
	EU710749	ToLDV

4.2 Diversidade de *Begomovirus* em tomateiro no Brasil

Os trabalhos pioneiros envolvendo a caracterização de geminivírus de tomateiro, outras plantas cultivadas e plantas daninhas transmitidos por mosca-branca no Brasil foi feita pela equipe do Dr. Álvaro Santos Costa no Instituto Agronômico de Campinas (IAC) (Costa, 1976; Souza-Dias & Kitajima, 1998). O primeiro registro formal de doenças do tomateiro causadas por espécies do gênero *Begomovirus* no Brasil foi o relato da ocorrência de plantas apresentando sintomas do tipo “mosaico dourado” e “clorose infecciosa”, transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo na década de 1960 (Flores *et al.*, 1960). Posteriormente, o vírus relatado foi purificado e *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) foi a espécie de *Begomovirus* caracterizada como sendo o agente causal destas doenças (Matyis *et al.*, 1975) e que também era transmitido mecanicamente (Costa *et al.*, 1975).

4.2.1 Pesquisa sobre a diversidade de espécies de *Begomovirus* no Brasil após 1990

No Brasil, mais de uma década passou sem que fosse relatada a presença de geminivírus em tomate. Em 1994, detectou-se geminivírus em tomateiro nos campos experimentais do CNPH e em dois Núcleos Rurais no Distrito Federal (Ribeiro *et al.*, 1994). Durante o período foi observada pela primeira vez o relato de *B. tabaci* biótipo B (também chamada *B. argentifolii*) associada a tomateiros no Brasil (Ribeiro *et al.*, 1994). Um dos focos iniciais de pesquisa nesta fase foi caracterizar a diversidade de espécies de geminivírus do tomateiro no Brasil objetivando encontrar, posteriormente,

fontes de resistência estáveis, duráveis e de amplo espectro. Esse trabalho pioneiro foi desenvolvido por consórcio de pesquisa estabelecida entre Embrapa Hortaliças, Universidade de Brasília (UnB) e mais tarde envolveu também a Universidade Federal de Viçosa (UFV).

A rápida dispersão do biótipo B de mosca-branca e sua ampla gama de hospedeiros pode ter contribuído para a transferência natural das novas espécies de begomovírus de plantas daninhas e de espécies nativas de solanáceas para o tomate cultivado, deste modo, resultando no crescimento significativo do número de novas espécies de begomovírus infectando tomate (Fernandes *et al.*, 2008). Todas as espécies brasileiras descritas até o presente momento possuem genoma bipartido (dois componentes de DNA), diferentes das espécies predominantes no continente europeu. Esses levantamentos indicaram a presença de cerca de dez espécies de *Begomovirus* e dezenas de recombinantes distribuídos nas diferentes regiões produtoras de tomate (Ribeiro *et al.*, 2003; Inoue-Nagata *et al.*, 2006).

Tecnologias de detecção de geminivírus em plantas infectadas e nas moscas foram desenvolvidas utilizando a técnica de hibridização e/ou PCR (“polymerase chain reaction”) utilizando primers universais (**Figuras 2 e 3**).

Figura 2 – Diagrama do DNA-A linearizado de espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido. A régua indica a ordem numérica dos nucleotídeos compreendidos entre a origem de replicação e o final do genoma viral. As ORFs AV1 (CP), AC1, AC2, AC3 e AC4 estão representadas por barras vermelhas. As barras em azul representam as regiões amplificadas por três pares de ‘primers’ universais: PALv1978/PARc496 – PALPAR (Rojas *et al.* 1993); região ‘Core CP’ englobando um segmento do gene codificador da capa protéica que é amplificada pelo par de ‘primers’ AV494/AC1048 (Brown *et al.*, 2001) e o segmento genômico analisado (SGA) no presente trabalho correspondendo a região amplificada pelos ‘primers’ BegoAFor1/BegoARev1 (Ha *et al.*, 2006). O bloco RIG representa a região intergênica que contém a região comum.

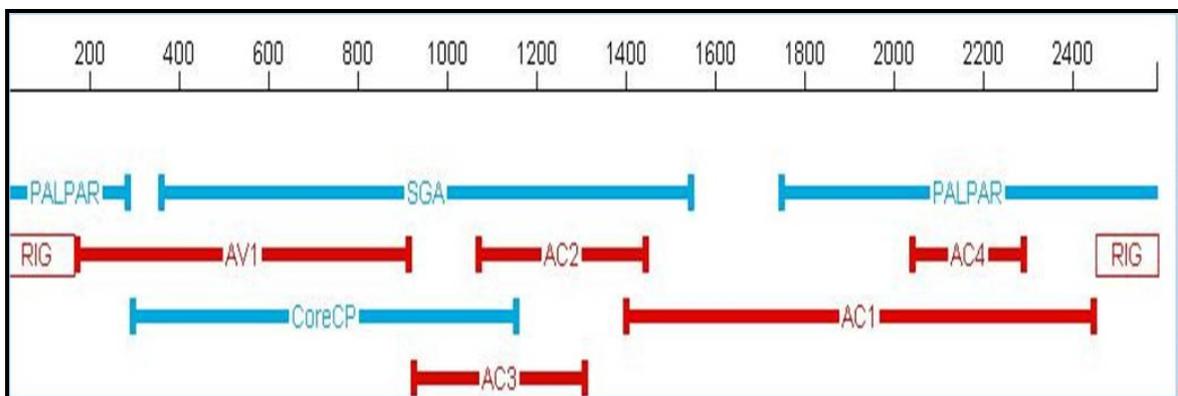
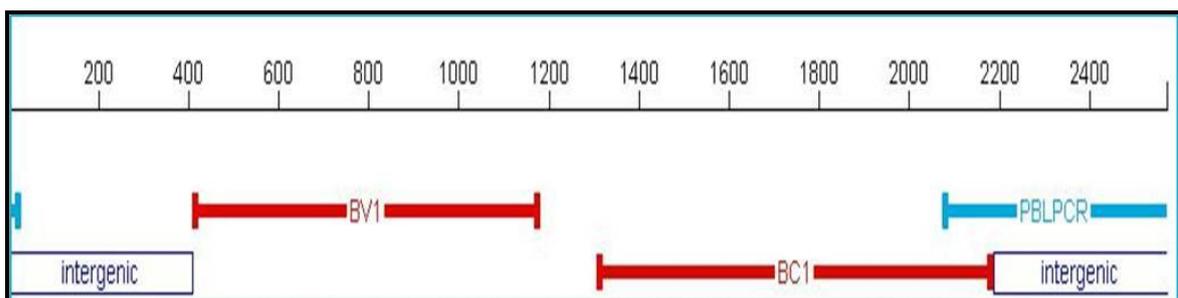


Figura 3 – Diagrama do DNA-B linearizado de espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido. A régua indica a ordem numérica dos nucleotídeos compreendidos entre a origem de replicação e o final do genoma viral. As ORFs BV1 e BC1 estão representadas por barras vermelhas. As barras em azul representam a região amplificada pelo par de ‘primers’ universais: PBL1v2040/PCRC1 – PBLPCR (Rojas *et al.*, 1993). A região PBLPCR foi caracterizada via sequenciamento no presente trabalho. O bloco ‘Intergenic’ representa a região intergênica que contém a região comum.



No estado de São Paulo, um novo geminivírus, denominado Tomato yellow vein streak virus (TYLCV), foi descrito por Faria *et al.* (1997). No Submédio do Vale São Francisco, infecções por geminivírus em tomateiro causaram perdas estimadas em até 100% em algumas áreas (Lima & Haji, 1998). Atualmente, a doença foi observada em lavouras de tomate nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Rio de Janeiro, Goiás, Ceará e no Distrito Federal, com perdas na produção estimadas entre 40 e 100% (Ribeiro *et al.*, 2003). Em estudos de detecção no Centro-Oeste do Estado de São Paulo, verificou-se que cerca de 10% das amostras de tomateiro coletadas com sintomas de mosaico estavam infectadas com um isolado de *Sida mottle virus* (SiMoV) (Cotrim *et al.*, 2007). Calegario *et al.* (2004) verificaram em Minas Gerais infecção natural de tomateiro com um isolado do *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV).

4.2.2 Natureza da diversidade genética de *Begomovirus* reportados no Brasil

Cinco isolados de begomovírus foram coletados de tomateiros na região do cinturão verde de Brasília – DF. Estes isolados foram amplificados, via PCR com primers universais, clonados e sequenciados. Posteriormente, as sequências foram depositadas no GenBank. Análises filogenéticas utilizando BLASTn indicaram que três isolados (PA-05, 34 e Ta4) eram mais relacionados com o Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) e que o nível de identidade entre eles variou entre 95 e 97%, sugerindo que são variantes de uma mesma espécie. Os outros dois isolados (DFM e DF-BR3) mostraram-se mais relacionados com o Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV). A comparação das regiões 5' da *CP* e da *Rep* e da região intergênica inteira dos isolados PA-05, DFM e DF-BR3 com outras espécies de begomovírus brasileiros indicaram que DF-BR3 apresenta 95% de identidade com PA-05 na região *CP*, 91% na região intergênica e apenas 74% de identidade com PA-05 na região da *Rep*. Esta observação, assim como o fato de ambos os isolados terem sido obtidos na mesma região geográfica, sugere que tanto DF-BR3 como PA-05 podem ser recombinantes. A análise de recombinação indicou que o isolado DF-BR3 seria uma quimera englobando diferentes segmentos virais e evidencia que este mecanismo genético pode estar contribuindo de maneira significativa para a formação do complexo de espécies de begomovírus bipartidos de tomateiro no Brasil (Inoue-Nagata *et al.*, 2006). A evolução dos vírus de planta é afetada por diversos fatores, incluindo as interações vírus-vetor e vírus-

hospedeiro. Como resultado, existe uma oportunidade muito maior para um vírus recombinante emergir com um novo conjunto de características biológicas (Padidam *et al.*, 1999). Neste contexto, a alta taxa de recombinação pode estar contribuindo para: (1) a recente emergência de novas doenças; (2) variabilidade na expressão de sintoma; (3) para expandir (ou contrair) o círculo de plantas hospedeiras e (4) expandir ou regionalizar geograficamente e ecologicamente as epidemias de cada potencial nova espécie viral.

4.3 *Begomovirus* em plantas invasoras no Brasil

Plantas daninhas têm sido relatadas como hospedeiras alternativas de begomovírus em várias regiões e, supostamente, constituem fonte potencial do vírus para o tomateiro, podendo ainda estar associadas à emergência de novas espécies de vírus desse gênero no campo (Ambrozevícius *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2002).

Espécies de plantas invasoras das famílias **Malvaceae** [*Sida rhobifolia* L., *Herissantia crispa* (L.), *Sidastrum micranthum* (St.-Hil.) Fryxel e *S. spinosa* L.], **Sterculiaceae** (*Waltheria indica* L. e *Triumfetta semitriloba* Jacq.), **Capparaceae** (*Cleome affinis* D.C.), **Fabaceae** [*Macroptillium lathyroides* (L.) Urban e *Desmodium* sp.] e **Euphorbiaceae** [*Cnidoscolus urens* (L.) Arthur] têm sido relatadas como hospedeiras de begomovírus no Brasil, constituindo importantes fontes de inóculo dos vírus que podem ser transmitidos para espécies cultivadas (Assunção *et al.*, 2006).

Recentemente, Arnaud *et al.* (2007) detectaram a presença de begomovírus em espécies de plantas invasoras das famílias **Amaranthaceae** (*Amaranthus spinosus* L. e *A. viridis* L.) e **Asteraceae** (*Ageratum conyzoides* L. e *Bidens pilosa* L.) na Serra do Ipiapaba, Ceará. As quatro espécies referidas são encontradas com frequência nas lavouras de tomateiro e nelas, comumente, observa-se a presença da mosca branca em suas folhas, demonstrando a movimentação do inseto entre as espécies de plantas daninhas e o tomateiro.

Plantas daninhas têm chamado a atenção de pesquisadores porque servem como reservatórios para vários geminivírus e, assim, atuam como hospedeiros adequados para recombinação. Como muitas daninhas são perenes, estas plantas podem manter populações virais entre as estações de cultivo. Em vários aspectos, plantas daninhas do gênero *Sida* são interessantes quando consideradas no contexto de epidemias virais.

Elas são amplamente distribuídas pela América Latina e outras regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde servem como hospedeiras para diversos geminivírus. Além disso, elas estão frequentemente associadas com várias culturas hortícolas tipicamente afetadas por geminivirose (Jovel *et al.*, 2007).

Plantas de *Sida* são um dos maiores reservatórios naturais de begomovírus (Jovel *et al.*, 2004; Zerbini *et al.*, 2005). Por várias décadas, um mosaico frequentemente associado a plantas de *Sida* foi considerado ser causado por uma estirpe brasileira de *Abutilon mosaic virus* (AbMV). Por estudos de infecção e comparação de sequências, foi demonstrado que o *Sida micrantha mosaic* está associado à pelo menos dois begomovírus distintos do AbMV, sendo denominado “*Sida micrantha mosaic-associated viruses*” (SimMV). Esses resultados indicam que uma co-infecção de begomovírus pode persistir por décadas mantendo sua integridade genômica, produzindo um reservatório de geminivírus parcialmente recombinados, porém distintos (Jovel *et al.*, 2004).

A diversidade genética entre geminivírus associados com três daninhas comuns na Jamaica foi estudada e geminivírus bipartidos foram encontrados em *Sida* spp., *Macroptilium lathyroides* e *Wissadula amplissima*. Os geminivírus encontrados em *Sida* spp. e *M. lathyroides* foram idênticos e designados *Sida golden mosaic geminivirus* (SidGMV-JA), enquanto o geminivírus encontrado em *W. amplissima* foi suficientemente distinto para ser designado *Wissadula golden mosaic geminivirus* (WGMV). Foi observado que SidGMV-JA era mais parecido com potato yellow mosaic geminivirus (PYMV) e proposto que SidGMV-JA e PYMV definiam um novo grupo de geminivírus, sugerindo que os geminivírus infectando daninhas na Jamaica são distintos dos geminivírus que infectam lavouras (Roye *et al.*, 1997).

Seis novas espécies de begomovírus, três em tomate e três infectando daninhas frequentemente associadas com lavouras de tomate foram reportadas no sudeste do Brasil. Os recursos genômicos indicaram que as seis novas espécies são típicas de begomovírus bipartidos do “Novo Mundo”. No entanto, os vírus pertencentes a duas das novas espécies não se agrupam com os vírus brasileiros na árvore filogenética. Essas espécies podem representar uma linhagem distinta de begomovírus do “Novo Mundo”, encontrados no Brasil pela primeira vez (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). A erradicação dessas plantas das áreas de cultivo deve ser uma medida adotada visando a redução da incidência desses vírus (Assunção *et al.*, 2006).

HIPÓTESES

- Fatores ambientais peculiares das diferentes regiões podem condicionar o estabelecimento de novos patossistemas, específicos para região.
- Fatores ambientais peculiares podem afetar processos evolutivos comumente reportados em *Begomovirus* (ex. recombinação entre distintos genomas virais).
- Espécies de plantas endêmicas das diferentes regiões podem representar novas fontes naturais (importantes reservatórios) de espécies de *Begomovirus*.
- Espécies virais endêmicas das diferentes regiões podem ser transmitidas e identificadas infectando espécies cultivadas.

OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO

O principal objetivo deste trabalho foi:

Prospectar e caracterizar a diversidade genética, genômica, geográfica e temporal dos begomovírus que infectam naturalmente o tomateiro e plantas daninhas dos gêneros *Cleome* (de regiões quentes) e *Leonurus* (de clima subtropical), incluindo uma descrição mais detalhada de:

- patossistemas conhecidos;
- potenciais novos vírus em hospedeiras conhecidas;
- potenciais novos vírus em novas hospedeiras;
- novas hospedeiras de viroses conhecidas.

CAPÍTULO 2

Diversidade de isolados de *Begomovirus* obtidos em plantas de tomateiro para consumo *in natura* no Brasil: Panorama de espécies virais em uma década de surtos epidêmicos (2001-2010)

Niday Alline N Fernandes^{1,2}; Maria Esther N Fonseca^{1,3}; Antônio F Costa¹; Ailton Reis^{1,3}; Alice K Inoue-Nagata^{1,3}; Leonardo S Boiteux^{1,3}

¹Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq)/Embrapa Hortaliças, CP 218, 70359-970, Brasília-DF; ²UnB, Departamento de Fitopatologia, 70910-900, Brasília-DF; ³Bolsista de Produtividade/CNPq. E-mail: boiteux@cnph.embrapa.br.

RESUMO

O cultivo de tomateiro para consumo *in natura* no Brasil é conduzido em uma grande amplitude de condições agroclimáticas, incluindo a região Amazônica (zona equatorial quente e úmida), o Semi-árido nordestino, regiões de clima seco e ameno no Cerrado brasileiro (no Centro-Oeste) e, principalmente, nas condições subtropicais do Sudeste e Sul do país. Até o início da década de 1990 as begomoviroses eram de ocorrência esporádica e sem importância econômica. No entanto, na década de 1990, um complexo extremamente diverso de begomovírus emergiu no Brasil, coincidindo com a introdução e dispersão de um novo biótipo do vetor mosca-branca, *Bemisia tabaci* biótipo B. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética das espécies de *Begomovirus* registradas com ênfase na cultura do tomateiro para consumo *in natura* em todas as regiões do Brasil (no período entre 2001 e 2010) e comparar com estudos realizados anteriormente. Os isolados foram caracterizados via PCR com primers universais para segmentos conservados do DNA-A e DNA-B e via sequenciamento de um segmento de 1100 pares de base do DNA-A. Estes ‘primers’ foram desenhados para anelar com regiões conservadas presentes na região 5’-terminal do gene AV1 (CP) e na região da região do 3’-terminal do gene AC1 (Rep). Duzentas e cinquenta duas amostras foliares (isolados) de tomateiro foram coletadas nas principais áreas produtoras de tomate para consumo *in natura* nos seguintes estados e regiões do Brasil: Norte (Tocantins-TO), Nordeste (Bahia-BA, Ceará-CE e Pernambuco-PE), Sul (Paraná-PR, Rio Grande do Sul-RS e Santa Catarina-SC), Sudeste (Espírito Santo-ES, Minas Gerais-MG, Rio de

Janeiro-RJ e São Paulo-SP) e Centro-Oeste (Distrito Federal-DF e Goiás-GO). Como esperado, o resultado da diversidade no agroecossistema do tomateiro para consumo *in natura* se mostrou muito mais variável que o reportado para tomate para processamento. Os resultados indicaram que todos os isolados são de genoma bipartido, não havendo ainda nenhum registro de espécies com genoma monopartido. As espécies *Tomato golden mosaic virus* (descrita antes do ingresso do biótipo B no Brasil) e *Tomato yellow spot virus* não foram detectadas neste levantamento. Existe uma aparente regionalização das espécies, com algumas sendo prevalentes em condições de clima mais quente e outras em condições de clima subtropical. Sete potenciais novas espécies virais estão emergindo, sendo que algumas já apresentam ampla distribuição geográfica enquanto outras ainda vêm se mantendo de maneira endêmica. Existem algumas estirpes que estão divergindo dos isolados das espécies originais a ponto de representarem ‘quasispecies’ ou mesmo potenciais novas espécies. Estirpes de espécies de *Begomovirus* reportadas inicialmente em plantas cultivadas e/ou plantas daninhas estão aparentemente se adaptado e infectando tomateiro, mas em frequência ainda muito baixa. Esta coleção de isolados virais representa uma importante ferramenta para estudos adicionais de variabilidade intra-específica e mecanismos evolucionários de espécies de *Begomovirus* e para utilização em programas de melhoramento genético desta cultura.

Palavras-chave: tomate, *Begomovirus*, diversidade, PCR.

ABSTRACT

Diversity of *Begomovirus* isolates from fresh-market tomatoes in Brazil: Survey of viral species in a decade of disease outbreaks (2001-2010) – In Brazil, fresh-market tomatoes are grown under a wide array of agroclimatic conditions ranging from warm and humid equatorial area in the Amazon River Basin to the semi-arid Northeast region. It is also cultivated in the dry and mild climates of the Brazilian Savannah (*cerrado*) in Center-West region and the subtropical mild climates of Southeast and South regions. The begomoviruses were minor diseases up to the 1990’s. However, an extremely diverse complex of *Begomovirus* species has arised after the introduction into the country of the whitefly *Bemisia tabaci* biotype B. This variability was identified in nation-wide surveys between the years 1994 and 1999 and in several recent State-wide surveys and/or in processing tomatoes areas in Central Brazil. The main objective of the

present work was to evaluate the nation-wide genetic diversity of *Begomovirus* species infecting fresh-market tomato crops during the years 2001 and 2010. This survey was done via PCR with universal primers targeting conserved regions of both DNA-A and DNA-B components and via sequencing analysis of a PCR amplicon of 1100 base pairs encompassing a region of the DNA-A component between the 5'-end of the AV1 (CP) gene and the 3'-end of the AC1 (Rep) gene. Two-hundred-fifty two leaf samples were collected in the main production areas and small growers fields in the following Brazilian regions: North (Tocantins-TO), North-East (Bahia-BA, Ceará-CE and Pernambuco-PE), South (Paraná-PR, Rio Grande do Sul-RS and Santa Catarina-SC), South-East (Espírito Santo-ES, Minas Gerais-MG, Rio de Janeiro-RJ and São Paulo-SP) and Central Brazil (Federal District-DF and Goiás-GO). As expected, the diversity of tomato-infecting *Begomovirus* species is higher than that observed in processing tomatoes. All isolates were bipartite genome with no report of monopartite species. Some viral species formerly described in Brazil were not detected in this survey including *Tomato golden mosaic virus* (described before the entrance of the biotype B) and *Tomato yellow spot virus*. There is a regional distribution of some species, with some of them being prevalent in warm conditions and others prevalent in subtropical areas. Seven potential new viral species are emerging, with some of them already showing a wide geographic distribution whereas others are yet endemic to some restrict areas. Some strains are diverging from the original viral species and many isolates are 'quasispecies' or even equivalent to new species according to the current taxonomic rules. Strains of *Begomovirus* species originally reported on other cultivated plant species and weeds are also moving to tomatoes yet at very low frequency. This virus collection also represents an important tool for breeding tomatoes for resistance and for additional studies of intra-specific variability and evolutionary mechanisms of the genus *Begomovirus*.

Keywords: tomato, *Begomovirus*, diversity, PCR.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L., família Solanaceae) para mesa ou para consumo *in natura* tem sido uma importante fonte de emprego ao longo de toda sua cadeia produtiva (ABCSEM, 2009). O Brasil apresenta uma grande diversidade de sistemas de cultivo do tomateiro para consumo *in natura* variando desde

pequenos produtores de base familiar até grandes fazendas com estrutura empresarial. A área cultivada tem variado, nos últimos anos, entre 38 e 40 mil hectares (Tavares, 2002; ABCSEM, 2009). A produção de tomate para mesa distribui-se entre as regiões Sudeste (59%), Centro-Oeste (7%), Sul (19%), Nordeste (14,7%) e Norte (0,3%). Os principais Estados produtores são Minas Gerais (20%), São Paulo (19,1%), Rio de Janeiro (9,7%), Bahia (9%), Paraná (9%) e Goiás (6,3%) Santa Catarina (6%) e Rio Grande do Sul (4%) (Boiteux *et al.*, 2008; ABCSEM, 2009).

Dentre as inúmeras doenças que afetam o tomateiro, aquelas causadas por begomovírus têm sido limitantes à produção comercial de tomate em diversas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (Polston & Anderson, 1997; Moriones & Navas-Castillo, 2000; Rojas & Gilbertson, 2008). Os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) são caracterizados por infectarem plantas dicotiledôneas, apresentarem partículas icosaédricas geminadas, com genoma composto por uma ou duas moléculas (componentes) de DNA circular de fita simples (DNA-A e DNA-B), cada uma com aproximadamente 2600 bases (Lazarowitz, 1992), sendo transmitidas por moscas-brancas do complexo *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) (Fauquet *et al.*, 2008). Mais de uma centena de diferentes espécies/estirpes de begomovírus já foram relatadas infectando naturalmente o tomateiro no mundo (Jones, 2003; Fauquet *et al.*, 2008). Perdas significativas de produção vêm sendo registradas desde as décadas 1970/1980 em diferentes regiões produtoras de tomate na Europa, Ásia e Américas (Polston & Anderson, 1997).

A ocorrência de begomovírus em tomateiro no Brasil pode ser dividida em duas fases. Até o início da década de 1990 as begomoviroses eram de ocorrência esporádica e sem importância econômica. Nesta primeira fase, os primeiros relatos de infecções por begomovírus foram feitos entre as décadas de 1960 e 1970 (Flores *et al.*, 1960; Costa, 1974; Costa *et al.*, 1975; Matyis *et al.*, 1975). Estes estudos resultaram na identificação de *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), que foi a primeira espécie de *Begomovirus* de tomateiro a ter o seu genoma bipartido completamente caracterizado e a infectividade dos dois componentes (DNA-A e DNA-B) demonstrada (Hamilton *et al.*, 1984).

No entanto, na década de 1990, um complexo extremamente diverso de begomovírus emergiu no Brasil, coincidindo com a introdução e dispersão de um novo biótipo do vetor mosca-branca, *B. tabaci* biótipo B (Lourenção & Nagai, 1994; França *et al.*, 1996; Ambrozevícius *et al.*, 2002). Este complexo viral tem sido devastador na produção de tomate, sendo considerado o principal fator limitante na produção dessa

hortaliça no Brasil (Fernandes *et al.*, 2008). Os sintomas típicos de infecção viral incluem clorose das nervuras, mosaico amarelo, clorose, rugosidade e enrolamento das folhas. Quando a infecção é precoce, as perdas podem ser totais e o controle químico do vírus é difícil, uma vez que a transmissão pela mosca branca é do tipo circulativa (Lapidot & Friedmann, 2002). Perdas de produção entre 60-78% têm sido registrada em híbridos suscetíveis (Giordano *et al.*, 2005; Pereira-Carvalho, 2009).

O primeiro registro formal de uma epidemia de begomovírus transmitida pela mosca-branca *B. tabaci* biótipo B foi feito em 1993 com isolados virais obtidos em Brasília-DF (Ribeiro *et al.*, 1994). O hábito alimentar polífago de *B. tabaci* biótipo B favoreceu sua rápida disseminação e epidemias de begomoviroses passaram a ser observadas em muitas áreas produtoras de tomateiro no Brasil (Ribeiro *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 2003). Em seguida, um novo begomovírus, denominado *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), foi caracterizado inicialmente em tomateiro no Estado de São Paulo (Faria *et al.*, 1997; Colariccio *et al.*, 2007) e posteriormente causando “mosaico deformante da batata” no Rio Grande do Sul (Albuquerque *et al.*, 2010). Até o presente, foram caracterizadas cinco espécies definitivas de begomovírus em tomateiro no Brasil [*Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV)] e ainda mais doze espécies tentativas [*Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Tomato yellow mosaic virus* (ToYMV), *Tomato severe mosaic virus* (ToSMV), *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), *Tomato infectious yellows virus* (ToIYV), *Tomato golden vein virus* (ToGVV), *Tomato crinkle virus* (ToCrV), *Tomato crinkle yellow leaf virus* (ToCYLV), *Tomato chlorotic vein virus* (ToCIVV), *Tomato mild mosaic virus* (ToMIMV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) e *Tomato leaf distortion virus* (ToLDV)] (Ribeiro *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2006; Inoue-Nagata *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Fauquet *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008). A infecção natural de tomateiro com isolados da espécie *Sida mottle virus* (SiMoV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) também foi registrada em Minas Gerais e São Paulo (Calegario *et al.*, 2004; Cotrim *et al.*, 2007).

Esta variabilidade de espécies de *Begomovirus* foi catalogada em diferentes trabalhos de levantamento tanto de âmbito nacional como de âmbito regional. O primeiro grande levantamento nacional foi conduzido por Ribeiro *et al.* (2003) com o sequenciamento parcial de 23 isolados coletados entre 1994 e 1999 em diferentes

regiões produtoras do Distrito Federal (um isolado), do Nordeste (11 isolados de PE, um do RN, três da PB e três da BA) e do Sudeste (quatro isolados de MG e um isolado do RJ). Neste estudo, pelo menos sete espécies novas foram descritas pela primeira vez no país. Quatro foram de ocorrência restrita ao Sudeste [entre elas a espécie *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV)], duas foram identificadas exclusivamente na região Nordeste e uma denominada de *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMV) foi encontrada em ambas as regiões (Ribeiro *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2007). Um subgrupo destas sete potenciais espécies foi posteriormente caracterizado e confirmado que representavam novos vírus (Andrade *et al.*, 2006; Inoue-Nagata *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007; Fauquet *et al.*, 2008). Outro importante estudo investigando a diversidade de espécies de *Begomovirus* em tomateiro foi conduzido com 138 isolados coletados entre os anos de 2004 e 2005 principalmente em tomateiro para processamento no Brasil Central, incluindo o Distrito Federal-DF (103 isolados); PE (15 isolados); SP (seis isolados); BA (seis isolados); GO (cinco isolados) e MG (dois isolados) (Fernandes *et al.*, 2008). Neste estudo foram identificadas as seguintes espécies: *Tomato severe rugose virus* (61% dos isolados), *Tomato golden vein virus* (29,8%), *Tomato mottle leaf curl virus* (7,1%), *Tomato yellow vein streak virus* (0,7%) e duas potenciais novas espécies (1,4% dos isolados) (Fernandes *et al.*, 2008).

Diversos levantamentos e trabalhos de caracterização regional de isolados de *Begomovirus* de tomateiro foram conduzidos. Uma análise foi realizada na região Sudeste com 137 isolados coletados durante o de 1999 nos municípios de São Fidélis-RJ, Varzêa Alegre-ES, Igarapé-MG, Mateus Leme-MG, Bicas-MG e Serra Azul-MG. Neste estudo, *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) foi predominante em MG e uma outra espécie não caracterizada predominou no RJ e ES. Quatro potenciais novas espécies foram detectadas na região amostrada (Ambrozevicius *et al.*, 2002). Neste período, nenhum isolado foi encontrado em Paty do Alferes-RJ (Ambrozevicius *et al.*, 2002). No Distrito Federal, cinco novos isolados foram caracterizados: um apresentou 95% de identidade com *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV); três representaram um potencial nova espécie [88% de identidade com o *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV)] e um isolado apresentou 77% de identidade com TMoLCV, sendo um recombinante com isolados desta potencial nova espécie (Inoue-Nagata *et al.*, 2006).

Outro trabalho caracterizou 16 isolados coletados em lavouras de tomateiro do Centro-Oeste do Estado de São Paulo entre os anos 2003 e 2004 (Cotrim *et al.*, 2007). As espécies predominantes foram ToSRV (50%) e ToYVSV e uma potenciais nova

espécies não completamente caracterizada (Cotrim *et al.*, 2007). A curiosidade é que foram encontrados isolados de *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) e *Sida mottle virus* (SiMoV) originalmente descritos em plantas daninhas (Calegario *et al.*, 2004). Mais recentemente foi conduzida a caracterização de 115 isolados obtidos em Paty do Alferes (RJ) coletados em 2005 e 17 isolados obtidos em Coimbra (MG) em 2007. Neste estudo, a espécie ToYVSV foi predominante no RJ (22 de 39 amostras) seguida de Tomato common mosaic virus (ToCmMV) (19/39) e SimMV (3/39). Em MG, todos os nove isolados foram de ToCmMV (Castillo-Urquiza, 2008). Ao todo foram identificadas três novas espécies infectando tomateiro: ToCmMV, Tomato mild mosaic virus (ToMIMV), e Tomato leaf distortion virus (ToLDV) (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). Levantamentos também foram conduzidos no Ceará, onde a infecção por *Begomovirus* foi verificada via PCR com ‘primers’ universais, porém sem descrição de espécies (Arnaud *et al.*, 2007) e na região serrana do Espírito Santo, onde não foi detectada a presença de *Begomovirus* em um levantamento feito em 2003 na região Serrana do Estado (Ávila *et al.*, 2004).

A cultura do tomate para consumo *in natura* é, normalmente, conduzido de maneira fragmentária, em pequenas propriedades, em uma grande amplitude de agroecossistemas, utilizando plantas estaqueadas ou tutoradas, com diferentes sistemas de condução e de manejo da cultura. Neste cenário, possíveis novas espécies ainda não analisadas podem estar ocorrendo nas diferentes regiões produtoras do país. O objetivo do presente trabalho foi catalogar diversidade genética e a predominância e distribuição geográfica de espécies de begomovírus presentes em regiões produtoras tradicionais de tomate para consumo *in natura* e também em pequenos núcleos Rurais no Distrito Federal e mais 12 Estados do Brasil durante o período de quase uma década.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados – Duzentas e cinquenta duas amostras foliares de tomateiro foram coletadas entre 2001 e 2010, nas principais áreas produtoras de tomate para consumo *in natura* e também para processamento nos seguintes estados e regiões do Brasil: Norte (Tocantins-TO), Nordeste (Bahia-BA, Ceará-CE e Pernambuco-PE), Sul (Paraná-PR, Rio Grande do Sul-RS e Santa Catarina-SC), Sudeste (Minas Gerais-MG, Espírito Santo-ES, Rio de Janeiro-RJ e São Paulo-SP) e Centro-Oeste (Distrito Federal-DF e Goiás-GO). Foram coletadas plantas exibindo sintomas típicos de infecção por

Begomovirus incluindo, nanismo, clorose (amarelecimento), distorção foliar, clareamento de nervuras e mosaico (**Figura 1**).

Purificação e estimativa da concentração do DNA total de tecidos infectados de tomateiro – A purificação de DNA total de tecido de tomate foi feita usando o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) seguindo o protocolo padrão com algumas adaptações implementadas por Boiteux *et al.* (1999). A concentração do DNA purificado foi estimada em gel de agarose 1% (p/v) a partir de uma solução do marcador de quantidade contendo o fago λ (lambda) na concentração de 10ng/ μ L. Todos os materiais foram diluídos para a concentração final de 20 ng/ μ L em TE (Tris 0,01M; EDTA 0,001M; pH 7,0).

Amplificação via PCR de segmentos genômicos dos DNA-A e DNA-B dos isolados virais – Segmentos dos DNA-A e DNA-B viral foram amplificados via reação em cadeia da polimerase ou “Polymerase chain reaction” (PCR). A PCR foi realizada em termocicladores do tipo *PCR System 9700* (Applied Biosystems). Os reagentes usados na mistura de 20 μ L foram: 2 μ L de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 1,2 μ L MgCl₂ 50mM; 2 μ L dNTPs (2,5 μ M cada); 0,5 μ L de cada primer (10 μ M cada); 0,32 μ L *Taq* DNA Polymerase (5u/ μ l), todos da *Invitrogen*[®] *Life Technologies*; 2 μ L de DNA molde (20 μ g/ μ L) e 11,48 μ L de água MilliQ. Os pares de ‘primers’ universais utilizados foram: ‘BegoAFor1’ / ‘BegoARev1’ (**Figura 2**) para um segmento do DNA-A (Ha *et al.*, 2006) e ‘PBL1v2040’ / ‘PCRC1’ (**Figura 3**) para um segmento do DNA-B (Rojas *et al.*, 1993). O perfil de amplificação consistiu de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 4 minutos, anelamento dos primers a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos, terminando em 7 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação (amplicons) foram analisados em géis de agarose 1% (p/v), corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta (Ambrozevicius *et al.*, 2002).

Reações de sequenciamento dos amplicons obtidos – Os amplicons para um segmento do DNA-A obtidos com os par de primers BegoAFor1 / BegoARev1 (Ha *et al.*, 2006) foram diretamente sequenciados utilizando o protocolo BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 3.1 (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado em um sequenciador ABI PRIM 3100 da Embrapa

Hortaliças (CNPH), utilizando o *kit ABI Prism BigDye version 3.0 chemistry da Applied Biosystems* e os iniciadores de síntese “1” senso e “1R” anti-senso, utilizados individualmente na amplificação de cada amostra, a fim de obter, através do consenso, um fragmento de maior tamanho possível.

Análise das sequências – Sequências consenso foram obtidas usando o programa SeqMan (DNASTar) e as sequências nucleotídicas foram analisadas usando EditSeq (DNASTar). A qualidade das sequências foi avaliada através do programa *SeqMan (Lasergene, Madison, WI)* e as sequências de baixa qualidade foram removidas (Allex, 1999). As sequências correspondentes ao fragmento do genoma dos diferentes isolados virais foram obtidas a partir do consenso dos fragmentos sequenciados com os iniciadores senso e anti senso utilizando-se o programa *SeqMan (Lasergene)[®] DNASTar*. As sequências foram comparadas com as disponíveis no banco de dados do GenBank pelo programa BLASTn, na página eletrônica do *National Center for Biotechnology Information – NCBI* (www.ncbi.nlm.nih.gov) e analisadas para níveis de identidade, usando o algoritmo BLASTn. As identidades nucleotídicas foram calculadas usando o algoritmo CLUSTAL W, com o programa MegAlign (DNASTAR). O alinhamento das sequências foi realizado por meio do *software Megalign (Lasergene, Madison, WI)*, utilizando-se o método Clustal W com as seguintes condições: “*gap penalty*” e “*gap length penalty*” = 10.

Análise Filogenética – A análise de parcimônia foi conduzida usando o programa PAUP 4.0 (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony version 3.1*), através da busca heurística. Foi utilizado o índice de suporte *bootstrap* com 2000 repetições. Associações que tiveram valores de *bootstrap* menores do que 50% não foram mostradas nas árvores. O grau de homoplasia foi avaliado pelo índice de consistência. Todos os espaços (“*gaps*”) gerados no alinhamento foram considerados na construção das árvores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as **252** amostras foram analisadas para a presença de begomovírus via PCR com primers universais tanto para o DNA-A quanto para o DNA-B (Ha *et al.*, 2006; Rojas *et al.*, 1993). Amplicons positivos (indicativo de infecção por begomovírus) foram

observados nas amostras para os dois componentes, indicando a presença exclusiva de isolados de *Begomovirus* de genoma bipartido. Este conjunto de amostras caracterizadas no presente trabalho foi coletado em 12 estados brasileiros mais o Distrito Federal, englobando áreas tradicionais de cultivo de tomate para consumo *in natura* no Brasil com também em novos pólos de produção desta hortaliça (**Tabela 1**). Conseqüentemente foram avaliadas neste estudo, amostras representativas do sistema de produção de tomate para consumo *in natura*. O par de ‘primers’ universais (BegoAFor1 / BegoARev1) foi utilizado para amplificar um segmento de 1100 pares de base do DNA-A utilizado para análise de sequencia e identificação dos isolados. Estes ‘primers’ foram desenhados para anelar com regiões conservadas presentes na região 5’-terminal do gene AV1 (CP) e na região 3’-terminal do gene AC1 (Rep) (**Figura 2**).

Diversidade na região Norte – A sequência de 1100 pares de base do DNA-A dos isolados **TO-045** e **TO-046** (coletados em Gurupi-TO) indicaram níveis de identidade de 83% com um segmento do *Tomato yellow spot virus*, registrado infectando feijoeiro na Argentina (GenBank FJ538207). Análise de sequência do DNA-A dos isolados **TO-083** e **TO-088** (coletados em Araguaína) indicou níveis de identidade de 83% com um segmento do DNA-A correspondendo da espécie *Sida yellow leaf curl virus* (EU710750), observado infectando plantas de *Sida rhombifolia* em Coimbra-MG (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). A análise de sequência dos isolados **TO-090**, **TO-093**, **TO-094** e **TO-095** (Aragominas), indicou níveis de identidade entre 83 e 84% com um segmento do DNA-A da espécie *Okra mottle virus* (FJ686695). Isolados deste vírus foram observado associados com a cultura da soja em Santo Antônio de Goiás-GO (Fernandes *et al.*, 2009). Já o isolado **TO-092** (Aragominas) indicou níveis de identidade 83% com um segmento do DNA-A da espécie *Tomato leaf distortion virus* (EU710749), recentemente descrita infectando plantas de tomateiro em Paty do Alferes-RJ (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). Estes resultados sugerem que de acordo com os atuais critérios taxonômicos (Fauquet *et al.*, 2008), estes isolados representam potenciais novas espécies de *Begomovirus*, sendo que duas delas, estão aparentemente endêmicas no Estado do Tocantins (**Tabelas 1 e 2**). Porém, a confirmação definitiva só poderá ser efetuada pelo sequenciamento completo do componente DNA-A do genoma viral. O cultivo do tomateiro tem ocupado um papel de destaque em diversos municípios do Estado do Tocantins. No Brasil, epidemias de *Begomovirus* foram relatadas imediatamente após a introdução do biótipo B em várias regiões do Brasil

(Lourenção & Nagai, 1994; França *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 1994). O hábito alimentar polífago do biótipo B favoreceu sua rápida disseminação em todas as áreas produtoras de tomate e outras solanáceas, incluindo o Estado do Tocantins. A infecção por espécies de *Begomovirus*, cujo vetor é a mosca-branca (*B. tabaci*), é, atualmente, um dos principais problemas fitossanitários do tomateiro no Estado. No entanto, ainda não existe relato sobre a caracterização das espécies de *Begomovirus* predominantes na região. Este trabalho é o primeiro a caracterizar a diversidade de espécies e isolados de begomovírus infectando tomateiro em diferentes regiões produtoras no Estado de Tocantins.

Diversidade na região Nordeste – A análise de sequência de quatro isolados da **Bahia (BA)** indicou níveis de identidade que variaram entre 83 e 84% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica do *Okra mottle virus* (FJ686695) e outros dois isolados analisados apresentaram níveis de identidade de 83% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica do *Tomato leaf distortion virus* (EU710749). Isolados com similaridade genética com estes dois vírus também foram registrados no presente levantamento no Estado do Tocantins (**Tabela 1**). Nos isolados do **Ceará (CE)**, observou-se uma grande diversidade de espécies infectando tomateiro. Das 12 sequências analisadas, três apresentaram níveis de identidade variando entre 83 e 84% com um segmento do DNA-A do *Okra mottle virus* (FJ686695), também registrado no Estado do Tocantins. Cinco isolados apresentaram níveis de identidade variando entre 91 e 100% com um segmento do DNA-A do *Tomato mottle leaf curl virus* (AY049225), dois apresentaram identidade de 82 e 83% com um segmento do DNA-A de *Tomato golden mottle virus* (AF132852), um isolado apresentou 83% de identidade com um segmento do DNA-A de *Tomato chlorotic mottle virus-Crumple* (AY090557) e o isolado **CE-005** apresentou identidade de 82% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica de uma estirpe de Sumaré-SP de *Tomato severe rugose virus* (EU086591). Nos isolados de **Pernambuco (PE)**, das quatro sequências analisadas, todas apresentaram espécies distintas de begomovírus infectando tomateiro. O isolado **PE-011** indicou níveis de identidade 88% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica do *Tomato chlorotic mottle virus* (AY049213); o isolado **PE-013** indicou níveis de identidade 87% com um segmento do DNA-A de *Tomato chlorotic mottle virus-Crumple* (AY090557); o isolado **PE-040** indicou níveis de identidade 97% com um segmento do DNA-A de *Sida micrantha mosaic virus* -

[*Brazil:okra*] (EU908733), observado infectando plantas de quiabo (*Abelmoschus esculentus*) e o isolado **PE-042** apresentou identidade de 98% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica de uma estirpe de Sumaré-SP de *Tomato severe rugose virus* (EU086591).

Diversidade na região Sudeste – A análise de sequência do DNA-A dos isolados **MG-011**, **MG-012** e **MG-016** de **Minas Gerais (MG)** indicou níveis de identidade variando entre 90 e 94% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica do *Tomato rugose mosaic virus*-[Ube] (AF291705), observado em plantas de tomate no Triângulo Mineiro-MG. A análise de sequência do DNA-A dos isolados **MG-013** e **MG-028** indicaram níveis de identidade de 96 e 99% respectivamente, com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica do *Tomato severe rugose virus* - PJU-SP (FJ824808), observado infectando pimentão (*Capsicum annuum*) em São Paulo-SP. Já a análise de sequência do DNA-A do isolado **MG-015** indicou níveis de identidade de 86% com um segmento do DNA-A de *Tomato yellow vein streak virus* (EF417915), observado infectando plantas de batata no Rio Grande do Sul-RS (Albuquerque *et al.*, 2010). Por sua vez, 11 isolados apresentaram níveis de identidade de 94% com um segmento do DNA-A de um isolado de Monte Mor-SP de *Tomato yellow vein streak virus* (EF459696), observado em plantas de tomate. O isolado **MG-029** apresentou níveis de identidade de 88% com uma estirpe de Petrolina de *Tomato severe rugose virus* (DQ207749). A análise de sequência de dois isolados do **Espírito Santo (ES)** indicou níveis de identidade de 96 e 97% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica do *Tomato common mosaic virus* (EU710754) registrado infectando plantas de tomate em Coimbra-MG (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). A análise de sequência de cinco isolados do **Rio de Janeiro (RJ)** indicou níveis de identidade que variaram entre 83 e 89% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica do *Tomato rugose mosaic virus*-[Ube] (AF291705). Outros três isolados analisados apresentaram níveis de identidade de 96% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica do *Tomato common mosaic virus* (EU710754). Os isolados **RJ-016** e **RJ-018** apresentaram níveis de identidade de 91 e 92% respectivamente com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica do *Sida mottle virus*-[Brazil] (AY090555). Este vírus já havia sido descrito infectando tomateiro em São Paulo e Minas Gerais, mas é, aparentemente, o primeiro registro deste vírus em tomateiro no RJ. Nos isolados de **São Paulo (SP)**, das 15 sequências de DNA-

A analisadas, foram observadas sete espécies de begomovírus distintas infectando tomateiro. Cinco isolados indicaram níveis de identidade variando entre 87 e 96% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica do *Tomato yellow vein streak virus* (EF459696). Outros quatro isolados indicaram níveis de identidade variando entre 93 e 99% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica de uma estirpe de Sumaré-SP de *Tomato severe rugose virus* (EU086591). Dois isolados indicaram níveis de identidade de 84% com um segmento do DNA-A do *Okra mottle virus* (EF417915). Um isolado indicou níveis de identidade de 89% com um segmento do DNA-A de uma estirpe de Piraju-SP de *Tomato severe rugose virus* (FJ824808); um indicou níveis de identidade de 84% com um segmento do DNA-A de *Tomato leaf distortion virus* (EU710749); um indicou níveis de identidade de 83% com um segmento do DNA-A de *Tomato golden mottle virus* (DQ520943) e o último isolado apresentou níveis de identidade de 98% com um segmento do DNA-A de *Euphorbia yellow mosaic virus* (FJ619507), observado infectando plantas leiteira (*Euphorbia heterophylla*) (Fernandes *et al.*, 2009).

Diversidade na região Centro-Oeste – Esta região teve mais isolados avaliados devido a posicionamento geográfico em relação a Brasília-DF, que foi a sede da realização destes estudos. Nos isolados do **Distrito Federal (DF)**, das 48 sequências de DNA-A analisadas, foram observadas oito espécies de begomovírus distintas infectando tomateiro. A maioria dos isolados analisados (18 isolados) indicaram níveis de identidade variando entre 85 e 97% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica do *Tomato rugose mosaic virus-[Ube]* (AF291705), sendo que dos 18 isolados analisados, apenas cinco apresentaram níveis de identidade abaixo de 89%. Outros 12 isolados indicaram níveis de identidade variando entre 85 e 99% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica do *Tomato yellow vein streak virus*, sendo 11 idênticos a um isolado brasileiro (EF459696) e um mais idêntico a um isolado argentino (GQ387369) deste vírus. Cinco isolados indicaram níveis de identidade variando entre 92 e 98% com um segmento do DNA-A de uma estirpe de Piraju-SP de *Tomato severe rugose virus* (FJ824808), sendo que apenas um isolado (**DF339**) apresentou níveis de identidade abaixo de 89% com esta espécie. Dois isolados (**DF-320 e DF-321**) apresentaram níveis de identidade de 94% com um segmento do DNA-A de *Tomato chlorotic mottle virus* (AY049213) e quatro indicaram níveis de identidade variando entre 94 e 99% com um segmento do DNA-A de *Tomato mottle*

leaf curl virus (AY049225). Quatro isolados indicaram níveis de identidade de 84, 85, 92 e 99% com um segmento do DNA-A de uma estirpe de Sumaré-SP de *Tomato severe rugose virus* (EU086591). Um isolado indicou níveis de identidade de 84% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica do *Okra mottle virus* (FJ686695), observado associado à cultura da soja em Santo Antônio de Goiás-GO (Fernandes *et al.*, 2009) e o último apresentou níveis de identidade de 92% com um segmento do DNA-A de *Tomato chlorotic vein virus* (AY049205). Nos isolados de **Goiás (GO)**, das 68 sequências de DNA-A analisadas, foram observadas oito espécies/estirpes de begomovírus distintas infectando tomateiro. A maioria dos isolados analisados (26 isolados) mostraram níveis de identidade variando entre 84 e 95% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica do *Tomato yellow vein streak virus*, sendo que 23 isolados foram idênticos a um isolado brasileiro (EF459696) e três isolados foram idênticos a um isolado argentino (GQ387369). Dos 23 isolados EF459696 (origem brasileira), cinco apresentaram níveis de identidade variando entre 84 e 87% e os outros 18 isolados mostraram níveis de identidade variando entre 90 e 95%. Os três isolados GQ387369 (origem argentina) indicaram níveis de identidade variando entre 86 e 87%. Outros 19 isolados indicaram níveis de identidade com um segmento do DNA-A de *Tomato severe rugose virus* – estirpe de Piraju-SP (FJ824808), sendo que dois isolados indicaram níveis de identidade de 82% e 85% e outros 17 isolados mostraram níveis de identidade variando entre 90% e 99%. Dezesesseis isolados indicaram níveis de identidade com um segmento do DNA-A de *Tomato rugose mosaic virus-[Ube]* (AF291705). Seis isolados apresentaram níveis de identidade variando entre 83% e 88% (sugerindo a divergência genética dentro das espécies) ao passo que os outros 10 isolados foram classificados como genuínas estirpes *Tomato rugose mosaic virus-[Ube]*, com níveis de identidade variando entre 91% e 99%. Três isolados (**GO-182**, **GO-184** e **GO-204**) apresentando sintomas de clorose e amarelecimento entre nervuras, indicaram níveis de identidade de 99% com um segmento do DNA-A do *Tomato severe rugose virus* – estirpe de Petrolina-GO (DQ207749), observado associado à cultura do pimentão no Brasil (Bezerra-Agasie *et al.*, 2005). Dois isolados (**GO-219** e **GO-376**) apresentando sintomas de mosaico dourado e clorose acentuada, mostraram níveis de identidade de 99 e 98% respectivamente com um segmento do DNA-A de uma de *Tomato severe rugose virus* – estirpe Sumaré-SP (EU086591), registrada plantas da planta daninha *Nicandra physaloides* (Solanaceae) (Barbosa *et al.*, 2009). Um isolado de Itaberaí-GO (**GO-342**), apresentando sintomas de amarelão, indicou níveis de

identidade de 82% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica de *Soybean blistering mosaic virus* (EF016486), observado associado a cultura da soja na Argentina (Rodriguez-Pardina *et al.*, 2006). Um isolado de Goianópolis-GO (**GO-114**), apresentando sintomas de clorose e nanismo, apresentou níveis de identidade de 92% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica de *Bean golden mosaic virus-Brazil* (FJ665283), isolado observado infectando soja no Brasil Central (Fernandes *et al.*, 2009).

Diversidade na região Sul – Na região Sul a grande maioria das sequências analisadas apresentaram níveis de identidade variando entre 97 e 99% com um segmento do DNA-A de uma estirpe de *Tomato severe rugose virus* – Sumaré-SP (EU086591), estirpe esta que foi observada infectando plantas *N. physaloides* (Barbosa *et al.*, 2009). Apenas um isolado (**RS33**) apresentou-se semelhante a uma estirpe de Piraju-SP (FJ824808), registrada infectando plantas de pimentão (*Capsicum annuum*). Estes resultados preliminares sugerem que a diversidade viral na região Sul é ainda pequena, sendo limitada a apenas uma espécie já caracterizadas infectando tomateiro em outras regiões do Brasil. Epidemias de begomovírus foram recentemente registradas em cultivos de tomateiro em diferentes regiões produtoras no Sul do Brasil (Paraná-PR, Santa Catarina-SC e Rio Grande do Sul-RS), causando preocupação para toda a cadeia produtiva de tomate para consumo *in natura* na região. A hipótese provável é que estejam surgindo populações do vetor *B. tabaci* mais adaptadas as condições de clima temperado da região Sul e expandindo, desta forma, amplitude geográfica das begomoviroses. No entanto, ainda não existem estudos sobre a diversidade de espécies que estão infectando o tomateiro nestas novas condições ambientais.

De maneira geral, os resultados indicaram, como esperado, que a diversidade no agroecossistema do tomateiro para consumo *in natura* se mostrou muito mais variável que o reportado para tomate para processamento (Fernandes *et al.*, 2008). Os resultados indicaram que todos os isolados são de genoma bipartido não havendo ainda nenhum registro de espécies de genoma monopartido. Existe uma aparente regionalização das espécies, com algumas sendo prevalentes em condições de clima mais quente e outras em condições de clima subtropical. Esta tendência de regionalização já havia sido observada por Ribeiro *et al.* (2003) onde algumas espécies foram registradas exclusivamente no Nordeste e outras no Sudeste. Vírus já descritos infectando tomateiro

no Brasil não foram encontrados em nossa coleção de isolados, incluindo: Tomato crinkle leaf yellows virus (Galvão *et al.*, 2003) e *Tomato yellow spot virus* (Andrade *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007), sugerindo que a sua natureza endêmica possa ser resultado de sua recente emergência ou de seus requerimentos epidemiológicos. Curiosamente, a espécie *Tomato golden mosaic virus* (descrita antes do ingresso do biótipo B no Brasil) também não foi detectada em nenhuma amostra neste levantamento.

Alguns registros apontam isolados de espécies já descritas infectando outras plantas que ainda não foram previamente reportados no tomateiro. Dois são, aparentemente, registros novos, incluindo um isolado de *Euphorbia yellow mosaic virus* (FJ619507) com 98% de identidade e um isolado de *Bean golden mosaic virus-Brazil* (FJ665283) com 92% de identidade. Por sua vez, *Sida mottle virus*-[Brazil] (AY090555) e *Sida micrantha mosaic virus* – [Brazil:okra] (EU908733) já foram previamente reportados infectando tomateiro em Minas Gerais e São Paulo (Calegario *et al.*, 2004; Cotrim *et al.*, 2007).

Recentemente foi publicada uma detalhada revisão do status de demarcação de espécies, estirpes e variantes de geminivirus (Fauquet *et al.*, 2008). Os novos critérios propõem que quando a identidade entre duas sequências for menor que 88% o isolado em questão pertence a uma nova espécie. Se o alinhamento apresentar níveis de identidade entre 88 ou 89%, o isolado pertence tentativamente à espécie mais relacionada. Por sua vez, quando a identidade nucleotídica entre as sequências for maior que 89%, o isolado em questão pertence definitivamente à espécie usada para comparação. Com relação à classificação ao nível intra-espécífico, as proposições são as seguintes: identidade de sequência abaixo de 93% caracteriza nova estirpe ('strain') dentro da espécie, enquanto níveis de identidade acima de 94% caracterizam uma variante de sequência daquela estirpe (Fauquet *et al.*, 2008).

As espécies de *Begomovirus* registradas no Brasil apresentam uma organização genômica com dois componentes e formam dois grupamentos monofiléticos bem definidos: um englobando ToYSV e outros vírus que infectam plantas daninhas e um segundo grupo que engloba espécies que infectam plantas cultivadas (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). No presente trabalho alguns isolados podem representar potenciais novas espécies, incluindo: isolados relacionados com o *Tomato yellow spot virus* – Argentina (FJ538207) com 83% de identidade; isolados relacionados com *Sida yellow leaf curl virus* (EU710750) com cerca de 83% de identidade; isolados relacionados com *Okra*

mottle virus (FJ686695) com níveis de identidade variando entre 83-84%; isolados relacionados com o *Tomato leaf distortion virus* (EU710749) com cerca de 83% de identidade; isolados relacionados com *Tomato golden mottle virus* (EF501976) com 82-83% de identidade e um único isolado obtido em Itaberaí-GO que apresentou relação genética com *Soybean blistering mosaic virus* (EF016486) com cerca de 82%. Além disso, como mencionado, algumas potenciais novas espécies estão sendo identificadas dentro de ToYVSV, ToRMV e ToSRV (**Tabela 1**). Um subgrupo destes isolados (TO-045; TO-092; TO-093; BA-045; CE-003; SP-002; SP-003; DF-034 e RJ-019) foi analisado mais detalhadamente em uma árvore filogenética (**Figura 4**) juntamente com outras espécies de *Begomovirus* caracterizadas no Brasil, Américas e no “Velho Mundo”. Esta árvore foi baseada em um alinhamento múltiplo de sequências de cerca de 1100 pares de bases correspondendo ao segmento do DNA-A flanqueado pelo par de ‘primers’ universais (BegoAFor1 / BegoARev1). O resultado indicou a presença potencial de sete novas espécies (**Figura 4**).

A identificação de sete potenciais novas espécies confirma a intensa capacidade do gênero *Begomovirus* em gerar diversidade genética a partir de intercâmbio de segmentos genômicos entre diferentes espécies virais (Seal *et al.*, 2006; Jones, 2009). Os resultados indicam que este intercâmbio de material genético, entre espécies de genoma bipartido do Brasil, ocorre naturalmente entre vírus pertencentes aos dois grupamentos monofiléticos. Muitas destas espécies que estão emergindo, mas que ainda não foram completamente descritas merecem estudos e caracterizações adicionais, especialmente pelo fato que algumas delas já apresentam uma distribuição geográfica relativamente ampla (**Tabelas 1 e 2**). Essa observação sugere que as novas espécies de begomovírus detectadas em tomateiro no Brasil após a introdução de *B. tabaci* biótipo B, e que inicialmente encontravam-se limitadas a certas regiões geográficas ou hospedeiras naturais da flora brasileira, estão sendo disseminadas aos poucos para o tomateiro e estes vírus podem, potencialmente, invadir o cultivo destas hortaliças em outras regiões. Um exemplo é o maciço avanço da espécie ToSRV nos três Estados da região Sul. No entanto, outras espécies ainda permanecem restritas a pequenas regiões, com ocorrência endêmica, sem que as razões para este confinamento geográfico estejam ainda completamente elucidadas.

As análises dos resultados também indicam que existem algumas estirpes (sensu Fauquet *et al.*, 2008) que estão divergindo dos isolados das espécies originais ao ponto de representarem potenciais novas espécies. Observa-se isso especialmente em isolados

dentro das espécies *Tomato severe rugose virus*, *Tomato rugose mosaic virus*-[Ube] e *Tomato yellow vein streak virus* (**Figura 4**), que se tornaram espécies predominantes em condições de campo ao longo dos anos (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; **Tabela 1**). Além disso, estirpes de *Begomovirus* reportadas inicialmente em plantas cultivadas e/ou plantas daninhas estão aparentemente se adaptando e infectando tomateiro, embora ainda sem grande importância epidemiológica, como indicado pelo baixo número de ocorrências no conjunto amostrado no presente trabalho.

Além de representar uma importante ferramenta para estudos adicionais de variabilidade intra-específica e dos mecanismos evolucionários de espécies de *Begomovirus*, esta coleção de isolados virais (que tem sido mantida pela Embrapa Hortaliças) pode ser muito útil em programas de melhoramento genético do tomateiro. A capacidade de produzir clones infectivos a partir de DNA viral mantido *in vitro* (Ferreira *et al.*, 2008. Wu *et al.*, 2008), torna esta coleção um arsenal de variabilidade do patógeno, tendo potencial utilização em programas de melhoramento genético desta cultura visando identificar genes e/ou conjuntos de genes que combinados apresentam espectro de ação mais amplos (Pereira-Carvalho *et al.*, 2010). Resistência de amplo espectro é uma característica imprescindível neste cenário de enorme diversidade de isolados virais.

Alguns dos estudos mais abrangentes sobre a prospecção da diversidade dos begomovírus no Brasil utilizaram a combinação das técnicas de PCR (com primers universais) e o sequenciamento parcial do genoma desses vírus (Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2008). No entanto, estudos recentes têm mostrado, cada vez mais, que a sequência completa do genoma (principalmente do componente DNA-A) é necessária para a definição mais precisa da diversidade de espécies desses vírus devido à intensa recombinação de segmentos genômicos que ocorre neste grupo (Fauquet *et al.*, 2005). De fato, dois isolados podem ser idênticos ou muito similares no segmento genômico analisado, mas representar um recombinante para as outras regiões ou em outro componente, levando a conclusões incorretas sobre o verdadeiro status taxonômico do vírus (Fauquet *et al.*, 2008). Por esta razão estudos/caracterização adicionais serão conduzidas com isolados representativos de potenciais novas espécies virais visando determinar inteiramente sua estrutura/organização genômica e elucidar pontos da biologia destes potenciais novos vírus incluindo: círculo de plantas hospedeiras, expressão de sintomas e a interação com loci de resistência a begomovírus reportados no tomateiro (García-Cano *et al.*, 2008; Pereira-Carvalho *et al.*, 2010).

Figura 1 – Diversidade de sintomas induzidos pela infecção por isolados de begomovírus em tomateiro: (A) Planta coletada no Estado do Tocantins – TO, exibindo sintomas de amarelecimento e distorção foliar; (B) planta de tomate em campo aberto em Brasília-DF com mosaico; (C) clorose apical, dobramento de borda, redução do tamanho dos folíolos e leve distorção foliar em planta conduzida sob casa plástica em Brasília-DF.

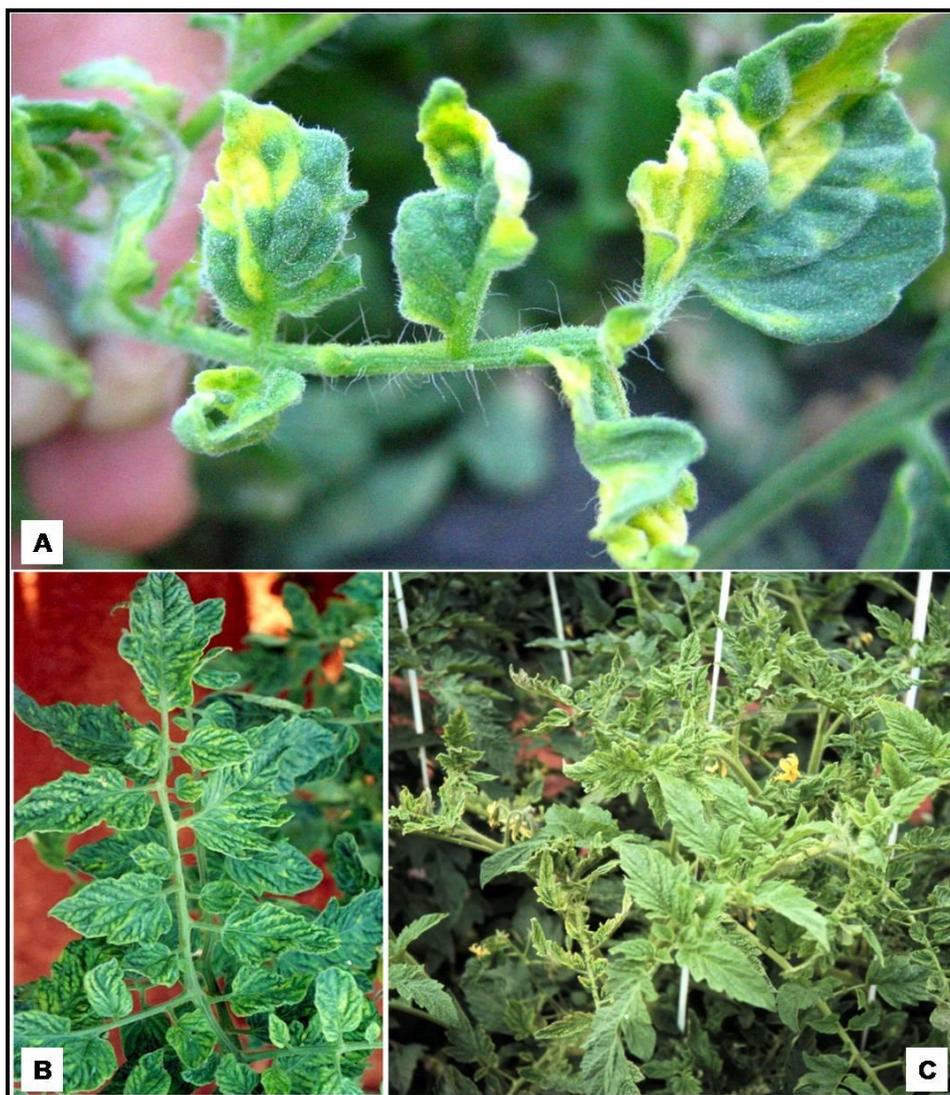


Figura 2 – Diagrama do DNA-A linearizado de espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido. A régua indica a ordem numérica dos nucleotídeos compreendidos entre a origem de replicação e o final do genoma viral. As ORFs AV1 (CP), AC1, AC2, AC3 e AC4 estão representadas por barras vermelhas. As barras em azul representam as regiões amplificadas por três pares de ‘primers’ universais: PALv1978/PARc496 – PALPAR (Rojas *et al.* 1993); região ‘Core CP’ englobando um segmento do gene codificador da capa protéica que é amplificada pelo par de ‘primers’ AV494/AC1048 (Brown *et al.*, 2001) e o segmento genômico analisado (SGA) no presente trabalho correspondendo a região amplificada pelos ‘primers’ BegoAFor1/BegoARev1 (Ha *et al.*, 2006). O bloco RIG representa a região intergênica que contém a região comum.

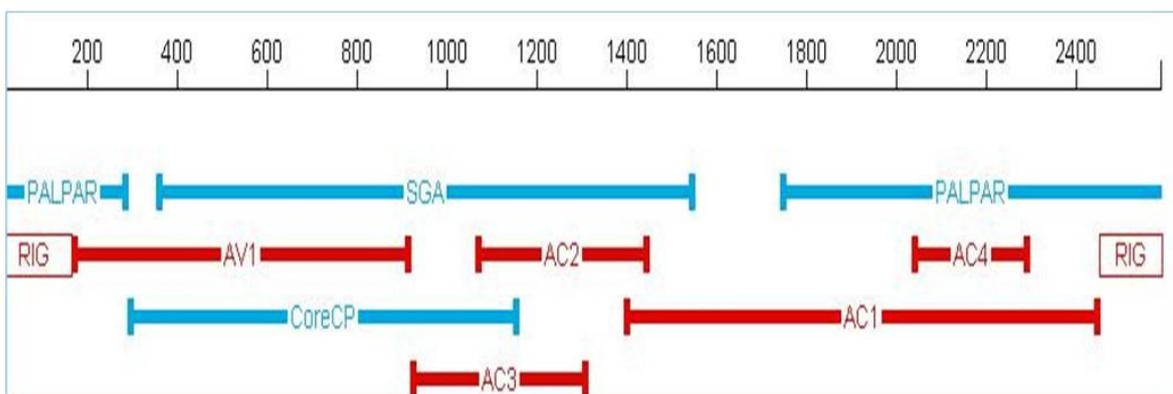


Figura 3 – Diagrama do DNA-B linearizado de espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido. A régua indica a ordem numérica dos nucleotídeos compreendidos entre a origem de replicação e o final do genoma viral. As ORFs BV1 e BC1 estão representadas por barras vermelhas. As barras em azul representam a região amplificada pelo par de ‘primers’ universais: PBL1v2040/PCRC1– PBLPCR (Rojas *et al.* 1993). A região PBLPCR foi caracterizada via sequenciamento no presente trabalho. O bloco ‘Intergenic’ representa a região intergênica que contém a região comum.

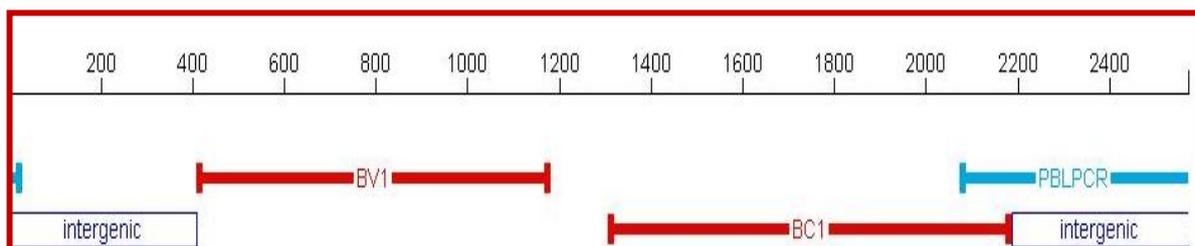


Tabela 1 – Lista do código do isolado, local, data de coleta (mês / ano), espécie viral com maior nível de identidade; BLASTn (% de identidade) e número de acesso no GenBank correspondente a espécie viral. Os isolados de tomateiro foram analisados via sequenciamento de um segmento de aproximadamente 1060 pares da base do DNA-A. Cada espécie e suas respectivas estirpes estão com uma diferente combinação de cor/preenchimento de célula.

Isolado	Local da Coleta	Data	Espécie Viral	BLASTn (%)	Acesso no GenBank
REGIÃO NORTE					
TO-045	Gurupi – TO	08/08	<i>Tomato yellow spot virus - Argentina</i>	83	FJ538207
TO-046	Gurupi – TO	08/08	<i>Tomato yellow spot virus - Argentina</i>	83	FJ538207
TO-083	Araguaina – TO	07/08	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	83	EU710750
TO-088	Araguaina – TO	07/08	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	83	EU710750
TO-090	Aragominas – TO	07/08	<i>Okra mottle virus</i>	84	FJ686695
TO-092	Aragominas – TO	07/08	<i>Tomato leaf distortion virus</i>	83	EU710749
TO-093	Aragominas – TO	07/08	<i>Okra mottle virus</i>	83	FJ686695
TO-094	Aragominas – TO	07/08	<i>Okra mottle virus</i>	83	FJ686695
TO-095	Aragominas – TO	07/08	<i>Okra mottle virus</i>	83	FJ686695
REGIÃO NORDESTE					
BA-045	Ibicoara /Igarachi – BA	05/09	<i>Okra mottle virus</i>	83	FJ686695
BA-046	Ibicoara /Igarachi – BA	05/09	<i>Tomato leaf distortion virus</i>	83	EU710749
BA-047	Ibicoara /Igarachi – BA	05/09	<i>Okra mottle virus</i>	84	FJ686695
BA-048	Ibicoara /Igarachi – BA	05/09	<i>Okra mottle virus</i>	84	FJ686695
BA-049	Ibicoara /Igarachi – BA	05/09	<i>Okra mottle virus</i>	84	FJ686695
BA-050	Ibicoara /Igarachi – BA	05/09	<i>Tomato leaf distortion virus</i>	83	EU710749
CE-001	Garaciaba do Norte – CE	08/05	<i>Okra mottle virus</i>	84	FJ686695
CE-002	Garaciaba do Norte – CE	08/05	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	91	AY049226
CE-003	Garaciaba do Norte – CE	08/05	<i>Tomato golden mottle virus</i>	82	EF501976
CE-004	Garaciaba do Norte – CE	08/05	<i>Okra mottle virus</i>	83	FJ686695
CE-005	Garaciaba do Norte – CE	08/05	<i>Tomato severe rugose virus - Sumare</i>	82	EU086591
CE-011	Carnaubal – CE	08/05	<i>Tomato chlorotic mottle virus-Crumple</i>	83	AY090557
CE-012	Carnaubal – CE	08/05	<i>Tomato golden mottle virus</i>	83	AF132852
CE-013	Carnaubal – CE	08/05	<i>Okra mottle virus</i>	83	FJ686695
CE-023	Croatá – CE	05/02	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	100	AY049225
CE-024	Repartição – CE	05/02	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	100	AY049225
CE-025	Repartição – CE	05/02	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	100	AY049225
CE-026	Vereda – CE	05/02	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	100	AY049225
PE-011	Pesqueira – PE	01/09	<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	88	AY049213
PE-013	Pesqueira – PE	01/09	<i>Tomato chlorotic mottle virus-Crumple</i>	87	AY090557
PE-040	Chã Grande /Zona Mata – PE	06/09	<i>Sida micrantha mosaic virus - [Brazil:okra]</i>	97	EU908733
PE-042	Chã Grande /Zona Mata – PE	06/09	<i>Tomato severe rugose virus - Sumare</i>	98	EU086591
REGIÃO SUDESTE					
MG-011	Serra Negra – MG	10/02	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	94	AF291705
MG-012	Serra Negra – MG	10/02	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	91	AF291705
MG-013	Serra Negra – MG	10/02	<i>Tomato severe rugose virus - PJU-SP</i>	96	FJ824808
MG-015	Serra Negra – MG	10/02	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	86	EF417915
MG-016	Serra Negra – MG	10/02	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	90	AF291705
MG-028	Cascalho Rico – MG	10/02	<i>Tomato severe rugose virus - PJU-SP</i>	99	FJ824808
MG-029	Cascalho Rico – MG	10/02	<i>Tomato severe rugose virus - Petrolina</i>	88	DQ207749
MG-061	Araguari – MG	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
MG-062	Araguari – MG	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
MG-063	Araguari – MG	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
MG-064	Araguari – MG	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
MG-065	Araguari – MG	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
MG-066	Araguari – MG	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
MG-067	Piracaiba – MG	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
MG-068	Piracaiba – MG	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
MG-069	Araguari – MG	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
MG-070	Araguari – MG	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
MG-071	Araguari – MG	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
ES-007	Venda Nova – ES	11/09	<i>Tomato common mosaic virus</i>	97	EU710754
ES-008	Venda Nova – ES	11/09	<i>Tomato common mosaic virus</i>	96	EU710754
RJ-001	Paty do Alferes – RJ	07/06	<i>Tomato common mosaic virus</i>	96	EU710754

RJ-003	Paty do Alferes – RJ	07/06	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	88	AF291705
RJ-006	Paty do Alferes – RJ	07/06	<i>Tomato common mosaic virus</i>	96	EU710754
RJ-007	Paty do Alferes – RJ	07/06	<i>Tomato common mosaic virus</i>	96	EU710754
RJ-015	São José do Ubá – RJ	07/06	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	88	AF291705
RJ-016	São José do Ubá – RJ	07/06	<i>Sida mottle virus-[Brazil]</i>	91	AY090555
RJ-017	São José do Ubá – RJ	07/06	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	89	AF291705
RJ-018	São José do Ubá – RJ	07/06	<i>Sida mottle virus-[Brazil]</i>	92	AY090555
RJ-019	São José do Ubá – RJ	07/06	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	88	AF291705
RJ-020	São José do Ubá – RJ	07/06	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	89	AF291705
SP-002	Monte Mor – SP	03/06	<i>Tomato severe rugose virus - PJU-SP</i>	89	FJ824808
SP-003	Monte Mor – SP	03/06	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	87	EF459696
SP-004	Monte Mor – SP	03/06	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
SP-006	Jaguariúna – SP	08/06	<i>Tomato severe rugose virus - Sumare</i>	99	EU086591
SP-008	Jaguariúna – SP	08/06	<i>Tomato severe rugose virus - Sumare</i>	99	EU086591
SP-016	Mogi Guaçu – SP	07/07	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	93	EF459696
SP-017	Mogi Guaçu – SP	07/07	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	96	EF459696
SP-018	Mogi Guaçu – SP	07/07	<i>Tomato severe rugose virus - Sumare</i>	93	EU086591
SP-022	Sorocaba – SP	02/08	<i>Tomato severe rugose virus - Sumare</i>	99	EU086591
SP-024	Piracicaba – SP	02/08	<i>Okra mottle virus</i>	84	FJ686695
SP-025	Piracicaba – SP	02/08	<i>Tomato leaf distortion virus</i>	83	EU710749
SP-026	Piracicaba – SP	02/08	<i>Tomato golden mottle virus</i>	83	DQ520943
SP-027	Piracicaba – SP	02/08	<i>Okra mottle virus</i>	84	FJ686695
SP-066	Sumaré – SP	11/01	<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>	98	FJ619507
SP-068	Sumaré – SP	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696

REGIÃO CENTRO-OESTE

DF-018	Ponte Alta – DF	03/03	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	97	AF291705
DF-023	CNPH – DF	03/03	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	88	AF291705
DF-024	CNPH – DF	03/03	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	88	AF291705
DF-026	CNPH – DF	03/03	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	91	AF291705
DF-027	CNPH – DF	03/03	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	85	GQ387369
DF-028	CNPH – DF	03/03	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	85	EF459696
DF-034	Lago Azul – DF	05/03	<i>Tomato severe rugose virus - Sumare</i>	92	EU086591
DF-044	Lago Azul – DF	05/03	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	95	AF291705
DF-045	Lago Azul – DF	05/03	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	90	AF291705
DF-046	Lago Azul – DF	05/03	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	86	AF291705
DF-047	Lago Azul – DF	05/03	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	97	AF291705
DF-048	CNPH – DF	05/03	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	89	AF291705
DF-049	CNPH – DF	05/03	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	92	AF291705
DF-050	CNPH – DF	05/03	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	87	AF291705
DF-051	CNPH – DF	05/03	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	91	AF291705
DF-052	CNPH – DF	05/03	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	89	EF459696
DF-054	Ponte Alta – DF	05/03	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	95	AF291705
DF-057	Ponte Alta Norte – DF	05/03	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	97	AF291705
DF-058	Ponte Alta Norte – DF	05/03	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	97	AF291705
DF-059	Ponte Alta Norte – DF	05/03	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	97	AF291705
DF-062	CNPH – DF	06/03	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	87	EF459696
DF-227	Planaltina – DF	06/07	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	92	AF291705
DF-288	CNPH – DF	07/09	<i>Tomato severe rugose virus - PJU-SP</i>	92	FJ824808
DF-313	Brazlândia – DF	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
DF-314	Brazlândia – DF	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
DF-315	Brazlândia – DF	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
DF-316	Brazlândia – DF	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
DF-317	Brazlândia – DF	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
DF-318	Brazlândia – DF	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
DF-319	Brazlândia – DF	12/01	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
DF-320	CNPH – DF	11/01	<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	94	AY49206
DF-321	CNPH – DF	11/01	<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	94	AY49206
DF-322	CNPH – DF	11/01	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	94	AY049225
DF-323	CNPH – DF	11/01	<i>Tomato severe rugose virus - PJU-SP</i>	94	FJ824808
DF-324	CNPH – DF	11/01	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	99	AY049225
DF-325	CNPH – DF	11/01	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	99	AY049225
DF-326	PAD – DF	05/02	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	98	AF291705
DF-327	PAD – DF	05/02	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	99	AY049225
DF-328	PAD – DF	05/02	<i>Tomato chlorotic vein virus</i>	93	AY049205
DF-329	PAD – DF	05/02	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	99	EF459698
DF-330	Pipiripau - DF	02/10	<i>Tomato severe rugose virus - Sumare</i>	99	EU086591
DF-338	Pipiripau - DF	02/10	<i>Tomato severe rugose virus - PJU-SP</i>	97	FJ824808
DF-339	Pipiripau - DF	02/10	<i>Tomato severe rugose virus - PJU-SP</i>	85	FJ824808
DF-340	Pipiripau - DF	02/10	<i>Okra mottle virus</i>	84	FJ686695
DF-341	Pipiripau - DF	02/10	<i>Tomato severe rugose virus - Sumare</i>	85	EU086591
DF-342	Pipiripau - DF	02/10	<i>Tomato severe rugose virus - PJU-SP</i>	98	FJ824808
DF-343	Pipiripau - DF	02/10	<i>Tomato severe rugose virus - PJU-SP</i>	98	FJ824808
DF-344	Pipiripau - DF	02/10	<i>Tomato severe rugose virus - Sumare</i>	84	EU086591
GO-017	Avelinópolis – GO	03/03	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	94	EF459696
GO-023	Luziânia – GO	03/03	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	91	EF459696

GO-029	Luziânia – GO	03/03	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	98	FJ824808
GO-031	Luziânia – GO	03/03	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	99	FJ824808
GO-032	Luziânia – GO	03/03	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	99	FJ824808
GO-033	Luziânia – GO	03/03	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	99	FJ824808
GO-034	Luziânia – GO	03/03	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	99	FJ824808
GO-035	Luziânia – GO	03/03	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	99	FJ824808
GO-045	Goianápolis – GO	04/03	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	99	FJ824808
GO-046	Goianápolis – GO	04/03	Tomato yellow vein streak virus	86	GQ387369
GO-086	Goianápolis – GO	04/03	Tomato yellow vein streak virus	94	EF459696
GO-091	Goianápolis – GO	04/03	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	90	FJ824808
GO-096	Goianápolis – GO	04/03	Tomato yellow vein streak virus	94	EF459696
GO-099	Goianápolis – GO	04/03	Tomato rugose mosaic virus-[Ube]	91	AF291705
GO-100	Goianápolis – GO	04/03	Tomato yellow vein streak virus	94	EF459696
GO-101	Goianápolis – GO	04/03	Tomato yellow vein streak virus	93	EF459696
GO-102	Goianápolis – GO	04/03	Tomato yellow vein streak virus	95	EF459696
GO-105	Goianápolis – GO	04/03	Tomato yellow vein streak virus	94	EF459696
GO-106	Goianápolis – GO	04/03	Tomato rugose mosaic virus-[Ube]	96	AF291705
GO-107	Goianápolis – GO	04/03	Tomato rugose mosaic virus-[Ube]	99	AF291705
GO-109	Goianápolis – GO	04/03	Tomato rugose mosaic virus-[Ube]	83	AF291705
GO-114	Goianápolis – GO	04/03	Bean golden mosaic virus-Brazil	92	FJ665283
GO-126	L. Bulhões – GO	05/03	Tomato rugose mosaic virus-[Ube]	87	AF291705
GO-127	L. Bulhões – GO	05/03	Tomato yellow vein streak virus	86	EF459696
GO-128	L. Bulhões – GO	05/03	Tomato rugose mosaic virus-[Ube]	95	AF291705
GO-129	L. Bulhões – GO	05/03	Tomato rugose mosaic virus-[Ube]	97	AF291705
GO-160	L. Bulhões – GO	05/03	Tomato yellow vein streak virus	90	EF459696
GO-168	L. Bulhões – GO	05/03	Tomato rugose mosaic virus-[Ube]	86	AF291705
GO-169	L. Bulhões – GO	05/03	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	82	FJ824808
GO-170	L. Bulhões – GO	05/03	Tomato rugose mosaic virus-[Ube]	97	AF291705
GO-182	Cristalina/Luziânia – GO	05/03	Tomato severe rugose virus-Petrolina	99	DQ207749
GO-184	Cristalina/Luziânia – GO	05/03	Tomato severe rugose virus-Petrolina	99	DQ207749
GO-188	Goianápolis – GO	05/03	Tomato rugose mosaic virus-[Ube]	87	AF291705
GO-189	Goianápolis – GO	05/03	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	90	FJ824808
GO-190	Goianápolis – GO	05/03	Tomato yellow vein streak virus	84	EF417915
GO-192	Goianápolis – GO	05/03	Tomato yellow vein streak virus	87	GQ387369
GO-196	Cristalina/Luziânia – GO	06/03	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	98	FJ824808
GO-197	Cristalina/Luziânia – GO	06/03	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	98	FJ824808
GO-199	Goianápolis – GO	04/03	Tomato yellow vein streak virus	87	EF417915
GO-204	Orizona – GO	07/03	Tomato severe rugose virus-Petrolina	99	DQ207749
GO-208	Orizona – GO	07/03	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	99	FJ824808
GO-213	Vianópolis – GO	07/03	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	99	FJ824808
GO-218	Morrinhos – GO	08/03	Tomato yellow vein streak virus	85	EF459696
GO-219	Morrinhos – GO	08/03	Tomato severe rugose virus – Sumare	99	EU086591
GO-221	Morrinhos – GO	08/03	Tomato yellow vein streak virus	87	EF459696
GO-227	Morrinhos – GO	08/03	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	99	FJ824808
GO-230	Morrinhos – GO	08/03	Tomato rugose mosaic virus-[Ube]	97	AF291705
GO-231	Morrinhos – GO	08/03	Tomato yellow vein streak virus	94	EF459696
GO-232	Itaberaí – GO	08/03	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	85	FJ824808
GO-246	Goianápolis – GO	09/03	Tomato rugose mosaic virus-[Ube]	93	AF291705
GO-248	Goianápolis – GO	09/03	Tomato rugose mosaic virus-[Ube]	87	AF291705
GO-250	Goianápolis – GO	09/03	Tomato rugose mosaic virus-[Ube]	88	AF291705
GO-259	Goianápolis – GO	09/03	Tomato yellow vein streak virus	94	EF459696
GO-289	Goiania – GO	09/03	Tomato rugose mosaic virus-[Ube]	98	AF291705
GO-342	Itaberaí – GO	04/06	Soybean blistering mosaic virus	82	EF016486
GO-360	Goiânia – GO	04/06	Tomato yellow vein streak virus	93	EF459696
GO-361	Goiânia – GO	04/06	Tomato yellow vein streak virus	86	GQ387369
GO-365	Goiânia – GO	04/06	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	98	FJ824808
GO-369	Goianápolis – GO	07/07	Tomato yellow vein streak virus	94	EF459696
GO-370	Goianápolis – GO	07/07	Tomato yellow vein streak virus	93	EF459696
GO-372	Goianápolis – GO	07/07	Tomato yellow vein streak virus	94	EF459696
GO-374	Goianápolis – GO	07/07	Tomato rugose mosaic virus-[Ube]	98	AF291705
GO-375	Goianápolis – GO	07/07	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	95	FJ824808
GO-376	Goianápolis – GO	07/07	Tomato severe rugose virus - Sumare	98	EU086591
GO-392	Itaberaí – GO	07/06	Tomato yellow vein streak virus	93	EF459696
GO-449	Goianápolis – GO	12/01	Tomato yellow vein streak virus	94	EF459696
GO-450	Goianápolis – GO	12/01	Tomato yellow vein streak virus	94	EF459696
GO-451	Goianápolis – GO	12/01	Tomato severe rugose virus - PJU-SP	99	FJ824808

REGIÃO SUL

PR-016	S. Gerônimo da Serra – PR	04/07	Tomato severe rugose virus - Sumare	97	EU086591
PR-023	Marilândia – PR	04/07	Tomato severe rugose virus - Sumare	99	EU086591
PR-037	Barro Branco – PR	04/07	Tomato severe rugose virus - Sumare	97	EU086591
PR-038	Barro Branco – PR	04/07	Tomato severe rugose virus - Sumare	97	EU086591
PR-072	S. Gerônimo da Serra – PR	03/08	Tomato severe rugose virus - Sumare	99	EU086591
PR-073	S. Gerônimo da Serra – PR	03/08	Tomato severe rugose virus - Sumare	98	EU086591
PR-079	Reserva – PR	03/08	Tomato severe rugose virus - Sumare	98	EU086591
PR-98	Marilândia do Sul - PR	05/06	Tomato severe rugose virus - Sumare	99	EU086591

Tabela 2 – Resumo geral da diversidade genética de **252** isolados, estirpes e espécies de *Begomovirus* de tomateiro identificados nas principais regiões produtoras do Brasil (cinco regiões, **12** estados e o Distrito Federal).

Região/ Estado	Nº de isolados caracterizados	Espécies virais identificadas e/ou geneticamente mais próximas	Nº de isolados de cada espécie por estado	BLASTn (%)
REGIÃO NORTE				
Estado do		1- <i>Tomato yellow spot virus</i> - Argentina	02	83
Tocantins -	09	2- <i>Sida yellow leaf curl virus</i>	02	83
TO		3- <i>Okra mottle virus</i>	04	83-84
		4- <i>Tomato leaf distortion virus</i>	01	83
REGIÃO NORDESTE				
Bahia – BA	06	1- <i>Okra mottle virus</i>	04	83-84
		2- <i>Tomato leaf distortion virus</i>	02	83
Ceará – CE	12	1- <i>Okra mottle virus</i>	03	83-84
		2- <i>Tomato chlorotic mottle virus</i> – Crumple	01	83
		3- <i>Tomato golden mottle virus</i>	02	82-83
		4- <i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	05	91-100
		5- <i>Tomato severe rugose virus</i> – Sumaré	01	82
Pernambuco – PE	04	1- <i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	01	88
		2- <i>Tomato chlorotic mottle virus</i> – Crumple	01	87
		3- <i>Sida micrantha mosaic virus</i> – [Brazil:okra]	01	97
		4- <i>Tomato severe rugose virus</i> – Sumaré	01	98
REGIÃO SUDESTE				
Minas Gerais – MG	18	1- <i>Tomato rugose mosaic virus</i> -[Ube]	03	90-94
		2- <i>Tomato severe rugose virus</i> – PJU-SP	02	96-99
		3- <i>Tomato severe rugose virus</i> – Petrolina	01	88
		4- <i>Tomato yellow vein streak virus</i>	12	86(1), 94(11)
Espírito Santo – ES	02	1- <i>Tomato common mosaic virus</i>	02	96,97
Rio de Janeiro – RJ	10	1- <i>Tomato common mosaic virus</i>	03	96
		2- <i>Tomato rugose mosaic virus</i> -[Ube]	05	83-89
		3- <i>Sida mottle virus</i> – [Brazil]	02	91-92
São Paulo – SP	15	1- <i>Tomato severe rugose virus</i> - PJU-SP	01	89
		2- <i>Tomato yellow vein streak virus</i>	05	87-96
		3- <i>Tomato severe rugose virus</i> – Sumaré	04	93-99
		4- <i>Tomato leaf distortion virus</i>	01	84
		5- <i>Okra mottle virus</i>	02	84
		6- <i>Tomato golden mottle virus</i>	01	83
		7- <i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>	01	98
REGIÃO CENTRO-OESTE				
Distrito Federal – DF	48	1- <i>Tomato rugose mosaic virus</i> -[Ube]	18	85-97
		2- <i>Tomato yellow vein streak virus</i>	12	85-99
		3- <i>Tomato severe rugose virus</i> – Sumaré	04	84-99
		4- <i>Tomato severe rugose virus</i> – PJU-SP	06	85(1),92-98(5)
		5- <i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	02	94
		6- <i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	04	94-99
		7- <i>Tomato chlorotic vein virus</i>	01	92
		8- <i>Okra mottle virus</i>	01	84

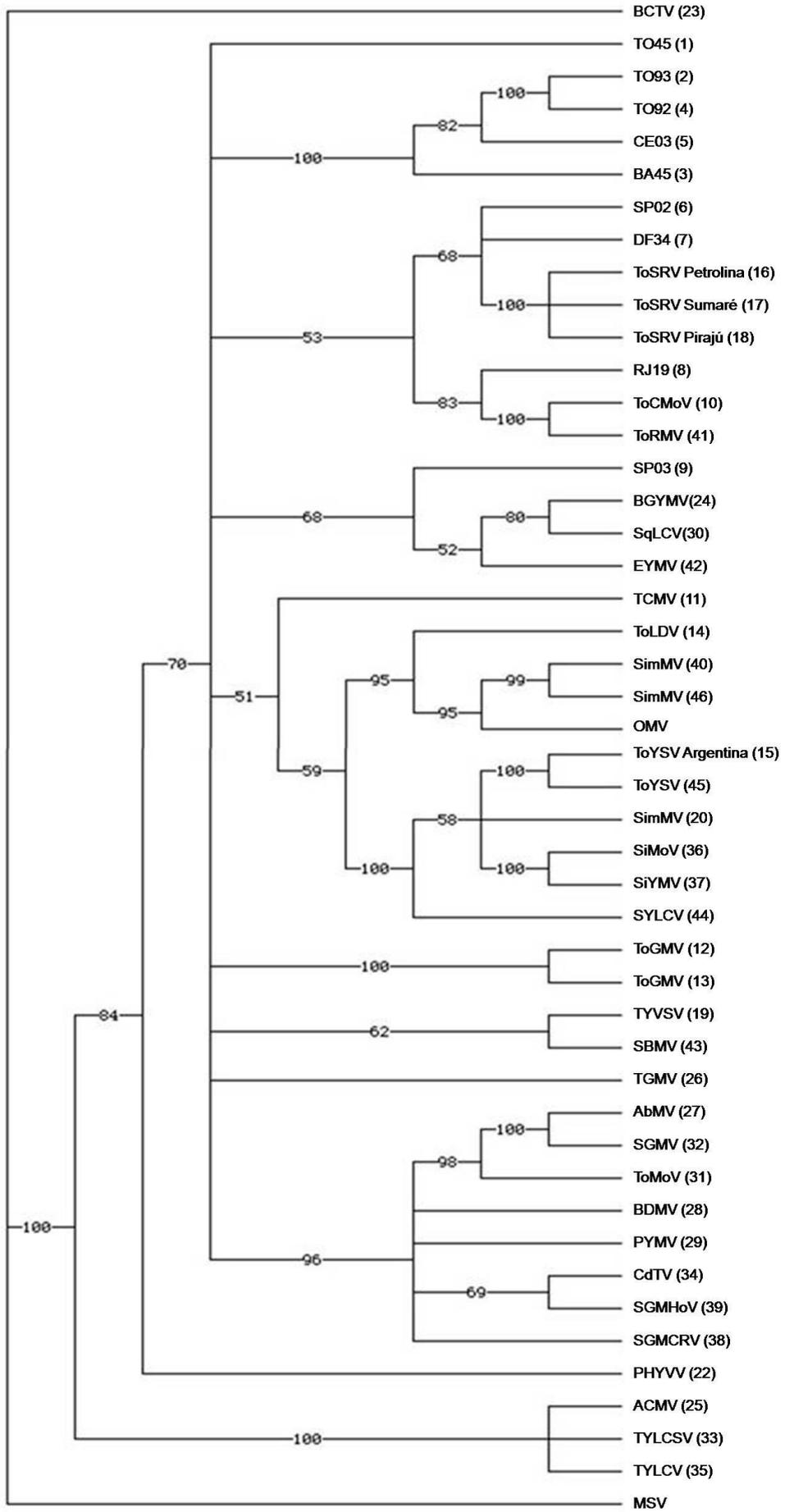
Goiás – GO	68	1- <i>Tomato yellow vein streak virus</i>	26	84-95
		2- <i>Tomato severe rugose virus – PJU-SP</i>	19	<85(2),>90(17)
		3- <i>Tomato rugose mosaic virus-[Ube]</i>	16	<89(6),>91(10)
		4- <i>Bean golden mosaic virus – Brazil</i>	01	92
		5- <i>Tomato severe rugose virus – Petrolina</i>	03	99
		6- <i>Tomato severe rugose virus – Sumaré</i>	02	98,99
		7- <i>Soybean blistering mosaic virus</i>	01	82

REGIÃO SUL

Paraná – PR	19	1- <i>Tomato severe rugose virus – Sumaré</i>	19	97-99
Rio Grande do Sul – RS	23	1- <i>Tomato severe rugose virus – Sumaré</i>	22	98-99
		2- <i>Tomato severe rugose virus – PJU-SP</i>	01	98
Santa Catarina – SC	18	1- <i>Tomato severe rugose virus – Sumaré</i>	18	98-99

Figura 4 – Árvore filogenética baseada em um alinhamento múltiplo de algumas das sequências de cerca de 1100 pares de bases de um segmento do DNA-A flanqueado pelo par de ‘primers’ universais (BegoAFor1 / BegoARev1). Estes ‘primers’ foram desenhados para anelar com regiões conservadas presentes na região 5’-terminus do gene AV1 (CP) e na região 3’-terminus do gene AC1 (Rep). Foram escolhidos nove isolados de tomateiro para análise: **TO-045; TO-092; TO-093; BA-045; CE-003; SP-002; SP-003; DF-034 e RJ-019**. Estes isolados foram escolhidos por apresentarem, em análises via BLASTn, baixa identidade com os *Begomovirus* depositados no GenBank. O alinhamento foi feito pelo método CLUSTAL W do programa Megalign (Lasergene, Madison-WI). A árvore filogenética foi construída usando análise de parcimônia do programa PAUP e a consistência de cada ramo da árvore foi determinada pelo método Bootstrap com 2000 repetições (valores de suporte são indicados em cada ramo da árvore). Os seguintes vírus foram utilizados para comparação com um subgrupo de isolados obtidos no presente levantamento:

AbMV, *Abutilon mosaic virus* (GenBank accession number NC_001928);
ACMV, *African cassava mosaic virus* (NC_001467);
BCTV, *Beet curly top virus* (NC_001412) = outgroup;
BDMV, *Bean dwarf mosaic virus* (NC_001931);
BGYMV, *Bean golden yellow mosaic virus* (NC_001439);
CdTV, *Chino del tomate virus* (NC_003830);
MSV, *Maize streak virus* (NC_001346);
PHYVV, *Pepper huasteco yellow vein virus* (NC_001359);
PYMV, *Potato yellow mosaic virus* (NC_001934);
SGMV, *Sida golden mosaic virus* (NC_002046);
SGMCRV, *Sida golden mosaic Costa Rica virus* (NC_004657);
SGMHoV, *Sida golden mosaic Honduras virus* (NC_004659);
SiMoV, *Sida mottle virus* (NC_004637; isolate A1, AJ557450);
SiYMV, *Sida yellow mosaic virus* (NC_004639);
SimMV, *Sida micrantha mosaic virus* (NC_005330 e AJ557450,);
SqLCV, *Squash leaf curl virus* (NC_001936);
TGMV, *Tomato golden mosaic virus* (NC_001507);
ToCMoV, *Tomato chlorotic mottle virus* (MG-Bt1 e AY090557);
ToSRV, *Tomato severe rugose virus* (Petrolina, DQ207749, Sumaré, EU086591 e Piraju-PJU, FJ 824808);
ToRMV, *Tomato rugose mosaic virus* – [Ube] (AF291705 = NC_002555);
ToMoV, *Tomato mottle virus* (NC_001938);
TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus* (NC_004005);
TYLCSV, *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (NC_003828);
ToGMV, *Tomato golden mottle virus* (AF132852 e DQ520943);
SBMV, *Soybean blistering mosaic virus* isolado NOA (EF016486);
ToYVS, *Tomato yellow vein streak virus* isolado Ba-3 (EF417915);
ToLDV, *Tomato leaf distortion virus* isolado BR:Co3:07 (EU710749);
SYLCV, *Sida yellow leaf curl virus* isolado BR:Co3:07 (EU710750);
TCMV, *Tomato common mosaic virus* isolate BR:Co22:07 (EU710754);
ToYSV, *Tomato yellow spot virus* from Argentina (FJ538207);
EYMV, *Euphorbia yellow mosaic virus* (FJ619507);
SimMV, *Sida micrantha mosaic virus* strain BR:Sag3:Soy:08 (FJ686693);
OMV, *Okra mottle virus* strain BR:Sag8:Soy:08 (FJ686695);
ToYSV, *Tomato yellow spot virus* (NC_007726).



CAPÍTULO 3

Caracterização de variantes de sequência de *Tomato yellow spot virus* infectando *Leonurus sibiricus* (Lamiaceae) no Brasil

Niday Alline N Fernandes^{1,2}; Maria Esther N Fonseca^{1,3}; Antônio F Costa¹; Leonardo S Boiteux^{1,3}

¹Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq)/Embrapa Hortaliças, CP 218, 70359-970, Brasília-DF; ²UnB, Departamento de Fitopatologia, 70910-900, Brasília-DF; ³Bolsista de Produtividade/CNPq. E-mail: boiteux@cnph.embrapa.br.

RESUMO

A planta invasora *Leonurus sibiricus* (família Lamiaceae) é de ocorrência comum nas proximidades ou dentro de lavouras de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) no Paraná. Também é comum, em condições naturais, a presença de plantas *L. sibiricus* com sintomas típicos de begomovirose. Análises para a presença de begomovírus foram conduzidas com 14 amostras (isolados) de folhas de *L. sibiricus* com sintomas coletadas nos municípios de São Gerônimo da Serra, Marilândia do Sul, Barro Branco e Barro Preto nos anos de 2007 e 2008. Segmentos genômicos do DNA-A e DNA-B virais foram amplificados via PCR usando dois pares de ‘primers’ universais. Amplicons foram obtidos para os dois componentes indicando a exclusiva presença de isolados com genoma bipartido. Segmentos de cerca de 1100 pares de bases do DNA-A de 13 isolados foram sequenciados e comparados com genomas de espécies de *Begomovirus* depositados no GenBank utilizando o algoritmo BLASTn. Todos os isolados de *L. sibiricus* apresentaram níveis de identidade elevados (entre 95,1 a 97,1%) com um isolado da espécie *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), observada infectando feijoeiro na Argentina (FJ538207) e tomateiro em Minas Gerais (NC_007726 = DQ336350). Os níveis de identidade entre os isolados *L. sibiricus* e a espécie *Sida mottle virus* (AY09055) variaram entre 90,8 e 91,9%. O nível de identidade entre os isolados de *L. sibiricus* variou de 96,5 e 99,7%. Desta forma, *L. sibiricus* é uma hospedeira de isolados de begomovírus que apresentam estreita relação genética com espécies virais já registradas infectando plantas cultivadas em diferentes regiões produtoras da América do Sul. No entanto, ToYSV não foi detectado, até o presente momento, infectando tomateiro no Sul do Brasil, apesar dos isolados de *L. sibiricus* estarem amplamente disseminados em regiões produtoras de tomate no Estado do Paraná. Desta forma, é possível que as diferenças genéticas observadas entre os isolados de *L. sibiricus* e o

isolado DQ336350 possam explicar a reduzida importância epidemiológica de ToYSV em tomateiros no Estado. A obtenção completa do genoma viral de isolados representativos de ToYSV de *L. sibiricus* e testes de infecção cruzada em diferentes cultivares de tomateiro poderão elucidar esta aparente especificidade hospedeira destes variantes de sequência de ToYSV.

Palavras-chave: rubim, *Begomovirus*, diversidade, PCR.

ABSTRACT

Molecular characterization of *Tomato yellow spot virus* sequence variants infecting *Leonurus sibiricus* (Lamiaceae) in Brazil – *Leonurus sibiricus* is a weed commonly found associated with tomato crops especially in areas with subtropical climate. This weed is also commonly found displaying typical begomovirus symptoms. Molecular analyses were conducted with *L. sibiricus* isolates collected in four counties in Paraná State, Brazil (São Gerônimo da Serra, Marilândia do Sul, Barro Branco, and Barro Preto) during the years 2007 and 2008. Total DNA was extracted from 14 symptomatic samples. DNA-A and DNA-B genomic segments were amplified via PCR employing universal primer pairs targeting conserved begomovirus genomic segments. Positive amplicons were observed for both primer pairs, indicating infection by bipartite begomovirus. Segments of 1100 base pairs of the DNA-A of 13 isolates were sequenced. The results were compared with the begomovirus genomes deposited at the GenBank using the BLASTn algorithm. High identity levels (95.1 to 97.1%) were observed among the *L. sibiricus* isolates and two isolates of *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) [from beans in Argentina (FJ538207) and from tomatoes in Minas Gerais (NC_007726 = DQ336350)]. The identity levels of the *L. sibiricus* isolates with *Sida mottle virus* (AY09055) ranged from 90.8 to 91.9%. The identity levels among *L. sibiricus* isolates were from 96.5 to 99.7%. Therefore, *L. sibiricus* is a natural host of begomovirus isolates displaying close genetic relationship with a viral species reported infecting two cultivated plants in South America. However, ToYSV isolates were not detected so far infecting tomatoes in South Brazil. It is possible that the genetic differences observed among ToYSV isolates from *L. sibiricus* when compared with the original tomato isolate (NC_007726) might explain the almost nil epidemiological importance of ToYSV on tomatoes in the Paraná State. The complete genome characterization of representative ToYSV isolates from *L. sibiricus* and cross-

infectivity tests in distinct tomato cultivars might clarify the apparent host-specific behavior of these sequence variants.

Keywords: *Leonurus*, *Begomovirus*, diversity, PCR.

INTRODUÇÃO

Um complexo de espécies de *Begomovirus* foi identificado causando severas perdas econômicas no tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) no Brasil após a introdução no país de *Bemisia tabaci* biótipo B no início da década de 1990 (Ribeiro *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 2003), fato que não ocorria no período anterior, quando o biótipo A predominava no país (Costa, 1976). Análise mais detalhadas da estrutura do genoma das espécies reportadas infectando o tomateiro após 1990 revelou um elevado grau de relacionamento genético com as espécies de *Begomovirus* registradas em ervas daninhas, reforçando a hipótese da transferência natural de segmentos genômicos de espécies virais originalmente presentes nestas diferentes plantas hospedeiras (Ambrozevícius *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007). Muitas plantas invasoras ou daninhas são perenes ou semi-perenes, podendo manter populações virais entre as estações de cultivo, representado, neste aspecto, um importante fator que pode levar ao surgimento e/ou manutenção de espécies virais e servir como sítios de geração de novos recombinantes (Ambrozevícius *et al.*, 2002).

Os primeiros registros da infecção de *Begomovirus* em plantas daninhas e em plantas nativas da flora brasileira datam do final da década de 1940 e início da década de 1950 (Costa, 1955; Costa & Bennett, 1950). A planta invasora *Leonurus sibiricus* (família Lamiaceae = Labiata), popularmente conhecida como “rubim”, apresenta ampla distribuição geográfica e ocorrência comum nas proximidades ou dentro de lavouras de tomateiro em áreas de clima subtropical no Brasil. É também comum a presença de *L. sibiricus* exibindo sintomas típicos de begomovirose, doença descrita no Brasil desde as décadas de 1950/1960 (Flores & Silberschmidt, 1965). Os principais sintomas de infecção por *Begomovirus* em *L. sibiricus* são mosaico dourado, áreas cloróticas e nanismo. *Leonurus mosaic virus* – LeMV (GenBank LMU92532) é, até o presente momento, a única espécie de *Begomovirus* formalmente registrada nesta hospedeira no Brasil (Faria & Maxwell, 1999; Colariccio *et al.*, 2007). Na Argentina, um vírus com alta identidade com *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) e *Sida mottle virus* (SiMoV) foi detectado infectando feijão, soja e também *L. sibiricus* (Rodriguez Pardina *et al.*, 2006).

Levantamentos extensivos sobre a diversidade das espécies de virais infectando *L. sibiricus* em condições naturais ainda são escassos no Brasil. O objetivo deste trabalho foi caracterizar (via sequenciamento) segmentos do DNA-A e do DNA-B de isolados de *Begomovirus* infectando naturalmente plantas de *L. sibiricus* presentes em campos de cultivo de tomate no Estado do Paraná.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados virais – Análises foram conduzidas com 14 amostras (isolados) de plantas de *L. sibiricus* com sintomas de mosaico dourado, áreas cloróticas e nanismo (**Figura 1**). As coletas foram feitas entre e/ou próximas de plantios comerciais de tomateiro nos municípios de São Gerônimo da Serra, Marilândia do Sul, Barro Branco e Barro Preto nos anos de 2007 e 2008.

Purificação e estimativa da concentração do DNA total de tecidos infectados – A purificação de DNA total de tecido de tomate foi feita usando o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) seguindo o protocolo padrão de com algumas adaptações implementadas por Boiteux *et al.* (1999). A concentração do DNA purificado foi estimada em gel de agarose 1% (p/v) a partir de uma solução do marcador de quantidade contendo o fago λ (lambda) na concentração de 10 ng/ μ L. Todos os materiais foram diluídos para a concentração final de 20 ng/ μ L em TE (Tris 0,01M; EDTA 0,001M; pH 7,0).

Amplificação via PCR de segmentos genômicos dos DNA-A e DNA-B dos isolados virais – Segmentos dos DNA-A e DNA-B viral foram amplificados via reação em cadeia da polimerase ou “Polymerase chain reaction” (PCR). A PCR foi realizada em termocicladores do tipo *PCR System 9700* (Applied Biosystems). Os reagentes usados na mistura de 20 μ L foram: 2 μ L de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 1,2 μ L MgCl₂ 50mM; 2 μ L dNTPs (2,5 μ M cada); 0,5 μ L de cada primer (10 μ M cada); 0,32 μ L *Taq* DNA Polymerase (5u/ μ l), todos da *Invitrogen*[®] *Life Technologies*; 2 μ L de DNA molde (20 μ g/ μ L) e 11,48 μ L de água MilliQ. Os pares de ‘primers’ universais utilizados foram: ‘BegoAFor1’ / ‘BegoAREv1’ (Figura 2) para um segmento do DNA-A (Ha *et al.*, 2006) e ‘PBL1v2040’ / ‘PCRC1’ (Figura 3) para um segmento do

DNA-B (Rojas *et al.*, 1993). O perfil de amplificação consistiu de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 4 minutos, anelamento dos ‘primers’ a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos, terminando em 7 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação (amplicons) foram analisados em géis de agarose 1% (p/v), corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta (Ambrozevicius *et al.*, 2002).

Reações de sequenciamento dos amplicons obtidos – Os amplicons foram separados em eletroforese e diretamente sequenciados. O sequenciamento foi realizado em um sequenciador ABI PRISM 3100 da Embrapa Hortaliças (CNPq), utilizando o *kit ABI Prism BigDye® Version 3.0 Chemistry* (Applied Biosystems). Os iniciadores de síntese “1” senso e “1R” anti-senso, foram utilizados individualmente na amplificação de cada amostra, a fim de obter, através do consenso, um fragmento de maior tamanho possível.

Análise das sequências – As sequências correspondentes ao fragmento do genoma dos diferentes isolados virais de *L. sibiricus* foram obtidas a partir do consenso dos fragmentos sequenciados com os iniciadores senso e anti senso utilizando-se o programa *SeqMan (Lasergene)®* DNASTAR e as sequências de baixa qualidade foram removidas (Allex, 1999). As sequências editadas foram inicialmente analisadas para níveis de identidade com as disponíveis no banco de dados do GenBank usando o algoritmo BLASTn disponível no site do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). As identidades nucleotídicas foram calculadas usando o algoritmo ‘CLUSTAL W’, com o programa ‘MegAlign’ (*Lasergene*)® DNASTAR (Madison, WI). O alinhamento das sequências foi realizado por meio do *software Megalign (Lasergene)®* DNASTAR (Madison, WI), utilizando-se o método ‘CLUSTAL W’ com as seguintes condições: ‘gap penalty’ e ‘gap length penalty’ = 10. Matrizes de similaridade genética foi obtida entre os isolados virais utilizando-se a informação de uma sequência comum de cerca de 1070 pares de base de um segmento do DNA-A amplificado com o par de ‘primers’ BegoAFor1/BegoARev1 (Ha *et al.*, 2006) e a informação da sequência de cerca de 550 pares de base correspondendo a região amplificada pelo par de ‘primers’ PBL1v2040/PCRC1 (Rojas *et al.* 1993).

Análise filogenética – Uma árvore filogenética foi construída (programa Clustal-W Megalign/ Lasergene) utilizando-se a informação de uma sequência comum de um

segmento do DNA-A e um segmento do DNA-B. Os isolados obtidos de plantas de *Leonurus sibiricus* foram comparados entre si e com isolados de *Tomato yellow spot virus* – ToYSV (GenBank **FJ538207**) registrado em feijoeiro na Argentina; isolado ToYSV (NC_007726 = **DQ336350**), originalmente descrito em tomateiro em Minas Gerais; um isolado de *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (**EU908733**) e um isolado de *Sida mottle virus* (SiMoV) (**AY090555**).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O par de ‘primers’ universais (BegoAFor1 / BegoARev1) foi utilizado para amplificar um segmento do DNA-A. Estes ‘primers’ foram desenhados para anelar com regiões conservadas presentes na região 5’-terminal do gene AV1 (CP) e na região do 3’-terminal do gene AC1 (Rep) (**Figura 2**). A análise de sequência com BLASTn deste segmento obtido de 12 isolados de “rubim” (*L. sibiricus*) (**Tabela 1**), coletados no Paraná-PR, indicou níveis de identidade que variaram entre 96 e 97% com um segmento do DNA-A correspondendo a capa protéica do *Tomato yellow spot virus* (DQ336350), reportado originalmente em plantas de tomateiro em São Joaquim de Bicas – MG (Andrade *et al.*, 2006), enquanto que um isolado (PR-015) indicou níveis de identidade de 96% com um segmento do DNA-A correspondendo a uma estirpe da Argentina de *Tomato yellow spot virus* (FJ538207), registrado infectando feijão comum (Rodriguez-Pardina *et al.*, 2006). Na Argentina, um vírus com alta identidade com *Sida mottle virus* (SiMoV) e com o isolado FJ538207 foi detectado infectando soja e também *L. sibiricus* (Rodriguez-Pardina *et al.*, 2006). *Leonurus mosaic virus* (LeMV) (GenBank LMU92532), a única espécie de *Begomovirus* formalmente registrada em *L. sibiricus* no Brasil (Faria & Maxwell, 1999; Colariccio *et al.*, 2007), não foi detectada nesta amostragem. Todas as 11 sequências de DNA-B analisadas (**Tabela 2**) indicaram níveis de identidade com um segmento do DNA-B de ToYSV (DQ336351), registrado em plantas de tomateiro em São Joaquim de Bicas – MG (Andrade *et al.*, 2006), sendo que oito isolados indicaram níveis de identidade variando entre 86 e 88% e os outros dois isolados (PR-033 e PR-088) indicaram níveis de identidade de 90 e 92%, respectivamente.

Um segmento genômico de 1064 pares de base do DNA-A e um segmento genômico de 500 pares de base do DNA-B (ambos de alta qualidade) foram obtidos para um subgrupo de isolados virais. Em termos de amostragem de diversidade, a região

do genoma flanqueada pelos ‘primers’ BegoAFor1/BegoARev1 é bastante informativa, sendo utilizada na identificação provisória de novas espécies de *Begomovirus* (Padidam *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001). Uma matriz de similaridade genética (**Figura 4**) foi obtida entre os isolados virais utilizando-se a informação de uma sequência comum de cerca de 1070 pares de base de um segmento do DNA-A amplificado com o par de ‘primers’ BegoAFor1/BegoARev1 (Ha *et al.*, 2006). Dez isolados de *Begomovirus* obtidos de plantas de *L. sibiricus* (PR-012, PR-013, PR-014, PR-028, PR-029, PR-033, PR-034, PR-035, PR-049 e PR-087) foram comparados entre si e com isolados de ToYSV (GenBank FJ538207) registrado em feijoeiro na Argentina, com um isolado ToYSV (DQ336350), originalmente descrito em tomateiro em Minas Gerais; e com isolados de *Sida micrantha mosaic virus* (EU908733) e de *Sida mottle virus* (SiMoV) (AY09055). Os resultados indicaram níveis de identidade entre os isolados de *L. sibiricus* e variaram entre 95,1 a 96,3% com FJ538207; entre 83,0 a 84,2% com EU908733; entre 95,6 a 97,1% com DQ336350 e entre 90,8 a 91,9% com AY09055 (**Figura 4**). A variabilidade entre pares de isolados de *L. sibiricus* variou de 96,5 (PR-028/PR-028) e 99,7% (entre PR-14/PR-12; PR-14/PR-029 e PR-014/PR-028). Na região do genoma viral analisada os isolados DQ336350 e AY09055 apresentaram 90,7% de identidade; FJ538207 e AY09055 apresentaram 91,2%, ao passo que os dois isolados de ToYSV (DQ336350 e FJ538207) apresentaram identidades de 94,6%. A maior divergência (84%) foi observada entre os isolados FJ538207 e EU908733. A identidade entre DQ336350 e EU908733 foi de 83,5%. Os isolados obtidos de plantas do gênero *Sida* (AY09055 e EU908733) apresentaram 85,3% de identidade. Estes resultados estão ilustrados na árvore filogenética, onde foi observado um agrupamento de isolados de *L. sibiricus* de acordo com o local de coleta (**Figura 5**). Resultados similares foram observados na análise conduzida com um segmento do DNA-B (**Figuras 6 e 7**). As diferenças genéticas entre isolados obtidos de *L. sibiricus* e entre os isolados de ToYSV (FJ538207 e DQ336350) e as espécies de *Sida* (EU908733 e AY09055) foram observadas ao longo de toda a sequência que representa CP/AC5 até o nucleotídeo 985 se estendendo até o nucleotídeo 1540 (corresponde as ORFs AC1/AC2) (**Figura 8**).

Novos critérios taxonômicos foram recentemente propostos para demarcar o status de isolados de *Begomovirus*. Quando o nível de identidade entre duas sequências for inferior a 88%, os isolados em questão pertencem a espécies diferentes. Se o alinhamento apresentar níveis de identidade entre 88 ou 89%, os isolados pertencem tentativamente à espécie mais relacionada (Fauquet *et al.*, 2008). Com relação à

classificação ao nível intra-espécifico a identidade de sequência abaixo de 93% caracteriza uma nova estirpe ('strain') dentro da espécie, enquanto níveis de identidade acima de 94% caracterizam uma variante de sequência daquela estirpe (Fauquet *et al.*, 2008). Os resultados obtidos indicaram níveis de identidade entre os isolados de *L. sibiricus* e isolados da espécie ToYSV (FJ538207 e DQ336350) variando entre 95,1 e 97,1%. Desta forma, de acordo com este recente guia de nomenclatura de *Begomovirus*, todos estes isolados de *L. sibiricus* representam variantes de sequência da espécie ToYSV. No entanto, os isolados *L. sibiricus* podem também ser classificados como estirpes de *Sida mottle virus* (SiMoV) (AY09055), uma vez que os níveis de identidade observados com esta espécie viral variaram entre 90,8 a 91,9%. Nesta situação de aparente sobreposição, apenas o sequenciamento completo do componente DNA-A poderá esclarecer, de maneira definitiva, este dúbio status taxonômico.

O ToYSV foi uma espécie que despertou interesse inicial devido aos intensos sintomas induzidos nas plantas de tomateiro infectadas, sendo caracterizados por um mosaico amarelado intenso, enrolamento e redução da área dos folíolos e nanismo (Andrade *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007). Nosso trabalho confirma que a espécie ToYSV é filogeneticamente relacionada ao *Sida mottle virus* (SiMoV), que infecta espécies de *Sida* (Malvaceae). O círculo de hospedeiras do isolado de ToYSV de tomate (São Joaquim de Bicas – MG) foi determinado experimentalmente (via transmissão mecânica e/ou biolística). O vírus foi transmitido via biolística para *S. lycopersium* 'Miller Early Pack', 'Rutgers' e 'Santa Clara', mas não foi observada a transmissão mecânica para esta hospedeira (Calegario *et al.*, 2007). Além disso, ToYSV pode infectar plantas da família Amaranthaceae (*Gomphrena globosa*) e da família Solanaceae (*Capsicum annuum* 'Ikeda', *Datura stramonium*, *S. lycopersium* 'Miller Early Pack', 'Rutgers' e 'Santa Clara', *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandi*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. tabacum* e *N. glauca*) (Calegario *et al.*, 2007). No entanto, é interessante mencionar que, em condições naturais, a espécie ToYSV tem sido registrada infectando tomateiro apenas endemicamente em MG (Andrade *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007). De fato, levantamentos sistemáticos (feitos antes e após a caracterização de ToYSV) têm demonstrado que este vírus apresenta ocorrência esporádica em tomateiro, não sendo encontrado um isolado sequer nos Estados do ES, SP, DF, GO, PE, RN, BA e RJ e mesmo em diversas regiões produtoras de tomate no Estado de MG (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.* 2003; Inoue-Nagata *et al.*, 2006; Cotrim *et al.*, 2007; Castillo-Urquiza, 2008; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008;

Fernandes *et al.*, 2008). Nesta dissertação, nenhum isolado de ToYSV foi detectado entre os 252 isolados caracterizados infectando tomateiro no país, incluindo a região Sul do Brasil, onde apenas estirpes e variantes de sequência de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) foram encontradas (**ver capítulo 2**).

Um enigma do ponto de vista epidemiológico, e que ainda necessita ser elucidado, é o fato de que amostras das variantes de sequência do ToYSV de *L. sibiricus* foram todas coletadas nas vizinhanças e/ou dentro de lavouras de tomateiro em diferentes regiões produtoras do Estado do Paraná. Desta forma, a espécie ToYSV está disseminada em plantas de *L. sibiricus* por diferentes regiões, englobando os municípios de São Gerônimo da Serra, Marilândia, Barro Branco e Barro Preto, que são áreas de intensivo cultivo do tomateiro. Estes resultados sugerem que o tomateiro represente uma hospedeira alternativa e esporádica do ToYSV, embora tenha sido descrito originalmente nesta hortaliça, onde grande esforços de caracterização de espécies virais tem sido conduzidos (Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2008). O mesmo raciocínio pode ser, provavelmente estendido para o caso do isolado de ToYSV originalmente registrado em feijoeiro na Argentina (FJ538207). No entanto, é importante realçar que não foi detectado em *L. sibiricus* nenhum isolado com sequência idêntica aos dois isolados de ToYSV descritos anteriormente em feijão e tomateiro (FJ538207 e DQ336350). Desta forma, é possível que estas (ou outras) diferenças genéticas observadas entre os isolados de *L. sibiricus* do Paraná e os isolados FJ538207 e DQ336350 (**Figura 8**) possam explicar a ausência de relatos de epidemias deste vírus em tomateiros no Estado. A presença maciça de plantas de *L. sibiricus* exibindo sintomas de infecção por ToYSV poderia assegurar uma permanente fonte de inóculo para tomateiro na região, aumentando a frequência de infecções por este patógeno, fato este que não tem sido observado em condições naturais. A obtenção completa do genoma viral de isolados representativos de *L. sibiricus* e testes de infecção cruzada com diferentes cultivares de tomateiro poderão elucidar a aparente especificidade hospedeira mostrada por estas variantes de sequência de ToYSV.

Figura 1 – Plantas de *Leonurus sibiricus* coletadas ao lado de um campo de produção de tomateiro em Marilândia do Sul (PR) exibindo sintomas típicos de infecção por espécies de *Begomovirus*.



Tabela 1 – Lista de 13 isolados de *Begomovirus* obtidos de plantas de *Leonurus sibiricus* [local e data de coleta (mês/ano), espécie viral, nível de identidade BLASTn (%) e número de acesso no GenBank] que foram caracterizados para um segmento em torno de 1070 pares da base do DNA-A e seus níveis de identidade com espécies virais cujas sequências foram depositadas no GenBank.

Código Isolado	Local da Coleta	Data de coleta	Espécie Viral	BLASTn (%)	Acesso GenBank
PR-012	São Gerônimo da Serra – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	96	DQ336350
PR-013	São Gerônimo da Serra – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	96	DQ336350
PR-014	São Gerônimo da Serra – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	96	DQ336350
PR-015	São Gerônimo da Serra – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus – Arg.</i>	96	FJ538207
PR-028	Marilândia – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	96	DQ336350
PR-029	Marilândia – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	97	DQ336350
PR-033	Marilândia – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	96	DQ336350
PR-034	Barro Branco – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	96	DQ336350
PR-035	Barro Branco – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	96	DQ336350
PR-042	Barro Preto – PR	04/2007	NÃO SEQUENCIADO	--	--
PR-048	Marilândia – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	97	DQ336350
PR-049	Marilândia – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	97	DQ336350
PR-087	São Gerônimo da Serra – PR	03/2008	<i>Tomato yellow spot virus</i>	96	DQ336350
PR-088	São Gerônimo da Serra – PR	03/2008	<i>Tomato yellow spot virus</i>	97	DQ336350

Tabela 2 – Lista de 10 isolados de *Begomovirus* obtidos de plantas de *Leonurus sibiricus* [local, data de coleta (mês/ano), espécie viral, nível de identidade BLASTn e número de acesso no GenBank] que foram caracterizados para um segmento de cerca de 500 pares da base do DNA-B e seus níveis de identidade com espécies virais cujas sequências foram depositadas no GenBank.

Código Isolado	Local da Coleta	Data da coleta	Espécie Viral	BLASTn (%)	Acesso GenBank
PR-012	São Gerônimo da Serra – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	88	DQ336351
PR-013	São Gerônimo da Serra – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	88	DQ336351
PR-014	São Gerônimo da Serra – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	88	DQ336351
PR-015	São Gerônimo da Serra – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	86	DQ336351
PR-028	Marilândia – PR	04/2007	NÃO SEQUENCIADO	---	---
PR-029	Marilândia – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	87	DQ336351
PR-033	Marilândia – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	90	DQ336351
PR-034	Barro Branco – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	87	DQ336351
PR-035	Barro Branco – PR	04/2007	NÃO SEQUENCIADO	---	---
PR-042	Barro Preto – PR	04/2007	NÃO SEQUENCIADO	---	---
PR-048	Marilândia – PR	04/2007	NÃO SEQUENCIADO	---	---
PR-049	Marilândia – PR	04/2007	<i>Tomato yellow spot virus</i>	86	DQ336351
PR-087	São Gerônimo da Serra – PR	03/2008	<i>Tomato yellow spot virus</i>	87	DQ336351
PR-088	São Gerônimo da Serra – PR	03/2008	<i>Tomato yellow spot virus</i>	92	DQ336351

Figura 2 – Diagrama do DNA-A linearizado de espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido. A régua indica a ordem numérica dos nucleotídeos compreendidos entre a origem de replicação e o final do genoma viral. As ORFs AV1 (CP), AC1, AC2, AC3 e AC4 estão representadas por barras vermelhas. As barras em azul representam as regiões amplificadas por três pares de ‘primers’ universais: PALv1978/PARc496 – PALPAR (Rojas *et al.* 1993); região ‘Core CP’ englobando um segmento do gene codificador da capa protéica que é amplificada pelo par de ‘primers’ AV494/AC1048 (Brown *et al.*, 2001) e o segmento genômico analisado (SGA) no presente trabalho correspondendo a região amplificada pelos ‘primers’ BegoAFor1/BegoARev1 (Ha *et al.*, 2006). O bloco RIG representa a região intergênica que contém a região comum.

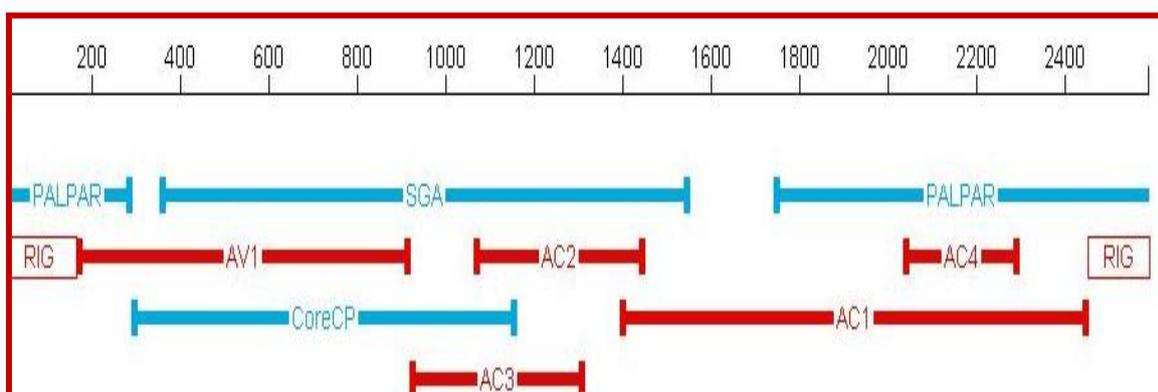


Figura 3 – Diagrama do DNA-B linearizado de espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido. A régua indica a ordem numérica dos nucleotídeos compreendidos entre a origem de replicação e o final do genoma viral. As ORFs BV1 e BC1 estão representadas por barras vermelhas. As barras em azul representam a região amplificada pelo par de ‘primers’ universais: PBL1v2040/PCRC1– PBLPCR (Rojas *et al.* 1993). A região PBLPCR foi caracterizada via sequenciamento no presente trabalho. O bloco ‘Intergenic’ representa a região intergênica que contém a região comum.

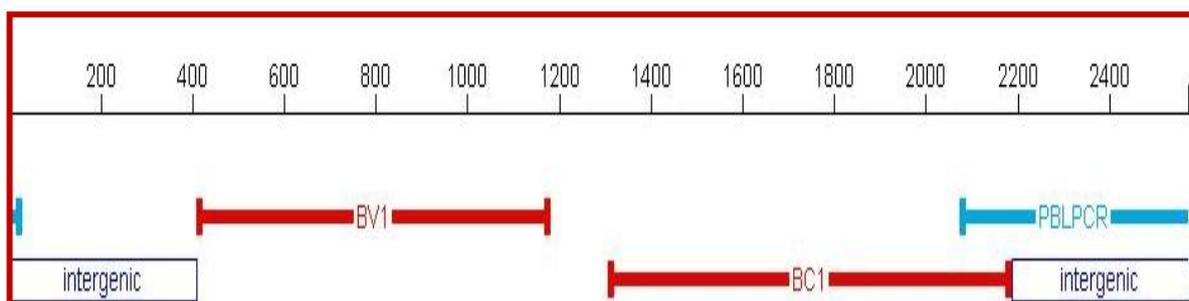


Figura 4 – Matriz de identidade genética obtida entre os isolados virais utilizando-se a informação de uma sequência comum de cerca de 1070 pares de base de um segmento do DNA-A amplificado com o par de ‘primers’ BegoAFor1/BegoARev1 (Ha *et al.*, 2006). Dez isolados de *Begomovirus* obtidos de plantas de *Leonurus sibiricus* (PR-012, PR-013, PR-014, PR-028, PR-029, PR-033, PR-034, PR-035, PR-049 e PR-087) foram comparados entre si e com isolados de *Tomato yellow spot virus* – ToYSV (GenBank FJ538207) registrado em feijoeiro na Argentina; isolado ToYSV (NC_007726 = DQ336350), originalmente descrito em tomateiro em Minas Gerais; um isolado de *Sida micrantha mosaic virus* (EU908733) e um isolado de *Sida mottle virus* (SiMoV) (AY090555). A fração acima da diagonal superior representa a percentagem de identidade entre os isolados. A fração abaixo da diagonal representa a percentagem de divergência.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
1	■	99.7	97.9	98.5	99.4	98.5	98.0	98.3	99.3	99.2	96.0	83.6	96.8	91.6	1	PR12
2	0.3	■	98.1	98.8	99.7	98.8	98.3	98.6	99.6	99.4	96.3	83.8	97.1	91.9	2	PR14
3	1.7	1.4	■	97.2	98.0	97.2	96.5	97.0	97.9	97.8	95.4	83.5	96.4	91.1	3	PR13
4	1.4	1.1	2.2	■	99.0	98.3	97.6	97.8	98.5	99.0	96.0	83.7	96.3	91.9	4	PR34
5	0.6	0.3	1.5	1.1	■	98.6	98.6	98.7	99.7	99.5	96.2	84.2	97.1	91.9	5	PR29
6	1.0	0.8	1.8	1.2	0.8	■	97.1	97.5	98.5	98.8	95.8	83.5	96.4	91.2	6	PR33
7	1.0	0.8	2.0	1.6	0.5	1.3	■	97.1	98.5	98.1	94.8	83.1	95.6	90.8	7	PR28
8	0.8	0.5	1.5	1.3	0.4	1.0	0.8	■	98.4	98.4	95.1	83.0	96.0	90.8	8	PR35
9	0.7	0.4	1.6	1.2	0.3	0.9	0.6	0.7	■	99.3	96.1	83.7	96.9	91.5	9	PR49
10	0.8	0.6	1.8	1.1	0.5	0.8	0.9	0.7	0.8	■	95.9	83.7	96.7	91.6	10	PR87
11	3.9	3.6	4.1	3.8	3.7	3.6	4.2	3.9	3.8	4.0	■	84.0	94.6	91.2	11	FJ538207
12	16.6	16.2	16.2	16.3	15.9	16.0	16.2	16.2	16.2	16.3	15.9	■	83.5	85.3	12	EU908733
13	3.1	2.8	3.1	3.6	2.8	3.0	3.3	3.1	2.9	3.2	5.1	16.1	■	90.7	13	NC007726
14	8.0	7.7	8.1	7.7	7.7	7.9	7.9	7.7	7.9	8.0	8.3	14.6	8.7	■	14	AY090555
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		

Figura 5 – Arvore filogenética utilizando o programa CLUSTAL-W (Megalign/Lasergene) obtida entre os isolados virais utilizando-se a informação de uma sequência comum de cerca de 1070 pares de base de um segmento do DNA-A amplificado com o par de ‘primers’ BegoAFor1/BegoARev1 (Ha *et al.*, 2006). Dez isolados de *Begomovirus* obtidos de plantas de *Leonurus sibiricus* (PR-012, PR-013, PR-014, PR-034, PR-029, PR-033, PR-028, PR-035, PR-049 e PR-087) foram comparados entre si e com isolados de *Tomato yellow spot virus* – ToYSV (GenBank **FJ538207**) registrado em feijoeiro na Argentina; isolado ToYSV (NC_007726 = **DQ336350**), originalmente descrito em tomateiro em Minas Gerais; um isolado de *Sida micrantha mosaic vírus* (SimMV) (**EU908733**) e um isolado de *Sida mottle virus* (SiMoV) (**AY090555**). A barra abaixo indica o número de substituições observadas nas diferentes sequências.

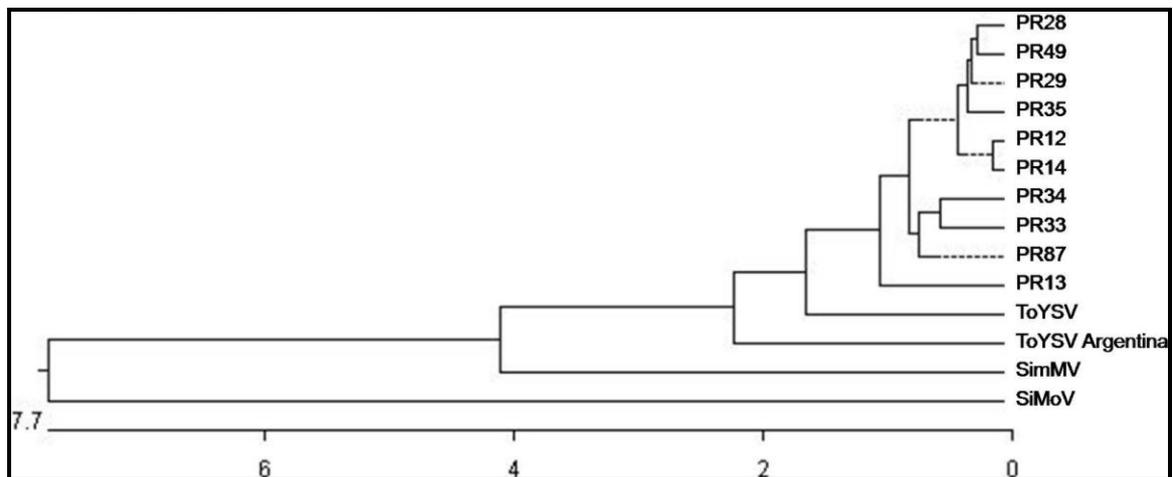


Figura 6 – Matriz de identidade genética obtida entre os isolados virais utilizando-se a informação de uma sequência comum de cerca de 550 pares de base de um segmento do **DNA-B** amplificado com o par de ‘primers’ universais: PBL1v2040/PCRC1– PBLPCR (Rojas *et al.*, 1993). Dez isolados de *Begomovirus* obtidos de plantas de *Leonurus sibiricus* (PR-012, PR-013, PR-014, PR-029, PR-033, PR-034, PR-049, PR-087 e PR-088) foram comparados entre si e com isolados de *Sida micrantha mosaic virus* (GenBank **FN557523**) e o isolado *Tomato yellow spot virus* (NC_007726 = **DQ336350**) reportado em tomateiro em Minas Gerais, Brasil. A fração acima da diagonal superior representa a percentagem de identidade entre os isolados. A fração abaixo da diagonal representa a percentagem de divergência.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	■	92.2	98.1	89.9	91.8	91.8	93.2	90.3	92.9	93.3	87.8	86.1	1	PR12
2	7.5	■	90.3	94.4	97.8	94.0	88.0	95.5	98.1	89.9	86.6	85.8	2	PR13
3	0.0	7.5	■	87.7	89.9	89.6	91.4	90.0	91.0	91.1	85.8	84.3	3	PR14
4	7.9	3.8	7.9	■	94.0	90.7	85.3	92.2	95.5	87.7	83.9	82.8	4	PR15
5	7.5	1.9	7.5	4.2	■	94.4	90.2	97.0	97.8	90.3	86.6	85.8	5	PR29
6	5.5	4.2	5.5	5.0	3.5	■	88.0	91.1	94.8	92.0	88.2	87.3	6	PR33
7	5.1	9.7	5.1	11.0	8.4	7.2	■	88.0	88.7	88.0	84.3	82.0	7	PR34
8	7.1	2.3	7.1	4.6	1.1	4.6	8.9	■	95.5	88.5	84.3	84.3	8	PR49
9	6.7	1.9	6.7	2.7	2.3	3.1	8.9	2.7	■	91.0	87.4	86.1	9	PR87
10	4.6	7.9	4.6	7.9	7.5	5.9	8.0	7.1	6.7	■	87.0	86.5	10	PR88
11	9.0	10.7	9.0	11.7	10.7	8.9	10.5	11.2	9.8	8.5	■	82.7	11	FN557523
12	8.5	10.2	8.5	11.5	9.8	8.4	10.8	9.3	9.8	8.1	11.9	■	12	NC007727
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

Figura 7 – Arvore filogenética utilizando o programa CLUSTAL-W (Megalign / Lasergene) obtida utilizando-se a informação de uma sequência comum de cerca de 500 pares de base de um segmento do DNA-B amplificado com o par de ‘primers’ universais: PBL1v2040/PCRC1– PBLPCR (Rojas *et al.* 1993). Dez isolados de *Begomovirus* obtidos de plantas de *Leonurus sibiricus* (PR-12, PR-13, PR-14, PR-29, PR-33, PR-34, PR-49, PR-87 e PR-88) foram comparados entre si e com isolados de *Sida micrantha mosaic virus* (GenBank **FN557523**) e *Tomato yellow spot virus* (NC_007727 = **DQ336350**) reportado em tomateiro em Minas Gerais, Brasil. A barra abaixo indica o número de substituições verificadas nas diferentes sequências.

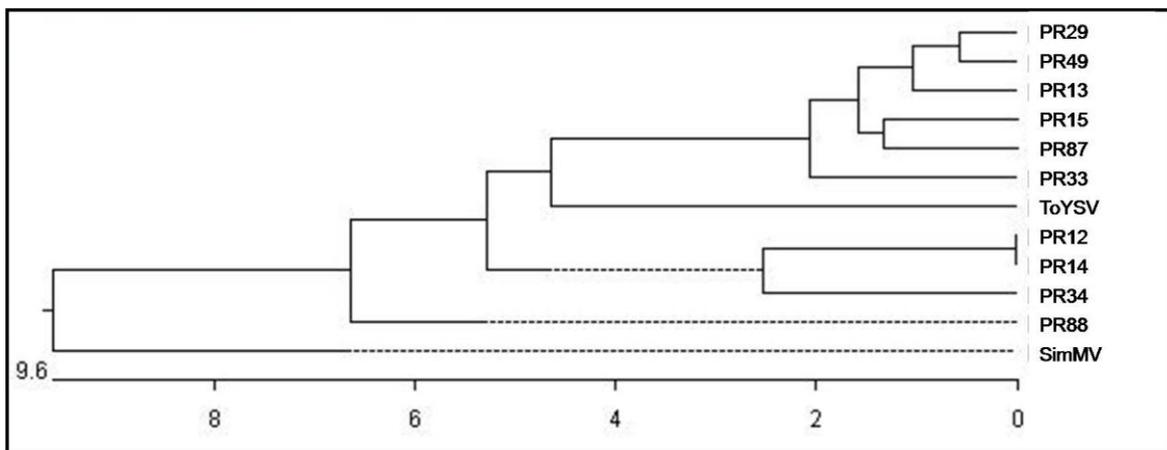
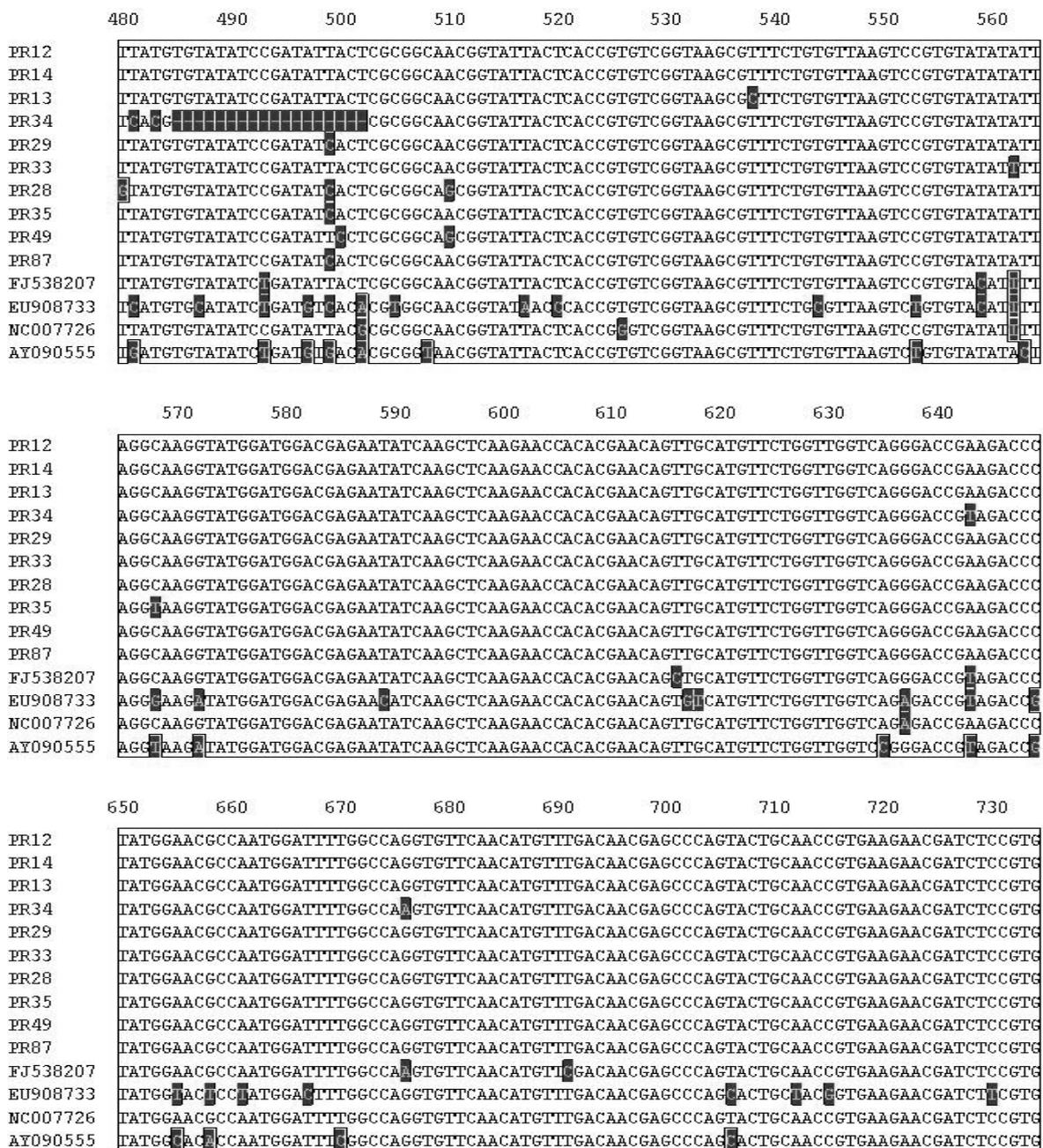


Figura 8 – Alinhamento de uma sequência comum de cerca de 1070 pares de base de um segmento do DNA-A amplificado com o par de ‘primers’ BegoAFor1/BegoARev1 (Ha *et al.*, 2006) de quatro isolados de *Begomovirus* de *Leonurus sibiricus* (PR-012, PR-013, PR-014, PR-034, PR-029, PR-033, PR-028, PR-035, PR-049 e PR-087) usando o algoritmo CLUSTAL W (Megalign program-Lasergene). Os isolados foram comparados entre si e com isolados de *Tomato yellow spot virus* – ToYSV (GenBank **FJ538207**) registrado em feijoeiro em Argentina; um isolado de ToYSV (**DQ336350**), descrito em tomateiro em Minas Gerais e com isolados de *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (**EU908733**) e *Sida mottle virus* (SiMoV) (**AY090555**).



CAPÍTULO 4

Caracterização de um complexo de espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido infectando plantas do gênero *Cleome* (Capparaceae) no Brasil.

Niday Alline N Fernandes^{1,2}; Maria Esther de N Fonseca¹; Grin M Costa³; Antonio F Costa¹; William P Dutra¹; Artur F Lima-Neto³; Leonardo S Boiteux^{1,2}

¹Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq); Embrapa Hortaliças, CP 218, 70359-970 Brasília – DF; ²Universidade de Brasília (UnB), Departamento de Fitopatologia, 70910-900, Brasília-DF; ³Faculdade de Guaraí (FAG), Av. JK 2541, Setor Universitário, 77700-000 Guaraí, Estado do Tocantins – TO. E-mail: boiteux@cnph.embrapa.br.

RESUMO

Um complexo de espécies de *Begomovirus* foi identificado em tomateiro no Brasil após a introdução no país de *Bemisia tabaci* biótipo B. Análises genômicas revelaram um elevado grau de relacionamento genético entre algumas espécies de *Begomovirus* reportadas em tomateiro e em ervas daninhas frequentemente associadas com o cultivo desta hortaliça. Estas observações indicam uma provável transferência natural de material genético entre espécies virais destes dois grupos de plantas hospedeiras. O gênero *Cleome* apresenta diversas espécies endêmicas de regiões de clima quente no Brasil, sendo que, comumente, apresenta plantas com sintomas de infecção por *Begomovirus*. No entanto, não existem amostragens extensivas da diversidade de *Begomovirus* infectando plantas do gênero *Cleome* no Brasil. Amostras foliares de plantas de *Cleome* com sintomas típicos de begomovirose foram coletadas em seis Estados (Amazonas-AM, Estado do Tocantins-TO, Mato Grosso-MT, Goiás-GO, Pernambuco-PE e Bahia-BA) entre 2004 e 2009. O DNA total foi extraído e análises (via PCR) foram conduzidas utilizando-se ‘primers’ universais capazes de amplificar segmentos tanto do DNA-A quanto do DNA-B. Os resultados mostraram que todas as amostras estavam infectadas exclusivamente por espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido. Sequências parciais foram determinadas para um amplicon de cerca de 1100 pares de base do DNA-A englobando a região 5’-terminal do gene AV1 (CP) e a região 3’-terminal do gene AC1 (Rep). Os amplicons de um grupo de isolados coletados em GO e TO apresentaram níveis de identidade nucleotídica entre 80 e 84% com a espécie *Sida micrantha mosaic virus* (AJ557450), registrada infectando *Sida rhombifolia*

(Malvaceae) no Brasil. Outro grupo de isolados obtido em GO, TO e AM apresentaram níveis de identidade entre 80 e 84% com a espécie *Tomato yellow spot virus* (FJ538207), originalmente reportada infectando tomateiro no Brasil e feijoeiro na Argentina. Um terceiro grupo de isolados, com ampla distribuição geográfica, apresentou níveis de identidade variando entre 80 e 83% com a espécie *Sida yellow leaf curl virus* (EU710750), reportada infectando espécies do gênero *Sida* no Brasil. Análise filogenética extensiva indicou que os isolados obtidos em plantas do gênero *Cleome* agrupam-se de maneira isolada em relação a todas as espécies previamente descritas no “Novo Mundo”. Desta forma, este conjunto de isolados compõe, muito provavelmente, um complexo contendo pelo menos três novas espécies virais. Os seguintes nomes provisórios foram sugeridos para as espécies representando, respectivamente, estes três grupos de isolados: *Cleome bright yellow mosaic virus* (CBYMV), *Cleome golden mosaic virus* (CGMV) e *Cleome chlorotic leaf virus* (CCLV).

Palavras-chave: *Cleome*, *Begomovirus*, distribuição geográfica, espécies virais, taxonomia.

ABSTRACT

A tomato-infecting bipartite begomovirus complex has emerged after the introduction of *Bemisia tabaci* biotype B in Brazil. Genomic analyses indicated a high degree of relationship of some tomato and weed-infecting begomoviruses suggesting a natural transfer of genetic material among these viral isolates. *Cleome* is a weed endemic to warm climates and commonly found displaying typical symptoms of *Begomovirus* infection. However, no large scale survey has been conducted to investigate the genetic diversity of *Begomovirus* species in the genus *Cleome* in Brazil. Leaf samples of *Cleome* were collected in six States (Amazonas-AM, Estado do Tocantins-TO, Mato Grosso-MT, Goiás-GO, Pernambuco-PE, and Bahia-BA). Total DNA was extracted from leaf tissue and bipartite begomovirus infection was confirmed via PCR in all samples. Universal begomovirus primers were able to amplify segments of both DNA-A and DNA-B genomes, indicating the exclusive presence of bipartite species. Partial nucleotide sequences were determined for a segment of the DNA-A using universal primers targeting conserved regions of the 5'-terminus of the AV1 (CP) gene and the 3'-terminus of the AC1 (Rep) gene. The DNA-A fragment of isolates collected in GO and TO shared 80 to 84% with the *Sida micrantha mosaic virus* (AJ557450), reported

infecting *Sida rhombifolia* (Malvaceae) in Brazil. Isolates from GO, TO and AM shared 80 to 84% identity with *Tomato yellow spot virus* (FJ538207) reported infecting tomatoes in Brazil and beans in Argentina. The third group of isolates (with broad geographic distribution) displayed identity levels between 80 and 83% with *Sida yellow leaf curl virus* (EU710750) reported infecting species of the genus *Sida* in Brazil. A comprehensive phylogenetic analysis indicated that the isolates of the genus *Cleome* are clustered in a group distinct of all *Begomovirus* species described in the New World. The isolates from *Cleome* might comprise a complex of at least three new viral species. The following tentative/provisional names are proposed for these isolates: Cleome bright yellow mosaic virus, Cleome golden mosaic virus, and Cleome chlorotic leaf virus (CCLV), respectively.

Keywords: *Cleome*, *Begomovirus*, geographical distribution, viral species, taxonomy.

INTRODUÇÃO

Os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) são caracterizados por infectarem plantas dicotiledôneas, apresentarem partículas icosaédricas geminadas, com genoma composto por uma ou duas moléculas (componentes) de DNA circular de fita simples (DNA-A e DNA-B), cada uma com aproximadamente 2600 bases (Lazarowitz, 1992). Estes vírus são transmitidos por moscas-brancas do complexo *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) (Stanley *et al.*, 2005). Mais de 600 diferentes espécies/estirpes de begomovírus já foram relatadas infectando naturalmente diferentes plantas hospedeiras nos cinco continentes (Jones, 2003; Fauquet *et al.*, 2008).

Um complexo de espécies de *Begomovirus* foi identificado em tomateiro no Brasil após a introdução no país de *B. tabaci* biótipo B (Ribeiro *et al.*, 2003). Análises genômicas revelaram um elevado grau de relacionamento genético entre as espécies de *Begomovirus* reportadas em tomateiro e em ervas daninhas frequentemente associadas com o cultivo desta hortaliça, indicando a provável transferência natural de segmentos virais entre as diferentes plantas hospedeiras (Ambrozevícius *et al.*, 2002). De fato, as espécies de *Begomovirus* registradas infectando tomateiro no Brasil apresentam dois grupamentos monofiléticos bem definidos: um grupo engloba a espécie Tomato yellow spot virus (ToYSV) e outros vírus que infectam plantas daninhas e um segundo grupo que engloba espécies que infectam plantas cultivadas (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008).

Levantamentos relatam um grupo grande de espécies de plantas invasoras como hospedeiras de *Begomovirus* no Brasil datam dos meados da década de 1940 (Kitajima *et al.*, 2007). A lista de hospedeiras inclui espécies da família Malvaceae (*Sida micrantha*; *Sida rhombifolia*, *Herissantia crispa*, *Sidastrum micranthum* e *S. spinosa*), Lamiaceae (*Leonurus sibiricus*); Sterculiaceae (*Waltheria indica* e *Triumfetta semitriloba*); Fabaceae (*Macroptilium lathyroides* e *Desmodium* sp.); Euphorbiaceae (*Euphorbia heterophylla* e *Cnidoscolus urens*), Oxalidaceae (*Oxalis* spp.); Convolvulaceae (*Ipomoea* spp.) e Asteraceae (*Blainvillea rhomboidea*) (Costa, 1955; Costa & Bennett, 1950; Flores & Silberschmidt, 1965; Ambrozevícius *et al.*, 2002, Jovel *et al.*, 2004; Assunção *et al.*, 2006; Paprotka *et al.*, 2010). Embora muitos destes vírus tenham sido descritos em trabalhos pioneiros conduzidos no Brasil no século passado, uma grande parte deles ainda aguarda completa caracterização genômica/molecular (Kitajima *et al.*, 2007). Recentemente, begomovírus foram detectados via PCR em plantas invasoras sintomáticas das famílias Amaranthaceae (*Amaranthus spinosus* e *A. viridis*) e Asteraceae (*Ageratum conyzoides* e *Bidens pilosa*) na Serra do Ipiapaba, Ceará (Arnaud *et al.*, 2007). Todas estas espécies de plantas daninhas são encontradas, com frequência, associadas com lavouras de tomateiro. A mosca-branca (*Bemisia tabaci*) é frequentemente encontrada colonizando as folhas destas plantas daninhas, indicando a potencial movimentação de insetos virulíferos entre as espécies de plantas daninhas, o tomateiro e outras plantas cultivadas.

Cleome (família Capparaceae) é um gênero cosmopolita composto por mais de 170 taxa (Iltis, 1959). Este gênero representa um grupo de plantas daninhas nativas do “Novo Mundo”, mas com disseminação global. A espécie multifoliata (*Cleome affinis* DC.) é a de maior distribuição geográfica no Brasil, sendo popularmente conhecida como “mussambê” ou “sojinha”. Esta espécie é uma invasora de culturas agrícolas, mas também é encontrada em pastagens, jardins, beira de estradas e em terrenos baldios em áreas urbanas (Leroy *et al.*, 1997). O gênero *Cleome* apresenta diversas espécies endêmicas de regiões de clima quente no Brasil, sendo que, comumente, apresenta plantas com sintomas típicos de infecção por *Begomovirus*. De fato, registros formais de infecção natural de plantas de *C. affinis* por *Begomovirus* já foram registrados no Brasil (Assunção *et al.*, 2006; Listik *et al.*, 2006; Fonseca *et al.*, 2007). No entanto, não existem relatos de amostragens extensivas da diversidade de espécies de *Begomovirus* infectando plantas do gênero *Cleome* no Brasil. O objetivo deste trabalho foi amostrar e

caracterizar a diversidade genética dos isolados de *Begomovirus* naturalmente associados com plantas do gênero *Cleome* em seis Estados do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados virais – Trinta e oito amostras foliares (isolados) de plantas de *Cleome* exibindo sintomas típicos de infecção por *Begomovirus* foram coletadas em seis Estados do Brasil (Amazônia, Estado do Tocantins, Mato Grosso, Bahia, Pernambuco e Goiás) entre os anos de 2004 e 2009 (**Tabela 1**). Foram coletadas, preferencialmente, plantas com sintomas de mosaico dourado, clorose (amarelecimento), distorção foliar e nanismo (**Figura 1**). Plantas sadias (i.e. sem sintomas aparentes) também foram coletadas e usadas como controles negativos.

Purificação e estimativa da concentração do DNA total de tecidos infectados – A purificação de DNA total de tecido das amostras de folhas de *Cleome* foi feita usando o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) seguindo o protocolo padrão de com algumas adaptações implementadas por Boiteux *et al.* (1999). A concentração do DNA purificado foi estimada em gel de agarose 1% (p/v) a partir de uma solução do marcador de quantidade contendo o fago λ (lambda) na concentração de 10 ng/ μ L. Todos os materiais foram diluídos para a concentração final de 20 ng/ μ L em TE (Tris 0,01M; EDTA 0,001M; pH 7,0).

Amplificação via PCR de segmentos genômicos dos DNA-A e DNA-B dos isolados virais – Segmentos dos DNA-A e DNA-B viral foram amplificados via reação em cadeia da polimerase ou “Polymerase chain reaction” (PCR). A PCR foi realizada em termocicladores do tipo *PCR System 9700* (Applied Biosystems). Os reagentes usados na mistura de 20 μ L foram: 2 μ L de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 1,2 μ L MgCl₂ 50mM; 2 μ L dNTPs (2,5 μ M cada); 0,5 μ L de cada primer (10 μ M cada); 0,32 μ L *Taq* DNA Polymerase (5u/ μ l), todos da *Invitrogen*[®] *Life Technologies*; 2 μ L de DNA molde (20 μ g/ μ L) e 11,48 μ L de água MilliQ. Os pares de ‘primers’ universais utilizados foram: ‘BegoAFor1’ / ‘BegoAREv1’ (Figura 2) para um segmento do DNA-A (Ha *et al.*, 2006) e ‘PBL1v2040’ / ‘PCRC1’ (Figura 3) para um segmento do DNA-B (Rojas *et al.*, 1993). O perfil de amplificação consistiu de 35 ciclos de

desnaturação a 94°C por 4 minutos, anelamento dos ‘primers’ a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos, terminando em 7 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação (amplicons) foram analisados em géis de agarose 1% (p/v), corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta (Ambrozevicius *et al.*, 2002).

Reações de sequenciamento dos amplicons obtidos – Os amplicons foram separados em eletroforese e diretamente sequenciados. O sequenciamento foi realizado em um sequenciador ABI PRISM 3100 da Embrapa Hortaliças (CNPq), utilizando o *kit ABI Prism BigDye® Version 3.0 Chemistry* (Applied Biosystems). Os mesmos iniciadores de síntese senso e anti-senso utilizados na amplificação do DNA foram empregados individualmente no sequenciamento de cada amostra, a fim de obter, através do consenso, um fragmento de maior tamanho e qualidade possível.

Análise das sequências – As sequências correspondentes ao fragmento do genoma dos diferentes isolados virais de *Cleome* foram obtidas a partir do consenso dos fragmentos sequenciados com os iniciadores senso e anti senso utilizando-se o programa *SeqMan (Lasergene)®* DNASTAR e as sequências de baixa qualidade foram removidas (Allex, 1999). As sequências editadas foram inicialmente analisadas para níveis de identidade com as disponíveis no banco de dados do GenBank usando o algoritmo BLASTn disponível no site do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). O alinhamento das sequências foi realizado por meio do *software Megalign (Lasergene)®* DNASTAR (Madison, WI), utilizando-se o método ‘CLUSTAL W’ com as seguintes condições: ‘gap penalty’ e ‘gap length penalty’ = 10. Matrizes de similaridade genética foram obtidas entre os isolados virais utilizando-se a informação de uma sequência comum de cerca de 1070 pares de base de um segmento do DNA-A amplificado com o par de ‘primers’ BegoAFor1/BegoARev1 (Ha *et al.*, 2006) e a informação da sequência de cerca de 550 pares de base correspondendo a região amplificada pelo par de ‘primers’ PBL1v2040/PCRC1 (Rojas *et al.* 1993).

Análise filogenética – A análise de parcimônia foi conduzida usando o programa PAUP 4.0 (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony* version 3.1, (Swofford, 1999), através da busca heurística. Foi utilizado o índice de suporte *bootstrap* com 2.000 repetições. Associações que tiveram valores de *bootstrap* menores do que 50% foram excluídas das

árvores. Todos os espaços (“gaps”) gerados no alinhamento foram considerados na construção das árvores.

Teste de infectividade (postulados de Koch) utilizando moscas-brancas – Estacas de uma planta de *Cleome* coletada em Alvorada-TO (isolado TO-003) com sintomas típicos de infecção por *Begomovirus* foram enraizadas em vasos contendo 5L solo autoclavado e mantidas em gaiolas individuais livres do acesso de moscas-brancas. Plantas sadias obtidas de sementes (sem sintomas) foram semeadas em vaso contendo 5L solo autoclavado. Plantas sintomáticas e sadias foram pulverizadas com o inseticida Imidacloprid® com o objetivo de eliminar a infestação natural de mosca-branca. Plantas sintomáticas e sadias foram inicialmente mantidas separadas em gaiolas cobertas com tela a prova de insetos. Uma semana após a aplicação do inseticida, vasos contendo plantas sintomáticas foram colocados nas gaiolas contendo vasos com plantas livres de sintomas. Cerca de 20-35 moscas-brancas avirulíferas foram colocadas na gaiola e mantidas por sete dias a fim de permitir que as moscas-brancas adquirissem o vírus das plantas sintomáticas e transmitissem o vírus para plantas testes (sadias). Um grupo de plantas sadias permaneceu isolado (sem compartilhar a gaiola com plantas sintomáticas) foi exposto também a moscas-brancas avirulíferas. Após este período todas as plantas foram novamente pulverizadas e a plantas testes foram transferidas para uma casa de vegetação livre de mosca para observar desenvolvimento de sintomas. A temperatura mínima foi de 23°C e temperatura máxima foi de 35°C, durante estes ensaios. DNA total foi extraído da planta infectada, das plantas sadias que desenvolveram sintomas após inoculação e dos controles sadios (não inoculados). O DNA foi avaliado com ‘primers’ universais para o DNA-A e o amplicon foi sequenciado e comparado com o vírus presente na fonte de inóculo original (isolado TO-003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise via PCR de 38 isolados de plantas de *Cleome* provenientes de seis estados (BA, PE, GO, AM, MT e TO) apresentou amplicons positivos tanto para DNA-A quanto para DNA-B (**Figura 2**), indicando a presença exclusiva de begomovirus de genoma bipartido. Foram observados amplicons de tamanho similar para o segmento amplificado do componente DNA-A. No entanto, foram observados polimorfismos de tamanho entre os diferentes isolados para o segmento do DNA-B (**Figura 2**), indicando

níveis de divergência maiores para esta região deste componente do genoma viral. Os polimorfismos observados entre os amplicons do componente DNA-B, permitiram sugerir que alguns isolados possam representar infecções mistas, embora em um número bem reduzido de isolados (**Figura 2**).

A análise de sequência utilizando o algoritmo BLASTn (**Tabelas 1 e 2**) de isolados de *Cleome* indicou variáveis de identidade com três espécies virais. O primeiro grupo apresentou isolados com níveis de identidade variando entre 80 e 83% com um segmento do DNA-A do *Sida yellow leaf curl virus* (EU710750), reportado em plantas de *Sida rhombifolia* (Malvaceae) em Coimbra-MG (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). Um segundo grupo, englobando dois isolados de GO, dois de TO e um da AM, apresentou níveis de identidade entre 80 e 84% com um segmento do DNA-A de uma estirpe de *Tomato yellow spot virus* (FJ538207), registrado infectando feijoeiro na Argentina (Rodríguez-Pardina *et al.*, 2006). Um terceiro grupo de isolados coletados em Goiás-GO e no Estado do Tocantins-TO indicou níveis de identidade entre 80 e 84% com um segmento do DNA-A do *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (AJ557450), descrito em plantas de *Sida rhombifolia* (Malvaceae) no Brasil e pertencente a um complexo viral conhecido como “*Sida micrantha* mosaic-associated viruses” (Jovel *et al.*, 2004). Neste terceiro grupo de isolados de *Cleome* está incluído o isolado TO-003 que corresponde a uma espécie provisória caracterizada em plantas de *C. affinis* no Estado do Tocantins-TO (Fonseca *et al.*, 2007) e cuja sequência de um segmento do componente DNA-A foi depositada no GenBank sob o código DQ388447. É importante ressaltar que a sequência DQ388447 foi obtida após sequenciamento de um amplicon obtido com o par de ‘primers’ PALv1978/PARc496 (Rojas *et al.* 1993). A este isolado foi dado o nome provisório de Cleome bright yellow mosaic virus (CBYMV). Por sua vez, as sequências no presente trabalho foram obtidas com os ‘primers’ BegoAFor1’ / ‘BegoARev1’ (Ha *et al.*, 2006) e não correspondem, portanto, à mesma região viral do depósito no GenBank, não permitindo a comparação das duas sequências através do alinhamento. Este fato que explica a ausência de ‘hits’ com CBYMV na Tabela 1.

Um subgrupo de 35 isolados também teve um segmento do DNA-B sequenciado (**Tabela 3**). Estas análises indicaram variáveis níveis de identidade com um segmento parcial da proteína de movimento (MP) do DNA-B de CBYMV (DQ388448). Treze isolados apresentaram níveis de identidade variando entre 70 e 89% e os outros 22 isolados indicaram níveis de identidade variando entre 90 e 96% com DQ388448. Neste caso, os segmentos genômicos do DNA-B do isolado depositado no GenBank e dos

outros isolados de *Cleome* foram obtidos com o mesmo par de ‘primers’ [PBL1v2040 / PCRC1 (Rojas *et al.* 1993)].

Em vários aspectos, plantas daninhas pertencentes à família Malvaceae são interessantes quando consideradas no contexto de epidemiologia e evolução de doenças causadas por espécies de *Begomovirus*. No Brasil, plantas de *Sida* são um dos maiores reservatórios naturais de begomovírus (Jovel *et al.*, 2004; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). Estas plantas são amplamente distribuídas pelas Américas e outras regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde servem como hospedeiras para diversos begomovírus (Mansoor *et al.*, 2006). Além disso, elas estão frequentemente associadas com várias culturas hortícolas tipicamente afetadas por geminivirose (Jovel *et al.*, 2004). As características botânicas de carpelos fundidos (sincarpia), placentação parietal e flores tetrâmeras são comuns das famílias Capparidaceae e Brassicaceae. No entanto, outras famílias apresentando flores pentâmeras, possuem um relacionamento genético estreito com a família Capparidaceae, incluindo: Papaveraceae, Violaceae, Tiliaceae, Caryophyllaceae e Malvaceae (Sharma, 1993). Desta forma, não é surpresa, no ponto de vista co-evolucionário, que vírus com segmentos genômicos apresentando níveis de identidade elevados com as espécies virais descritas na família Malvaceae tais como *Sida yellow leaf curl virus* e *Sida micrantha mosaic virus* tenham sido reportadas infectando o gênero *Cleome* no Brasil (**Tabela 1**).

O teste de transmissão (uma modificação dos Postulados de Koch) foi positivo, com plantas sadias inoculadas desenvolvendo sintomas cerca de 20 dias após infestação com moscas-brancas viruríferas (**Figura 1A**). O sequenciamento dos amplicons para DNA-A e DNA-B confirmaram que as plantas foram infectadas com o isolado utilizado como inóculo (TO-003). Plantas infestadas com moscas-brancas avirulíferas não desenvolveram sintomas e apresentaram resultados negativos em PCR (dados não mostrados). Desta forma, foi demonstrado que os sintomas observados em plantas gênero *Cleome* em condições naturais (**Figura 1B**) são, muito provavelmente, associados com a infecção por espécies de *Begomovirus*.

Uma árvore filogenética foi estabelecida comparando um grupo de 28 isolados de begomovirus obtidos de plantas do gênero *Cleome* com isolados representativos de espécies de *Begomovirus* de genoma monopartido e bipartido do “Velho Mundo” e do “Novo Mundo” (**Figura 3**). Esta análise filogenética extensiva indicou que estas potenciais novas espécies descritas em *Cleome* são típicas de begomovírus bipartidos do “Novo Mundo”. No entanto, todos os isolados obtidos em plantas do gênero *Cleome*

agrupam-se na árvore filogenética de maneira isolada em relação a todas as espécies previamente descritas no “Novo Mundo”, incluindo as demais espécies de *Begomovirus* descritas no país. Uma possível conclusão é que essas potenciais espécies descritas em *Cleome* podem representar uma linhagem distinta de begomovírus do “Novo Mundo”. Recentemente, o mesmo foi observado com duas novas espécies de *Begomovirus* identificadas infectando as espécies *S. rhombifolia* e *S. micrantha* no Sudeste do Brasil (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). Foi também observado que os isolados de *Cleome* tenderam a agrupar-se de acordo com a proximidade geográfica, embora três municípios tenham apresentado o registro de mais do que um dos grandes grupos de isolados (**Tabela 1**). Uma análise mais simplificada, utilizando apenas informação de níveis de identidade com o algoritmo BLASTn, indicou, como mencionado, três grandes grupos de isolados. No entanto, uma análise cuidadosa da topologia da árvore filogenética construída usando análise de parcimônia do programa PAUP (com a consistência de cada ramo da árvore sendo determinada pelo método Bootstrap com 2000 repetições) sugere que o número de espécies infectando *Cleome* pode variar de três até seis (**Figura 3**). Nesta árvore, as espécies virais com relacionamento genético mais próximo com os isolados de *Cleome* foram os isolados de *Tomato golden mottle virus* [um vírus descrito infectando tomateiro na América Central (AF132852) e no México (DQ520943)] e *Soybean blistering mosaic virus* (EF016486), um vírus reportado infectando soja na Argentina (Rodríguez-Pardina *et al.*, 2006). Uma próxima etapa deste estudo deve, necessariamente, envolver a caracterização completa do genoma de isolados representativos dentro destes grupos (‘clusters’). A potencial presença de potenciais infecções mistas observada em alguns isolados indica a necessidade de substituir, para estes isolados, o sequenciamento direto dos amplicons por uma análise envolvendo a clonagem dos segmentos genômicos em vetores apropriados.

Os novos critérios taxonômicos propõem que quando a identidade entre duas sequências for menor que 88% o isolado em questão pertence a uma nova espécie. Se o alinhamento apresentar níveis de identidade entre 88 ou 89%, o isolado pertence tentativamente à espécie mais relacionada (Fauquet *et al.*, 2008). Por sua vez, quando a identidade nucleotídica entre as sequências for maior que 89%, o isolado em questão pertence definitivamente à espécie usada para comparação (Fauquet *et al.*, 2008). Neste contexto, os isolados obtidos em plantas do gênero *Cleome* representam, muito provavelmente, um complexo contendo pelo menos três novas espécies virais. Como mencionado, o status taxonômico de novas espécies destes isolados só poderá ser

confirmado após completa análise de seus genomas. Os seguintes nomes provisórios foram sugeridos para as espécies representando estes três grandes grupos de isolados: Cleome bright yellow mosaic virus (CBYMV), Cleome golden mosaic virus (CGMV) e Cleome chlorotic leaf virus (CCLV).

Tabela 1 – Lista de 32 isolados de isolados de *Begomovirus* obtidos de plantas do gênero *Cleome* (isolado, local, data de coleta, espécie viral com o nível de identidade mais alto usando o algoritmo BLASTn) que foram caracterizados para um segmento de cerca de 1100 pares da base do DNA-A e seus níveis de identidade com espécies virais cujas sequências foram depositadas no GenBank e o respectivo número de acesso.

Código Isolado	Local da coleta	Data da coleta mês/ano	Espécie viral	BLASTn (%)	Acesso GenBank
AM-005	Irاندuba – AM	11/2007	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	81	EU710750
AM-007	Silves – AM	11/2007	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	80	EU710750
AM-008	Silves – AM	11/2007	<i>Tomato yellow spot virus – Argentina</i>	80	FJ538207
BA-005	Porto Seguro – BA	08/2007	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	82	EU710750
GO-394	Flores de Goiás – GO	04/2008	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	81	EU710750
GO-395	Flores de Goiás – GO	04/2008	NAO SEQUENCIADO	---	---
GO-396	Flores de Goiás – GO	04/2008	<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	81	AJ557450
GO-404	Pirinópolis – GO	05/2008	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	81	EU710750
GO-405	Pirinópolis – GO	05/2008	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	80	EU710750
GO-427	Itapirapuã – GO	05/2009	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	80	EU710750
GO-432	Cavalcante – GO	10/2009	<i>Tomato yellow spot virus – Argentina</i>	82	FJ538207
GO-433	Cavalcante – GO	10/2009	<i>Tomato yellow spot virus – Argentina</i>	82	FJ538207
GO-442	Monte Alegre – GO	10/2009	<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	80	AJ557450
GO-443	Monte Alegre – GO	10/2009	<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	80	AJ557450
GO-444	Monte Alegre – GO	10/2009	<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	80	AJ557450
MT-001	Rondonópolis – MT	07/2007	NAO SEQUENCIADO	---	---
MT-002	Rondonópolis – MT	07/2007	NAO SEQUENCIADO	---	---
PE-017	Recife – PE	04/2009	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	80	EU710750
PE-018	Recife – PE	04/2009	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	80	EU710750
TO-003	Alvorada – TO	06/2004	<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	80	AJ557450
TO-017	Gurupi – TO	06/2004	<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	81	AJ557450
TO-032	Palmas – TO	11/2005	NAO SEQUENCIADO	---	---
TO-036	Palmas – TO	12/2005	<i>Tomato yellow spot virus – Argentina</i>	84	FJ538207
TO-245	Natividade – TO	10/2009	<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	81	AJ557450
TO-246	Natividade – TO	10/2009	<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	81	AJ557450
TO-247	Natividade – TO	10/2009	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	81	EU710750
TO-248	Natividade – TO	10/2009	<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	81	AJ557450
TO-249	Natividade – TO	10/2009	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	81	EU710750
TO-262	Chapada da Natividade – TO	10/2009	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	80	EU710750
TO-263	Chapada da Natividade – TO	10/2009	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	80	EU710750
TO-264	Chapada da Natividade – TO	10/2009	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	83	EU710750
TO-279	Taquarauto – TO	10/2009	<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	80	AJ557450
TO-280	Taquarauto – TO	10/2009	NAO SEQUENCIADO	---	---
TO-281	Taquarauto – TO	10/2009	NAO SEQUENCIADO	---	---
TO-282	Taquarauto – TO	10/2009	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	80	EU710750
TO-283	Taquarauto – TO	10/2009	<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	79	AJ557450
TO-300	Taquaruçu – TO	10/2009	<i>Tomato yellow spot virus – Argentina</i>	84	FJ538207
TO-301	Taquaruçu – TO	10/2009	<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	80	AJ557450

Tabela 2 – Lista de 36 isolados (isolado, local, data de coleta, espécie viral, nível de identidade BLASTn e número de acesso no GenBank) de *Begomovirus* obtidos de plantas do gênero *Cleome* que foram caracterizados via sequenciamento de um segmento de cerca de 550 pares da base do DNA-B. Níveis de identidade com espécies virais cujas sequências foram depositadas no GenBank são expressos em porcentagem.

Isolado	Local da Coleta	Data da coleta mês/ano	Espécie Viral	BLASTn (%)	Acesso no GenBank
AM-005	Silves-AM	11/2007	NAO SEQUENCIADO	---	---
AM-007	Silves-AM	11/2007	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	91	DQ388448
AM-008	Silves-AM	11/2007	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	91	DQ388448
BA-005	Porto Seguro-BA	08/2007	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	71	DQ388448
GO-394	Flores de Goiás-GO	04/2008	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	80	DQ388448
GO-395	Flores de Goiás-GO	04/2008	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	82	DQ388448
GO-396	Flores de Goiás-GO	04/2008	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	88	DQ388448
GO-404	Pirinópolis-GO	05/2008	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	95	DQ388448
GO-405	Pirinópolis-GO	05/2008	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	94	DQ388448
GO-427	Itapirapuã-GO	05/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	90	DQ388448
GO-432	Cavalcante-GO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	81	DQ388448
GO-433	Cavalcante-GO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	79	DQ388448
GO-442	Monte Alegre-GO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	96	DQ388448
GO-443	Monte Alegre-GO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	89	DQ388448
GO-444	Monte Alegre-GO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	95	DQ388448
MT-001	Rondonópolis-MT	07/2007	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	95	DQ388448
MT-002	Rondonópolis-MT	07/2007	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	94	DQ388448
PE-017	Recife-PE	04/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	89	DQ388448
PE-018	Recife-PE	04/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	91	DQ388448
TO-003	Alvorada-TO	06/2004	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	96	DQ388448
TO-017	Gurupi-TO	06/2004	NAO SEQUENCIADO	---	---
TO-032	Palmas-TO	06/2004	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	72	DQ388448
TO-036	Palmas-TO	11/2005	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	71	DQ388448
TO-245	Natividade-TO	12/2005	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	94	DQ388448
TO-246	Natividade-TO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	94	DQ388448
TO-247	Natividade-TO	10/2009	NAO SEQUENCIADO	---	---
TO-248	Natividade-TO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	94	DQ388448
TO-249	Natividade-TO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	94	DQ388448
TO-262	Natividade-TO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	94	DQ388448
TO-263	Natividade-TO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	70	DQ388448
TO-264	Natividade-TO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	70	DQ388448
TO-279	Taquarauto-TO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	91	DQ388448
TO-280	Taquarauto-TO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	90	DQ388448
TO-281	Taquarauto-TO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	90	DQ388448
TO-282	Taquarauto-TO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	90	DQ388448
TO-283	Taquarauto-TO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	91	DQ388448
TO-300	Taquaruçu-TO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	71	DQ388448
TO-301	Taquaruçu-TO	10/2009	<i>Cleome bright yellow mosaic virus</i>	91	DQ388448

Figura 1 – (A) Plantas de *Cleome affinis* exibindo sintomas de infecção pelo isolado **TO-003** [obtido no município de Alvorada (TO)] após transmissão controlada com moscas-brancas virulíferas em condições de casa de vegetação. Plantas apresentaram sintomas iniciais de clorose e redução de tamanho dos folíolos 20 dias após infestação com moscas-brancas virulíferas; (B) Sintomas de *Begomovirus* de um isolado de plantas do gênero *Cleome* (**GO-432**) obtido na região urbana de Cavalcante, Estado de Goiás (GO).



Figura 2 – Amplificação via PCR de um segmento do DNA-A e amplificação via PCR de um segmento do DNA-B de 23 isolados obtidos de plantas do gênero *Cleome* (sojinha) no Estado do Amazonas (AM), Bahia (BA), Goiás (GO), Mato Grosso (MT), Pernambuco (PE) e Estado do Tocantins (TO). O padrão de amplicons obtido com UM segmento do DNA-B do isolado GO-443 apresenta sinais de potencial infecção mista.

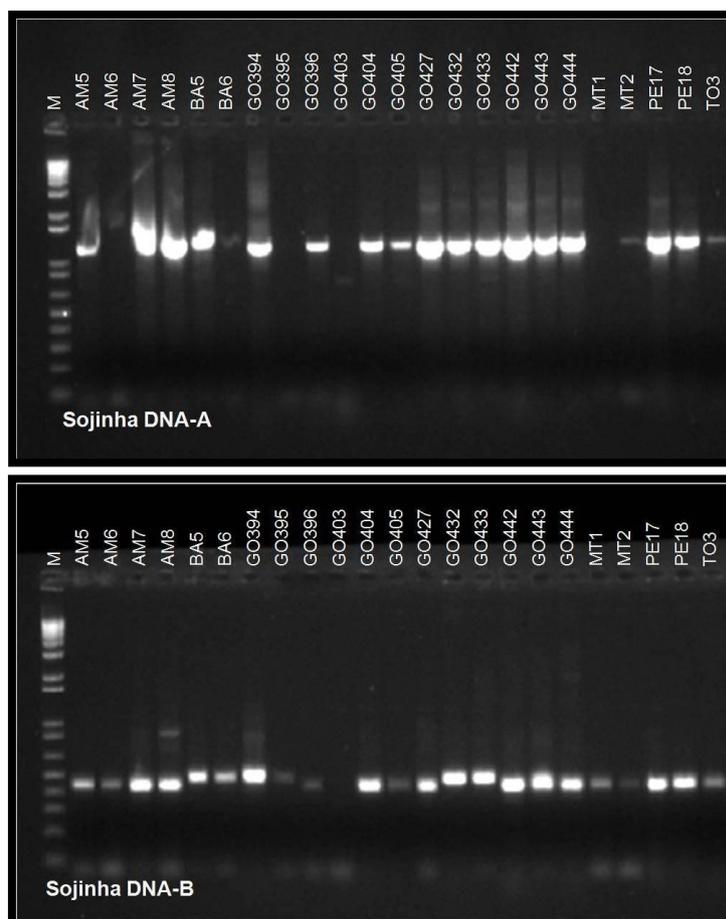
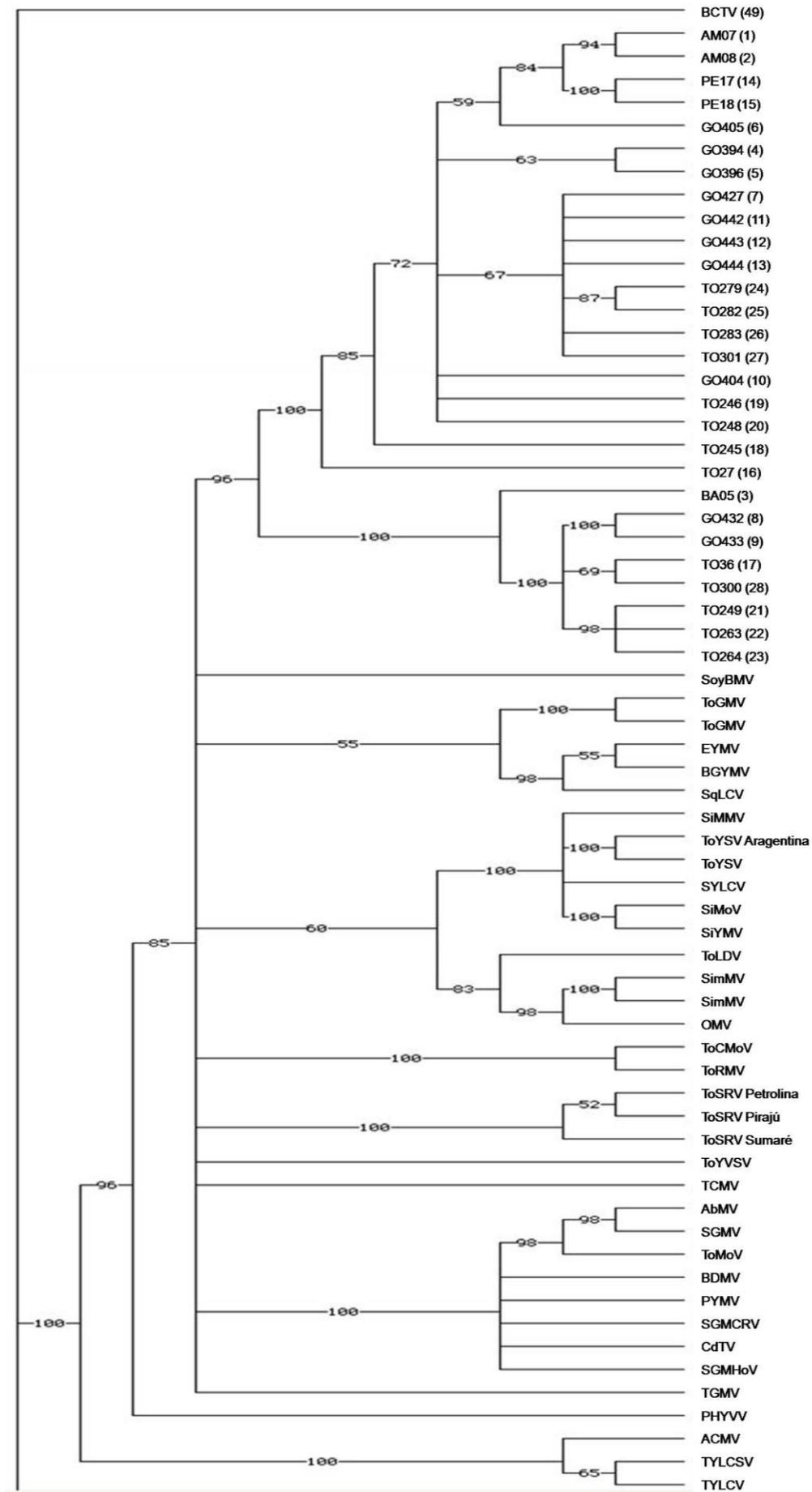


Figura 3 – Árvore filogenética baseada em um alinhamento múltiplo de sequências de cerca de 1100 pares de bases correspondendo a um segmento do DNA-A flanqueado pelo par de ‘primers’ universais (BegoAFor1 / BegoARev1). Estes ‘primers’ foram desenhados para anelar com regiões conservadas presentes na região 5’-terminal do gene AV1 (CP) e na região 3’-terminal do gene AC1 (Rep). Foram escolhidos 28 isolados de *Cleome* para análise (**para os detalhes de cada isolado ver Tabela 1**). O alinhamento foi feito pelo método CLUSTAL-W do programa Megalign (Lasergene, Madison-WI). A árvore filogenética foi construída usando análise de parcimônia do programa PAUP e a consistência de cada ramo da árvore foi determinada pelo método Bootstrap com 2000 repetições (valores de suporte são indicados em cada ramo da árvore). Os seguintes vírus foram utilizados para comparação com um subgrupo de isolados obtidos no presente levantamento:

AbMV, *Abutilon mosaic virus* (GenBank accession number NC_001928);
 ACMV, *African cassava mosaic virus* (NC_001467);
 BCTV, *Beet curly top virus* (NC_001412) = **outgroup**;
 BDMV, *Bean dwarf mosaic virus* (NC_001931);
 BGYMV, *Bean golden yellow mosaic virus* (NC_001439);
 CdTV, *Chino del tomate virus* (NC_003830);
 MSV, *Maize streak virus* (NC_001346);
 PHYVV, *Pepper huasteco yellow vein virus* (NC_001359);
 PYMV, *Potato yellow mosaic virus* (NC_001934);
 SGMV, *Sida golden mosaic virus* (NC_002046);
 SGMCRV, *Sida golden mosaic Costa Rica virus* (NC_004657);
 SGMHoV, *Sida golden mosaic Honduras virus* (NC_004659);
 SiMoV, *Sida mottle virus* (NC_004637; isolate A1, AJ557450);
 SiYMV, *Sida yellow mosaic virus* (NC_004639);
 SimMV, *Sida micrantha mosaic virus* (NC_005330 e AJ557450,);
 SqLCV, *Squash leaf curl virus* (NC_001936);
 TGMV, *Tomato golden mosaic virus* (NC_001507);
 ToCMoV, *Tomato chlorotic mottle virus* (MG-Bt1 e AY090557);
 ToSRV, *Tomato severe rugose virus* (Petroлина, DQ207749, Sumaré, EU086591 e Piraju-PRJ, FJ 824808);
 ToRMV, *Tomato rugose mosaic virus* – [Ube] (AF291705 = NC_002555);
 ToMoV, *Tomato mottle virus* (NC_001938);
 TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus* (NC_004005);
 TYLCSV, *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (NC_003828);
 ToGMV, *Tomato golden mottle virus* (AF132852 e DQ520943);
 SoyBMV, *Soybean blistering mosaic virus* isolado NOA (EF016486);
 ToYVSV, *Tomato yellow vein streak virus* isolado Ba-3 (EF417915);
 ToLDV, *Tomato leaf distortion virus* isolado BR:Co3:07 (EU710749);
 SYLCV, *Sida yellow leaf curl virus* isolado BR:Co3:07 (EU710750);
 TCMV, *Tomato common mosaic virus* isolate BR:Co22:07 (EU710754);
 ToYSV, *Tomato yellow spot virus* estirpe Argentina (FJ538207);
 EYMV, *Euphorbia yellow mosaic virus* (FJ619507);
 SimMV, *Sida micrantha mosaic virus* strain BR:Sag3:Soy:08 (FJ686693);
 OMV, *Okra mottle virus* strain BR:Sag8:Soy:08 (FJ686695);
 ToYSV, *Tomato yellow spot virus* (NC_007726).



CONSIDERAÇÕES FINAIS

De maneira geral, os resultados indicaram, como esperado, que a variabilidade de *Begomovirus* no agroecossistema do tomateiro para consumo *in natura* é muito mais variável que o reportado para tomate para processamento. Os resultados indicaram que todos os isolados são de genoma bipartido não havendo ainda nenhum registro de espécies de genoma monopartido. Existe uma aparente regionalização das espécies, com algumas sendo prevalentes em condições de clima mais quente e outras em condições de clima subtropical. Alguns vírus já descritos infectando tomateiro no Brasil não foram encontrados em nossa coleção de isolados, incluindo: *Tomato crinkle leaf yellows virus* e *Tomato yellow spot virus*, sugerindo que a sua natureza endêmica possa ser resultado da recente emergência ou dos requerimentos epidemiológicos destas espécies virais. Curiosamente, a espécie *Tomato golden mosaic virus* também não foi detectada em nenhuma amostra neste levantamento.

Begomovirus reportados inicialmente em plantas cultivadas e/ou plantas daninhas estão aparentemente se adaptado e infectando tomateiro, embora ainda sem grande importância epidemiológica, como indicado pelo conjunto amostrado no presente trabalho. Dois são, aparentemente, registros novos, incluindo um isolado de *Euphorbia yellow mosaic virus* e um isolado de *Bean golden mosaic virus-Brazil*.

No presente trabalho alguns isolados identificados podem representar potenciais novas espécies, incluindo: isolados relacionados com o *Tomato yellow spot virus* – Argentina; isolados relacionados com *Sida yellow leaf curl virus*; isolados relacionados com *Okra mottle virus*; isolados relacionados com o *Tomato leaf distortion virus*; isolados relacionados com *Tomato golden mottle virus* e um único isolado obtido em Itaberaí-GO que apresentou relação genética com *Soybean blistering mosaic virus*. As análises dos resultados também indicam que existem algumas estirpes que estão divergindo dos isolados das espécies originais ao ponto de representarem potenciais novas espécies. Observa-se isso especialmente dentro das espécies *Tomato severe rugose virus*, *Tomato rugose mosaic virus-[Ube]* e *Tomato yellow vein streak virus*, que se tornaram espécies predominantes em condições de campo ao longo dos anos.

A análise detalhada de um subgrupo destes isolados em uma árvore filogenética, juntamente com outras espécies de *Begomovirus* caracterizadas no Brasil, Américas e no “Velho Mundo”, indicou a presença de sete potenciais novas espécies, confirmando a

intensa capacidade do gênero *Begomovirus* em gerar diversidade genética a partir de intercâmbio de segmentos genômicos entre diferentes vírus. Muitas destas espécies que estão emergindo, mas que ainda não foram completamente descritas, merecem estudos e caracterizações adicionais, especialmente pelo fato que algumas delas já apresentam uma distribuição geográfica relativamente ampla.

Essa observação sugere que as novas espécies de begomovírus detectadas em tomateiro no Brasil após a introdução de *B. tabaci* biótipo B, e que inicialmente encontravam-se limitadas a certas regiões geográficas e/ou restritas a hospedeiras naturais da flora brasileira, estão sendo disseminadas gradativamente para o tomateiro. Estes vírus podem, potencialmente, expandir sua ocorrência geográfica e afetar o cultivo do tomateiro em outras regiões. No entanto, outras espécies ainda permanecem geograficamente restritas, com ocorrência endêmica, sem que as razões para este confinamento geográfico estejam ainda completamente elucidadas.

Além de representar uma importante ferramenta para estudos adicionais de variabilidade intra-específica e dos mecanismos evolucionários de espécies de *Begomovirus*, esta coleção de isolados virais pode ser muito útil em programas de melhoramento genético do tomateiro. A capacidade de produzir clones infectivos a partir de DNA viral mantido *in vitro*, torna esta coleção uma amostra ampla da variabilidade do patógeno, tendo potencial utilização na identificação genes e/ou conjuntos de genes que combinados apresentam espectros mais amplos de ação. Resistência de amplo espectro é uma característica imprescindível neste cenário de enorme diversidade de isolados virais no cultivo do tomateiro.

Um enigma do ponto de vista epidemiológico é o fato de isolados de *Tomato yellow spot virus* estarem infectando exclusivamente *Leonurus sibiricus* em amostras coletadas nas vizinhanças e/ou dentro de lavouras de tomateiro, em diferentes regiões produtoras do Estado do Paraná. Desta forma, a espécie ToYSV está disseminada em plantas de *L. sibiricus* por diferentes regiões, englobando os municípios de São Gerônimo da Serra, Marilândia, Barro Branco e Barro Preto, que são áreas de intensivo cultivo do tomateiro. Estes resultados sugerem que o tomateiro represente uma hospedeira alternativa e esporádica do ToYSV, embora tenha sido descrito originalmente nesta hortaliça. No entanto, é importante realçar que não foi detectado em *L. sibiricus* nenhum isolado com seqüência idêntica aos dois isolados de ToYSV descritos anteriormente em feijão e tomateiro. Desta forma, é possível que estas (ou outras) diferenças genéticas observadas entre os isolados de *L. sibiricus* do Paraná e os

isolados descritos anteriormente possam explicar a ausência de relatos de epidemias deste vírus em tomateiros no Paraná. A presença maciça de plantas *L. sibiricus* exibindo sintomas de infecção por ToYSV poderia assegurar uma permanente fonte de inóculo para tomateiro na região, aumentando a frequência de infecções por este patógeno, fato este que não tem sido observado em condições naturais. A obtenção completa do genoma viral de isolados representativos de *L. sibiricus* e testes de infecção cruzada com diferentes cultivares de tomateiro poderão elucidar a aparente especificidade hospedeira mostrada por estas variantes de sequência de ToYSV.

Os resultados da diversidade de *Begomovirus* infectando plantas do gênero *Cleome* no Brasil mostraram que todas as amostras estavam infectadas exclusivamente por espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido. Os amplicons de um grupo de isolados coletados em Goiás (GO) e no Estado do Tocantins (TO) apresentaram níveis de identidade nucleotídica entre 80 e 84% com a espécie *Sida micrantha mosaic virus*, registrada infectando *Sida rhombifolia* (Malvaceae) no Brasil. Outro grupo de isolados obtido em GO, TO e Amazonas (AM) apresentaram níveis de identidade entre 80 e 84% com a espécie *Tomato yellow spot virus*, originalmente reportada infectando tomateiro no Brasil e feijoeiro na Argentina. Um terceiro grupo de isolados, com ampla distribuição geográfica, apresentou níveis de identidade variando entre 80 e 83% com a espécie *Sida yellow leaf curl virus*, reportada infectando espécies do gênero *Sida* no Brasil. Análise filogenética extensiva indicou que os isolados obtidos em plantas do gênero *Cleome* agrupam-se de maneira isolada em relação a todas as espécies previamente descritas no “Novo Mundo”. Desta forma, este conjunto de isolados compõe, muito provavelmente, um complexo contendo pelo menos três novas espécies virais. Os seguintes nomes provisórios foram sugeridos para as espécies representando, respectivamente, estes três grupos de isolados: *Cleome bright yellow mosaic virus* (CBYMV), *Cleome golden mosaic virus* (CGMV) e *Cleome chlorotic leaf virus* (CCLV).

Estudos recentes têm mostrado, cada vez mais, que a sequência completa do genoma (principalmente do componente DNA-A) é necessária para a definição mais precisa da diversidade de espécies desses vírus devido à intensa recombinação de segmentos genômicos que ocorre neste grupo. De fato, dois isolados podem ser idênticos ou muito similares no segmento genômico analisado, mas representar um recombinante para as outras regiões ou em outro componente, levando a conclusões incorretas sobre o verdadeiro status taxonômico do vírus. Por esta razão

estudos/caracterização adicionais serão conduzidas com isolados representativos de potenciais novas espécies virais visando determinar inteiramente sua estrutura/organização genômica e elucidar pontos da biologia destes potenciais novos vírus incluindo: círculo de plantas hospedeiras, expressão de sintomas e a interação com loci de resistência a begomovírus reportados no tomateiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCSEM (Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas), 2009. Tomate lidera crescimento e lucratividade no setor de hortaliças. Online [<http://www.abcsem.com.br/noticia.php?cod=284>].
- AGRIANUAL – Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira, 2007. São Paulo: *FNP Consultoria & Comércio*, 435.
- Albuquerque LC, Martin DP, Avila AC, Inoue-Nagata AK, 2010. Characterization of tomato yellow vein streak virus, a begomovirus from Brazil. *Virus Genes* **40**, 140-7.
- Allex CF, 1999. *Computational Methods for Fast and Accurate DNA Fragment Assembly*. Wisconsin, Madison: University of Wisconsin, tese de doutorado.
- Ambrozevicus LP, Calegario RF, Fontes EPB, Carvalho MG, Zerbini FM, 2002. Genetic diversity of *Begomovirus* infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira* **27**, 372-7.
- Andrade EC, Manhani GG, Alfenas PF, Calegario RF, Fontes EPB, Zerbini FM, 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**, 3687-96.
- Arguello-Astorga GR, Guevara-Gonzalez RG, Herrera-Estrella LR, Rivera-Bustamante, RF, 1994. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology* **203**, 90–100.
- Arnaud LSEP, Santos CDG, Lima JAA, Feitosa FAA, 2007. Predominância de begomovírus em tomateiros na região produtora da Ibiapaba, Ceará, e sua detecção natural em plantas daninhas. *Fitopatologia Brasileira* **32**, 241-6.
- Assunção IP, Listik AF, Barros MCS, Amorim EPR, Silva SJC, Izael O, Silva O, Ramalho-Neto CE, Lima GSA, 2006. Diversidade genética de *Begomovirus* que infectam plantas invasoras na região nordeste. *Planta Daninha* **24**, 239-44.
- Ávila AC, Pozzer L, Bezerra I, Kormelink R, Prins M, Peters D, Nagata T, Kitajima EW, Resende R, 1998. Diversity of tospoviruses in Brazil. In: *International Symposium on Tospoviruses and thrips in Floral and Vegetable Crops*, Wageningen **4**, 32-4.
- Azzam O, Frazer J, de la Rosa D, Beaver JS, Ahlquist P, Maxwell DP, 1994. Whitefly transmission and efficient ss-DNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* **204**, 289-96.
- Barbosa JC, Barreto SS, Inoue-Nagata AK, Reis MS, Firmino AC, Bergamin Filho A, Rezende JAM, 2009. Natural infection of *Nicandra physaloides* by Tomato severe rugose virus in Brazil. *Journal of General Plant Pathology* **75**, 440–3.
- Bedford ID, Briddon RW, Brown JK, Rosell RC, Markham PG, 1994. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Annals of Applied Biology* **125**, 311-25.

- Boiteux LS, Fonseca MEN, Simon PW, 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **124**, 32-8.
- Boiteux LS, Melo PCT, Vilela NJ, 2008. Tomate para Consumo *in natura* . In: Albuquerque ACS, Silva AG, eds. *Desenvolvimento da Agricultura Tropical: Quatro Décadas de Inovações Tecnológicas, Institucionais e Políticas*. Brasília, DF: Embrapa **1**, 557-67.
- Briddon RW, Bedford ID, Tsai JH, Markham PG, 1996. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivírus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology* **219**, 387-94.
- Briddon RW, Markham PG, 2000. Cotton leaf curl virus disease. *Virus Research* **71**, 151-9.
- Briddon RW, Pinner MS, Stanley J, Markham PG, 1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* **177**, 85-94.
- Briddon RW, Bull SE, Amin I, Idris IM, Mansoor S, Bedford ID, Dhawan P, Rishi N, Siwatch SS, Abdel-Salam AM, Brown JK, Zafar Y, Markham PG, 2003. Diversity of DNA β , a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology* **312**, 106-21.
- Brown JK, 1994. The status of *Bemisia tabaci* (Genn.) as a pest and vector in world agroecosystems. *FAO Plant Protection Bulletin* **42**, 3-32.
- Brown JK, Bird J, 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Disease* **76**, 220-5.
- Brown JK, 1996. The Biology and molecular epidemiology of the Geminiviridae subgroup III. In: Stacey G, Keen N, eds. *Plant-Microbe Interactions Review Series*. New York: Chapman and Hall, 125-95.
- Brown JK, Idris AM, Torres-Jerez I, Banks GK, Wyatt SD, 2001. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Archives of Virology* **146**, 1581-98.
- Boulton MI, 2002. Functions and interactions of mastrevirus gene products. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **60**, 243-255.
- Calegario RF, Ferreira SS, Andrade EC, Zerbini FM, 2004. Caracterização de um isolado do *Begomovirus Sida micrantha virus* (SimMV) obtido de tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* **29**, 150.
- Calegario RF, Ferreira SS, Andrade EC, Zerbini FM, 2007. Characterization of Tomato yellow spot virus, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **42**, 1335-1347.
- Castillo-Urquiza GP, 2008. Diversidade e estrutura genética de populações de begomovírus em duas regiões produtoras de tomate do sudeste do Brasil. Viçosa, Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, tese de doutorado.
- Castillo-Urquiza GP, Beserra Jr. JEA, Bruckner FP, Lima ATM, Varsani A, Alfenas-Zerbini P, Zerbini FM, 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology* **153**, 1985-1989.

- Colariccio A, Eiras M, Chaves ALR, Bergmann JC, Zerbini FM, Harakava R, Chagas CM, 2007. *Tomato yellow vein streak virus*, a new *Begomovirus* on tomato from Brazil: Complete DNA-A sequence and some molecular and biological features. *Journal of Plant Pathology* **89**, 385–390.
- Costa AS. 1955. Studies on *Abutilon* mosaic in Brazil. *Phytopathologische Zeitschrift* **24**, 97–112.
- Costa AS, 1965. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. *FAO Plant Protection Bulletin* **13**, 121–130.
- Costa AS, 1975. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legume crops in Brazil. p. 171. In: Bird JL, Maramorosch, K, eds. *Tropical Diseases of Legumes*. New York: Academic Press,
- Costa AS, 1976. Whitefly-transmitted plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* **14**, 429–440.
- Costa AS, Bennett CW, 1950. Whitefly transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. *Phytopathology* **40**, 266.
- Cotrim AA, Krause-Sakate R, Narita N, Zerbini FM, Pavan MA, 2007. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica* **33**, 300–303.
- Czosnek H, Ghanim M, Ghanim M, 2002. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci* – insights from studies with *Tomato yellow leaf curl virus*. *Annals of Applied Biology* **140**, 215–231.
- Dhar AK, Singh RP, 1995. Geminivirus. In: Singh US, Singh RP, Kohmoto K, eds. *Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Virus & Viroids*, 289–309.
- Dianese EC, Resende RO, Inoue-Nagata AK, 2008. Alta incidência de *Pepper yellow mosaic virus* em tomateiro em região produtora no Distrito Federal. *Tropical Plant Pathology* **33**, 67–68.
- Dianese EC, Fonseca MEN, Goldbach R, Kormelink R, Inoue-Nagata AK, Resende RO Boiteux LS, 2010. Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the *Sw-5* (*Tospovirus* resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. *Molecular Breeding* **25**, 133–142.
- Eagle PA, Orozco BM, Hanley-Bowdoin L, 1994. A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *Plant Cell* **6**, 1157-70.
- FAO, 2010. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Online [www.fao.org/waicent/portal/statistics_en.asp].
- Faria JC, 1994. Mosaico dourado. In: Sartorato A, Rava CA, eds. *Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle*. Goiânia, GO, Brazil: EMBRAPA-CNPAP, 262–284.
- Faria JC, Bezerra IC, Zerbini FM, Ribeiro SG, Lima MF, 2000. Situação atual das geminiviruses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* **25**, 125–137.
- Faria JC, Maxwell DP, 1999. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology* **89**, 262–268.

- Faria JC, Souza-Dias JAC, Slack SA, Maxwell DP, 1997. A New Geminivirus Associated with Tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease* **81**, 423.
- Faria JC, Zerbini FM, 2000. Família *Geminiviridae* – taxonomia, replicação e movimento. *RAPP* **8**, 27–57.
- Fauquet CM, Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini M, Zhou X, 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* **153**, 783–821.
- Fauquet CM, Maxwell DP, Gronenborn B, Stanley J, 2000. Revised proposal for naming geminiviruses. *Archives of Virology* **145**, 1743–1761.
- Fauquet CM, Stanley J, 2005. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: A review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Archives of Virology* **150**, 2151–2179.
- Fernandes FR, Albuquerque LC, Giordano LB, Boiteux LS, Avila AC, Inoue-Nagata, AK, 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite *Begomovirus* species associated to tomatoes. *Virus Genes* **36**, 251–258.
- Fernandes FR, Cruz ARR, Faria JC, Zerbini FM, Aragão FJL, 2009. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. *Archives of Virology* **154**, 1567–1570.
- Ferreira PTO, Lemos TO, Nagata T, Inoue-Nagata AK, 2008. One-step cloning approach for construction of agroinfectious begomovirus clones. *Journal of Virological Methods* **147**, 351–354.
- Flores E, Silberschmidt K, Kramer M, 1960. Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico* **26**, 65-9.
- Fonseca MEN, Boiteux LS, Dutra WP, Lima-Neto AF, Silva PP, Inoue-Nagata AK, 2007. Molecular characterization of a new bipartite *Begomovirus* species infecting *Cleome affinis* (Capparidaceae) in Tocantins State, Brazil. p. 96. In: *Abstract Book of the 5th International Geminivirus Symposium*, Ouro Preto-MG, Brazil.
- Fontes EPB, Gladfelter HJ, Schaffer RL, Petty ITD, Hanley-Bowdoin L, 1994. Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell* **6**, 405–16.
- Fontes PCR, Silva DJH, 2002. Produção de Tomate de Mesa. Viçosa: Aprenda Fácil, 197.
- França FH, Villas-Boas GL, Branco MC, 1996. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Annals da Sociedade Brasileira de Entomology Society* **25**, 369–372.
- Franca FH, Villas Boas GL, Castelo Branco M, Medeiros MA, 2000. Manejo integrado de pragas. p. 112-127. In: Silva JBC, Giordano LB, eds. *Tomate para processamento industrial*. EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia/ EMBRAPA-CNPq.
- Frischmuth T, Unseld S, Ringel M, Konrad A, Lauster A, 2000. Virus-specific adaptations for production of a pseudorecombinant virus formed by two distinct bipartite geminiviruses from Central America. *Virology* **274**, 179–188.
- Gafni Y, 2003. Tomato yellow leaf curl virus, the intracellular dynamics of a plant DNA virus. *Molecular Plant Pathology* **4**, 9–15.

- Galvão RM, Mariano AC, Luz DF, Alfenas PF, Andrade EC, Zerbini FM, Almeida MR, Fontes EPB, 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.
- García-Cano E, Resende RO, Boiteux LS, Giordano LB, Fernández-Muñoz R, Moriones E, 2008. Phenotypic expression, stability, and inheritance of a recessive resistance to monopartite begomoviruses associated with tomato yellow leaf curl disease in tomato. *Phytopathology* **98**, 618–627.
- Gardê A, Gardê N, 1993. *Culturas Hortícolas*. 6ª edição. Lisboa: Clássica, (Coleção Nova Coleção Técnica Agrária), 469.
- Gardiner WE, Sunter G, Brand L, Elmer JS, Rogers SG, Bisaro DM, 1988. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: the coat protein is not required for systemic spread or symptom development. *The EMBO Journal* **7**, 899–904.
- German TL, Ullman, DE. Moyer JW, 1992. Tospoviruses: Diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annual Review of Phytopathology* **30**, 315–348.
- Goldbach, RW, Peters K, 1994. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. *Seminaries in Virology* **5**, 113–120.
- Guevara-González RG, Torres-Pacheco I, González M, 2002. Molecular strategies for virus resistance in pepper in México. *Proceedings of the 16th International Pepper Conference*. Tampico, Tamaulipas, Mexico.
- Ghanim M, Morin S, Zeidan M, Czosnek H, 1998. Evidence for transovarial transmission of Tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology* **240**, 295–303.
- 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*. *Virology* **91**, 188–196.
- Giordano LB, Fonseca MEN, Silva JBC, Inoue-Nagata AK, Boiteux LS, 2005. Efeito da infecção precoce por *Begomovirus* com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. *Horticultura Brasileira* **23**, 815–818.
- Gutierrez C, 1999. Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**, 313–329.
- Gutierrez C, 2000. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *The EMBO Journal* **19**, 792–799.
- Gutierrez C, Ramirez-Parra E, Mar Castellano M, Sanz-Burgos AP, Luque A, Missich R, 2004. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Veterinary Microbiology* **98**, 111–119.
- Ha C, Coombs S, Revill P, Harding R, Vu M, Dale J, 2006. *Corchorus yellow vein virus*, a New World geminivirus from the Old World. *Journal of General Virology* **87**, 997–1003.
- Hamilton WDO, Stein VE, Coutts RHA, Buck KW, 1984. Complete nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of tomato golden mosaic virus: potential coding regions and regulatory sequences. *The EMBO Journal* **3**, 2197–2205.

- Hanley-Bowdoin L, Settlage SB, Orozco BM, Nagar S, Robertson D, 1999. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Review in Plant Sciences* **18**, 71–106.
- Harrison BD, Robinson DJ, 1999. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (Begomoviruses). *Annual Review of Phytopathology* **37**, 369–398.
- Howarth AJ, Caton J, Bossert M, Goodman RM, 1985. Nucleotide sequence of bean golden mosaic virus and a model for gene regulation in geminiviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**, 3572–3576.
- Iltis HH, 1959. Studies in the Capparidaceae VI. *Cleome* sect. *Physostemon*: taxonomy, geography and evolution. *Brittonia* **11**, 123–162.
- Inoue-Nagata AK, Fonseca MEN, Resende RO, Boiteux LS, Monte DC, Dusi AN, Ávila AC, Van Der Vlugt RAA, 2002. Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. *Archives of Virology* **147**, 849–855.
- Inoue-Nagata AK, Martin DP, Boiteux LS, Giordano LB, Bezerra IC, Ávila AC, 2006. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting *Begomovirus* complex. *Pesquisa agropecuária brasileira* **41**, 1329–1332.
- Jenkins JA, 1948. The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany* **2**, 379–392.
- Jones JB, Stall RE, Zitter TA, 1991. Compendium of Tomato Diseases. St. Paul, MN. *American Phytopathological Society*, 75.
- Jones DR, 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 195–219.
- Jones RAC, 2009. Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Research* **141**, 113–130.
- Jovel J, Preiß W, Jeske H, 2007. Characterization of DNA intermediates of an arising geminivirus. *Virus Research* **130**, 63–67.
- Jovel J, Reski G, Rothenstein D, Ringel M, Frischmuth T, Jeske H, 2004. *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from Abutilon mosaic virus. *Archives of Virology* **149**, 829–841.
- Jupin I, De Kouchkovsky F, Jouanneau F, Gronenborn B, 1994. Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): involvement of the protein encoded by ORF C4. *Virology* **204**, 82–90.
- Kim KS, Shock TL, Goodman RM, 1978. Infection of *Phaseolus vulgaris* by bean golden mosaic virus: Ultrastructural aspects. *Virology* **89**, 22–33.
- Kitajima EW, Souza-Dias JAC, Rezende JAM, 2007. The work and legacy of Álvaro Santos Costa, a pioneer geminivirologist. p.1. *Book of Abstracts 5th International Geminivirus Symposium*. Ouro Preto-MG, Brazil.
- Laufs J, Traut W, Heyraud F, Matzeit V, Rogers SG, Schell J, Gronenborn B, 1995. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replicator initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 3879–3883.

- Lapidot M, Friedmann M, 2002. Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Annals of Applied Biology* **140**, 109–127.
- Lazarowitz SG, 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical reviews in plant science* **11**, 327–349.
- Leroy GH, Doll J, Pancho JV, Herberger JP, 1997. *World Weeds: Natural Histories and Distribution*. John Wiley and Sons, Nova York.
- Lima MF, Haji FNP, 1998. Mosca branca x geminivírus na cultura do tomate no Submédio do Vale do São Francisco. *Horticultura Brasileira*. **15**: contracapa.
- Lima GSA, Assunção IP, Resende LV, Ferreira MAJ, Viana THP, Gallindo FAT, Freitas NS, 2002. Detecção de begomovírus associados a plantas invasoras no Estado de Pernambuco e caracterização molecular parcial de um isolado de *Sida rhombifolia*. *Summa Phytopathologica* **28**, 353–356.
- Listik AF, Barros MS, Silva SC, Assunção IP, Lira MCP, Lima GA, 2006. Caracterização parcial de um begomovírus de mussambê proveniente do estado de Pernambuco. *Summa Phytopathologica* **32**, 397.
- Liu Y, Robinson DJ, Harrison BD, 1998. Defective forms of cotton leaf curl virus DNA-A that have different combinations of sequence deletion, duplication, inversion and rearrangement. *Journal of General Virology* **79**, 1501–1508.
- Lourenção AL, Nagai H, 1994. Surtos populacionais de Bemisia tabaci no estado de São Paulo. *Bragantia* **53**, 53–59.
- Maia IG, Gonçalves MC, Arruda P, Vega J, 2000. Molecular evidence that sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) is a member of the *Luteoviridae* family. *Archives of Virology* **145**, 1009–1019.
- Mansoor S, Khan SH, Bashir A, Saeed M, Zafar Y, Malik KA, Briddon RW, Stanley J, Markham PG, 1999. Identification of a novel circular single-stranded DNA associated with cotton leaf curl disease in Pakistan. *Virology* **259**, 190–199.
- Matos ES, Siqueira WJ, Lourenção AL, Melo AMT, Sawazaki HE, Souza- Dias JAC, Colariccio A, 2003. Resistência de genótipos de tomateiro a um isolado de geminivírus do cinturão verde de Campinas, São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* **28**, 159–165.
- Matyis JC, Silva DM, Oliveira AAR, Costa AS, 1975. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica* **1**, 267–274.
- Melo PCT, 1992. Mosca-branca ameaça produção de hortaliças. *Asgrow Informe Técnico Sementes*.
- Melo PCT, Boiteux LS, Vilela NJ, Ferraz E, 2008. Tomate para Processamento Industrial. p. 547–556. In: Albuquerque ACS, Silva, AG, eds. *Desenvolvimento da Agricultura Tropical: Quatro Décadas de Inovações Tecnológicas, Institucionais e Políticas*. Brasília, DF: Embrapa volume **1**,
- Melo PCT, Melo AMT, Boiteux LS, 2009. Overview and perspectives of tomato breeding for fresh market adapted to mild tropical climates of Brazil. *Acta Horticulturae* **821**, 55–62.
- Melo PCT, Vilela NJ, 2005. Desafios e perspectivas para a cadeia brasileira do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira* **23**, 154–157.

- Monci F, Sánchez-Campos S, Navas-Castillo J, Moriones E, 2002. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology* **303**, 317–326.
- Monaco L, 1964. Melhoramento do tomateiro. *Boletim do Campo* **193**, 79–85.
- Morales KJ, Andreson PK, 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* **146**, 415–441.
- Mound LA, 1996. The Thysanoptera vector species of Tospoviruses. *Acta Horticulturae* **431**, 298–307.
- Morin S, Ghanim M, Zeidan M, Czosnek H, Verbeek M, Van Den Heuvel FJM, 1999. A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl. *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.
- Muniyappa V, Venkatesh HM, Ramappa HK, Kulkarni RS, Zeidan M, Tarba CY, Ghanim M, Czosnek H, 2000. *Tomato leaf curl virus* from Bangalore (ToLCVBand4): sequence comparison with Indian isolates, detection in plants and insects, and vector relationships. *Archives of Virology* **145**, 1583–1598.
- Nagar S, Pedersen TJ, Carrick KM, 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 AC, Tavares PCM, Barbosa CJ, Juliatti FC, Kitajima EW, 1995. Occurrence of different tospoviruses in six States of Brazil. *Fitopatologia Brasileira* **20**, 90–95.
- Nagata T, Inoue-Nagata AK, van Lent J, Goldbach R, Peters D, 2002. Factors determining vector competence and specificity for transmission of Tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology* **83**, 663–671.
- Noris E, Vaira AM, Caciagli P, Masenga V, Gronenborn B, Accotto GP, 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 AO, Lucas WJ, Gilbertson RL, 1994. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* **76**, 925–932.
- Orozco BM, Hanley-Bowdoin L, 1998. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 24448–24456.
- Padidam M, Beachy RN, Fauquet CM, 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 CM, 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* **265**, 218–225.
- Palmer KE, Rybicki EP, 1998. The molecular biology of mastreviruses. *Advances in Virus Research* **50**, 183–234.

- Paprotka T, Boiteux LS, Fonseca MEN, Resende RO, Jeske H, Faria JC, Ribeiro SG, 2010. Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. *Virus Research* **136** (prelo).
- Pascal E, Sanderfoot AA, Ward BM, Medville R, Turgeon R, Lazarowitz SG, 1994. The geminivirus BR1 movement protein binds to single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. *Plant Cell* **6**, 995–1006.
- Pazinato BC, Galhardo RC, 1997. *Processamento Artesanal do Tomate*. 2a ed. Campinas: CATI, Boletim Técnico **29**, 263.
- Pereira-Carvalho RC. 2009. Expressão fenotípica e mecanismos de ação de genes envolvidos na resistência ampla a *Begomovirus* monopartidos e bipartidos em tomate (Tese de Doutorado em Fitopatologia). Brasília, Distrito Federal: Universidade de Brasília.
- Pereira-Carvalho RC, Boiteux LS, Fonseca MEN, Díaz-Pendón JA, Moriones E, Fernández-Muñoz R, Charchar JM, Resende RO, 2010. Multiple resistance to *Meloidogyne* spp. and to bipartite and monopartite *Begomovirus* spp. in wild *Solanum* (*Lycopersicon*) accessions. *Plant Disease* **94**, 179–185.
- Pilartz M, Jeske H, 1992. Abutilon mosaic geminivirus double-stranded DNA is packed into minichromosomes. *Virology* **189**, 800–802.
- Pita JS, Fondong VN, Sangaré A, Otim-Nape GW, Ogwal S, Fauquet CM, 2001. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology* **82**, 655–665.
- Polston JE, Anderson PK, 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease* **81**, 1358–1369.
- Qin S, Ward BM, Lazarowitz SG, 1998. The bipartite geminivirus coat protein aids BR1 function in viral movement by affecting the accumulation of viral single-stranded DNA. *Journal of Virology* **72**, 9247–9256.
- Resende RO, Cupertino FP, 1996. Doenças causadas por vírus em tomateiro. *Informe Agropecuário* **184**, 19–27.
- Ribeiro SG, Ambrozevícius LP, Ávila AC, Bezerra IC, Calegário RF, Fernandes JJ, Lima MF, Mello RN, Rocha H, Zerbini FM, 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* **148**, 281–295.
- Ribeiro SG, Ávila AC, Bezerra IC, Fernandes JJ, Faria JC, Lima MF, Gilbertson RL, Zambolim EM, Zerbini FM, 1998. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. *Plant Disease* **82**, 830.
- Ribeiro SG, Martin DP, Lacorte C, Simões IC, Orlandini DRS, Inoue-Nagata AK, 2007. Molecular characterization of Tomato chlorotic mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Virology* **97**, 702–711.
- Ribeiro SG, Melo LV, Boiteux LS, Kitajima EW, Faria JC, 1994. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia brasileira* **19**, 330.
- Ridgen JE, Dry IB, Krake LR, Rezaian MA, 1996. Plant virus DNA replication

- processes in *Agrobacterium*: Insight into the origins of geminiviruses? *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 10280–10284.
- Rodríguez-Pardina PE, Zerbini FM, Ducasse DA, 2006. Genetic diversity of begomoviruses infecting soybean, bean and associated weeds in Northwestern Argentina. *Fitopatologia Brasileira* **31**, 342–348.
- Rojas A, 2004. A Complex of Begomoviruses Affecting Tomato Crops in Nicaragua. Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala, doctoral thesis.
- Rojas MR, Gilbertson RL, Russel DR, Maxwell D, 1993. Use of degenerated primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* **77**, 340–347.
- Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ, Gilbertson RL, 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 361–394.
- Roossinck M.J, 1997. Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology* **35**, 191–209.
- Roye ME, McLaughlin WA, Nakhla MK, Maxwell DP, 1997. Genetic diversity among geminiviruses associated with the weed species *Sida* spp., *Macroptilium lathyroides*, and *Wissadula amplissima* from Jamaica. *Plant Disease* **81**, 1251–1258.
- Rubinstein G, Czonesk H, 1997. Long-term association of tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: Effects on insect transmission, capacity, longevity and fecundity. *Journal of General Virology* **78**, 2683–2689.
- Santos CDG, Ávila AC, Resende RO, 2003. Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca. *Fitopatologia Brasileira* **28**, 664–673.
- Sanz AI, Fraile A, Garcia-Arenal F, Zhou X, Robinson DJ, Khalid S, Butt T, Harrison BD, 2000. Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *Journal of General Virology* **81**, 1839–1849.
- Saunders K, Lucy A, Stanley J, 1991. DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus are consistent with a rolling circle mechanism of replication. *Nucleic Acids Research* **19**, 2325–2330.
- Schaffer RL, Miller CG, Petty ITD, 1995. Virus and host-specific adaptations in the BL1 and BR1 genes of bipartite geminiviruses. *Virology* **214**, 330–338.
- Seal SE, VandenBosch F, Jeger MJ, 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**, 23–46.
- Settlage SB, Miller AB, Hanley-Bowdoin L, 1996. Interactions between geminivirus replication proteins. *Journal of Virology* **70**, 6790–6795.
- Sharma OP, 1993. *Plant Taxonomy*. Tata McGraw-Hill, Nova York, 452pp.
- Stanley J, 1995. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggest strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology* **206**, 707–712.

- Stanley J, Gay MR, 1983. Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. *Nature* **301**, 260–262.
- Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC, 2005. Geminiviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. *Virus Taxonomy. 8th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA, USA: Elsevier Academic Press, 301–326.
- Stanley J, Townsend R, Curson SJ, 1985. Pseudorecombinants between cloned DNAs of two isolates of Cassava Latent Virus. *Journal of General Virology* **66**, 1055–1061.
- Sunter G, Bisaro DM, 1991. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology* **180**, 416–419.
- Sunter G, Hartitz MD, Bisaro DM, 1993. Tomato golden mosaic virus leftward gene expression: Autoregulation of geminivirus replication proteins. *Virology* **195**, 275–280.
- Sunter G, Hartitz MD, Hormudzi SG, Brough CL, Bisaro DM, 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.
- Swofford DL, 1999. PAUP*, *Phylogenetic Analysis Using Parsimony* (*and Related Methods). Version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Tavares CAM. 2002. Perspectivas econômicas da tomaticultura frente aos problemas causados pelos geminivírus. *O Biológico* **64**, 157–158.
- Timmermans MCP, Das OP, Messing J, 1994. Geminiviruses and their use as extrachromosomal replicons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**, 79–112.
- Wu CY, Lai YC, Lin NS, Hsu YH, Tsai HT, Liao JY, Hu CC, 2008. A simplified method of constructing infectious clones of begomovirus employing limited restriction enzyme digestion of products of rolling circle amplification. *Journal of Virological Methods* **147**, 355–359.
- Zerbini FM, Andrade EC, Barros DR, Ferreira SS, Lima ATM, Alfenas PF, Mello RN, 2005. Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. *Australasian Plant Pathology* **34**, 475–480.
- Zhou XP, Liu YL, Calvert L, Munoz C, Otim Nape GW, Robinson DJ, Harrison BD, 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.