

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

BEGOMOVÍRUS DE PLANTAS DE PIMENTÃO E TOMATE NO ESTADO DE SÃO PAULO: OCORRÊNCIA, VARIABILIDADE, IDENTIFICAÇÃO DE BIÓTIPOS DE *Bemisia tabaci* E DE RESISTÊNCIA EM *Capsicum* spp.

KELLY CRISTINA GONÇALES ROCHA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP

Maio/2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

BEGOMOVÍRUS DE PLANTAS DE PIMENTÃO E TOMATE NO ESTADO DE SÃO PAULO: OCORRÊNCIA, VARIABILIDADE, IDENTIFICAÇÃO DE BIÓTIPOS DE *Bemisia tabaci* E DE RESISTÊNCIA EM *Capsicum* spp.

KELLY CRISTINA GONÇALES ROCHA

Orientadora: **Profa. Dra. Renate Krause Sakate**

Co-Orientador: **Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP

Maio/2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA LAGEADO - BOTUCATU (SP)

R672b Rocha, Kelly Cristina Gonçalves, 1980-
Begomovírus de plantas de pimentão e tomate no Estado de São Paulo : ocorrência , variabilidade, identificação de biótipos de *Bemisia tabaci* e de resistência em *Capsicum* spp. / Kelly Cristina Gonçalves Rocha. - Botucatu : [s.n.], 2009.

xi, 106 f. : il., tabs.

Tese(Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2009

Orientador: Renate Krause Sakate

Co-orientador: Carlos Frederico Wilcken

Inclui bibliografia

1. *Solanum lycopersicum*. 2. Pimenta-hortícola. 3. Tolerância à vírus. 4. Hortaliças. 5. Mosca-branca - Biótipos. 6. Amplificação por círculo rolante. I. Sakate, Renate Krause. II. Wilcken, Carlos Frederico. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

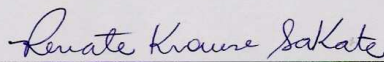
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "BERGOMOVÍRUS DE PLANTAS DE PIMENTÃO E TOMATE NO ESTADO DE SÃO PAULO: OCORRÊNCIA, VARIABILIDADE, IDENTIFICAÇÃO DE BIÓTIPOS DE Bemisia tabaci E DE RESISTÊNCIA EM Capsicum spp."

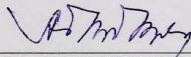
ALUNA: KELLY CRISTINA GONÇALES ROCHA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE
CO-ORIENTADOR: CARLOS FREDERICO WILCKEN

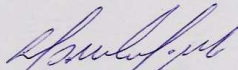
Aprovado pela Comissão Examinadora:



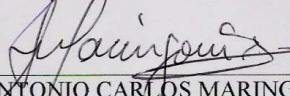
PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE



DRA. ARLETE MARCHI TÁVARES DE MELO



PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN



PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI



DR. ROMULO FUJITO KOBORI

Data da Realização: 15 de maio de 2009.

BIOGRAFIA

KELLY CRISTINA GONÇALES ROCHA – Nascida em 03 de Março de 1980, na cidade de Bebedouro, SP. Filha de Cristiano Rocha e Maria Ap. Gonçalves Rocha. Ingressou no Curso de Agronomia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, graduando-se em Janeiro de 2004. Em março de 2004, iniciou o Mestrado em Agronomia, área de concentração Entomologia Agrícola, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, obtendo o título em Fevereiro de 2006. Em março de 2006 iniciou o curso de pós-graduação em Proteção de Plantas, em nível de Doutorado, na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA, na cidade de Botucatu, SP.

Obrigado Senhor Jesus, por me conduzir em todos os caminhos. Foi tua mão que me ergueu quando, durante o trajeto, necessitei e, minha fé em Ti, junto com tua palavra me deu forças e me orientou, quando estava desanimando. Quando senti tristeza, pusestes amigos em meu caminho e me alegraram. Prometo que a tua presença continuará constantemente em minha vida, pois eu te conheci e em ti confio. Ajude-me a ensinar e a continuar aprendendo, sempre junto a Ti e a meu próximo, o respeito à Natureza, ao Amor e à Humanidade, os quais foram escritos pelas mesmas mãos.

Cláudio Aparecido Takahashi.

A Deus, pelo Dom da vida.

A meus Pais Maria Ap. e Cristiano,

Pela dedicação, confiança, compreensão e grande amor. Obrigada pelos grandes esforços destinados a minha formação intelectual e de vida, vocês são meus poderosos modelos de vida, pois me ensinaram o amor e a bondade.

Dedico

Aos grandes amores de minha vida, minha irmã Aline Cristina, e meu noivo Luis Henrique, a amizade e seus carinhos sempre me deram força para que eu seguisse meu caminho. Estaremos sempre juntos.

Ofereço

HOMENAGEM

*Profa. Dra. Renate Krause Sakate
Orientadora*

*Muito obrigada pela Orientação. A cada momento de
nossas vidas aprendemos grandes lições, principalmente ao
lado de nossos mestres. Foi, além de Mestre, minha
Amiga.*

Agradeço

AGRADECIMENTOS

A autora agradece a todos por tudo que ganhou...

A **Deus**, pelas vitórias conquistadas e principalmente por sua presença constante em minha vida.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu**, pela oportunidade de realização do curso.

Aos meus Pais e minha irmã e meu noivo, pelo apoio incondicional, incentivo, pela compreensão e dedicação em todos os momentos de minha vida;

À minha orientadora e amiga, Prof. Dra. Renate Krause Sakate, pelos ensinamentos, incentivo, compreensão e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan, pelos ensinamentos, pelas sugestões, contribuições e informações valiosas para o desenvolvimento do trabalho, e todo seu grande bom humor;

A minha mais que especial amiga Elida sua força e incentivo em todos meus momentos, obrigada pela convivência e ensinamentos;

Ao meu grande companheiro de laboratório e amigo Julio Marubayashi, por sua amizade e auxílio nos trabalhos;

Às amigas, Maria do Carmo Barbosa, por toda força e torcida, e a Adriane Sanches, pela amizade e companheirismo.

Aos companheiros e amigos de laboratório Márcio Sanches, Denise Nozaki, Mônica Fecury, Tatiana Mituti, Gerson Suzuki, David Spadotti, Bruno, Ricardo Lima, por todo apoio, ensinamentos e amizade.

Aos amigos da Sakata Seed Sudamerica Dr. Rômulo F. Kobori e Dr. Ricardo Gioria, pelo apoio sempre prestado e sugestões nesta pesquisa;

À Dr. Arlete M. T. Melo, pelo fornecimento de sementes;

Ao Dr. Jesús Navas-Castillo e Dr. Enrique Moriones, pelo aceite de estágio em seu laboratório de Virologia de “La Mayora” na Espanha, por todo ensinamento e confiança.

A todos amigos de laboratório de Virologia de “La Mayora”, España, onde passei três meses intensos de minha vida...Muchas Gracias;

Aos colegas de curso Martha, Juan, Cristiane, Adimara, Sandra Schultz, Tadeu e Djanira, Sandra Elizabeth, Caroline, Juliana e todos aqueles com que convivi, pela amizade e simpatia sempre;

Aos Professores Carlos Frederico Wilcken, Carlos Gilberto Raetano, Antônio Carlos Maringoni, Edson Luis Lopes Baldin, Edson Luiz Furtado e ao saudoso Nilton Luiz de Souza pela formação e ensinamentos, e aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal e da Faculdade de Ciências Agrônomicas, pelos auxílios com o experimento e na realização do curso;

Aos meus sogros Marco Antonio e Doroti Maria, e amigos Claudio e Neise e filhos Takahashi, pelo apoio e incentivo, por me acolherem e tudo o que fizeram por mim, ajudando a tornar possível a realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

E a todos que de alguma maneira contribuíram na realização deste projeto.

Peço a Deus que dê a todos muita sabedoria, e que sejam sempre abençoados.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
1 RESUMO.....	1
2 SUMMARY.....	3
3 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 As culturas do pimentão e tomateiro	6
3.2 Família <i>Geminiviridae</i>	7
3.3 Organização genômica e expressão das proteínas dos begomovírus	8
3.4 Replicação e movimento viral	10
3.5 <i>Begomovirus</i> em plantas de <i>Capsicum</i> spp. e tomateiro	11
3.6 Transmissão natural dos begomovírus	13
3.7 Detecção de <i>Begomovirus</i>	16
3.8 Resistência a begomovírus em plantas de tomateiro e <i>Capsicum</i> spp.	17
CAPÍTULO 1.....	18
Ocorrência e variabilidade genética de <i>Begomovirus</i> em plantas de pimentão e tomate no Estado de São Paulo	18
Resumo	19
Abstract	20
Introdução	22
Material e Métodos	24
Resultados e Discussão	26
Referências Bibliográficas	31
CAPÍTULO 2.....	43
Prevalência de <i>Bemisia tabaci</i> biótipo B em áreas cultivadas de hortaliças no estado de São Paulo, Brasil	43
Resumo	44
Abstract	45
Introdução	46

Material e Métodos	48
Resultados e Discussão	49
Referências Bibliográficas	52
CAPÍTULO 3	60
Avaliação da resistência de genótipos de <i>Capsicum</i> spp. ao <i>Tomato severe rugose virus</i> – gênero <i>Begomovirus</i>	60
Resumo	61
Abstract	62
Introdução	63
Material e Métodos	65
Resultados e Discussão	68
Referências Bibliográficas	72
4 CONCLUSÕES GERAIS	79
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
APÊNDICE	93

LISTA DE TABELAS

	Página
 (Capítulo 1)	
Tabela 1. Porcentagem de detecção de begomovírus utilizando a técnica de PCR e RCA em amostras provenientes de plantas de pimentão coletadas em diferentes municípios do Estado de São Paulo durante janeiro de 2007 a julho de 2008	38
Tabela 2. Porcentagem de detecção de begomovírus utilizando a técnica de PCR e RCA em amostras provenientes de plantas de tomate coletadas em diferentes municípios do Estado de São Paulo durante janeiro de 2007 a julho de 2008..	38
 (Capítulo 2)	
Table 1. Amostras de <i>Bemisia tabaci</i> coletadas em diferentes municípios do Estado de São Paulo, suas respectivas plantas hospedeiras e identificação do biótipo. Ano base: 2007/2008.....	55
Table 2. Sequências do GenBank utilizadas nas análises para a construção da árvore filogenética.	56
 (Capítulo 3)	
Tabela 1. Relação de acessos de espécies de <i>Capsicum</i> spp. e relação entre número de plantas infectadas e número de plantas inoculadas (NPInf/NPInoc), porcentagem de plantas infectadas e sintomas de infecção de dois isolados de <i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV).	77

LISTA DE FIGURAS

	Página
(Capítulo 1)	
Figura 1. Análise filogenética de begomovírus infectando plantas de pimentão no Estado de São Paulo e outros begomovírus do GenBank, baseado no alinhamento de nucleotídeos referente à parte da região codificadora para a capa protéica obtida com o oligonucleotídeo PrV324. Valor de Bootstrap 2000, Programa Mega Versão 4.0. Sequências de begomovírus utilizadas para comparação: ToSRV (DQ207749), ToSRV (AY029750), SiMV, (NC004637) e ToYVSV (EF459696). Botucatu, 2008.	39
Figura 2. Análise filogenética de begomovírus infectando tomate no Estado de São Paulo e outros begomovírus do GenBank, baseado no alinhamento de nucleotídeos referente à parte da região codificadora para a capa protéica obtida com o oligonucleotídeo PrV324. Valor de Bootstrap 2000, Programa Mega Versão 4.0. Sequências de begomovírus utilizadas para comparação: ToSRV (DQ207749), ToSRV (AY029750), SiMV, (NC004637) e ToYVSV (EF459696). Botucatu, 2008.	40
Figura 3. Produto de RCA digerido com <i>HpaII</i> e separado em gel de poliacrilamida a 10%, a partir de isolados de ToSRV coletados em plantas de pimentão em regiões produtoras do estado de São Paulo. M= 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen). Números indicam diferentes amostras (Cultivar/Município): 9 (Eppo/Santa Cruz do Rio Pardo); 22 (Sandy/Itapetininga); 23 (Wando/Itapetininga); 31 (Margarita/Reginópolis); 44 (Margarita/Reginópolis) e 46 (Prador/Pirajú). Botucatu, 2008.	41
Figura 4. Produto de RCA digerido com <i>HpaII</i> separado em gel de poliacrilamida a 10% de isolados de ToSRV coletados em plantas de tomate em regiões produtoras do estado de São Paulo. M= 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen). Números indicam diferentes amostras (Variedade/Município): 1	

(Carmen/Sabino); 17 (Santa Clara/São Miguel Arcanjo); 24 (Santa Clara/São Miguel Arcanjo); 26 (Santa Clara/São Miguel Arcanjo); 37 (Santa Clara/São Miguel Arcanjo); 46 (Cordilheira/São Pedro do Turvo); 48 (Cordilheira/São Pedro do Turvo); 66 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 69 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 70 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 75 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 77 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 78 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 79 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 80 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 87 (Paron/Sabino); 88 (Paron/Sabino); 91-93 (Paron/Lins); 101 (Momotoro/Lins) e 103 (Momotoro/Lins).42

(Capítulo 2)

Figure 1. Amplificação por PCR da mtCOI (~880nt) de amostras de mosca-branca coletadas no Estado de São Paulo em diferentes culturas. M: marcador DNA 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). Amostras: 1- Pimentão, 2- Tomate, 3- *Amaranthus* sp., 4- Pimentão, 5- Berinjela, 6- Pimentão, 7- Berinjela, 8- Abobrinha, 9- Pepino e 10- Tomate. Espanha, 2008.....57

Figure 2. Padrões de RFLP de fragmentos de mtCOI digeridos com *TaqI*, amostras controles: 1 – 3 Biótipo B e 4 Biótipo Q. M: Marcador de DNA 1Kb DNA Plus Ladder (Invitrogen). Espanha, 2008.58

Figure 3. Árvore filogenética usando o método Neighbor-joining do fragmento parcial do gene mitocondrial COI de amostras de *Bemisia tabaci* coletadas no Estado de São Paulo, comparadas com algumas seqüências do GenBank. (Tabela 2). Espanha, 2008.59

(Capítulo 3)

Figure 1. Perfil eletroforético do produto de RCA digerido com enzima *HpaII* para os isolados de ToSRV (1-ToSRV – Sakata, isolado de tomate; 2- ToSRV isolado de pimentão; 3- ToSRV-PJU, isolado de pimentão) e 4-ToYVSV. M= 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen)78

1 RESUMO

Considerando o aumento de begomovírus e mosca-branca no campo o presente trabalho teve como objetivos a detecção, a caracterização molecular e a análise da diversidade genética de begomovírus em pimentão e tomateiro em diferentes municípios do Estado de São Paulo: Piraju, Tejuπά, Santa Cruz do Rio Pardo, São Pedro do Turvo, São Miguel Arcanjo, Itapetininga, Lins, Sabino, Timburí, Iacanga, Pirajuí, Avaí, Reginópolis e Salto; a identificação de biótipos de *B. tabaci* por meio da amplificação do gene mitocondrial (citocromo oxidase I - mtCOI) seguido de seqüenciamento ou RFLP utilizando a enzima *Taq I* e a avaliação para resistência de acessos de *Capsicum* spp. a dois isolados de ToSRV.

A análise da variabilidade foi realizada por meio de seqüenciamento da região da capa protéica (DNA-A) com oligonucleotídeos universais e, paralelamente, as mesmas amostras foram testadas por amplificação por círculo rolante (RCA) sendo, posteriormente, clivadas com a enzima de restrição *HpaII*. Um total de 812 amostras foi analisado, sendo 709 de pimentão e 103 de tomate. Por PCR tradicional, foram detectadas positivas para presença de begomovírus 98 amostras provenientes de pimentão e 39 de tomateiro, e por RCA-PCR, foram 332 e 82 respectivamente, evidenciando maior sensibilidade desta técnica. Dessas amostras, foram seqüenciadas 39 de pimentão e 25 de tomateiro, verificando-se ocorrência prevalente da espécie ToSRV no estado de São Paulo. Infecção mista com ToSRV e ToYVSV foi observada em

tomateiro. Por RCA-RFLP, foram observados quatro padrões de clivagem com a enzima *HpaII* e todos foram confirmados como sendo da espécie ToSRV, indicando variabilidade molecular intra-específica. Para tomateiro, foram observados 18 padrões de restrição, dois idênticos aos verificados em plantas de pimentão indicando, possivelmente, infecção pelos mesmos isolados de ToSRV, porém, padrões distintos para ToSRV também foram observados, além do padrão referente à infecção mista de ToSRV e ToYVSV.

O seqüenciamento de 17 amostras do gene mitocondrial (citocromo oxidase I) de *B. tabaci* e a análise do padrão de restrição com a enzima *Taq I* das demais amostras obtidas de moscas-brancas coletadas em áreas produtoras de pimentão e tomateiro indicaram somente a presença do biótipo B.

A avaliação de 29 acessos de *Capsicum* spp. para resistência a dois isolados de ToSRV, um proveniente de pimentão e outro de tomateiro, indicou que o isolado proveniente de tomateiro é mais agressivo causando sintomas evidentes em 25 dos materiais testados. Para o isolado de pimentão, foram observados sintomas em somente 14 acessos. O acesso de pimentão *C. annuum*, Catarino Cascabel do México, comportou-se como imune a ambos os isolados avaliados 30 dias após inoculação, podendo ser indicado para programas de melhoramento visando resistência ao ToSRV.

Palavras Chave: *Solanum lycopersicum*, pimenta-hortícola, hortaliças, tolerância, rolling circle amplification (RCA) e biótipos de mosca-branca.

BEGOMOVIRUS OF PEPPER AND TOMATO PLANTS IN SÃO PAULO STATE: OCCURRENCE, VARIABILITY, IDENTIFICATION OF *Bemisia tabaci* BIOTYPES AND OF RESISTANCE IN *Capsicum* spp. BOTUCATU, 2009. 123P.

Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: KELLY CRISTINA GONÇALES ROCHA

Adviser: RENATE KRAUSE SAKATE

Co-adviser: CARLOS FREDERICO WILCKEN

2 SUMMARY

Considering the high incidence of begomoviruses and the whitefly on the field, the objectives of this work were to analyze the genetic diversity of begomoviruses infecting pepper and tomato plants in different counties of São Paulo State: Piraju, Tejuπά, Santa Cruz do Rio Pardo, São Pedro do Turvo, São Miguel Arcanjo, Itapetininga, Lins, Sabino, Timburí, Iacanga, Pirajuí, Avaí, Reginópolis and Salto; the identification of biotypes of *B. tabaci* through the amplification of the mitochondrial gene (cytochrome oxidase I)

followed by sequencing the gene or analysis by RFLP using the enzyme *TaqI* and the evaluation of *Capsicum* spp. for the resistance source for two isolates of ToSRV.

The coat protein from the DNA A of the begomovirus was amplified and sequenced, and the same samples were amplified by rolling circle amplification (RCA) followed by analysis by RCA-RFLP using the *HpaII* enzyme. A total of 812 samples were analyzed, 709 from pepper and 103 from tomato. By PCR, 98 samples from pepper and 39 from tomato were positives for the presence of begomoviruses, while by RCA-PCR 332 and 82 respectively. Thirty-nine samples from pepper and 25 from tomato were sequenced indicating the prevalence of the ToSRV species in São Paulo State. Mixed infections with ToSRV and ToYVSV were found in tomato plants. By RCA-RFLP four restriction profiles were found for ToSRV in pepper plants. In tomato 18 profiles were observed: two identical as observed for ToSRV in pepper, indicating possible infection with the same ToSRV isolates, a profile for ToSRV and ToYVSV mixed infections and also different profiles for ToSRV isolates didn't found in pepper plants.

The sequencing of 17 samples of *B. tabaci* mitochondrial cytochrome oxidase I gene and analysis by *Taq I* digestion of whiteflies collected in growers areas of pepper and tomato indicated only the presence of the B biotype.

The resistance of 29 genotypes of *Capsicum* spp. to two ToSRV isolates, one from tomato and another from pepper, indicated that the tomato isolate is more aggressive causing symptoms on 25 genotypes compared than to the pepper isolate that caused visually symptoms in only 14 genotypes. *C. annuum* "Catarino Cascabel" from México not showed symptoms and was immune until 30 days after inoculation, to both isolates and can be indicated in breeding programs aiming the resistance to ToSRV.

Key Word: *Solanum lycopersicum*, chillies, vegetables, tolerance, rolling circle amplification (RCA) and whitefly biotypes.

3 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Atualmente, o tomateiro e o pimentão são as espécies mais conhecidas das hortaliças e consideradas entre as de maior importância econômica no mercado brasileiro.

As doenças causadas por vírus de plantas provocam graves perdas econômicas nestas culturas em todo o mundo. Entre as viroses mais importantes estão aquelas ocasionadas pelos begomovírus (Família *Geminiviridae*) (Faria et al., 2000; Ribeiro et al., 2003; Rojas et al., 2005). Atualmente, já foram descritas mais de 180 espécies de begomovírus no mundo, das quais 50 espécies podem infectar o tomateiro (Fauquet et al., 2008). No Brasil foram relatadas cinco espécies definitivas, além de seis espécies tentativas baseadas em sequências de genomas parciais (Castillo-Urquiza et al., 2008). Dentre as espécies descritas em tomateiro, somente duas foram verificadas em pimentão (Nozaki, 2007).

Estes vírus são transmitidos pela mosca branca *Bemisia tabaci*. Existem aproximadamente 41 biótipos, sendo que até o presente somente dois (A e B) foram relatados no Brasil (Rabello et al., 2008).

O presente trabalho teve como objetivos a detecção, a caracterização molecular e a análise da diversidade genética de begomovírus que infectam plantas de pimentão e tomateiro no estado de São Paulo, identificação de biótipos de mosca-branca, por meio da

amplificação do gene mitocondrial (citocromo oxidase I - mtCOI) seguido de seqüenciamento ou RFLP utilizando a enzima *Taq* I e a análise para a resistência ao ToSRV de diferentes acessos do gênero *Capsicum* spp..

Para atingir estes objetivos a tese foi dividida em três capítulos na forma de artigos científicos, sendo o primeiro capítulo intitulado “**Ocorrência e variabilidade genética de *Begomovirus* infectando solanáceas no estado de São Paulo**” redigido conforme as normas da revista *Summa Phytopathologica*, o segundo capítulo intitulado “**The B biotype of *Bemisia tabaci* is prevalent in vegetable growers areas of São Paulo State, Brazil**” redigido conforme as normas da revista *Scientia Agrícola* e o terceiro intitulado “**Avaliação da resistência de genótipos de *Capsicum* spp. ao *Tomato severe rugose virus* – gênero *Begomovirus*” redigido conforme as normas da revista *Summa Phytopathology*.**

3.1 As culturas do pimentão e do tomateiro

O pimentão pertence ao gênero *Capsicum* e o tomateiro ao gênero *Solanum* (antigo gênero *Lycopersicon*), ambos são membros da família Solanaceae. As solanáceas apresentam distribuição mundial, exceto na Antártida, sendo que a maior diversidade de espécies ocorre nas Américas do Sul e Central (Natural History Museum, 2009). De acordo com Jenkins (1948), plantas de tomate são originárias do Peru e Equador e somente foram domesticadas quando alcançaram o México. *Capsicum* é um gênero tipicamente americano, com a existência de apenas uma espécie fora das Américas (Bianchetti et al., 1999).

Os maiores produtores de tomate são China, Estados Unidos da América, Turquia e Índia (Agrianual, 2008). O Brasil é o oitavo maior produtor, com cerca de 55 mil hectares cultivados e produção de 3,5 milhões de toneladas. Embora cultivado em todos os estados em maior ou menor escala, os principais produtores são Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro (Agrianual, 2008).

O cultivo de pimentão ocorre praticamente em todas as regiões do país, sendo cultivados aproximadamente 12 mil ha, com produção de 280 mil toneladas de frutos. O Estado de São Paulo cultiva cerca de 23,70 % dessa área, seguido pelos estados do RJ, MG, SC, PR, GO e CE. Apenas 4,70% de toda a área produtora de pimentão no País está sob

cultivo protegido e localizado praticamente no Estado de São Paulo e Distrito Federal (Kobori et al., 2008).

3.2 Família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é composta por quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* (van Regenmortel et al., 2000), sendo subdivididos com base no número de componentes do genoma, o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros e relacionamento filogenético. Essa família engloba os vírus cujo genoma é composto por uma fita simples de DNA circular (ssDNA), encapsidado em partículas icosaédricas geminadas (Stanley et al., 2005).

O gênero *Mastrevirus* (espécie tipo *Maize streak virus* - MSV) é constituído por genoma monopartido (2,6 – 2,8 Kb) e codifica três ou possivelmente quatro proteínas [ORF (“Open Reading Frame”): V1, V2 e C1, C2] (Stanley et al., 2005). São transmitidos por cigarrinhas (Hemiptera: *Cicadellidae*) de maneira circulativa e não-propagativa, sendo a maioria encontrada em plantas monocotiledôneas, especialmente em milho. MSV é endêmico na África e seus hospedeiros naturais são as gramíneas infestantes. Outra espécie importante deste gênero é *Wheat dwarf virus*, que infecta a cultura do trigo (Varma & Malathi, 2003).

O gênero *Curtovirus* (espécie tipo *Beet curly top virus* - BCTV) apresenta genoma monopartido (2,9 – 3kb) e as espécies deste gênero estão limitadas ao floema. O DNA codifica de seis a sete proteínas dependendo da espécie. A transmissão é feita por cigarrinhas (*Circulifer tenellus*) (Hemiptera: *Cicadellidae*) de maneira circulativa não-propagativa (Stanley et al., 2005). Essas viroses infectam apenas dicotiledôneas, especialmente beterraba, tomate e melão, e são encontradas na Índia, no continente Americano e países do Mediterrâneo (Ascenio-Ibáñez et al., 2000).

O gênero *Topocuvirus* contém apenas uma espécie, o *Tomato pseudo-curly top virus*, transmitido por *Micrutalis malleifera* (Hemiptera: *Membracidae*). O genoma do TPCTV (2861 nts) consiste de um único componente de fita simples de DNA e codifica 6 proteínas, as quais são muito próximas aos vírus do gênero *Curtovirus*. Provavelmente, os *Topocuvirus* evoluíram por recombinação inter-específica entre gêneros diferentes (Bridson et al., 1996; Stanley et al., 2005).

Os *Begomovirus* podem ser divididos em dois grandes grupos, os originados do Novo Mundo (Américas - Hemisfério Ocidental) e os do Velho Mundo (Europa, Ásia e África – Hemisfério Oriental). Neste gênero, encontram-se os vírus transmitidos por mosca-branca para dicotiledôneas, sendo o membro tipo o *Bean golden yellow mosaic virus*-BGYMV (Stanley et al., 2005).

A maioria dos begomovírus é constituída por dois componentes, o DNA A e o DNA B. No entanto, alguns begomovírus do Velho Mundo, como o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e *Tomato leaf curl virus* (TLCV) têm apenas um componente genômico, o DNA A (Fauquet et al., 2003; Stanley et al., 2005). No continente americano, ocorrem tipicamente os begomovírus de genoma bipartido, com tamanho variando entre 2,5 a 2,8 kb cada (Stanley et al., 2005). Mais recentemente, o begomovírus monopartido *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) foi relatado no México e Cuba infectando plantas do gênero *Capsicum* sp. (Carrillo-Tripp et al., 2007). Cada um dos componentes (DNA-A e DNA-B) é responsável por etapas distintas no processo de infecção, sendo o DNA-A envolvido na replicação viral, transcrição e formação da capa protéica e o DNA-B responsável pelo movimento (célula-a-célula e longa distância) do vírus na planta (Rojas et al., 2005; Stanley et al., 2005). Ambos os componentes são essenciais para a infecção sistêmica eficiente do vírus na planta.

3.3 Organização genômica e expressão das proteínas dos begomovírus

Os componentes A e B são similares no tamanho, mas diferem na seqüência de nucleotídeos, exceto por uma Região Comum (RC) de 200 a 250 pb, altamente conservada para cada espécie viral e com identidade normalmente acima de 90% entre os componentes A e B da mesma espécie (Lazarowitz, 1992; Fontes et al., 1994; Pilartz & Jeske, 2003). Dentro da região comum, localiza-se uma seqüência de nove nucleotídeos (5'-TAATATTAC-3') conservada entre todos os geminivírus, onde se encontra o domínio funcional da origem de replicação. Essa seqüência de nucleotídeos é clivada durante o início da replicação viral e se localiza num contexto de 29 a 32 nucleotídeos capazes de formar uma estrutura em forma de grampo. Embora a seqüência de 30 nucleotídeos varie entre espécies de geminivírus, a estrutura em forma de grampo está sempre presente, sendo assim considerada um elemento conservado estruturalmente e essencial para replicação denominado

SCE (*structurally-conserved element*) (Lazarowitz et al., 1992; Faria & Zerbini, 2000; Stanley et al., 2005).

A transcrição dos genes virais ocorre tanto no sentido viral ($5' \rightarrow 3'$) como no sentido complementar ($3' \rightarrow 5'$) (Howarth et al., 1985; Rojas et al., 2005). A transcrição é bidirecional tanto no componente A, quanto no componente B (Faria et al., 2000). Um begomovírus bipartido codifica 6-7 proteínas, sendo as do componente A as proteínas AV1 (CP), transcritas no sentido viral, AC1 (Rep), AC2 (TrAP), AC3 (REn) e AC4 no sentido complementar. No componente B, a proteína BV1 (NSP) é transcrita no sentido viral e BC1 (MP) no sentido complementar (Faria et al., 2000; Rojas et al., 2005; Stanley et al., 2005). Os begomovírus monopartidos apresentam, além das proteínas AV1 (CP), AC1 (Rep), AC2 (TrAP), AC3 (REn) e AC4, transcritas da mesma forma que nos bipartidos, a proteína AV2 (MP) transcrita no sentido viral (Stanley et al., 2005).

As funções das principais proteínas são:

- Proteína capsidial (CP), codificada pela ORF AV1, é responsável por encapsidar os componentes A e B além de estar provavelmente envolvida no movimento célula a célula e a longa distância (Stanley et al., 2005). A CP também é importante para a transmissão pelo vetor *B. tabaci*, sendo necessária para o transporte do vírus através da mosca-branca até a hemolinfa. Morin et al. (2000) demonstraram que a CP do vírus TYLCV liga-se à GroEL, proteína produzida por bactéria endossimbionte presente em *B. tabaci*, e este fato protege as partículas virais de degradação no vetor;
- Proteína Rep, produzida pela ORF AC1, é a proteína associada à replicação viral (Fontes et al., 1994). Essa proteína interage com a proteína retinoblastoma homóloga de planta regulando a progressão do ciclo celular, fazendo com que células diferenciadas voltem a produzir fatores que permitam a replicação viral (Stanley et al., 2005);
- Proteína transativadora da transcrição (TrAP), produzida pela ORF AC2, influencia a transcrição e subsequente expressão dos genes CP e NSP (van Wezel et al., 2001) além de ser supressora do silenciamento gênico pós-transcricional (Mansoor et al., 2003);
- Proteína REn, produzida pela ORF AC3, interage com a proteína AC1 e aumenta a acumulação do DNA viral. Embora não seja essencial para que a replicação ocorra, na presença da proteína REn, o acúmulo de DNA viral é muito maior (Faria & Zerbini, 2000);

- Proteína C4, codificada pela ORF AC4, é um determinante da expressão de sintomas, envolvida no controle do ciclo celular e na divisão celular, estimulando a proliferação celular (Rojas et al., 2005; Stanley et al., 2005).

O componente B do begomovírus bipartido apresenta função de movimento do DNA viral, e codifica as proteínas:

- Proteína NSP (*nuclear shuttle protein*), codificada pela ORF BV1, é essencial para o tráfico intracelular pelo núcleo (Noueiry et al., 1994; Sanderfoot et al., 1996);
- Proteína de Movimento (MP), codificada pela ORF BC1, é responsável pelo movimento célula-célula via plasmodesma (Noueiry et al., 1994; Sanderfoot et al., 1996; Stanley et al., 2005). De acordo com Oparca (2004), é um importante determinante na expressão de sintomas.

3.4 Replicação e Movimento viral

Após a introdução de partículas virais na célula vegetal pela mosca-branca, seguida do desencapsulamento da partícula viral, inicia-se o processo de replicação dos begomovírus no núcleo das células infectadas. O primeiro passo é a conversão do DNA de fita simples (ssDNA) em DNA de fita dupla (dsDNA) (conhecido como forma replicativa, RF) utilizando o mecanismo de círculo rolante, semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos ϕ X174 e M13 (Stanley, 1995). Essa etapa inicial depende totalmente do sistema enzimático do hospedeiro, onde ocorrerá a tradução da proteína viral Rep e posterior replicação e formação das formas replicativas do vírus (RFs), que servem de molde para a síntese de novos componentes genômicos e transcrição dos genes virais. O sítio de início da replicação viral, ou origem de replicação (*ori*), está localizado na região intergênica comum entre os dois componentes genômicos, razão da conservação da sequência de nucleotídeos entre os dois componentes do genoma viral (Stanley et al., 2005). Durante a replicação, ocorre a síntese de uma molécula de ssDNA linear de sentido viral, contendo várias unidades do genoma (multímero ou concatômero). O concatômero é clivado, formando monômeros e estes, religados, geram moléculas circulares de ssDNA, correspondendo ao genoma viral. A clivagem é realizada pela proteína Rep e ocorre na sequência conservada de nove nucleotídeos da região

comum, sendo que o ponto de corte será sempre no mesmo local (TAATATT \times AC) (Faria & Zerbini, 2000; Stanley et al.; 2005). A replicação é idêntica para o DNA B. Mutações nos genes Rep, TrAP, NSP e MP podem bloquear a infectividade viral (Hanley-Bowdoin, 1999).

Para o estabelecimento de uma infecção sistêmica na planta, é necessário que, após a replicação na célula inicial, o vírus infecte outras células. O movimento no interior do hospedeiro pode ser dividido em dois processos, sendo o primeiro o movimento célula a célula via plasmodesmas e a longa distância, através do floema. Para isso, os begomovírus codificam uma proteína não estrutural denominada MP codificada pela ORF BC1 (Noueiry et al., 1994; Sanderfoot et al., 1996). Plantas transgênicas expressando a proteína MP de begomovírus frequentemente apresentam sintomas de infecção viral. A maioria dos vírus codifica pelo menos uma proteína de movimento (MP) que controla o transporte do complexo viral nucleoproteína através do plasmodesma, com função de permitir ou auxiliar o movimento célula a célula, levando ao surgimento dos sintomas da infecção devido a um desarranjo do transporte intercelular (Scholthof, 2005). Como os begomovírus se multiplicam no núcleo da célula infectada, é necessário o transporte do núcleo para o citoplasma, que é realizado pela segunda proteína denominada NSP (Stanley et al., 2005). Ainda não estão clara a forma e a natureza do complexo de DNA dos begomovírus que trafega pelos plasmodesmas (Noueiry et al., 1994; Scholthof, 2005).

3.5 Begomovirus em plantas de *Capsicum* spp. e tomateiro

No Brasil, as doenças causadas por begomovírus bipartido são associadas principalmente ao tomateiro. Porém, verificou-se nestes últimos anos, um aumento populacional do inseto em *Capsicum* spp. e presença de begomovírus em plantas cultivadas. A incidência destes vírus na cultura, relatada pela primeira vez em 1975 (Matys et al., 1975), aumentou vertiginosamente a partir do início da década de 1990 (Ribeiro et al., 2003). Esse aumento esteve diretamente relacionado à introdução do biótipo B de *B. tabaci*, o qual, ao contrário do biótipo A (até então o único presente no Brasil), coloniza o tomateiro com grande eficiência (Lourenção & Nagai, 1994).

Desde então, em tomateiro, foram descritas as espécies *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) e *Tomato yellow vein streak virus*

(ToYVSV) (Faria et al., 1997; Fernandes et al., 2006; Calegario et al., 2007; Ribeiro et al., 2007) além das espécies tentativas baseado em seqüências de genomas parciais como o Tomato chlorotic vein virus, Tomato crinkle yellow leaf virus, Tomato crinkle virus, Tomato dwarf leaf curl virus, Tomato golden vein virus, Tomato infectious yellows virus, Tomato mottle leaf curl virus e Tomato severe mosaic virus (Fauquet et al., 2008).

Ao contrário do verificado em outros países, relatos e infecção de plantas de pimentão por begomovírus no Brasil são recentes, como em 2001, no estado de Pernambuco (Lima et al., 2001) e em 2005, no estado de São Paulo (Nozaki et al., 2006). As duas espécies encontradas foram o ToYVSV e o ToRSV (Nozaki, 2007). No Distrito Federal, também foi verificada presença do ToSRV em pimenta (*Capsicum baccatum*) (Bezerra-Agasie et al., 2006).

Em outras regiões do mundo, vários begomovírus já foram relatados em *Capsicum* spp. No México destacam-se *Pepper huasteco virus*, PHV (Garzón-Tiznado et al., 1993), *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) e *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV). *Pepper leaf curl virus* (PepLCV), outra espécie em plantas de pimentão, foi encontrada e caracterizada em Taiwan (Shih et al., 2001). Infecção pelo TYLCV em *C. annuum* e *C. chilense* foi relatada em diferentes partes do mundo, como no Sul da Espanha (Reina et al., 1999) e Cuba (Quiñones et al., 2002).

Além de plantas cultivadas, muitas espécies de plantas invasoras têm sido relatadas como hospedeiras de *Begomovirus* em vários Países, inclusive no Brasil. As espécies geralmente pertencem às famílias Malvaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae (Morales & Anderson, 2001). Alguns estudos demonstraram casos em que begomovírus provenientes de plantas invasoras podem ser transmitidos para espécies cultivadas através do inseto-vetor (Faria et al., 2000).

A espécie monopartida TYLCV ainda não foi encontrada no Brasil (Inoue-Nagata et al., 2004b) e, em São Paulo, verificou-se que tanto em tomateiro como em plantas de pimentão, as espécies ToYVSV e ToSRV são as encontradas (Fernandes et al., 2008; Marubayashi et al., 2008). Já, no estado de Goiás e no Distrito Federal, há predominância do ToSRV e da espécie tentativa TGVV, enquanto que, no estado de Pernambuco, da espécie tentativa ToMoLCV (Fernandes et al., 2008).

3.6 Transmissão natural dos begomovírus

Os begomovírus não são transmitidos por semente ou por contato entre plantas infectadas e sadias (Santos et al., 2003). Sua dispersão ou introdução no campo dá-se pela ação da mosca-branca a partir de fontes de vírus de áreas próximas, podendo ser de cultivos antigos como também de fontes alternativas no campo (Costa, 1976). Os vetores são insetos sugadores classificados na ordem Hemiptera, incluindo as moscas-brancas (Família: Aleyrodidae) da espécie *Bemisia tabaci* (Lazarowitz et al., 1992; Villas Bôas et al., 1997). *B. tabaci* é vetora de espécies de vírus pertencentes ao gêneros *Begomovirus* (*Geminiviridae*), *Crinivirus* (*Closteroviridae*), *Carlavirus* (*Flexiviridae*) e *Ipomovirus* (*Potyviridae*) (Brown & Czosnek, 2002).

Acredita-se que o centro de origem de *B. tabaci* possa ser o Oriente, tendo sido introduzida na Europa, África e Américas, pelo homem, através de material vegetal (Brown & Bird, 1992). A mosca-branca é encontrada nos trópicos e subtropicais de todos os continentes (Brown, 2000). Sua distribuição está estritamente 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 et al., 1993).

Moscas-brancas são insetos diminutos, medindo de 1 a 2mm, sendo as fêmeas maior que os machos (Nateshan et al., 1996). Os adultos de mosca-branca têm o dorso de coloração amarelo pálido e asas brancas. Como suas asas cobrem quase todo o corpo, a cor predominante é o branco, daí ser erroneamente denominada de mosca-branca (Toscano et al., 2002). Seu ciclo de vida compreende quatro fases (ovo, ninfa, pupa e adulto) e sofre influência das condições climáticas e ambientais, principalmente temperatura, umidade relativa do ar e planta hospedeira (Gill, 1990; Nava-Camberos et al., 2001). Villas Bôas et al. (2002), estudando a biologia de *B. tabaci* biótipo B em plantas de tomate, sob as condições de 28°C, 70% UR e fotofase de 14h, obtiveram duração em torno de 3 dias para que as ninfas criadas em plantas de tomate se tornassem adultas.

As fêmeas podem ovipositar de 130 a 300 ovos durante o ciclo, dependendo da planta hospedeira e temperatura (Toscano et al., 2002). A reprodução é sexuada ou por partenogênese arrenótoca, na qual fêmeas não fecundadas resultam em ovos

que darão machos estéreis e, dependendo das condições climáticas, há 11 a 15 gerações por ano (Gill, 1990).

O complexo *B. tabaci* é constituído de populações morfologicamente idênticas, mas que exibem variabilidade biológica quanto aos hospedeiros preferencialmente colonizados, polimorfismo genético, fecundidade, composição de procariotas endossimbiontes e capacidade de transmissão das diferentes espécies de begomovírus, de modo que hoje são classificadas em diferentes biótipos (Brown et al., 1995; Frohlich et al., 1999).

Existem, aproximadamente, 41 biótipos, sendo que apenas dois (biótipos A e B) são encontrados no Brasil (Rabello et al., 2008). O biótipo Q é encontrado na Europa e Ásia (Bosco et al., 2006). Esse biótipo é exótico no Brasil e representa uma ameaça devido à alta resistência ao pyriproxyfen (Horowitz et al. 2003) e buprofezin e reduzida suscetibilidade aos inseticidas neonicotinóides, como imidacloprid, acetamiprid e thiumethoxam (Hodges, 2009), utilizados comumente no controle da *B. tabaci*. Na Bacia do Mediterrâneo, além dos biótipos B e Q, também foram observados os biótipos M, S e T (Bosco et al., 2006). O biótipo S é restrito a plantas de *Ipomoea indica* e encontrado em Málaga na Espanha, enquanto que o biótipo T foi encontrado em *Euphorbia characias*, na Sicília e outras regiões do sul da Itália. O biótipo M foi verificado em algodão, na Turquia (Bosco et al., 2006).

Como os diferentes biótipos apresentam morfologia semelhante, técnicas moleculares como RAPD-PCR, PCR-RFLP e seqüenciamento dão suporte aos estudos filogenéticos das populações de *B. tabaci* (Brown, 2000; Bosco et al., 2006; Rabello et al., 2008). Um método que permite a rápida identificação de biótipos dos cinco biótipos B, Q, M, S e T, foi desenvolvido por Bosco et al. (2006). O método se baseia na amplificação do gene mitocondrial para a citocromo oxidase I, seguido de digestão enzimática com a enzima *Tru9I*, que distingue os cinco biótipos claramente, ou com a enzima *TaqI*, que permite a separação dos biótipos B e Q, mais importantes hoje para a agricultura (Bosco et al., 2006). Análise deste gene vem sendo empregada para estudar populações de mosca-branca do mundo todo (Frohlich et al., 1999) e permite classificar as populações em cinco grupos: a) Novo Mundo: incluindo populações de moscas-brancas das Américas; b) Mediterrâneo-Africa: englobando populações da África e Bacia do Mediterrâneo; c) África: populações restritas à

mandioca; d) Subcontinente Indiano: populações do Norte do subcontinente Indiano e e) China: populações do sul e leste da Ásia (Brown et al., 2000).

De acordo com Perring (1995), *B. tabaci* ficou conhecida nos EUA como raça da Califórnia, raça algodão, raça-A e biótipo A. O primeiro relato de mosca-branca no Brasil ocorreu na Bahia, em 1928, em *Euphorbia pulcherrima*, *Nicotiana glauca* and *N. tabacum* [Bondar (1928) *apud* Lima et al., 2000]. Até a década de 90, a população de mosca-branca era baixa e com algumas perdas relacionadas à transmissão de vírus em feijão e tomateiro (Ribeiro *et al.*, 1998). Por volta de 1991, houve a introdução do biótipo B (Lourenção & Nagai, 1994), cujas fêmeas apresentam maiores taxas de oviposição e mortalidade baixa em novos hospedeiros e gama de hospedeiros maior que a do biótipo A (Bedford et al., 1994). Além disso, apresenta maior grau de adaptação climática e dispersão muito maior (Bedford et al., 1994, Morales & Jones, 2004). Essas características fizeram com que o biótipo B predominasse em regiões onde anteriormente havia o biótipo A (Lima et al., 2002; Rabello et al., 2008).

A modalidade de transmissão de begomovírus por moscas-brancas é do tipo circulativa não propagativa (Brown, 1997; Morin et al., 1999). O vírus circula na hemolinfa, mas não replica no vetor, envolvendo a passagem de partículas virais do intestino para a hemolinfa do inseto, da hemolinfa para as glândulas salivares e destas para outras plantas (Hull, 2004). A alta eficiência de transmissão da mosca-branca pode estar associada ao fato do vírus ser introduzido pelo inseto diretamente nas células do floema, onde se alimenta, possibilitando o maior sucesso para o início da replicação e movimento viral (Brown, 1997). Apenas para o caso do TYLCV, existem evidências de replicação viral no inseto e passagem transovariana (Ghanim et al., 1998).

Acredita-se que a grande maioria dos vírus de plantas transmitidos de maneira circulativa por insetos vetores interage com a proteína GroEL. Esta é produzida por bactérias endossimbiontes de insetos, para evitar a destruição na hemolinfa das partículas virais e assegurar a transmissão do vírus (Akad et al., 2007). Akad et al. (2007) demonstraram que a capa protéica do TYLCV interage com a proteína GroEL de *B. tabaci*, e que distúrbios nesta interação acarretam em redução da transmissão do vírus pelo inseto.

3.7 Detecção de *Begomovirus*

A identificação e caracterização de begomovírus baseada apenas na sintomatologia não é possível, uma vez que os sintomas variam de acordo com as condições ambientais, idade da planta hospedeira e ocorrência de infecções mistas envolvendo duas ou mais espécies virais (Paplomatas et al., 1994). Os métodos tradicionalmente utilizados na diagnose são a reação da polimerase em cadeia (PCR), utilizando oligonucleotídeos universais desenhados por Rojas et al. (1993), e a hibridização de ácidos nucléicos, utilizando, como sonda, fragmentos clonados do DNA viral (Gilbertson et al., 1991; Morilla, et al., 2005). Recentemente, uma tecnologia de amplificação que utiliza o mecanismo de replicação por círculo rolante de DNAs circulares, denominada RCA (*Rolling circle amplification*) foi desenvolvida para aumentar a sensibilidade de detecção de membros que apresentam DNA circular, como é o caso dos geminivírus, por meio do uso da enzima DNA polimerase do bacteriófago ϕ 29 e um “primer” randômico (Inoue-Nagata et al., 2004a; Haible et al., 2006). As vantagens do uso de RCA estão relacionadas à simplicidade de uso da técnica, detecção de todos os componentes infecciosos de DNA circular e possibilidade de seqüenciamento direto do produto amplificado (Haible et al., 2006).

Ao RCA pode-se aliar o RFLP, que consiste na clivagem do produto por enzimas de restrição específicas que permitam diferenciar os indivíduos analisados (Haible et al., 2006). Uma das enzimas comumente utilizadas é a *HpaII*, que fornece padrões que permitem, muitas vezes, identificar espécies diferentes de begomovírus sem a necessidade de seqüenciamento do DNA viral (Haible et al., 2006).

3.8 Resistência a begomovírus em plantas de tomateiro e *Capsicum* spp.

Programas de melhoramento têm descoberto fontes de resistência ao begomovírus monopartido TYLCV em várias espécies selvagens de tomateiro, incluindo *Solanum pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. habrochaites* (*Lycopersicon hirsutum*) e *S. cheesmaniae* (Scott, 2006; Ji et al., 2007a). Vários locos de resistência ao TYLCV foram relatados e mapeados até o momento (Ji et al., 2007a). O primeiro locus identificado foi o *Ty-1*, originado de *S. chilense* (*L. chilense*) mapeado no cromossomo 6 do tomateiro (Zamir et al., 1994). Outro loco de resistência ao TYLCV foi encontrado em *S.*

habrochaites f. *glabratum* e designado como *Ty-2* (Hanson et al., 2006). Ji et al. (2007b) mapearam um terceiro locus denominado de *Ty-3* no cromossomo 6.

Todos os levantamentos conduzidos no Brasil indicaram a presença exclusiva de begomovírus com genoma bipartido (Ribeiro et al., 2003; Inoue- Nagata *et al.*, 2004a). Ensaio de resistências a genótipos e híbridos de tomateiros contém o gene de resistência *Ty-1*, indicaram resistência a TYVSV (Matos et al., 2003). Boiteux et al. (2007) verificaram que o loco *Ty-1* em tomateiro confere tolerância a distintas espécies de *Begomovirus* bipartidos. Trata-se de herança tipo dominância incompleta, onde se observou resistência parcial aos begomovírus bipartidos em híbridos experimentais (Nizio et al., 2008).

De acordo com Ji & Scott (2008) resistência a begomovírus monopartidos vem sendo utilizada como controle dessas viroses devido à introgressão de genes de resistência em cultivares de tomate, pois pesquisas demonstraram que três regiões no cromossomo 6 de uma espécie de tomate selvagem, sendo que 2 genes no cromossomo (*Ty-1* e *Ty-3*) apresenta um alto nível de resistência.

Para o pimentão, pouco se sabe sobre a resistência genética aos begomovírus bipartidos encontrados no Brasil. No entanto, no México, foi observada tolerância as espécies PHV e PepGMV em populações de *C. chinense* (Godinez-Hernández et al., 2001).

CAPÍTULO 1

**OCORRÊNCIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Begomovirus* EM PLANTAS DE
PIMENTÃO E TOMATE NO ESTADO DE SÃO PAULO**

OCORRÊNCIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Begomovirus* EM PLANTAS DE PIMENTÃO E TOMATE NO ESTADO DE SÃO PAULO

Kelly Cristina Gonçalves Rocha¹; Julio Massaharu Marubayashi¹; Jesús Navas-Castillo²;
Marcelo Agenor Pavan¹ e Renate Krause-Sakate¹

¹ Departamento de Produção Vegetal, Setor Defesa Fitossanitária, UNESP, Faculdade de Ciências Agronômicas, CEP 18603-970, Botucatu, SP; ² Estación Experimental “La Mayora”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 29750 Algarrobo-Costa, Málaga, España.

Aceito para publicação em: ___/___/_____

Rocha, K.C.G.; Marubayashi, J.M.; Navas-Castillo, J.; Pavan, M.A.; Krause-Sakate, R. **Ocorrência e variabilidade genética de *Begomovirus* em plantas de pimentão e tomate no Estado de São Paulo.**

RESUMO

A incidência de begomovírus aumentou muito no Brasil após a introdução do biótipo B de *Bemisia tabaci* em 1990. Um levantamento para avaliar a ocorrência de begomovírus nas culturas de pimentão e tomate no estado de São Paulo foi realizado entre janeiro/2007 e julho/2008. O DNA total de amostras de pimentão (710) e de tomateiro (103) foi extraído e a presença de begomovírus foi testada por PCR utilizando-se o par de olinucleotídeos universais PAL1v1978/PAR1c496 e PAL1v1978/PAR1c715. Paralelamente, as mesmas amostras foram testadas por amplificação por círculo rolante (RCA), analisadas por RCA-RFLP e clivadas com a enzima de restrição *HpaII*, a fim de se conhecer a variabilidade genética dos isolados. Os resultados demonstraram que, para a técnica de PCR, 99 amostras de pimentão (13,94%) e 39 de tomateiro (37,86%) foram positivas para a presença de begomovírus. Por RCA-PCR, 333 (46,90%) e 82 (79,61%) amostras foram positivas para pimentão e tomateiro, respectivamente, mostrando a maior sensibilidade da técnica. O seqüenciamento direto dos

produtos de PCR indicou a presença de apenas a espécie *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) na amostras de pimentão e tomateiro analisadas. Porém, seqüenciamento parcial de clones feitos a partir de produto RCA permitiu a detecção de infecção mista de ToSRV e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) em amostras de tomateiro. No estudo de variabilidade por RCA-RFLP, quatro padrões de restrição foram observados para o ToSRV em pimentão. Para tomateiro observaram-se 18 padrões, sendo dois idênticos aos isolados de ToSRV encontrados em pimentão, nove para outros isolados de ToSRV somente encontrados em tomateiro, um padrão correspondente à infecção mista por ToSRV com ToYVSV e, para os seis restantes não foi possível afirmar a qual espécie correspondem, pois o produto de PCR não foi seqüenciado. Esse resultado indica claramente maior diversidade genética dos begomovírus em tomateiro quando comparada com a de pimentão.

Palavras chave: *Geminiviridae*, *Bemisia tabaci*, levantamento, Solanáceas, *Solanum* e *Capsicum*.

OCCURRENCE AND GENETIC VARIABILITY OF *Begomovirus* IN PEPPER AND TOMATO PLANTS IN SÃO PAULO STATE

ABSTRACT

The incidence of begomoviruses has sharply increased in Brazil after the introduction of the biotype B of *Bemisia tabaci* in the early 1990s. All species reported in Brazil have two genomic components (DNA A and B). A survey from January/2007 to July/2008 to evaluate the occurrence of begomoviruses in different pepper and tomato crops from São Paulo state

was carried out. Total DNA of 710 pepper and 103 tomato samples was extracted and, the presence of begomoviruses tested by PCR using the primer pairs PAL1v1978/PAR1c496 and PAL1v1978/PAR1c715. The same samples were tested by rolling circle amplification (RCA) and then analyzed by RCA-RFLP with the restriction enzyme *HpaII* to evaluate the genetic variability of the isolates. Ninety nine (13, 94%) samples collected from pepper and thirty nine (37, 86%) from tomato were positives by PCR indicating the presence of begomovirus. By RCA-PCR, three hundred and thirty three (46, 90%) and eighty two (79, 61%) samples from pepper and tomato were positives, showing greater sensitivity of these technique. The direct sequencing of PCR products indicated the presence of only the specie *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) in peppers and tomato plants. However by partial sequencing of clones, two species ToSRV and *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) were detected in tomato. By RCA-RFLP, four distinct profiles were observed for begomovirus in pepper, while for tomato eighteen profiles were observed. Two were identical to ToSRV isolates from pepper, nine correspond to isolates of ToSRV only found in tomato plants, one for the mixed infection by ToSRV with ToYVSV and for the six others it is not possible to affirm which specie of begomovirus is present because no virus fragment was sequenced. These results indicate a higher degree of genetic variability of begomovirus found in tomato compared than pepper plants.

Key Words: *Geminiviridae*, *Bemisia tabaci*, Field Survey, Solanaceas, *Solanum* and *Capsicum*

INTRODUÇÃO

Plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.) são as hortaliças mais cultivadas em todo o Brasil. As doenças causadas por vírus nessas solanáceas têm ocasionado graves perdas econômicas em todo o mundo. Dentre as viroses mais importantes estão àquelas ocasionadas pelos begomovírus (Família *Geminiviridae*) (Faria et al., 2000).

A família *Geminiviridae* é constituída por quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* (Van Regenmortel et al., 2000). Os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* são considerados os mais importantes pelo número de espécies que infectam plantas cultivadas e invasoras (Faria et al., 2000; Castillo-Urquiza et al., 2008), constituindo-se atualmente num dos principais problemas fitossanitários de muitas culturas agrícolas em todo o mundo (Moriones & Navas-Castilho, 2000; Monci et al., 2002; Ribeiro et al., 2003, Rojas et al., 2005). Caracterizam-se por apresentar “partículas geminadas” com morfologia icosaédrica e genoma composto, na maioria das vezes, por duas moléculas de DNA circular de fitas simples, denominadas DNA-A e DNA-B, cada uma com aproximadamente 2.500 nucleotídeos. No entanto, alguns begomovírus do Velho Mundo como o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e *Tomato leaf curl virus* (TLCV) têm apenas um componente genômico, o DNA A (Lazarowitz, 1992; Van Regenmortel et al., 2000; Stanley et al., 2005).

As espécies de vírus deste gênero são transmitidas pela *Bemisia tabaci*, um inseto polífago (Bedford et al., 1994). No Brasil a incidência de begomovírus aumentou drasticamente após a introdução do biótipo B de *Bemisia tabaci* que ao contrário do biótipo A (até então o único presente no Brasil), coloniza o tomateiro com grande eficiência (Lourenção & Nagai, 1994). Desde então, cinco espécies definitivas foram descritas em tomateiro: *Tomato*

chlorotic mottle virus (ToCMV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (Calegario et al., 2007; Faria et al., 1997; Fernandes et al., 2006; Ribeiro et al., 2007) além de seis espécies tentativas baseado em seqüências de genomas parciais (Fernandes et al., 2008; Ribeiro et al., 2003). Em pimentão já foram verificadas as espécies ToSRV (Nozaki et al., 2006; Bezerra-Agasie et al., 2006) e ToYVSV (Nozaki, 2007).

Algumas espécies de vírus relacionadas a plantas invasoras como *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (Calegario et al., 2005; Castillo-Urquiza et al., 2007) foram relatadas infectando naturalmente plantios de tomateiro. A presença de diversas espécies no campo, todas transmitidas por mosca branca, torna comum a ocorrência de infecções mistas, com dois ou mais vírus presentes simultaneamente na mesma planta (Ribeiro et al., 2003; Castillo-Urquiza et al., 2007). A explicação mais provável para o rápido surgimento e disseminação de begomovírus é a colonização de plantas silvestres e daninhas pelo biótipo B de *B. tabaci*, possibilitando que vírus nativos presentes nestas plantas sejam transferidos para plantas cultivadas, como o tomateiro (Castillo-Urquiza et al., 2008).

Diante, do alto grau de diversidade genética e importância econômica em solanáceas dos begomovírus bipartidos, encontrados no Brasil, os objetivos foram, avaliar a ocorrência e a diversidade genética de begomovírus isolados de plantas de tomate e pimentão no Estado de São Paulo, utilizando-se PCR e amplificação do genoma viral por RCA (rolling circle amplification), associado ao RFLP, que permite avaliar a variabilidade genética destes isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletas nos campos de produção comercial de plantas de pimentão e tomate

Amostras de tecidos foliares de plantas de pimentão foram coletadas nas principais regiões produtoras do estado de São Paulo, incluindo as áreas de cultivo protegido de Pirajú, Tejuapé, Santa Cruz do Rio Pardo, Sorocaba, São Miguel Arcanjo, Itapetininga, Pirajuí, Iacanga, Salto, Avaí e Reginópolis e a campo aberto em Lins, Cafelândia e Sabino. Amostras de tomateiro foram coletadas apenas em cultivo protegido nas regiões de Lins, Sabino, São Miguel Arcanjo, São Pedro do Turvo, Piraju e Santa Cruz do Rio Pardo. Foram coletadas 813 amostras, sendo 710 de pimentão e 103 de tomateiro, durante janeiro/2007 e julho/2008, sendo estas coletas trimestrais.

Análise do DNA viral

A extração de DNA genômico total foi realizada segundo o método descrito por Dellaporta et al. (1983). O DNA total extraído de cada amostra foi submetido à reação de “Polymerase Chain Reaction” (PCR) utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores “universais” PALIv1978/PAR1c496, que amplificam um fragmento com aproximadamente 1100bp do DNA-A dos begomovírus correspondente à parte da ORF (Open Reading Frame) AC1 (Rep), à região comum e parte da ORF AV1 (CP) (Rojas et al., 1993). Paralelamente, o DNA foi amplificado por círculo rolante (RCA) segundo método descrito por Inoue-Nagata et al. (2004) e Haible et al. (2006) e o produto de RCA foi utilizado na reação de PCR utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos.

Foram selecionadas e re-amplificadas por PCR 52 amostras positivas para begomovírus do Estado de São Paulo, sendo 27 amostras de pimentão e 17 de tomateiro, com os pares de

oligonucleotídeos PrV324/PrC889 (Wyatt & Brown, 1996) e oito amostras de plantas de pimentão com os oligonucleotídeos PALIv1978/PAR1c715 (Rojas et al., 1993) para serem seqüenciadas. Ambos os oligonucleotídeos amplificam parte da porção codificadora para a proteína capsidial. As amostras resultantes do seqüenciamento foram comparadas entre si e com outras seqüências de begomovírus depositadas no GenBank utilizando-se os programas Blast n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e Clustal W (Thompson et al., 1994). A análise filogenética foi realizada com o programa MEGA versão 4.0 (Kumar et al., 2004), utilizando o método de “Neighbor-Joining”, com valor de “bootstrap” 2000.

Para estimar a variabilidade genética, 45 amostras positivas de pimentão e 34 de tomateiro foram amplificadas por RCA seguida de RFLP, utilizando-se a enzima de restrição *HpaII*. O perfil eletroforético foi observado em gel de poliacrilamida 10%, corado com brometo de etídeo, conforme descrito por Haible et al. (2006).

Dezoito amostras foram linearizadas com as enzimas *BamHI* e *BgIII*. Utilizando-se *BamHI*, foram linearizadas quatro amostras de pimentão (22G, 31H, 44E e 62A) e sete de tomateiro (1To, 24To, 26To, 46To, 88To, 93To e 103To). Usando a enzima *BgIII*, foram linearizadas uma amostra de pimentão (82A) e seis de tomateiro (1To, 24To, 26To, 46To, 88To, 93To). As amostras foram clonadas no vetor plasmidial pBluescript II SK+ para seqüenciamento parcial com o oligonucleotídeo M13- (5' GTAAAACGACGGCCAGT 3') do vetor plasmidial. Os clones 44E (*BamHI*) e 82A (*BgIII*) oriundos de pimentão foram seqüenciados completamente por “primer walking”. O seqüenciamento dessas amostras foi realizado pela MACROGEN, Inc. (Seoul, Korea do Sul).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ocorrência e diversidade

Por PCR, foram detectadas 99 (13,94%) e 39 (37,86%) amostras positivas para begomovírus em plantas de pimentão e tomateiro, enquanto que, por RCA-PCR, observaram-se 333 (46,90%) e 82 (79,61%) amostras positivas, respectivamente (Tabela 1 e 2). Esses resultados evidenciam maior sensibilidade na diagnose de begomovírus quando se associa a RCA com a PCR. A RCA baseia-se na amplificação por círculo rolante de amostras de DNA circulares e, como o componente genômico dos begomovírus é constituído por DNA de fita simples circular, este

se torna substrato para a amplificação (Inoue-Nagata et al., 2004; Haible et al., 2006). Apesar da sensibilidade da PCR ser alta, muitas vezes a concentração viral na planta pode ser inferior a este limiar, levando a detecções de falso negativo. Desse modo, a RCA aumenta a concentração do DNA viral que será substrato para a PCR, como pode ser observado tanto em plantas de tomate como em pimentão, aumentando consideravelmente o número de amostras positivas. Para begomovírus, a RCA pode ser utilizada para diagnóstico sem posterior utilização da PCR linearizando-se o produto e observando-se o aparecimento de bandas do tamanho correspondente ao genoma completo dos begomovírus (Haible et al., 2006).

Vinte e sete amostras de pimentão e 17 de tomateiro foram seqüenciadas com os oligonucleotídeos PrV324 (Wyatt e Brown, 1996), enquanto que 8 amostras de pimentão foram seqüenciadas com o oligonucleotídeo PAR1c715 (Rojas et al., 1993). Comparação com seqüências depositadas no GenBank demonstrou predominância da espécie ToSRV em todas regiões amostradas no Estado de São Paulo. A identidade dos isolados de ToSRV de plantas de pimentão variou de 97 a 99% para os 520 nucleotídeos obtidos com o oligonucleotídeo PrV324 e de 92% a 98% para os 500 nucleotídeos obtidos com o oligonucleotídeo

PAR1c715, comparando-se com o ToSRV (DQ207749). Para os isolados provenientes de tomateiro, a identidade variou de 91 a 98% com o ToSRV (DQ207749) para os 520 nucleotídeos amplificados pelo “primer” PrV324. Essa variabilidade pode ser observada nas árvores filogenéticas preparadas com as seqüências obtidas com o oligonucleotídeo PrV324, obtidas a partir de amostras coletas em pimentão (Figura 1) e tomateiro (Figura 2).

O seqüenciamento das amostras de plantas de pimentão clonadas com *Bam*HI nas regiões das ORFs AC1, AC2 e AC3, correspondente às proteínas Rep, TrAP e REn do DNA A de begomovírus, também confirmou a presença do ToSRV, com identidade variando de 98 a 99%. Para amostras de tomateiro clonadas com *Bam*HI, houve identidade de 97 a 99%, nas mesmas regiões seqüenciadas. De uma mesma amostra positiva de tomate (46To) foram obtidos vários clones e pôde-se verificar infecção mista de ToSRV e ToYVSV, sendo que o isolado de ToSRV mostrou identidade de 99% com o ToSRV (DQ207749) e o ToYVSV 99% com o ToYVSV-[G22] (EF459696).

O seqüenciamento das amostras de plantas de pimentão e tomateiro clonadas com *Bg*III nas regiões das ORFs BC1 e BV1, correspondente às proteínas MP e NSP do DNA-B de begomovírus bipartido, confirmou alta identidade variando de 98 a 99% com o componente B das espécies ToSRV e ToRMV. Segundo Lima et al. (2008), as espécies ToSRV e ToRMV compartilham do mesmo DNA-B, pois, ambas as seqüências apresentam identidade de 98% entre si e, alta identidade de nucleotídeos (97%) entre a região comum.

Algumas espécies de begomovírus encontram-se amplamente distribuídas pelo País, enquanto outras estão restritas a certas regiões. Os resultados obtidos nessa pesquisa corroboram os de Nozaki (2007) que verificou presença das espécies ToSRV e ToYVSV, com predominância de ToSRV em campos de pimentão analisados no Estado de São Paulo. De

acordo com Fernandes et al. (2008), os isolados ToSRV e ToYVSV tornaram-se predominantes em campos de tomateiro no Distrito Federal e no Estado de São Paulo. Por outro lado, o ToYVSV foi relatado como prevalente em Minas Gerais (Calegario et al., 2007), e na principal região produtora de tomate do Estado de São Paulo (Colariccio et al., 2007). A prevalência de algumas espécies poderia ser interpretada como uma adaptação preferencial de espécies virais ou melhor eficiência de transmissão pelo inseto vetor (Castillo-Urquiza et al., 2008).

Infecções mistas por vírus de plantas são muito comuns em condição de campo, e podem resultar em efeitos antagônicos, aditivos e até sinérgicos (Castillo-Urquiza et al., 2008). A presença de dois ou mais begomovírus na mesma planta aumenta a probabilidade de eventos de recombinação e/ou pseudo-recombinação entre componentes do genoma viral, o que pode levar ao surgimento de novas espécies mais adaptadas ao novo hospedeiro (Monci et al., 2002; Inoue-Nagata et al., 2006).

Caracterização do genoma viral

O DNA-A e o DNA-B do isolado (denominado 44E e 82A, respectivamente) foram clonados e as seqüências nucleotídicas determinadas obtendo-se tamanhos de 2591 e 2569 nucleotídeos, respectivamente. Quando comparados a outros begomovírus, os clones 44E e 82A apresentaram maior identidade de seqüência, de 98%, com ToSRV-DNA A (número de acesso DQ 207749) de Petrolina de Goiás, proveniente de pimenta, e de 98% com ToRMV DNA B (número de acesso AF291706), isolado de tomate proveniente de Uberaba. Deste modo, foi comprovada a identidade viral seguindo os critérios taxonômicos atuais para o gênero *Begomovirus*, cujo DNA-A indica a espécie viral presente (Stanley et al., 2005; Fauquet et al., 2008).

Tanto o DNA-A como o DNA-B apresentaram todas as seqüências conservadas e a organização genômica semelhante a outros begomovírus bipartidos. O DNA-A codifica uma provável ORF no senso viral e quatro no senso complementar. Comparando-se a identidade da seqüência do DNA-A verificaram-se 98% de identidade para as regiões que codificam CP (AV1) e AC4, e 99% para as regiões AC1 (Rep), AC2 (TrAP) e AC3 (REn). O DNA B codifica duas ORFs (uma viral e uma complementar) com identidade de 98% para as ORF BV1 (NSP) e BC1 (MP) e de 97% para a região comum (RC) ou região intergênica entre ambos os componentes A e B.

Pela análise por RCA-RFLP das amostras de pimentão com sintomas e presença de begomovírus, foram observados quatro padrões de clivagem com a enzima *HpaII* (Figura 3) e todos foram confirmados como sendo da espécie ToSRV pela análise de seqüências (Figura 1), indicando variabilidade genética dentro da espécie. Para amostras positivas para begomovírus em tomateiro, foram observados 18 padrões de restrição (Figura 4), dois idênticos aos verificados em pimentão (17; 101 e 1; 92 em tomateiro iguais a 31H e 44E, respectivamente em pimentão), indicando possivelmente infecção pelos mesmos isolados de ToSRV. No entanto, padrões distintos para ToSRV também foram observados para algumas amostras (24, 37, 46, 48, 69, 75, 79, 87, 88, 92, 93, 101 e 103, 24) os quais tiveram porções do genoma viral seqüenciados. Em razão da infecção mista de ToSRV e ToYVSV na amostra 46 proveniente de tomate, verificou-se a ocorrência de um padrão distinto, porém idêntico à amostra 48. Ambas são amostras coletadas na mesma área produtora. Para apenas seis padrões (66, 70, 77, 78, 80 e 91) não seqüenciados, não foi possível verificar a espécie de begomovírus presente. Esses resultados indicam, possivelmente, alta variabilidade dentro da mesma espécie em tomateiro,

ou alta frequência de infecções mistas que não puderam ser detectadas pelo seqüenciamento direto do produto de PCR e/ou seqüenciamento de clones oriundos dessas amostras.

De acordo com Haible et al. (2006) a combinação de RCA com RFLP é altamente superior na diagnose de geminivírus quando comparada aos procedimentos baseados somente na PCR, e pode ser utilizada para estimar a ocorrência de begomovírus e sua diversidade genética.

A técnica RCA pode ser utilizada também para amplificar DNAs satélites, os quais acompanham vários geminivírus do Velho Mundo e que, em alguns casos, são importantes na determinação de patogenicidade (Alberter et al., 2005; Briddon et al., 2003). Também pode ser usado para amplificar patógenos de plantas do gênero *Nanovirus* (Gronenborn, 2004).

O monitoramento da ocorrência de begomovírus no Estado de São Paulo revelou que ToSRV foi a única espécie encontrada em cultivo de pimentão, porém, mostrou variabilidade genética usando a técnica RCA-RFLP, com a enzima *HpaII*. Esses resultados indicam um baixo grau de diversidade nos isolados encontrados infectando plantas de pimentão, com base no padrão de clivagem entre as amostras analisadas para a enzima testada. Entretanto, para as amostras coletadas em plantas de tomate com sintomas de begomovírus, a análise dos padrões indicou alta variabilidade para os isolados. A maior preferência de mosca-branca pelo tomateiro em relação a pimentão poderia explicar a maior diversidade dos isolados de ToSRV e a infecção mista. Mesmo a região geográfica analisada ser restrita, esse grau de diversidade ressalta a rápida emergência de ToSRV em tomate e pimentão no Estado de São Paulo e serve de base para os programas de melhoramento genético que devem ser voltados principalmente para esta espécie de begomovírus neste Estado.

AGRADECIMENTOS

O primeiro autor agradece à CAPES pela concessão de bolsa de estudos e ao apoio do Consejo Superior de Investigaciones Científicas-CSIC, Málaga, Espanha..

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Alberter, B.; Rezaian, A.M.; Jeske, H. Replicative intermediates of ToLCV and its satellite DNAs. **Virology**, v.331, p.441–448, 2005.

Ambrozevicius, L.P.; Calegario, R.F.; Fontes, E.P.B.; Carvalho, M.G.; Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.372-377, 2002.

Bedford, I.D.; Briddon, R.W.; Brown, J.K.; Rosell, R.C.; Markham, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. **Annals of Applied Biology**, v.125, p.311-325, 1994.

Bezerra-Agassie, I.C.; Ferreira, G.B.; Ávila, A.C.; Inoue-Nagata, A.K. First report of *Tomato severe rugose virus* in chili pepper in Brazil. **Plant Disease**, v.90, p.114, 2006.

Briddon, R.W., Bull, S.E., Amin, I., Idris, A.M., Mansoor, S., Bedford, I.D., Dhawan, P., Rishi, N., Siwatch, S.S., Abdel-Salam, A.M., Brown, J.K., Zafar, Y., Markham, P.G. Diversity of DNA beta, a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. **Virology**, v.312, p.106–121, 2003.

Calegario, R.F.; Andrade, E.C.; Ferreira, S.S.; Manhani, G.G.; Zerbini, F.M. Biological and molecular characterization of a tomato isolate of *Sida micranthe mosaic virus* (SimMV).

Fitopatologia Brasileira (Suplemento), v.30, p.180, 2005.

Calegario, R.F.; Andrade, E.C.; Ferreira, S.S.; Zerbini, F.M. Characterization os *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), a novel begomovirus infecting tomatoes in Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, p.1335-1342, 2007.

Agropecuária Brasileira, Brasília, v.42, p.1335-1342, 2007.

Castillo-Urquiza, G.P.; Beserra Junior, J.E.A.; Alfenas-Zerbini, P.; Varsani, A.; Lima, A.T.M.; Barros, D.R.; Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato in Paty do Alferes, Rio de Janeiro state, Brazil. **Virus Reviews and Research**, v.12, p.233, 2007.

Castillo-Urquiza, G.P.; Evando, J. Beserra Jr, A.; Bruckner, F.P.; Lima, A.T.M.; Varsani, A.; Alfenas-Zerbini, P. & Zerbini, F.M. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, DOI 10.1007/s00705-008-0172-0, 2008.

Colariccio, A.; Eiras, M.; Chaves, A.L.R.; Bergmann, J.C.; Zerbini, F.M.; Harakava, R. & Chagas, C.M. 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**, v.89, p.385-390, 2007.

Dellaporta, S.L.; Woods, J.; Hicks, J.B. A plant DNA miniprep, versionII. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.1, p.19-21, 1983.

Faria, J.C.; Souza-Dias J.A.C.; Slack, S.; Maxwell, D.P. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, v.81, p.423, 1997.

Faria, J.C.; Bezerra, I.C.; Zerbini, F.M.;Ribeiro, S.G.; Lima, M.F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 125-137, 2000.

Fauquet, C.M.; Briddon, R.W.; Brown, J.K.; Moriones, E.; Stanley, J.; Zerbini, F.M.; Zhou, X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. **Archives of Virology**, v.153, p.783-821, 2008.

Fernandes, F.R.; Albuquerque, L.C.; Giordano, L.B.; Boiteux, L.S.; Ávila, A.C.; Inoue-Nagata, A.K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, v.36, p.251–258, 2008.

Fernandes, J.J.; Carvalho, M.G.; Andrade, E.C.; Brommonschenkel, S.H.; Fontes, E.P.B.; Zerbini, F.M. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato infecting begomovirus from Brazil. **Plant Pathology**, v.55, p.513–522, 2006.

Gronenborn, B. Nanoviruses: genome organisation and protein function. **Vet. Microbiol**, v.98, p.103–109, 2004.

Haible, D.; Kober, S.; Jeske, H., Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. **Journal of Virological Methods**, v.135, p.9–16, 2006.

Inoue-Nagata, A.K., Albuquerque, L.C., Rocha, W.B., Nagata, T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase.

Journal of Virological Methods, v.116, p.209–211, 2004.

Inoue-Nagata, A.K., Martin, D.P.; Boiteux, L.S.; Giordano, L.D.; Bezerra, I.C.; Ávila, A.C. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1329-1332, 2006.

Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I.B.; Nei, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v.5, p.150-163, 2004.

Lazarowitz, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.11, p.327-349, 1992.

Lima, A.T.M.; Silva, F.N.; Hallwass, M.; Alves Jr, M.; Rocha, C.S.; Inoue-Nagata, A.; Zerbini, F.M. Pseudorecombination between *Tomato rugose mosaic virus* and *Tomato severe rugose virus*: two distinct DNAs sharing the same DNA-B. XIX National Meeting of Virology (**Abstract**). Caxambú, MG: SBV, 2008. 313p.

Lourenção, A.L.; Nagai, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. **Bragantia**, v.53, n.1, p.53-59, 1994.

Monci, F.; Sanchez-Campos, S.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations, **Virology**, v.303, p.317–326, 2002.

Moriones, E.; Navas-Castillo, J. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. **Virus Research**, v.71, p.123-134, 2000.

Nozaki, D.N. Estudos biológicos e moleculares de begomovírus infectando pimentão (*Capsicum annuum*) no Estado de São Paulo (Tese de Doutorado), FCA-UNESP, Botucatu, 2007.

Nozaki, D.N.; Krause-Sakate, R.; Hasegawa, J.M.; Cezar, M.A.; Dziuba, P.H.; Pavan, M.A. First report of *Tomato severe rugose virus* infecting pepper plants in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.3, p.5040, 2006.

Ribeiro, S.G.; Ambrozevicius, L.P.; Ávila, A.C.; Bezerra, I.C.; Calegario, R.F.; Fernandes, J.J.; Lima, M.F.; Mello, R.N.; Rocha, H.; Zerbini, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v.148, p.281–295, 2003.

Ribeiro, S.G.; Martin, D.P.; Lacorte, C.; Simões, I.C.; Orlandini, D.R.S.; Inoue-Nagata, A.K. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that

recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses.

Phytopathology, v.97, p.702–711, 2007.

Rojas, M.R.; Gilbertson, R.T.; Russel, D.R.; Maxwell, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v.77, p.340-347, 1993.

Rojas, M.R.; Hagen, C.; Lucas, W.J.; Gilbertson, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v.43, p.361–394, 2005.

Stanley, J.; Bisaro, D.M.; Briddon, R.W.; Brown, J.K.; Fauquet, C.M.; Harrison, B.D.; Rybicki, E.P.; Stenger, D.C. *Geminiviridae*. In Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball L.A. (9eds), **Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier/Academic Press: London, 2005, pp.301-326.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v.22, p.4673-4680, 1994.

van Regenmortel, M.H.V.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Carstens, E.B.; Estes, M.K.; Lemon, S.M.; Maniloff, J.; Mayo, M.A.; McGeoch, D.J.; Pringle, C.R.; Wickner, R.B. (Eds.).

Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. In: REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES, 7., 2000, New York. **Report...** New York: academic Press, 2000. 985 p.

Wyatt, S.D. E Brown, J.K. Detection of subgroup iii geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. **Phytopathology**. v.86, p.1288-1293, 1996.

Tabela 1. Porcentagem de detecção de begomovírus utilizando a técnica de PCR e RCA em amostras provenientes de plantas de pimentão coletadas em diferentes municípios do Estado de São Paulo durante janeiro de 2007 a julho de 2008.

Municípios	Números de Amostras	Resultado positivo para (%)	
		PCR	RCA
Piraju	53	23	29
Óleo	3	0	0
Tejupá	120	23	77
Santa Cruz do Rio Pardo	74	21	39
Capão Bonito	20	0	4
Itapetininga	139	27	84
São Miguel Arcanjo	109	0	35
Avaí	14	1	8
Lins	42	0	5
Reginópolis	59	3	26
Cafelândia	18	0	10
Sabino	5	0	0
Pirajuí	16	0	11
Iacanga	11	0	2
Timburí	23	0	0
São Manuel	3	0	2
Salto	1	1	1
TOTAL	710	99 (13,94%)	333 (46,90%)

Tabela 2. Porcentagem de detecção de begomovírus utilizando a técnica de PCR e RCA em amostras provenientes de plantas de tomate coletadas em diferentes municípios do Estado de São Paulo durante janeiro de 2007 a julho de 2008.

Municípios	Números de Amostras	Resultado positivo para (%)	
		PCR	RCA
Sabino	12	5	10
São Miguel Arcanjo	34	6	20
São Pedro do Turvo	11	8	11
Piraju	14	0	9
Santa Cruz do Rio Pardo	18	14	18
Lins	14	6	14
TOTAL	103	39 (37,86%)	82 (79,61%)

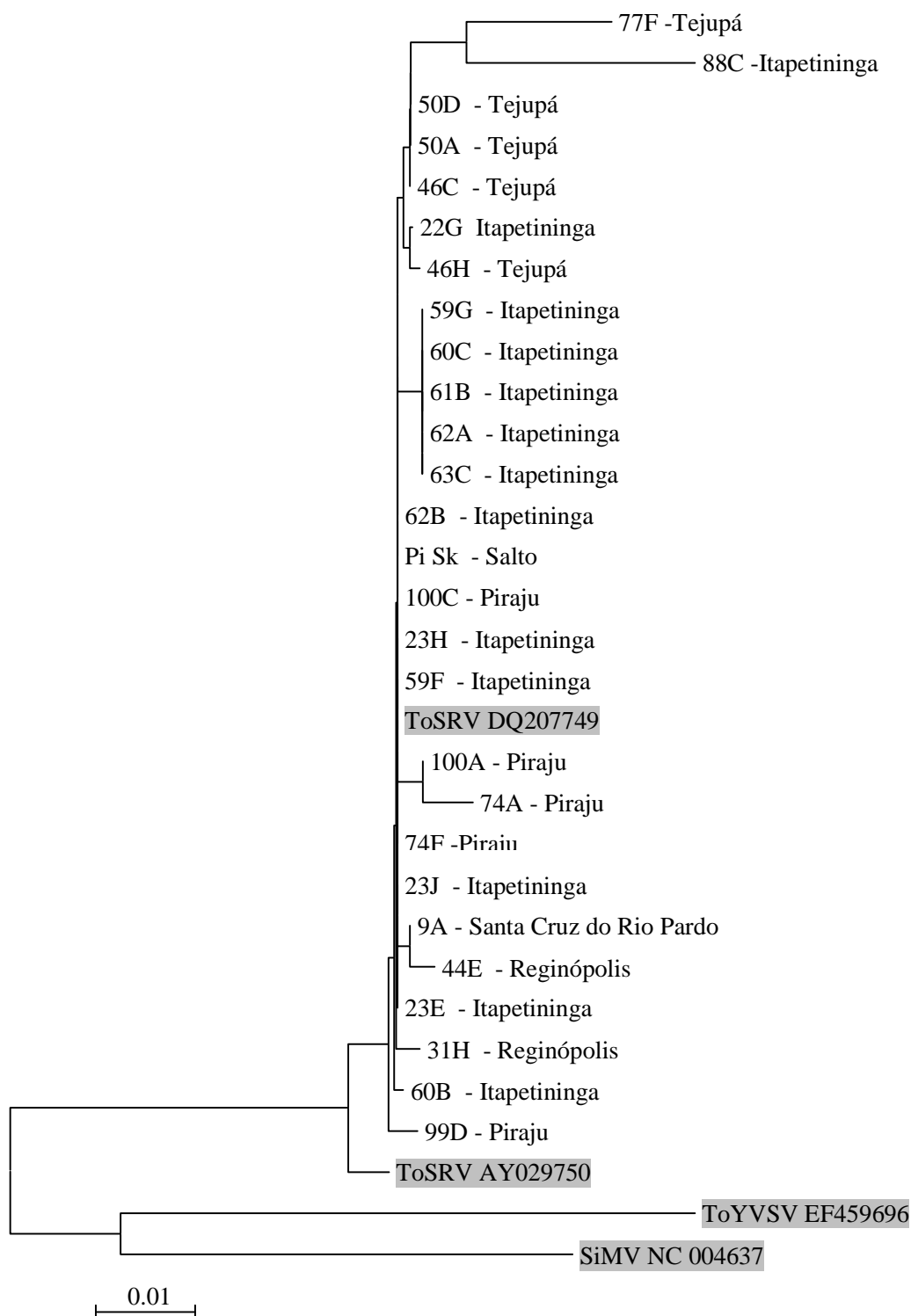


Figura 1. Análise filogenética de begomovírus infectando plantas de pimentão no Estado de São Paulo e outros begomovírus do GenBank, baseado no alinhamento de nucleotídeos referente à parte da região codificadora para a capa protéica obtida com o oligonucleotídeo PrV324. Valor de Bootstrap 2000, Programa Mega Versão 4.0. Sequências de begomovírus utilizadas para comparação: ToSRV (DQ207749), ToSRV (AY029750), SiMV, (NC004637) e ToYVSV (EF459696). Botucatu, 2008.

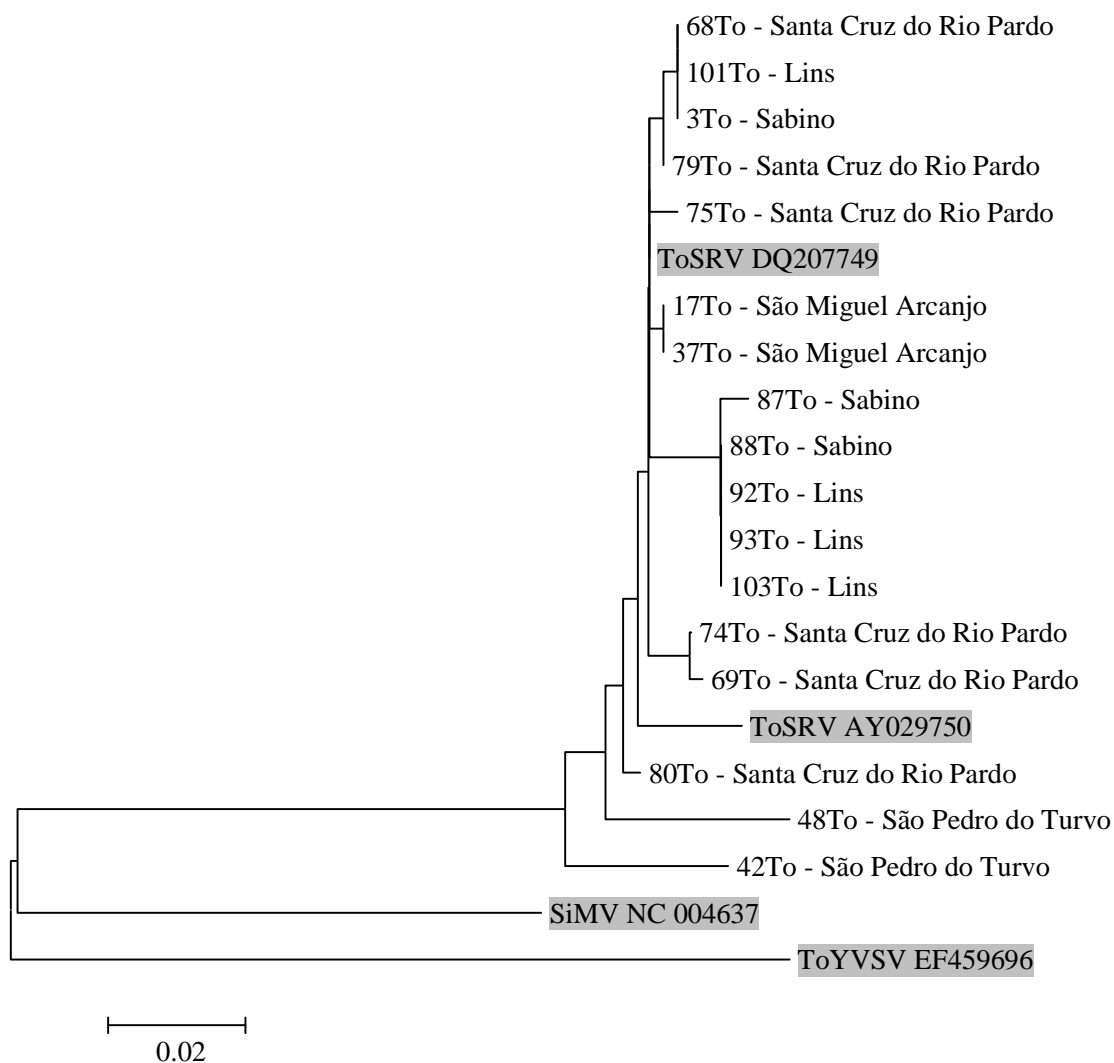


Figura 2. Análise filogenética de begomovírus infectando tomate no Estado de São Paulo e outros begomovírus do GenBank, baseado no alinhamento de nucleotídeos referente à parte da região codificadora para a capa protéica obtida com o oligonucleotídeo PrV324. Valor de Bootstrap 2000, Programa Mega Versão 4.0. Sequências de begomovírus utilizadas para comparação: ToSRV (DQ207749), ToSRV (AY029750), SiMV, (NC004637) e ToYVSV (EF459696). Botucatu, 2008.

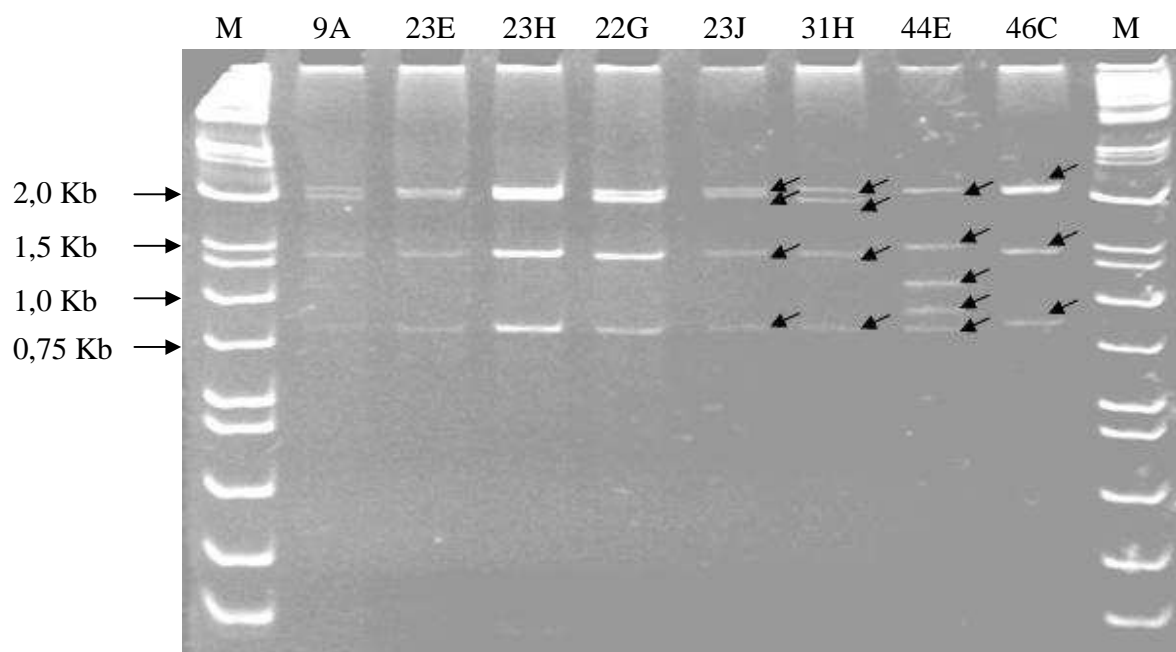


Figura 3. Produto de RCA digerido com *HpaII* e separado em gel de poliacrilamida a 10%, a partir de isolados de ToSRV coletados em plantas de pimentão em regiões produtoras do estado de São Paulo. M= 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen). Números indicam diferentes amostras (Cultivar/Município): 9 (Eppo/Santa Cruz do Rio Pardo); 22 (Sandy/Itapetininga); 23 (Wando/Itapetininga); 31 (Margarita/Reginópolis); 44 (Margarita/Reginópolis) e 46 (Prador/Pirajú). Botucatu, 2008.

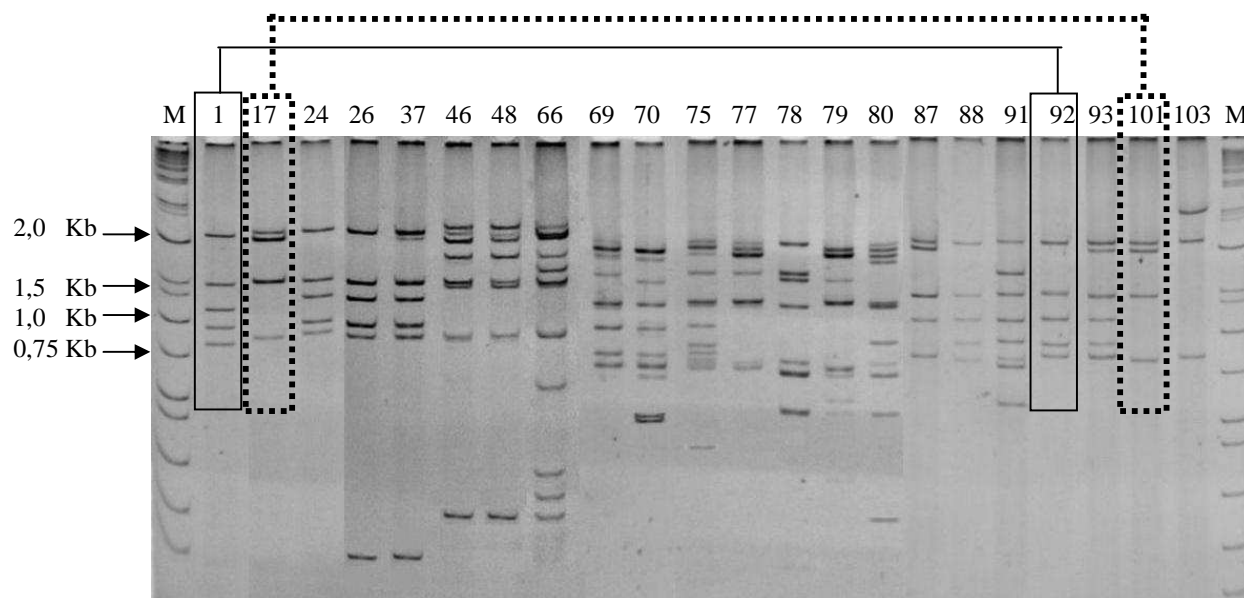


Figura 4. Produto de RCA digerido com *HpaII* e separado em gel de poliacrilamida a 10%, a partir de isolados de ToSRV coletados em plantas de tomate em regiões produtoras do estado de São Paulo. M= 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen). Números indicam diferentes amostras (Cultivar/Município): 1 (Carmen/Sabino); 17 (Santa Clara/São Miguel Arcanjo); 24 (Santa Clara/São Miguel Arcanjo); 26 (Santa Clara/São Miguel Arcanjo); 37 (Santa Clara/São Miguel Arcanjo); 46 (Cordilheira/São Pedro do Turvo); 48 (Cordilheira/São Pedro do Turvo); 66 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 69 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 70 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 75 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 77 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 78 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 79 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 80 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 87 (Paron/Sabino); 88 (Paron/Sabino); 91-93 (Paron/Lins); 101 (Momotaro/Lins) e 103 (Momotaro/Lins). Botucatu, 2008.

CAPÍTULO 2

PREVALÊNCIA DE *Bemisia tabaci* BIÓTIPO B EM ÁREAS CULTIVADAS DE HORTALIÇAS NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

**PREVALÊNCIA DE *Bemisia tabaci* BIÓTIPO B EM ÁREAS CULTIVADAS DE
HORTALIÇAS NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**

**KELLY C.G. ROCHA¹; JULIO M. MARUBAYASHI¹; JESÚS NAVAS-CASTILLO²; VALDIR
A. YUKI³; CARLOS F. WILCKEN¹; MARCELO A. PAVAN¹; RENATE KRAUSE-SAKATE¹**

¹ Departamento de Produção Vegetal, Setor Defesa Fitossanitária, UNESP, Faculdade de Ciências Agronômicas, CEP 18603-970, Botucatu, SP; ² Estación Experimental “La Mayora”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 29760 Algarrobo-Costa, Málaga, Spain; ³ Instituto Agronômico de Campinas, Centro de Fitossanidade, CEP 13012-970, Campinas, SP.

Aceito para publicação em: ___/___/_____

Rocha, K.C.G.; Marubayashi, J.M.; Navas-Castillo, J.; Yuki, V.A.; Wilcken, C.F.; Pavan, M.A.; Krause-Sakate, R. **Prevalência de *Bemisia tabaci* biótipo B em áreas cultivadas de hortaliças no Estado de São Paulo, Brasil.** Neotropical Entomology.

RESUMO – *Bemisia tabaci* (Gennadius) é hoje considerada uma das mais importantes pragas em cultivos de hortaliças e ornamentais em todo o mundo. Embora, o biótipo B apresente uma maior distribuição global, o biótipo Q, provavelmente nativo do Mediterrâneo, vem crescendo em importância devido à sua recente detecção em muitas áreas do mundo e sua resistência a inseticidas. Populações de mosca-branca foram coletadas em áreas de cultivo de hortaliças do Estado de São Paulo, Brasil. As amostras foram submetidas em análise por PCR, com amplificação do gene mitocondrial (citocromo oxidase I - mtCOI). O produto da PCR foi enviado a seqüenciamento e também utilizado na RFLP com a enzima *TaqI*, para determinar o biótipo de populações de *B. tabaci*. Apenas o biótipo B foi detectado em amostras coletadas nas culturas do pimentão, tomate, pepino, abobrinha, couve, berinjela e *Amaranthus* spp.

Palavras-chave: gene do cytochroma oxidase I, RFLP, seqüenciamento, moscas-brancas.

**PREVALENCE OF *Bemisia tabaci* B BIOTYPE IN VEGETABLES GROWERS
AREAS OF SÃO PAULO STATE, BRAZIL**

ABSTRACT – *Bemisia tabaci* is one of the most prolific pests of vegetables and ornamental crops around the world. Although the B biotype shows the widest global distribution, the Q biotype, probably native to the Mediterranean Basin, is reaching increasing importance due to recent detection in many areas of the world and to its proved resistance to insecticides. PCR amplification of mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene followed by RFLP analysis with *Taq I* and/or sequencing were utilized to determine the biotype of *B. tabaci* populations collected from vegetable producing areas of São Paulo State, Brazil. Only the B biotype was detected in this area from pepper, tomato, cucurbits, eggplant and *Amaranthus* spp. samples.

KEY WORDS: cytochrome oxidase I gene, RFLP, sequencing, whiteflies.

Introdução

A mosca branca, *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyrodidae), é uma das mais importantes pragas dos cultivos de hortaliças e ornamentais em todo o mundo. Este inseto apresenta alta variabilidade biológica intra-específica e genética, e pode ser considerada como um complexo espécie (Bosco *et al.*, 2006). Morfológicamente os biótipos são indistinguíveis, porém possuem características biológicas distintas, incluindo preferência de hospedeiro. Biótipos de *B. tabaci* foram originalmente caracterizado por seus padrões de esterases (Brown *et al.*, 1995, Jones *et al.*, 2008) e mais tarde, por análise molecular de diferentes genes conservados, incluindo o gene mitocondrial do cytochroma oxidase I (mtCOI) (Brown, 2000).

Em adição aos danos diretamente causados pela sucção do floema e excreção de honeydew, que serve como substrato para infecções de fungos (Jones *et al.*, 2008), as moscas brancas são conhecidas principalmente como vetores de vírus dos gêneros *Begomovirus* (família *Geminiviridae*), *Crinivirus* (família *Closteroviridae*) e outros (Ribeiro *et al.*, 1998; De Barro *et al.*, 2000; Bosco *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2008). Muitas destes vírus, principalmente os do gênero *Begomovirus*, são de grande impacto econômico para várias hortaliças. Os begomovírus são reconhecidos como os mais importantes vírus de plantas emergentes em regiões tropicais e sub-tropicais (Brown, 2000).

O primeiro relato de *B. tabaci* biótipo A, no Brasil, ocorreu na Bahia em 1928, em *Euphorbia pulcherrima*, *Nicotiana glauca* e *N. tabacum* (Bondar, 1928). Até cerca da década de 1990, a população de *B. tabaci* era baixa e as perdas relatadas em algumas culturas foram relacionadas à transmissão de vírus para feijão e tomateiro (Ribeiro *et al.*, 1998).

O biótipo B de *B. tabaci* é mais conhecido e de maior distribuição mundial. Foi detectado em poinsettia na Flórida (USA) e recebeu nomes comuns de raça Flórida ou raça

poinsettia (Costa e Brown, 1990). Também ficou conhecida como raça B, biótipo B ou tipo B, para distinguir da espécie nativa presente nos Estados Unidos, o biótipo A de *B. tabaci* (Lima *et al.*, 2002), além de também ter sido chamado de *Bemisia argentifolii* (Perring *et al.*, 1993). Este biótipo foi introduzido no Brasil no começo de 1990, provavelmente pelo comércio internacional de plantas ornamentais (Lourenção e Nagai, 1994).

Nos últimos anos este biótipo se espalhou para vários estados no Brasil, causando perdas severas em diferentes como melão, melância, algodão, feijões, soja, quiabo, tomate, repolho (Lima *et al.*, 2002) e pimentões e pimentas (Nozaki *et al.*, 2006; Bezerra-Agassie *et al.*, 2006). Atualmente, o B biótipo está presente em todos os estados do Brasil. O biótipo B apresenta maior produção de honeydew, maior gama de hospedeiros e alto nível de resistência a inseticidas, quando comparado ao biótipo A (Lima *et al.*, 2002).

Outro biótipo que vem atraindo a atenção e interesse mundial é o biótipo Q, encontrado na Europa e Ásia, e pode ser nativo do Mediterrâneo (Bosco *et al.*, 2006). Esse biótipo é exótico no Brasil e representa uma ameaça, devido a resistência ao pyriproxyfen (Horowitz *et al.*, 2003), buprofezin e baixa suscetibilidade aos inseticidas neonicotinóides, imidacloprid, acetamiprid e thimethoxam (Hodges, 2009), utilizados atualmente no controle de *B. tabaci*.

Na Bacia do Mediterrâneo, além dos biótipos B e Q, também foram relatados os biótipos M, S e T (Bosco *et al.*, 2006). Os biótipos S e T são muito restritos em sua distribuição geográfica e especificidade de hospedeiro. O biótipo S foi relatado apenas em plantas de *Ipomoea indica* na Costa Sul da Espanha, enquanto que, o biótipo T foi encontrado em *Euphorbia characias* na Sicília e outras regiões do sul da Itália. O biótipo M foi relatado em plantas de algodão na Turquia (Bosco *et al.*, 2006).

Estudos de identificação de biótipos de *B. tabaci* no Brasil são escassos. A fim de verificar se já ocorre a presença do biótipo Q no Estado de São Paulo, em áreas de cultivos de plantas de tomate e pimentão, amostras de *B. tabaci* foram coletadas nessas áreas de cultivos, e também em algumas hortaliças próximas. Para determinação de biótipos, o gene mitocondrial (mtCOI) foi amplificado por PCR seguido da técnica RFLP com enzima de restrição *TaqI* e/ou enviado a seqüenciamento.

Material e Métodos

Adultos de *B. tabaci* foram amostrados em 27 localidades no Estado de São Paulo, durante 2007/2008. Os indivíduos foram coletados com auxílio de aspirador manual e preservados imediatamente em etanol 95% e armazenado a -20°C, até o processamento. As amostras de *B. tabaci* foram provenientes de cultivos de pimentão, tomateiro e demais hortaliças (Tabela 1). Colônias do biótipo B do Brasil e biótipo Q da Espanha foram utilizados como controle nas análises.

Para caracterização molecular e análise por PCR-RFLP e seqüenciamento do gene mtCOI, cada indivíduo foi macerado diretamente em papel estéril Whatman 3MM (pedaço 2mm²), o qual foi colocado diretamente em microtubo de 0,2mL para a reação de PCR. Uma porção da seqüência do gene mtCOI foi amplificado por PCR com os oligonucleotídeos MA482-FW (5'-TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT-3') e MA483-RV (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3') (Simon *et al.*, 1994; Frohlich *et al.*, 1999). A análise da PCR foi realizada com um volume final de 50µl (MgCl₂ 50mM, dNTP 2,5µM, MA482-FW e MA483-RV 10µM) usando 0.5 U de *Taq* polymerase (Bioline).

A amplificação foi realizada em um PCR Express Thermal Cycler (Bio-Rad), seguindo os passos: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 45°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final a 72°C por 10 minutos. A presença do fragmento do gene da mtCOI foi visualizada em gel de agarose a 1% e corado com brometo de etídio.

O produto amplificado (880bp) de cada amostra foi utilizado junto à técnica RFLP, utilizando-se 5µl do produto da PCR clivado com 1U da enzima *TaqI*, em um volume final de 15µl, mantido a 65°C por 2 horas. O padrão de restrição foi observado por eletroforese e visualizado em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. Cinco indivíduos das populações de cada região foram analisados.

O gene mtCOI de 17 populações representativas foram enviadas a seqüenciamento. As seqüências foram agrupadas e analisadas usando o programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) e comparadas entre si e com outras seqüências de moscas-brancas depositadas no GenBank, utilizando-se os programas Blast n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). A análise filogenética foi realizada com o programa MEGA versão 4.0 (Kumar *et al.*, 2004), utilizando o método de “Neighbor-Joining”, com valor de “bootstrap” 2000.

Resultados e Discussão

Na análise por PCR, os oligonucleotídeos da mtCOI amplificaram fragmentos de 880 bp de tamanho esperado (Figura 1). Amostras de cinco populações dentre as 27 coletadas no Estado de São Paulo, não permitiram amplificação do gene mtCOI com os oligonucleotídeos

descritos acima. No entanto, moscas-brancas dessas populações foram morfologicamente indistinguíveis das demais populações coletadas.

De acordo com Bosco *et al.*, (2006), o método PCR-RFLP usado nesse trabalho é facilmente aplicado e eficiente na distinção dos biótipos B e Q. Os controles, colônias o biótipo B do Brasil e do biótipo Q da Espanha, utilizados nesse experimento para comparação, mostraram os padrões de restrição esperados após digestão do produto da PCR com a enzima *TaqI*. Todas as amostras coletadas no campo tiveram padrão para biótipo B (Figura 2).

Para confirmação do biótipo das moscas-brancas amostradas, a seqüência do gene mtCOI de alguns indivíduos foi determinada. Em análise pelo Blast n, e comparando-se as seqüências com as depositadas no GenBank, verificou-se que todas as seqüências apresentaram alta identidade com o gene mtCOI de outras populações caracterizadas como biótipo B de *B. tabaci* como observado na Figura 3. A árvore filogenética foi construída utilizando as seqüências do gene mtCOI obtidas das amostras coletadas e seqüências de populações representativas dos biótipos B e Q, como também uma seqüência de *Trialeurodes vaporariorum* (Tabela 2, Figura 3).

Recentemente, o biótipo Q encontrado no Mediterrâneo foi verificado na China (Zhang *et al.*, 2005) e EUA. Neste último caso, o biótipo Q foi identificado em plantas importadas de poinsettia em um viveiro na Califórnia (Hodges, 2009).

A identificação correta de insetos pragas ou vetores de vírus é um pré-requisito para o manejo efetivo e redução de danos em culturas agrícolas (Brown, 2000). O conhecimento da variação genética dentro de populações de mosca-branca é necessário para um manejo e controle eficiente (Guirao *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 2002; Rabello *et al.*, 2008). O gene mtCOI vem sendo muito utilizado para estudos e separação de biótipos de *B. tabaci* de populações

provenientes de diferentes partes do mundo, melhorando o entendimento da diversidade genética do complexo espécie *B. tabaci* (Frohlich *et al.*, 1999; Brown, 2000; De Barro *et al.*, 2000, Bosco *et al.*, 2006). Estes estudos podem prevenir a introdução de biótipos exóticos, principalmente o Q, assim como outros, no Brasil, pois, a invasão de espécies ou biótipos estrangeiros pode causar sérios problemas econômicos, impacto ambiental e social a agricultura nacional.

Por meio das análises realizadas neste trabalho ficou evidente que no Estado de São Paulo, em áreas, onde o principal cultivo é o tomate e pimentão, aparentemente só ocorre o biótipo B. Porém levantamentos mais precisos em outras regiões geográficas, coletando-se de hospedeiros bem variados são necessários para se avaliar melhor a população de *B. tabaci* no Brasil. Segundo Villas-Bôas *et al.* (1999) o biótipo B tem se dispersado nos campos rapidamente, sendo considerada a espécie de mosca branca que comumente devasta os cultivos agrícolas nas várias regiões geográficas do país.

Agradecimentos

Ao apoio do Consejo Superior de Investigaciones Científicas-CSIC, Málaga, Espanha.

Referências Bibliográficas

- Bezerra-Agasie, I.C., Ferreira, G.B., Ávila, A.C. de & Inoue-Nagata, A.K. 2006.** First report of *Tomato severe rugose virus* in chili pepper in Brazil. *Plant Dis.* 90:114.
- Bosco, D., Loria, A., Sartor, C. & Cenis, J.L. 2006.** PCR-RFLP Identification of *Bemisia tabaci* biotypes in the Mediterranean Basin. *Phytoparasitica* 34:243-251.
- Bondar, G. 1928.** Aleyrodideos do Brasil. *Bolm. Lab. Path. Veg. Est. Bahia* 5: 1-37.

- Brown, J.K., Frohlich, D.R. & Rosell, R.C. 1995.** The sweet potato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Ann. Rev. Entomol.* 40: 511-534.
- Brown, J. K. 2000.** Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-begomovirus complexes. *Vir. Res.* 71:233–260.
- Costa, H.S. & Brown, J.K. 1990.** Variability in biological characteristic isozyme patterns and virus transmission among populations of *Bemisia tabaci* Genn. in Arizona. *Phytopathology* 80:888.
- De Barro, P.J., Drive, F., Trueman, J.W. & Curran, J. 2000.** Phylogenetic relationships of world populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal ITS1. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16:29-36.
- Frohlich, D. R., Torres–Jerez, I., Bedford, I. D., Markham, P. G. & Brown, J. K., 1999.** A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Mol. Ecol.* 8: 1683–1691.
- Guirao, P., Beitia, F. & Cenis, J.L. 1994.** Aplicación de la técnica RAPD-PCR a la taxonomía de moscas blancas (Homoptera, aleyrodidae). *Bull. Entomol. Res.* 20:757-764.
- Hodges, G. 2009.** *Bemisia tabaci* (Gennadius) (biotype ‘Q’): A potential new biotype for Florida’s vegetable and ornamental crops. (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Alert*. Disponible en <http://www.doacs.state.fl.us/pi/enpp/ento/b.tabaci.html>
- Horowitz, A., Gorman, K., Ross, G. & Denholm, I. 2003.** Inheritance of pyriproxyfen in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Q biotype). *Arch. Insect Biochemistry and Physiology* 54:177-186.
- Jones, C.M., Gorman, K., Denholm, I. & Williamson, M.S. 2008.** High-throughput allelic discrimination of B and Q biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci*, using *TaqMan* allele-selective PCR. *Pest Management Science* 64:12-15.

Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5:150-163.

Lima, L.H.C., Campos, L., Moretzsohn, M.C., Navia, D., Oliveira, M.R.V. & de Oliveira, M.R.V. 2002. Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) populations in Brazil revealed by RAPD markers. *Genet. Mol. Biol.* 25:217– 223.

Lourenção, A.L. & Nagai, H. 1994. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. *Bragantia* 53:53-59.

Nozaki, D.N., Krause-Sakate, R., Hasegawa, J.M., César, M.A., Dziuba, P.H. & Pavan, M.A. 2006. First report of *Tomato severe rugose virus* infecting pepper plants in Brazil. *Fitopatol. bras.* [online] 31:321-321.

Perring T.M., Cooper A.D., Rodriguez R.J., Farrar C.A. & Bellows T.S.J. 1993. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science*, v.259, p.74-77.

Rabello, A.R., Queiroz, P.R., Simões, K.C.C., Hiragi, C.O., Lima, L.H.C., M.R.V. & Mehta, A. 2008. Diversity analysis of *Bemisia tabaci* biotypes: RAPD, PCR-RFLP and sequencing of the ITS1 rDNA region. *Genet. Mol. Biol.* 31:585-590.

Ribeiro, S.G., Ávila, A.C., Bezerra, I.C., Fernandes, J.J., Faria, J.C., Lima, M.F., Gilbertson, R.L., Maciel-Zambolim, E. & Zerbini, F.M. 1998. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. *Plant Dis.* 82:830-834.

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87:651–701.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.

Villas-Bôas, G.L., França, F.H., Newton, M. & Elias, M.F. Predominância do biótipo B de mosca branca (*Bemisia argentifolii*) em diversos hospedeiros e regiões do Brasil. *Anais, 8º Encontro Latino-americano e do Caribe Sobre Moscas Brancas e Geminivirus, Recife, 1999.* p.150.

Zhang, L.P., Zhang, Y. J., Zhang, W. J., Wu, Q. J., Xu, B. Y. and Chu, D. 2005. Analysis of genetic diversity among different geographical populations and determination of biotypes of *Bemisia tabaci* in China. *Journal of Applied Entomology* 129:121–128.

Tabela 1. Amostras de *Bemisia tabaci* coletadas em diferentes municípios do Estado de São Paulo, suas respectivas plantas hospedeiras e identificação do biótipo. Ano base: 2007/2008.

Amostras	Local de coleta	Coleta	Planta Hospedeira	Biótipo
1	Lins	Outubro/07	Pimentão	B
2	Lins	Abril/08	Tomate	B
3	Lins	Abril/08	<i>Amaranthus</i> sp.	B
4	Pirajuí	Abril/08	Pimentão	B
5	Lins	Agosto/08	Beringela	B
6	Avaí	Agosto/08	Pimentão	B
7	Itapetininga	Março/08	Beringela	B
8	Itapetininga	Março/08	Abobrinha	B
9	São Miguel Arcanjo	Mai/08	Pepino	B
10	Tejupá	Janeiro/08	Tomate	B
11	Tejupá	Janeiro/08	Couve-folha	B
12	Tejupá	Janeiro/08	Pimentão	B
13	Tejupá	Abril/08	Pimentão	B
14	Itapetininga	Setembro/08	Pimentão	B
15	Santa Cruz do Rio Pardo	Janeiro/08	Pimentão	B
16	São João da Boa Vista	Setembro/08	Abobrinha	B
17	Insetário – Virologia	Setembro/08	Pimentão	B

Tabela 2. Seqüências do GenBank utilizadas nas análises para a construção da árvore filogenética.

Espécies de moscas-brancas	Biótipo	Origem	Número de acesso do GenBank
<i>Bemisia tabaci</i>	B	Reunião	AJ550176
		China	EU376994
		Flórida	FJ188651
		Chipre	AM696208
		Espanha	DQ302947
	Q	Egito	DQ130056
		Israel	AF418671
		Espanha	EU427719
		Japão	AB204586
		Grécia	DQ365869
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>		França	691083
		Flórida	FJ188623
		Reunião	AJ550183

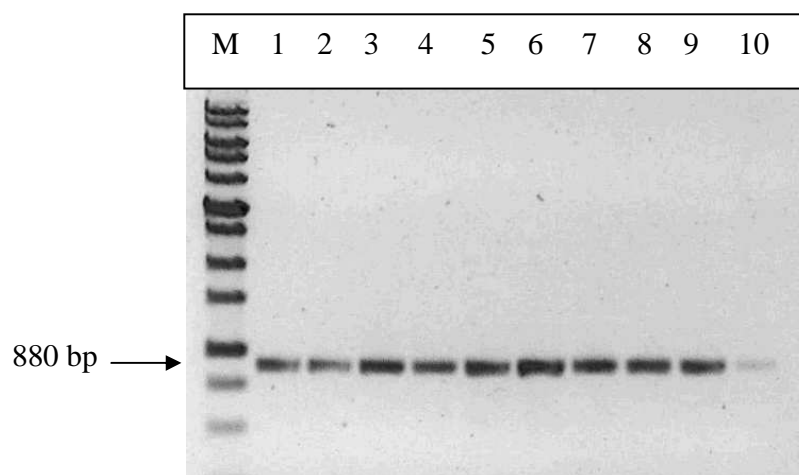


Figura 1. Amplificação por PCR da mtCOI (~880nt) de amostras de mosca-branca coletadas no Estado de São Paulo em diferentes culturas. M: marcador DNA 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). Amostras: 1- Pimentão, 2- Tomate, 3- *Amaranthus* sp., 4- Pimentão, 5- Berinjela, 6- Pimentão, 7- Berinjela, 8- Abobrinha, 9- Pepino e 10- Tomate. Espanha, 2008.

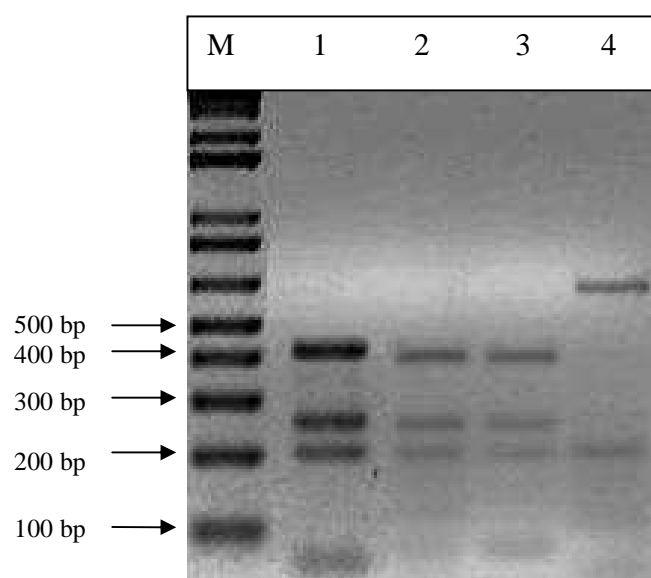


Figura 2. Padrões de RFLP de fragmentos de mtCOI digeridos com *TaqI*, amostras controles: 1 – 3 Biótipo B e 4 Biótipo Q. M: Marcador de DNA 1Kb DNA Plus Ladder (Invitrogen). Espanha, 2008.

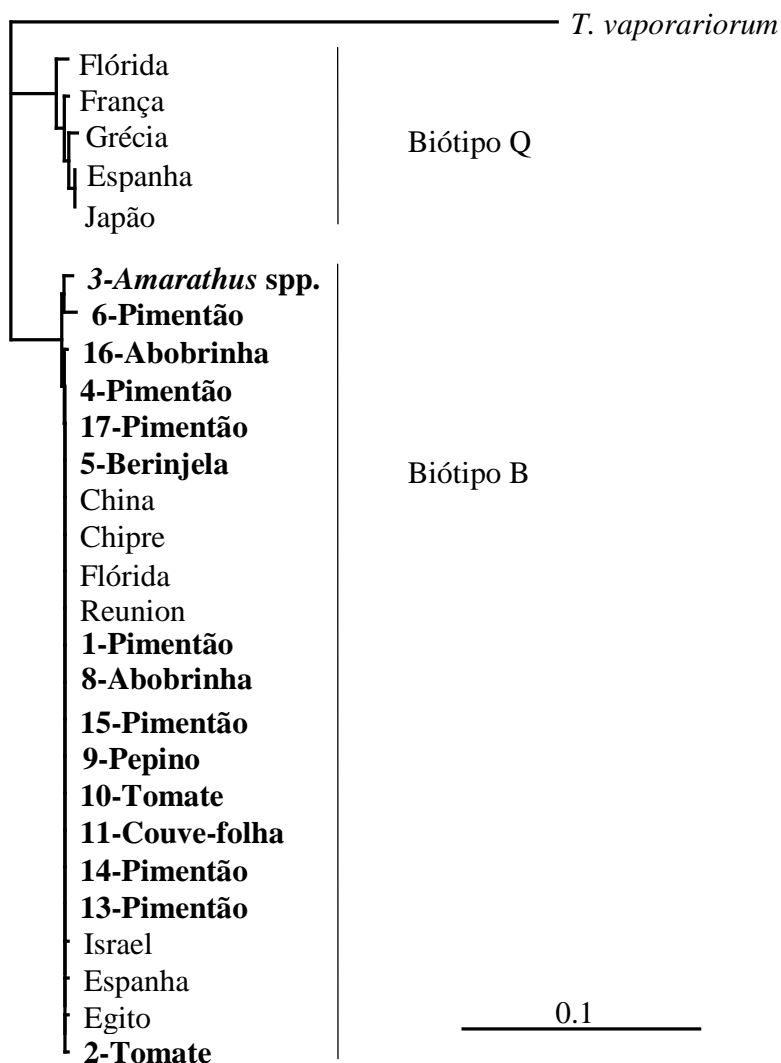


Figure 3. Árvore filogenética obtida utilizando-se o método Neighbor-joining para o fragmento parcial do gene mitocondrial COI das amostras de *Bemisia tabaci* coletadas no Estado de São Paulo, comparadas com algumas seqüências do GenBank listadas na Tabela 2.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE *Capsicum* spp. AO *Tomato*

severe rugose virus* – GÊNERO *Begomovirus

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE *Capsicum* spp. AO *Tomato****severe rugose virus* – GÊNERO *Begomovirus*****KELLY C.G. ROCHA^{1*}; JULIO M. MARUBAYASHI¹; TATIANA MITUTI¹; RICARDO GIORIA²;****RÔMULO F. KOBORI²; ARLETE M.T. MELO³; MARCELO A. PAVAN¹; RENATE KRAUSE-****SAKATE¹**

¹ Departamento de Produção Vegetal, Setor Defesa Fitossanitária, UNESP, Faculdade de Ciências Agronômicas, CEP 18603-970, Botucatu, SP; ² Sakata Seed Sudamérica, Bragança Paulista, SP.; ³Instituto Agronômico (IAC), Cx. Postal 28, CEP 13012-970, Campinas, SP.

* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor: Bolsista da CAPES

Aceito para publicação em: ___/___/_____

RESUMO

Rocha, K.C.G.; Marubayashi, J.M.; Mituti, T.; Gioria, R.; Kobori, R.F.; Melo, A.M.T.; Pavan, M.A.; Krause-Sakate, R. **Avaliação da resistência de genótipos de *Capsicum* spp. ao *Tomato severe rugose virus* – gênero *Begomovirus*. *Summa Phytopathologica*.**

Doenças causadas pelos begomovírus podem afetar diretamente a cultura do pimentão, especialmente a espécie *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) que tem ocorrido nas áreas de cultivo no Estado de São Paulo. Considerando que há pouca informação sobre genótipos resistentes ou tolerantes ao vírus, procurou-se avaliar o comportamento de diferentes acessos de pimentas e pimentões *Capsicum* spp. contra dois isolados de ToSRV, um proveniente de tomateiro (ToSRV-Sk) e outro de pimentão (ToSRV-PJU). Dos vinte e nove acessos inoculados, vinte e cinco foram suscetíveis e três comportaram-se como tolerantes ao ToSRV-Sk. Para o ToSRV-PJU, quatorze foram suscetíveis, *C. annuum* (Hebron) e *C. chinense* (Pimenta Habanero BG 592) foram tolerantes e doze genótipos foram considerados imunes

aos 30 dias após a inoculação (d.a.i). Dentre estes, o acesso *C. annuum* (Pimenta ardida-AF2191) foi tolerante ao isolado ToSRV-Sk e imune ao ToSRV-PJU. Apenas um acesso de pimentão, *C. annuum*, Catarino Cascabel do México, comportou-se como imune aos 30 d.a.i. a ambos os isolados, podendo ser indicado em programas de melhoramento de *Capsicum* spp. visando resistência ao ToSRV. Os resultados também demonstraram diferenças na agressividade entre os isolados de ToSRV utilizados e que essa variabilidade deve ser considerada em programas de melhoramento genético visando resistência a begomovírus em *Capsicum* spp.

Palavras-chaves: *Bemisia tabaci*, *Geminivirus*, tolerância, pimentão, pimenta e hortaliças.

ABSTRACT

Rocha, K.C.G.; Marubayashi, J.M.; Mituti, T.; Gioria, R.; Kobori, R.F.; Melo, A.M.T.; Pavan, M.A.; Krause-Sakate, R. **Evaluation of *Capsicum* spp. genotypes resistance to *Tomato severe rugose virus* –*Begomovirus* genus.** *Summa Phytopathologica*.

Diseases caused by the begomoviruses affect directly pepper crops, especially the species *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), which predominates in the commercial areas of pepper, in São Paulo State. Talking into account scarce research information concerning on resistance or tolerance to the virus this work was to evaluate the resistance against two strains of ToSRV, one deriving from tomato (ToSRV-Sk) and one from pepper (ToSRV-PJU), on different genotypes of *Capsicum* spp. From the twenty-nine *Capsicum* spp. genotypes inoculated, twenty-five were susceptible and three were tolerant to ToSRV-Sk isolate. For the ToSRV-PJU strain, fourteen genotypes were susceptible, *C. annuum* (Hebron) and *C. chinense* (Pimenta Habanero BG 592) were tolerant and twelve genotypes were considered immune to

the virus at 30 days after inoculation (d.a.i.). Among these, *C. annuum* (Pimenta ardida-AF2191) was tolerante to ToSRV-Sk and immune to ToSRV-PJU. Only one access of pepper *C. annuum*, Catarino Cascabel of Mexico, was immune to both ToSRV strains at 30 d.a.i., and could be source of resistance in breeding programs to *Capsicum* spp. resistance to ToSRV. The results also indicate that the isolates differ in agressivity and this must be considered in breeding programs.

Key-words: *Bemisia tabaci*, *Geminivirus*, tolerance, sweet pepper, chillies, vegetables.

INTRODUÇÃO

O gênero *Capsicum* spp. é originário da América tropical, onde várias espécies são cultivadas e utilizadas como alimento desde os tempos pré-históricos. No Brasil, o pimentão (*Capsicum annuum* L.) é uma das dez mais importantes hortaliças cultivadas, sendo seus frutos consumidos na forma *in natura*, e utilizados na indústria alimentícia e na produção de pigmentos (Peixoto *et al.*, 1999).

Algumas limitações para o cultivo de pimentões e pimentas são as doenças de origem viral. A incidência de doenças em solanáceas causadas por begomovirose tem aumentado significativamente, coincidindo com o aumento populacional de seu inseto vetor, a mosca-branca. O gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) inclui os vírus que infectam dicotiledôneas, os quais são transmitidos por *Bemisia tabaci* e apresentam genoma composto por uma ou duas moléculas de DNA circular de fita simples (Polston & Anderson, 1997; Stanley *et al.*, 2005).

No Brasil, a incidência de begomovirus em tomateiro aumentou de forma drástica a partir de meados da década de 1990, com a introdução e disseminação do biótipo B de *B. tabaci* (Zerbini *et al.*, 1996; Faria *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 1998; Ambrozevicius *et al.*, 2002). Esse biótipo encontra-se disseminado desde o Paraná até o Rio Grande do Norte, atacando uma gama de hospedeiros, dentre os quais se incluem solanáceas, cucurbitáceas, brássicas, leguminosas, algodão, mandioca, alface, quiabo, plantas ornamentais, e plantas daninhas e silvestres (Lourenção & Nagai, 1994; Villas Bôas *et al.*, 1997).

Em pimentão, infecção por begomovírus foi observada em amostras coletadas no ano de 1997 nos estados da Bahia e Pernambuco (Lima *et al.*, 2001). E em 2003, a espécie *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) foi relatada em pimenta “dedo-de-moça” (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*), em Petrolina de Goiás (Bezerra-Agasie *et al.*, 2006). Em 2005, além do ToSRV, foi verificada a espécie *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) no Estado de São Paulo (Nozaki *et al.*, 2006). Atualmente, um levantamento realizado no estado de São Paulo mostrou que a espécie ToSRV tornou-se prevalente nos cultivos de pimentão (Marubayashi *et al.*, 2008). O ToSRV também tem causado muitos danos ao cultivo de tomateiro (*Solanum esculentum* Mill.), em áreas de plantio de todo o Brasil (Fernandes *et al.*, 2008).

Para o complexo mosca-branca-geminivírus no cultivo de solanáceas, principalmente de tomateiro e pimentão, a utilização de cultivares resistentes pode ser considerada a opção mais eficaz, durável e estável dentro da estratégia de manejo integrado (Friedmann *et al.*, 1998). Dessa forma, esse trabalho teve como objetivos verificar a reação de diferentes genótipos de *Capsicum* spp. a dois isolados de ToSRV, sendo um proveniente de tomateiro e outro de pimentão.

MATERIAL E MÉTODOS

Avaliação da resistência de *Capsicum* spp. ao ToSRV

Vinte e nove genótipos de *Capsicum* spp., sendo 20 acessos de *C. annuum*, 2 de *C. baccatum*, 2 de *C. frutescens* e 5 de *C. chinense*, foram inoculadas com dois isolados de ToSRV, além do tomateiro variedade Santa Clara usado como controle positivo (Tabela 1).

A semeadura foi realizada em bandejas de poliestireno expandido com 220 células contendo substrato comercial, avaliando-se 10 plantas por acesso. As mudas foram mantidas em casa de vegetação e, por ocasião da inoculação, foram transferidas para gaiolas teladas com dimensões 1x1x1 metros. A temperatura e a luminosidade foram controladas, sendo de aproximadamente, 25°C e 12 horas de fotoperíodo, respectivamente. As plantas foram inoculadas aos 30 dias após a semeadura.

Isolados de ToSRV:

Foram utilizados dois isolados de ToSRV, um proveniente de *Capsicum annuum* (ToSRV-PJU) obtido por Nozaki (2007) e outro proveniente de tomateiro (ToSRV-Sk) cedido pela Empresa Sakata Seed Sudamerica. Ambos foram mantidos separadamente no cultivar de tomate Santa Clara, para evitar contaminação.

A identidade de ambos os isolados de ToSRV foi confirmada por sequenciamento parcial da capa protéica do seu DNA-A utilizando-se os oligonucleotídeos descritos por Rojas *et al.* (1993) e a variabilidade genética foi avaliada pela técnica de RCA-RFLP (Inoue-Nagata *et al.*, 2004a; Haible *et al.*, 2006). O DNA total foi extraído pelo método de Dellaporta *et al.* (1983) e submetido à amplificação por círculo rolante (RCA) com o kit Templi Phi (Amersham Biosciences) adicionando-se 5 µL do tampão da amostra e 1 µL do DNA extraído.

O DNA foi desnaturado a 95°C por 3 minutos e imediatamente transferido para recipiente contendo gelo triturado. A essa mistura, foram adicionados 5 µL do tampão de reação e 0,2 µL da enzima. A reação foi incubada a 30°C por 18 horas. Após o término da incubação, a enzima foi inativada aquecendo-se a reação a 65°C por 10 minutos. A reação de amplificação do DNA foi diluída adicionando-se 30 µL de TE (10mM Tris e 1mM EDTA pH 8,0). Os produtos de DNA dos isolados amplificados por Templi Phi foram submetidos à análise de padrão de restrição de fragmento (RFLP) com a enzima de restrição *HpaII*. A qualidade do DNA, o tamanho do fragmento e a quantificação foram estimados em gel de poliacrilamida a 10% utilizando-se o marcador de comprimento 1 Kb DNA Plus Ladder (Invitrogen). O isolado ToSRV-Sk apresentou pelo menos o dobro de sítios de clivagem para a enzima *HpaII* do que o isolado ToSRV-PJU (Figura 1). A comparação dos isolados, com a técnica RCA-RFLP, mostrou variabilidade genética entre eles, indicando diferentes sítios de restrição com a enzima.

Inserir Figura 1

Método de inoculação e transmissão utilizando o vetor:

Colônias de *B. tabaci* biótipo B livres de vírus coletadas em campo e mantidas em couve (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*), soja (*Glycine max*) e tomate (*S. lycopersicum*) foram utilizadas na transmissão do vírus. Para a transmissão, foram empregados insetos adultos coletados e transferidos com auxílio de aspirador bucal, composto de um tubo de vidro. Os insetos foram transferidos para pequenas gaiolas contendo ramos de plantas de tomateiro infectados com o isolado ToSRV-PJU, o qual foi previamente confirmado por PCR. Em cada gaiola foram adicionados em torno de 1.000 insetos adultos, os quais foram mantidos em sala

escura climatizada a 30°C por um período de acesso à aquisição (PAA) de 24 horas. Após esse PAA, as moscas-brancas, supostamente virulíferas, foram transferidas para gaiolas maiores contendo as bandejas com as plantas saudias, onde permaneceram por sete dias, durante o período de acesso de inoculação (PAI), a fim de promover a transmissão o vírus. Após o PAI, as plantas foram pulverizadas com inseticida para eliminação de todas as moscas-brancas, ninfas e ovos depositados durante o PAI. As plantas foram mantidas em casa de vegetação sob temperatura de 25 a 30°C por um período de 30 dias, sendo analisadas por PCR (Reação de polimerase em cadeia) quanto à presença de sintomas e detecção do vírus.

As bandejas contendo as mudas foram dispostas em uma sala de criação de mosca-branca diretamente na fonte de inóculo com o ToSRV-Sk. O PAI durou sete dias e, a seguir, as mudas foram tratadas com inseticidas específicos. Após o período de transmissão, as bandejas foram levadas para casa de vegetação e mantidas sob as mesmas condições ambientais descritas anteriormente.

Avaliação de sintomas e detecção PCR:

A avaliação foi realizada visualmente, verificando-se presença de sintomas, e por PCR aos 30 dias após a inoculação. O DNA total foi extraído das dez plantas inoculadas por acesso, segundo protocolo de Dellaporta *et al.* (1983).

Foram escolhidas as folhas apicais, pois, segundo Rocha *et al.* (2008), é a região mais sensível à detecção do vírus, armazenando-se a -20°C. Na reação de PCR, foi utilizada uma pré-mistura PCR Master Mix (Promega), seguindo as instruções do fabricante, e utilizou-se o par de oligonucleotídeos GemiA1202s 5' TGG TAG ACT CTG CTC GCG G '3 (senso) e GemiA1876a 5' CTC TTT CAC TAG CGT ACC G '3 (antisenso), que flanqueiam parte dos

genes que codificam a Rep (AC1) e a Trap (AC2) (Nozaki, 2007). O programa consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 40 segundos, anelamento a 54°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, mais um passo de extensão final de 72°C durante 10 minutos. O fragmento de DNA amplificado (800bp) foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,8% e corado com brometo de etídio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio de transmissão do ToSRV por mosca-branca, todas as plantas de tomateiro cultivar Santa Clara, utilizadas como controle, foram infectadas por ambos os isolados, apresentando 100% de infecção pelo vírus.

Para o isolado ToSRV-Sk, 25 acessos foram suscetíveis apresentando sintomas evidentes da infecção. Os acessos *C. annuum* (Pimenta ardida-AF2191), *C. annuum* (IAC-545) e *C. annuum* (Pimenta Serrano IAC 1129) apresentaram proporções de 4/10, 8/10 e 3/10 referentes à relação entre número de plantas infectadas e número de plantas inoculadas, respectivamente. As plantas infectadas foram assintomáticas, evidenciando uma tolerância ao vírus (Tabela 1).

Para o isolado ToSRV-PJU, 14 acessos comportaram-se como suscetíveis. Os acessos *C. annuum* (Hebron) e *C. chinense* (Pimenta Habanero BG 592) tiveram proporções de 5/10 e 1/10 (plantas infectadas/plantas inoculadas) respectivamente. As plantas infectadas não apresentaram sintomas da infecção, comportando-se como tolerantes. Doze genótipos inoculados com esse isolado mostraram-se imunes na análise com 30 dias após inoculação (DAI), não tendo sido verificada presença do DNA em nenhuma das dez plantas/acesso (Tabela 1).

Inserir Tabela 1

Dentre as plantas de *Capsicum* spp. suscetíveis, foram observados diferentes sintomas como deformação, rugosidade foliar, mosaico, clareamento de nervuras e redução do porte da planta. O isolado ToSRV-Sk mostrou-se mais severo, ocasionando o aparecimento dos sintomas mais precocemente quando comparado ao ToSRV-PJU, bem como infectando a grande parte dos acessos testados.

Dentre os genótipos avaliados, *C. annuum* (Pimenta ardida-AF2191) apresentou tolerância para o isolado ToSRV-Sk e imunidade para ToSRV-PJU, aos 30 d.a.i. . Já, o acesso *C. annuum*, Catarino Cascabel do México, foi considerado imune aos dois isolados de ToSRV no período avaliado. Ambos os genótipos podem ser fontes importantes e promissoras para estudos e mapeamento de genes de resistência para fins de melhoramento genético.

Em outras regiões do mundo, vários begomovírus já foram relatados em *Capsicum* spp. No México, destacam-se *Pepper huasteco virus*, PHV (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993), *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) e mais recentemente o begomovirus monopartido *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Carrillo-Tripp *et al.*, 2007). Tanto em *C. annuum* como em *C. chinense*, o TYLCV foi verificado no sul da Espanha (Reina *et al.*, 1999) e Cuba (Quiñones *et al.*, 2002).

No México, foi observada tolerância ao begomovírus PHV em populações de *C. chinense* (Godinez-Hernández *et al.*, 2001). Morilla *et al.* (2005) demonstraram que, plantas de *C. annuum* quando inoculadas com diferentes isolados de TYLCV, TYLCV-Mld [ES01/99] e TYLCV-[Alm], comportaram-se diferencialmente, de acordo com método de inoculação; pelo método de infiltração com *Agrobacterium tumefaciens* nenhuma planta de pimentão foi infectada; por meio da biobalística, foi possível detectar o DNA viral, porém as plantas permaneceram assintomáticas; e com inoculação por mosca-branca, detectou-se apenas o

DNA do isolado TYLCV-[Alm], mas as plantas permaneceram assintomáticas. No presente estudo, utilizou-se a mosca-branca como vetora do vírus para os genótipos, pois é a condição que ocorre na natureza.

Observou-se que os acessos testados apresentaram maior suscetibilidade ao isolado proveniente de tomateiro do que o de pimentão. A alta variabilidade genética dos begomovírus se reflete no grande número de espécies descritas (van Regenmortel *et al.*, 2000), o que, na prática, dificulta a adoção das medidas de controle, como a eliminação de hospedeiras alternativas. Assim, a utilização de cultivares resistentes é considerada a medida mais adequada para o controle de fitoviroses.

Estudos de divergência genética de populações de plantas de *Capsicum* spp. são importantes, pois possibilitam o monitoramento de bancos de germoplasma, gerando informações úteis para preservação e uso dos acessos em programas de melhoramento e também na escolha de progenitores para mapeamento de genes (Sudré *et al.*, 2005).

Vários locos de resistência ao begomovírus monopartido TYLCV foram mapeados em várias espécies selvagens de tomateiro, incluindo *Solanum pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. habrochaites* (*Lycopersicon hirsutum*) e *S. cheesmaniae* (Scott, 2006). A espécie selvagem *Solanum chilense* Dun. é fonte do gene *Ty-1*, com dominância parcial e que confere tolerância a begomovírus. Esse gene pode ser encontrado em diversas linhagens comercializadas na França, Israel, Flórida (EUA) e nas Américas (Zakay *et al.*, 1991; Zamir *et al.*, 1994). Esse gene interfere na proteína viral do TYLCV, e é mais eficiente em condições de baixo inóculo (Zamir *et al.*, 1994). Segundo Kasrawi *et al.* (1988), linhagens de *S. peruvianum* f. *humifusum* C. H. Mull. e de *S. peruvianum* (L.) Mill. exibiram resistência ao TYLCV. No Brasil, ainda não foi detectada a presença da espécie TYLCV (Faria *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*,

1994; Inoue-Nagata *et al.*, 2004b). No entanto, estudos recentes mostraram que o loco *Ty-1* confere reação de tolerância a distintas espécies de begomovírus bipartidos (Boiteux *et al.*, 2007). Em *S. habrochaites* f. *glabratum* foi encontrado o *Ty-2* (Hanson *et al.*, 2006) e Ji *et al.* (2007b) mapearam um terceiro loco denominado de *Ty-3* no cromossomo 6 do tomateiro.

A busca de fontes de resistência constitui no primeiro passo para o melhoramento genético visando resistência a patógenos. A grande dificuldade, porém, é a complexidade genética da resistência, bem como a presença de barreiras intraespecíficas. O mapeamento genético do gene de resistência encontrado no pimentão possibilitaria sua introgressão no tomateiro e abriria outra possibilidade de obtenção de genótipos resistentes ao ToSRV, tanto em pimentão como no tomateiro.

AGRADECIMENTOS

A Empresa Sakata Seed Sudamérica, pelo auxílio nesta pesquisa e ao Instituto Agrônomo de Campinas IAC, pelo fornecimento de sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ambrozevicius, L.P.; Calegario, R.F.; Fontes, E.P.B.; Carvalho, M.G.; Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p.372-377, 2002.
2. Bezerra-Agasie, I.C.; Ferreira, G.B.; Ávila, A.C. de; Inoue-Nagata, A.K. First report of *Tomato severe rugose virus* in chili pepper in Brazil. **Plant Disease**, v.90, p.114, 2006.

3. Boiteux, L.S.; Oliveira, V.R.; Silva, C.H.; Makishima, N.; Inoue-Nagata, A.K.; Fonseca, M.E.N.; Giordano, L.B. Reaction of tomato hybrids carrying the *Ty-1* locus to Brazilian bipartite *Begomovirus* species. **Horticultura Brasileira**, v.25, p.020-023, 2007.
4. Carrillo-Tripp, J.; Lozoya-Gloria, E.; Rivera-Bustamante, R.F. Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by *Pepper golden mosaic virus*. **Phytopathology**, v.97, p.51-59, 2007.
5. Dellaporta, S.L.; Woods, J.; Hicks, J.B. A plant DNA miniprep, version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.1, p.19-21, 1983.
6. Faria, J.C.; Souza-Dias J.A.C.; Slack, S.; Maxwell, D.P. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, v.81, p.423, 1997.
7. Fernandes, F.R.; Albuquerque, L.C.; Giordano, L.B.; Boiteux, L.S.; Ávila, A.C.; Inoue-Nagata, A.K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, v.36, p.251–258, 2008.
8. Friedmann, M.; Lapidot, M.; Cohen, S.; Pilowsky, M. A novel source of resistance to tomato yellow leaf curl virus exhibiting a symptomless reaction to viral infection. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, v.123, p.1004–1007, 1998.
9. Garzón-Tiznado, J.A.; Torres-Pacheco, I.; Ascencio-Ibanez, J.T.; Herrera-Estrella, L.; Rivera-Bustamante, R.F. Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. **Phytopathology**, v.83, n.5, p.514-521, 1993.
10. Godinez-Hernández, Y.; Anaya-López, J.L.; Díaz-Plaza, R.; González-Chavira, M.; Torres-Pacheco, I. Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in

- chili peppers (*Capsicum chinense*) from Yucatán, México. *HortScience*, v.36, n.1, p.139-142, 2001.
11. Haible, D.; Kober, S.; Jeske, H. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. **Journal of Virological Methods**, v.135, p.9–16, 2006.
 12. Hanson, P.; Green, S.K.; Kuo, G. *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. **Tomato Genet. Coop. Rep.**, v.56, p.17–18, 2006.
 13. Inoue-Nagata, A.K., Albuquerque, L.C., Rocha, W.B., Nagata, T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, v.116, p.209–211, 2004a.
 14. Inoue-Nagata, A.K.; Navas-Castillo, J.; Melo, P.C.T.; Ávila, A.C. Busca por *Tomato yellow leaf curl virus* e *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* em tomateiros. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.4, p.799-800, 2004b.
 15. Ji, Y.; Schuster, D.J.; Scott, J.W. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. **Molecular Breeding**, v.20, p.271-284, 2007.
 16. Kasrawi, M.A.; Suwwan, M.A.; Mansour, A. Sources of resistance to tomato yellow leaf curl virus in *Lycopersicon* species. **Euphytica**, v.37, p.61-64, 1988.
 17. Lima, M.F.; Bezerra, I.C.; Ribeiro, S.G.; Ávila, A.C. Distribuição de geminivírus nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale de São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p. 81-85, 2001.
 18. Lourenção, A.L.; Nagai, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. v.53, p.53-59, 1994.

19. Marubayashi, J.M.; Rocha, K.C.G.; Ribeiro, L.C.; Mituti, T.; Fecury, M.M.; Wilcken, C.F.; Pavan, M.A.; Krause-Sakate, R. Prevalence of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) on pepper's crops in São Paulo state. XIX National Meeting of Virology (Abstract). Caxambú, MG: SBV, 2008. 313p.
20. Morilla, G.; Janssen, D.; García-Andrés, S.; Moriones, E.; Cuadrado, I.M. & Bejarano, E.R. Pepper (*Capsicum annuum*) Is a Dead-End Host for *Tomato yellow leaf curl virus*. *Phytopathology*, v.95, n.9, p.1089-1097, 2005.
21. Nozaki, D.N. Estudos biológicos e moleculares de begomovírus infectando pimentão (*Capsicum annuum*) no Estado de São Paulo (Tese de Doutorado), FCA-UNESP, Botucatu, 2007.
22. Nozaki, D.N.; Krause-Sakate, R.; Hasegawa, J.M.; César, M.A.; Dziuba, P.H. & Pavan, M.A. First report of *Tomato severe rugose virus* infecting pepper plants in Brazil. **Fitopatologia Brasileira** [online]. v.31, n.3, p.321-321, 2006.
23. Peixoto, J.R.; Ramos, R.S.; Faria, B.Jr.; Silva, C.M.; Angelis, B. de Avaliação de genótipos de pimentão no período de inverno, em Araguari, MG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.10, p.1865-1869, 1999.
24. Polston, J.E.; Anderson, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. **Plant Disease**, v. 81, p. 1358-1369, 1997.
25. Quiñones, M.; Fonseca, D.; Martínez, Y.; Accotto, G. First report of *Tomato yellow leaf curl virus* infecting pepper plants in Cuba. **Plant Disease**, v.86, p.73, 2002.
26. Reina, J.; Morilla, G.; Bejarano, E.; Rodríguez, M.; Janssen, D. First report of *Capsicum annuum* plants infected by tomato yellow leaf curl virus. **Plant Disease**, v.83, p.1176, 1999.

27. Ribeiro, S.G.; Melo, L.V.; Boiteux, L.S.; Kitajima, E.W.; Faria, J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.330, 1994.
28. Ribeiro, S.G.; Ávila, A.C.; Bezerra, I.C.; Fernandes, J.J.; Faria, J.C.; Lima, M.F.; Gilbertson, R.L.; Maciel-Zambolim, E.; Zerbini, F.M. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with a new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease**, v. 82, p. 830, 1998.
29. Rocha, K.C.G.; Marubayashi, J.M.; Cesar, M.L.; Pavan, M.A.; Krause-Sakate, R. Replicação viral do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) diferentes partes das plantas de tomateiro e pimentão. **Summa Phytopathologica**, v.34, p.516, 2008 (Resumo).
30. Rojas, M.R.; Gilbertson, R.L.; Russell, D.R.; Maxwell, D. Use of degenerate oligonucleotídeos in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v. 77, p. 340-347, 1993.
31. Scott, J.W. Breeding for resistance to viral pathogens. In: Razdan MK, Mattoo AK (eds) **Genetic improvement of solanaceous crops**, vol. 2: tomato. Science Publ, Enfield, p.447-474, 2006.
32. Stanley, J.; Bisaro, D.M.; Briddon, R.W.; Brown, J.K.; Fauquet, C.M.; Harrison, B.D.; Rybicki, E.P.; Stenger, D.C. *Geminiviridae*. In: FAUQUET, C.M. **Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, London, Elsevier/Academic Press; p.301-326, 2005.
33. Sudré, C.P.; Rodrigues, R.; Riva, E.M.; Karasawa, M.; Amaral Júnior, A.T. Divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão utilizando técnicas multivariadas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p.22-27, 2005.

34. van Regenmortel, M. H.V.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Carstens, E.B.; Estes, M.K.; Lemon, S.M.; Maniloff, J.; Mayo, M.A.; McGeoch, D.J.; Pringle, C.R.; Wickner, R.B. (Eds.). Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. In: **REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES**, 2000, New York. Report... New York: academic Press, 2000. 985 p.
35. Villas Bôas, G.L.; França, F.H.; Ávila, A.C.; Bezerra, I.C. Manejo integrado da mosca-branca *Bemisia argentifolii*. Brasília, Embrapa CNPH, Cir. Téc. 9, 12 p. 1997.
36. Zakay, Y.; Navot, N.; Zeidan, M.; Kedar, N.; Rabinowtch, H.; Czosnek, H.; Zamir, D. Screening *Lycopersicon* accessions for resistance to tomato yellow leaf curl virus: presence of viral DNA and symptom development. **Plant Disease**, v.75, p.279-281, 1991.
37. Zamir, D.; Ekstein-Michelson, I.; Zakay, Y.; Navot, N.; Zeidan, M.; Sarfatti, M.; Eshed, Y.; Harel, E.; Pleban, T.; Van Oss, H.; Kedar, N.; Rabinovith, H.D.; Cnosnek, H. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, Ty-1. **Theoretical and Applied Genetics**, v.88, p.141-146, 1994.
38. Zerbini, F.M.; Zambolim, E.M.; Carrijo, I.V.; Gilbertson, R.L. Um novo geminivirus isolado de tomateiro (*L. esculentum*) em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p.430, 1996.

Tabela 1. Relação de acessos de espécies de *Capsicum* spp. e relação entre número de plantas infectadas e número de plantas inoculadas (NPIInf/NPIInoc), porcentagem de plantas infectadas e sintomas de infecção de dois isolados de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV).

Amostras	ESPÉCIE	Empresa/Instituição	Acesso/Cultivar	ToSRV-Sk		ToSRV-PJU			
				NPIInf/NPIInoc	Sintomas %	NPIInf/NPIInoc	% Sintomas		
1	<i>Capsicum annuum</i>	Seminis	Paloma	5/10	50	M/CN/FD/RP	10/10	100	M/CN
2	<i>Capsicum annuum</i>	Sakata	Martha R	7/10	70	CN/R	5/10	50	M/CN
3	<i>Capsicum annuum</i>	Isla	Amarelo – Satrapo	7/10	70	LM/CN/RP	***	***	***
4	<i>Capsicum annuum</i>	Clause Brasil	Hebron	10/10	100	PC/RP/LM/CN	5/10	50	SS
5	<i>Capsicum annuum</i>	Clause Brasil	Itamara	9/10	90	CN/LM/R	8/10	80	M/CN
6	<i>Capsicum annuum</i>	Clause Brasil	Pimenta Dínamo	9/10	90	CN/M	2/10	20	M/CN
7	<i>Capsicum annuum</i>	Clause Brasil	Máximos	7/10	70	CN	3/10	30	CN
8	<i>Capsicum annuum</i>	Topseed	Jalapeño	5/10	50	CN/M	4/10	40	M/CN
9	<i>Capsicum annuum</i>	Sakata	Pimenta ardida - AF 2191	4/10	40	SS	0/10	0	SS
10	<i>Capsicum annuum</i>	Sakata	Magali R	7/10	70	CN/R	4/10	40	M/CN
11	<i>Capsicum annuum</i>	IAC	IAC – 545	8/10	80	SS	5/10	50	R/M
12	<i>Capsicum annuum</i>	IAC	IAC 11-8-1	6/10	60	CN/R	6/10	60	R/M
13	<i>Capsicum annuum</i>	IAC	IAC 21-4-2	5/10	50	RP/FD	3/10	3	LM
14	<i>Capsicum frutescens</i>	IAC	Pimenta malagueta IAC-822	3/10	30	CN	7/10	70	LM
15	<i>Capsicum annuum</i>	IAC	Críollo de Morellos 334 IAC-982	5/10	50	CN	3/10	30	M
16	<i>Capsicum annuum</i>	IAC	Pimenta Serrano IAC - 1129	3/10	30	SS	3/10	30	LM
17	<i>Capsicum baccatum</i>	Brasília	Dedo-de-moça	8/10	80	M/R	10/10	100	R/FD
18	<i>Capsicum chinense</i>	IAC	Murupi Pimenta de cheiro IAC-1243	5/10	50	RP	0/10	0	SS
19	<i>Capsicum chinense</i>	IAC	PI 159236 IAC-984	9/10	90	PC	0/10	0	SS
20	<i>Capsicum frutescens</i>	IAC	Malagueta IAC-1077	6/10	60	PC/CN	0/10	0	SS
21	<i>Capsicum chinense</i>	Argentina	Pimenta – Argentina	6/10	60	CN/M	0/10	0	SS
22	<i>Capsicum chinense</i>	Colômbia	Pimenta – Colômbia	8/10	80	CN	0/10	0	SS
23	<i>Capsicum annuum</i>	Monte Alto	Jalapeño – Monte Alto	8/10	80	CN/PC/M	0/10	0	SS
24	<i>Capsicum annuum</i>	Belém	Pimenta picante	10/10	100	M/AM	0/10	0	SS
25	<i>Capsicum baccatum</i>	Bolívia	Pimenta Guamica #243 - Bolívia	10/10	100	M/RP/FD	0/10	0	SS
26	<i>Capsicum chinense</i>	México	Pimenta Habanero BG 592	10/10	100	M/RP/FD	1/10	10	SS
27	<i>Capsicum annuum</i>	Colômbia	IAC Colômbia #12	2/10	20	LM/CN	0/10	0	SS
28	<i>Capsicum annuum</i>	Filipinas	Pimenta Filipinas # 124	3/10	30	FD/CN/PC	0/10	0	SS
29	<i>Capsicum annuum</i>	México	Catarino Cascabel – México	0/10	0	SS	0/10	0	SS
30	<i>Solanum esculentum</i>	Sakata	Tomate Santa Cruz	10/10	100	R/CN/RP/FD/EB	10/10	100	MA/CN

*** Não inoculado; SS: sem sintomas; AM: amarelecimento foliar; FD: folhas deformadas; R: rugosidade foliar; MA: manchas amareladas; M: mosaico; LM: leve mosaico; CN: clareamento de nervura; RP: redução do porte da planta; PC: pontos cloróticos; EB: enrolamento de bordos. NPIInf= número de plantas infectadas positivas por PCR, NPIInoc= número de plantas inoculadas.

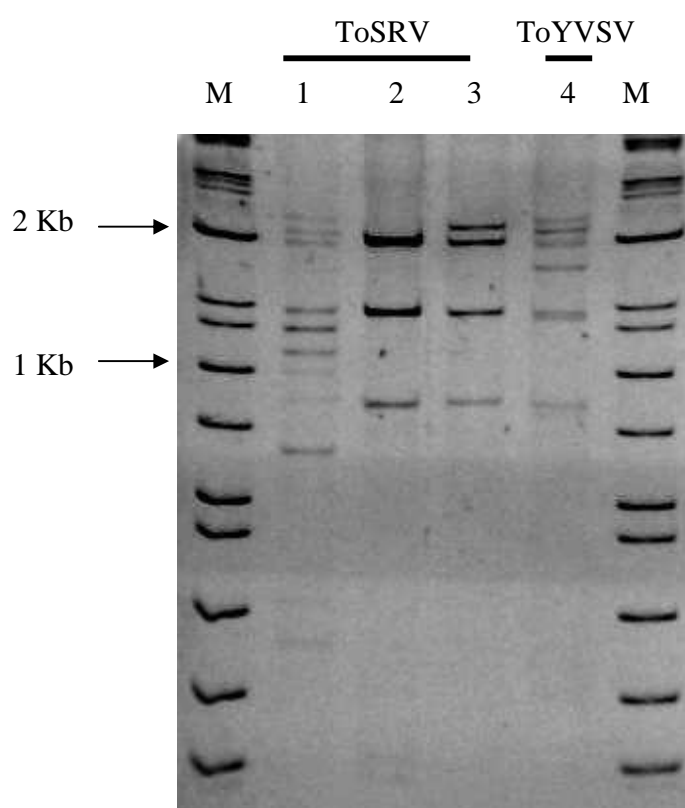


Figura 1. Perfil eletroforético do produto de RCA digerido com enzima *HpaII* para os isolados de ToSRV (1-ToSRV – Sakata, isolado de tomate; 2- ToSRV isolado de pimentão; 3- ToSRV-PJU, isolado de pimentão) e 4-ToYVSV. M= 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

4 CONCLUSÕES GERAIS

- O *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) é a espécie predominante de begomovírus no Estado de São Paulo, tanto em pimentão como em tomateiro;
- A técnica RCA é mais sensível na detecção de begomovírus, comparado a PCR tradicional;
- Entre os isolados de ToSRV que infectam plantas de pimentão e tomate verifica-se maior variabilidade genética no genoma viral em isolados provenientes de tomateiro;
- O biótipo B de *Bemisia tabaci* foi o único encontrado em áreas produtoras de pimentão e tomate do estado de São Paulo;
- O acesso de pimentão *C. annuum*, Catarino Cascabel do México comportou-se como imune a dois isolados de ToSRV, na avaliação aos 30 dias após inoculação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGRIANUAL, Revista Anuário da Agricultura Brasileira, FNP Consultoria e Agroinformática, “Pimentão e Tomate”, p. 504 , 2008.

AKAD, F.; EYBISHTZ, A.; EDELBAUM, D.; GOROVITS, R.; DAR-ISSA, O.; IRAKI, N.; CZOSNEK, H. Making a friend from a foe: expressing a GroEL gene from the whitefly *Bemisia tabaci* in the phloem of tomato plants confers resistance to tomato yellow leaf curl viru. **Archives of Virology**, v.152, p.1323–1339, 2007.

ASCENCIO-IBÁÑEZ, J.T.; MONSALVE-FONNEGRA, Z.I.; PRUNA-CAMACHO, M.B.; DIAZ-PLAZA, R.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Los Geminivirus. **Revista Mexicana de Fitopatologia**, v.17, n.2, p.113-125, 2000.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA Faculdade de Ciências Agronômicas.
Normas para elaboração de dissertações e teses – ABNT NBR 10520. Botucatu, 2002.

BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; ROSELL, R.C.; MARKHAM, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. **Annals of Applied Biology**, v.125, p.311-325, 1994.

BEZERRA-AGASIE, I.C.; FERREIRA, G.B.; ÁVILA, A.C.; INOUE-NAGATA, A.K. First report of *Tomato severe rugose virus* in chili pepper in Brazil. **Plant Disease**, v.90, p.114, 2006.

BIANCHETTI, L. B. et al. **Relatório de viagem para coleta de espécies de *Capsicum* (Solanaceae), realizada entre os dias 28/04 e 26/05 de 1999, no Sudeste Brasileiro.** Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/projetos/capsicum/index.htm>> Acesso em 01/03/2009.

BOITEUX, L.S.; OLIVEIRA, V.R.; SILVA, C.H.; MAKISHIMA, N.; INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; GIORDANO, L.B. Reaction of tomato hybrids carrying the *Ty-1* locus to Brazilian bipartite *Begomovirus* species. **Horticultura Brasileira**, v.25, p.020-023, 2007.

BOSCO, D.; LORIA, A.; SARTOR, C.; CENIS, J.L. PCR-RFLP identification of *Bemisia tabaci* biotypes in the Mediterranean Basin. **Phytoparasitica**, v.34, n.3, p.243-251, 2006.

BRIDDON, R.W.; BEDFORD, I.D.; TSAI, J.H. & MARKHAM, P.G. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. **Virology**, v.219, p.387-394, 1996.

BROWN, J.K.; CZOSNEK, H. Whitefly transmission of plant viruses. In: Plumb RT (ed), Advances in botanical research. **Plant virus vector interactions**, v.36. Academic Press, New York, p. 65–100, 2002.

BROWN, J.K. Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-begomovirus complexes. **Virus Research**, v.71, p.233–260, 2000.

BROWN, J.K.; BIRD, J. Whitefly transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Cariccean basin. **Plant Disease**, Saint Paul, v.76, n.3, p.220-225, 1992.

BROWN, J.K. The biology and molecular epidemiology of the Geminiviridae subgroup III. In: Stacey, G.E & Keen, N.T. (Eds). **Plant-Microbe Interactions**. New York. ITP. 1997. pp.125-195.

BROWN, J.K.; FROHLICH, D.R.; ROSELL, R.C. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? **Annual Review of Entomology**, v.40, p.511-534, 1995.

BROWN, J.K.; IDRIS, A.M.; FLETCHER, D.C. *Sinaloa tomato leaf curl virus*, a newly described geminivirus of tomato and pepper in west coastal Mexico. **Plant Disease**, v.77, p.1262, 1993.

CALEGARIO, R.F.; FERREIRA, S.S.; ANDRADE, E.C.; ZERBINI, F.M. Characterization of Tomato yellow spot virus, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1335–1347, 2007.

CARRILLO-TRIPP, J.; LOZOYA-GLORIA, E.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by *Pepper golden mosaic virus*. **Phytopathology**, v.97, p.51-59, 2007.

CASTILLO-URQUIZA, G.P.; EVANDO, J. BESERRA JR, A.; BRUCKNER, F.P.; LIMA, A.T.M.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; ZERBINI, F.M. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, DOI 10.1007/s00705-008-0172-0, 2008.

COSTA, A.S. Whitefly-transmitted plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v.14, p.429-449, 1976.

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

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

FARIA, J.C.; ZERBINI, F.M. Família Geminiviridae - taxonomia, replicação e movimento. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.8, p.25-65, 2000.

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

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

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

FERNANDES J.J.; CARVALHO MG, ANDRADE EC,; BROMMONSCHENKEL SH, FONTES EPB, ZERBINI FM Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato infecting begomovirus from Brazil. **Plant Pathology**, v.55, p.513–522, 2006.

FONTES, E.P.B.; GLADFELTER, H.J.; SCHAFFER, R.L.; PETTY, I.T.D.; HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. **Plant Cell**, v.6, p.405-416, 1994.

FROHLICH, D.R.; TORRES-JEREZ, I.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G.; BROWN, J.K. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. **Molecular Ecology**, v.8, p.1683-1691, 1999.

GARZON-TIZNADO, J.A.; TORRES-PACHECO, I.; ASCENCIO-IBANEZ, J.T.; HERRERA-ESTRELLA, L.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. **Phytopathology**, v.83, p.514-521, 1993.

GHANIM, M., MORIN, S., ZEIDAN, M & CZOSNEK, H. Evidence for transovarial transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. **Virology**, v.240, p.295-303. 1998.

GILBERTSON, R.L.; HIDAYAT, S.H.; MARTINEZ, R.T.; LEONG, S. A.; FARIA, J.C.; MORALES, F.; MAXWELL, D.P. Differentiation of bean-infecting geminiviruses by nuclei acid hybridization probes and aspects of bean golden mosaic in Brazil. **Plant Disease**, v. 75, p. 336-342, 1991.

GILL, R.J. The morphology of whiteflies, In: GERLING, D. (Ed). **Whiteflies: their bionomics pest status and management**. Andover: Intercept. 1990. p.13-46.

HAIBLE, D.; KOBER, S.; JESKE, H. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. **Journal of Virological Methods**, v.135, p.9-16, 2006.

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

HANSON, P.; GREEN, S.K.; KUO, G. Ty-2, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. **Tomato Genet. Coop. Rep.**, v.56, p.17–18. 2006.

HODGES, G. *Bemisia tabaci* (Gennadius) (biotype 'Q'): A potential new biotype for Florida's vegetable and ornamental crops. (Hemiptera: Aleyrodidae). **Pest Alert**. Acesso em Fevereiro de 2009. Disponível em <http://www.doacs.state.fl.us/pi/enpp/ento/b.tabaci.html>

HOROWITZ, A., GORMON, K., ROSS, G.; DENHOLM, I. Inheritance of pyriproxyfen in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Q biotype). **Archives Insect Biochemistry and Physiology**, v.54, p. 177-186, 2003.

HOWARTH, A.J.; CATON, J.; BOSSERT, M.; GOODMAN, R.M. Nucleotide sequence of *Bean golden mosaic virus* and a model for gene regulation in Geminiviruses. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**. v., 82, p. 3572-3576, 1985.

HULL, R. **Matthews' Plant Virology**. Elsevier Academic Press, California, 2004. 1001p.

INOUE-NAGATA, A.K., ALBUQUERQUE, L.C., ROCHA, W.B., NAGATA, T., 2004. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. **J. Virol. Meth.** v.116, p.209–211, 2004a.

INOUE-NAGATA, A.K.; NAVAS-CASTILLO, J.; MELO, P.C.T.; ÁVILA, A.C. Busca por *Tomato yellow leaf curl virus* e *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* em tomateiros. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.4, p.799-800, 2004b.

JENKINS, J.A. The origin of the cultivated tomato. **Journal Economic Botany**, v.2, n.4, p.379-392, 1948.

JI, Y.; SCOTT, J.W.; HANSON, P.; GRAHAM, E.; MAXWELL, D.P. Sources of resistance, inheritance, and location of genetic loci conferring resistance to members of the tomato

infecting begomoviruses. In: Czosnek H (ed) *Tomato yellow leaf curl virus disease: Management, molecular biology, Breeding for resistance*. Kluwer, Dordrecht, 2007a.

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

Ji, Y.; SCOTT, J.W. Marker Assisted Breeding For Tomato *Begomovirus* Resistance. **Molecular Markers for Plant Breeding**. Abstract... 2008.

JONES, C.M.; GORMAN, K.; DENHOLM, I.; WILLIAMSON, M.S. High-throughput allelic discrimination of B and Q biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci*, using *TaqMan* allele-selective PCR. **Pest Management Science**, v.64, n.1, p.12-15, 2008.

KOBORI, R.F.; GIORIA, R.; BRUNELLI, K.R. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças do pimentão no Brasil. In: Ghini, R. & Hamada, E. **Mudanças Climáticas Impactos sobre doenças de plantas no Brasil**. Embrapa informação tecnológica. 331p., 2008.

LAZAROWITZ, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v.11, p.327-349, 1992.

LIMA, L. H. C.; NAVIA, D.; INGLIS, P. W.; OLIVEIRA, M. R. V. & DE OLIVEIRA, M. R. V. Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. **Genet. Mol. Biol.**, v.23, p.781-785, 2000.

LIMA, M.F.; BEZERRA, I.C., RIBEIRO, S.G., AVILA. A.C. Distribuição de geminivírus nas culturas de tomate e pimentão em doze municípios de Submédio do Vale do São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.81-85, 2001.

LIMA, L. H. C., CAMPOS, L., MORETZSOHN, M. C., NAVIA, D., OLIVEIRA, M. R. V.; DE OLIVEIRA, M. R. V. Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) populations in Brazil revealed by RAPD markers. **Genet. Mol. Biol.** v.25, p.217– 223, 2002.

LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. v.53, n.1, p.53-59, 1994.

MANSOOR, S.; BRIDDON, R.W.; ZAFAR, Y.; STANLEY, J. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. **Trends Plant Scienci**, v.8, p.128–134, 2003.

MARUBAYASHI, J.M.; ROCHA, K.C.G.; RIBEIRO, L.C.; MITUTI, T.; FECURY, M.M.; WILCKEN, C.F. ; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R. Prevalence of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) on pepper's crops in São Paulo state. XIX National Meeting of Virology (**Abstract**). Caxambú, MG: SBV, 2008. 313p.

MATOS, E.S.; SIQUEIRA, W.J.; LOURENÇÃO, A.L.; MELO, A.M.T.; SAWAZAKI, H.E.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; COLARICCIO, A. Resistência de genótipos de tomateiro a um isolado de geminivírus do cinturão verde de Campinas, São Paulo. **Fitopatologia Brasileira** v.28, p.159-165, 2003.

MATYS, J.C. ; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.A.R; COSTA, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.1, p.267-275, 1975.

MORALES, F.J.; ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whiteflytransmitted geminiviruses in Latin America. **Archives of Virology**, v.146, p.415-441, 2001.

MORALES, F.J.; JONES, P.G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. **Virus Research**, v.100, p.57-65, 2004.

MORILLA, G.; JANSSEN, D.; GARCÍA-ANDRÉS, S.; MORIONES, E.; CUADRADO, I.M.; BEJARANO, E.R. Pepper (*Capsicum annuum*) is a dead-end host for *Tomato yellow leaf curl virus*. **Phytopathology**, v.95, n.9, p.1089-1097, 2005.

MORIN, S.; GHANIM, M.; SOBOL, I.; CZOSNEK, H. A GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system. **Virology**, v.276, p.404-416, 2000.

MORIN, S., GHANIM, M; ZEIDAN, M; CZOSNEK, H; VERBEEK, M. & VAN DEN HEUVELT, F.J.M. 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. 1999.

NAVA-CAMBEROS, U.N.; RILEY, D.G.; HARRIS, M.K. Temperature and host plant effects on development, survival, and fecundity of *Bemisia argentifolli* (Homoptera: Aleyrodidae). **Environmental Entomology**, v.30, p.55-63, 2001.

NATESHAN, H.M.; MUNIYAPPA, V.; SWANSON, M.M.; HARRISON, B.D. Host range, vector and serological relationships of cotton leaf curl virus from southern India. **Annual Applied Biology**, v.128, p.233-244, 1996.

NATURAL HISTORY MUSEUM, Solanaceae Source, site disponível em:

<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/solanaceaesource/> Acessado em 06/04/2009.

NIZIO, D.A.C.; MALUF, W.R.; FIGUEIRA, A.R.; NOGUEIRA, D.W.; SILVA, V.F.; GONÇALVES NETO, A. C. Caracterização de genótipos de tomateiro resistentes a begomovírus por marcador molecular co-dominante ligado ao gene *Ty-1*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.43, n.12, p.1699-1705, 2008.

NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, v.76, p.925–32, 1994.

NOZAKI, D.N. Estudos biológicos e moleculares de begomovírus infectando pimentão (*Capsicum annuum*) no Estado de São Paulo (Tese de Doutorado), FCA-UNESP, Botucatu, 2007.

NOZAKI, D.N.; KRAUSE-SAKATE, R.; HASEGAWA, J.M.; CEZAR, M.A.; DZIUBA, P.H.; PAVAN, M.A. First report of *Tomato severe rugose virus* infecting pepper plants in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n3, p.5040, 2006.

OPARKA, K.J. Getting the message across: How do plant cells exchange macromolecular complexes? **Trends Plant Science**, v.9, p.33–41, 2004.

PAPLOMATAS, E.J.; PATEL, V.P.; HOU, Y.M.; NOUEIRY, A.O.; GILBERTSON, R.L. Molecular characterization of a new sap-transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. **Phytopathology**, v.84, p.1215-1224, 1994.

PERRING T.M.; COOPER A.D.; RODRIGUEZ R.J.; FARRAR C.A.; BELLOWS T.S.J. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. **Science**, v.259, p.74-77, 1993.

PERRING, T.M. Biological differences of two species of *Bemisia* that contribute to adaptative advantage. In: Gerling D.; Mayer, R.T. (eds) *Bemisia: Taxonomy, biology, damage, control and management*. Intercept, Andover, UK. 702p. 1995.

PILARTZ, M.; JESKE, H. Mapping of Abutilon mosaic geminivirus minichromosomes. **Journal Virology**, v.77, p.10808-10818, 2003.

QUÍÑONES, M.; FONSECA, D.; MARTÍNEZ, Y.; ACCOTTO, G. First report of *Tomato yellow leaf curl virus* infecting pepper plants in Cuba. **Plant Disease**, v.86, p.73, 2002.

RABELLO, A.R.; QUEIROZ, P.R.; SIMÕES, K.C.C; HIRAGI, C.O.; LIMA, L.H.C.; M.R.V.; MEHTA, A. Diversity analysis of *Bemisia tabaci* biotypes: RAPD, PCR-RFLP and sequencing of the ITS1 rDNA region. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.585-590, 2008.

REINA, J.; MORILLA, G.; BEJARANO, E.; RODRÍGUEZ, M.; JANSSEN, D. First report of *Capsicum annuum* plants infected by tomato yellow leaf curl virus. **Plant Disease**. v.83, p.1176, 1999.

RIBEIRO, S.G.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; FERNANDES, J.J.; FARIA, J.C. LIMA, M.F.; GILBERTSON, R.L.; ZAMBOLIM, E.M.; ZERBINI, F.M. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease**, v.82, p.830, 1998.

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

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

ROJAS, M.R.; HAGEN, C.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review Phytopathology**, v.43, p.361–394, 2005.

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

SANDERFOOT, A.A.; INGHAM, D.J.; LAZAROWITZ, S.G. A viral movement protein as a nuclear shuttle-The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. **Plant Physiology**, v.110, p.23–33, 1996.

SANTOS, C.D.G.; ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.664-673, 2003.

SCHOLTHOF, H.B. Plant virus transport: motions of functional equivalence. **Trends Plant Science**, v.10, p.376–382, 2005.

SCOTT, J.W. Breeding for resistance to viral pathogens. In: Razdan MK, Mattoo AK (eds) **Genetic improvement of solanaceous crops**, vol. 2: tomato. Science Publ, Enfield, pp 447–474, 2006.

SHIH, S.L.; ROFF, M.M.N.; GREEN, S.K. (2001). Virology Unit, Asian Vegetable Research and Development Center, P.O. Box 42, Shanhua, Tainan, Taiwan, Republic of China.

STANLEY, J. Analysis of African Cassava Mosaic Virus Recombinants Suggests Strand Nicking Occurs within the Conserved Nonanucleotide Motif during the Initiation of Rolling Circle DNA Replication. **Virology**, v.206, p.707-712, 1995.

STANLEY, J. BISARO, D.M., BRIDDON, R.W., BROWN, J.K., FAUQUET, C.M., HARRISON, B.D., RYBICKI, E.P., STENGER, D.C. *Geminiviridae*. In Fauquet, C. M.; Mayo, M. A.; Mmaniloff, J., Desselberger, U., Ball L.A. (eds), **Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier/Academic Press, London, 2005, pp. 301-326.

TOSCANO, L.C.; BOIÇA JÚNIOR, A.L.; MARUYAMA, W.I. Fatores que Afetam a Oviposição de *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em tomateiro. **Neotropical Entomology**, v.31, p.631-634, 2002.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. (Eds.). Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. In: REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES, 7., 2000, New York. **Report...** New York: academic Press, 2000. 985 p.

VAN WEZEL, R.; LIU, H.T.; TIEN, P.; STANLEY, J.; HONG, Y.G. Gene C2 of the monopartite geminivirus *Tomato yellow leaf curl virus*-China encodes a pathogenicity determinant that is localized in the nucleus. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.14, p.1125-1128, 2001.

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

VILLAS BÔAS, G. et al. **Manejo integrado da mosca branca *Bemisia argentifolii***. Brasília, EMBRAPA-CNPq, 1997, Circular Técnica, n. 9.

VILLAS BÔAS, G.L.; FRANÇA, F.H.; MACEDO, N. Potencial biótico da mosca branca *Bemisia argentifolii* a diferentes plantas hospedeiras. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.1, p.71-79, 2002.

ZAMIR, D.; EKSTEIN-MICHELSON, I.; ZAKAY, Y.; NAVOT, N.; ZEIDAN, M.; SARFATTI, M.; ESHED, Y.; HAREL, E.; PLEBAN, T.; van-OSS, H.; KEDAR, N.; RABINOWITCH, H.D.; CZOSNEK, H. Mapping and introgression of tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty -1*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.88, p.141 - 146, 1994.

APÊNDICE

Alinhamento de nucleotídeos do DNA A do isolado de pimentão (44E) proveniente da região de Reginópolis com o ToSRV (número de acesso DQ 207749) obtido no GenBank.

```

T0SRVPetrolinaDNA-A      ACCGGATGGCCGCGGATTTTTACCCCTTTAGTTTCAATTAAGTAAAGTGATTGTCTG 60
DNA-Apimentao            ACCGGATGGCCGCGGATTTTTACCCCTTTAGTTTCAATTAAGTAAAGTGAAGTACTGTCTG 60
*****

T0SRVPetrolinaDNA      TGGCCAATCATATTGGGCCTGTCGAGCTTAGATATTTGTAACAAGTTAAGGCCAATTT 120
DNAApimentao            TGGCCAATCATATTGGGCCTGTCGAGCTTAGATATTTGTAACAAGTTAAGGCCAAGTT 120
*****

T0SRVPetrolinaDNA      GTTGAACGGCTATAAATTGAACATACACTTTACTTTTGCCTTAATTCAAATGCCTAAGC 180
DNAApimentao            GTTAAACGGCTATAAATTGAACATACACTTTACTTTTGCCTTAATTCAAATGCCTAAGC 178
***

T0SRVPetrolinaDNA      GTGATGCCCATGGCGTTTAAACGGCGGGAACCTCAAAGGTTTCCCGCTCTGTCAATTATT 240
DNAApimentao            GTGATGCCCATGGCGTTTAAACGGCGGGAACCTCAAAGGTTTCCCGTCTGTCAATTTT 238
*****

T0SRVPetrolinaDNA      CTCCCCGTGCAGGATATGGACCCAAATATAATAAGGCCGCTGAGTGGGTGAACAGGCCA 300
DNAApimentao            CTCCCCGTGCAGGATATAGACCCAAATATAACAAGGCCTCTGAGTGGGTGAACAGGCCA 298
*****

T0SRVPetrolinaDNA      TGTACAGGAAGCCCAGGATCTACCGTACTTTGAGAGGCCCAGATGTTCCCTAGAGGCTGTG 360
DNAApimentao            TGTACAGGAAGCCCAGGATCTACCGTACTTTGAGAGGCCCAGATGTTCCCTAGAGGCTGTG 358
*****

T0SRVPetrolinaDNA      AAGGGCCTTGTAAGGTTTACGCTTACGAGTCTCGTCATGATGTTTCCCATGTGCGGAAGG 420
DNAApimentao            AAGGGCCTTGTAAGGTTTACGCTTACGAGTCTCGTCATGATGTTTCCCATGTGCGGAAGG 418
*****

T0SRVPetrolinaDNA      TGATTTGTGTGCTGACGTTACACGTTGTAACGGTATTACTCACCGTGTGGTAAGCGTT 480
DNAApimentao            TGATTTGTGTGCTGACGTTACACGTTGTAACGGTATTACTCACCGTGTGGTAAGCGTT 478
*****

T0SRVPetrolinaDNA      TCTGCGTGAAGTCTGTATATATTTAGGGAAGGTATGGATGGACGAGAGCATCAAGTTGA 540
DNAApimentao            TCTGCGTGAAGTCTGTATATATTTAGGGAAGGTATGGATGGATGAGAGCATCAAGTTGA 538
*****

T0SRVPetrolinaDNA      AGAATCACACAAATAGTGTGATGTTCTGGTTGGTTAGAGATCGGAGACCTTATTGACAC 600
DNAApimentao            AGAATCACACAAATAGTGTGATGTTCTGGTTGGTTAGAGATCGGAGACCTTATTGACAC 598
*****

T0SRVPetrolinaDNA      CTATGGATTTTGGCCAGGTGTTCAACATGTTTGACAACGAGCCTAGCACTGCAACTGTTA 660
DNAApimentao            CTATGGATTTTGGCCAGGTGTTCAACATGTTTGACAACGAGCCTAGCACTGCAACTGTTA 658
*****

T0SRVPetrolinaDNA      AGAACGATCTTCGGGATCGTTTTTACGGTTCATGCACAAGTTTATGCCAAGGTTACTGGTG 720
DNAApimentao            AGAACGATCTTCGGGATCGTTTTTACGGTTCATGCACAAGTTTATGCCAAGGTTACTGGTG 718
*****

T0SRVPetrolinaDNA      GACAGTATGCCAGTAATGAGCAGGCATTAGTGAAGCGCTTTTGGAAAGTCAACAACAACG 780
DNAApimentao            GACAGTATGCCAGTAATGATCAGGCATTAGTGAAGCGCTTTTGGAAAGTCAACAACAACG 778
*****

T0SRVPetrolinaDNA      TAGTCTACAACCATCAGGAGGCAGGAAATACGAGAATCATACTGAGAACGCCCTTGCTAT 840
DNAApimentao            TAGTCTACAACCATCAGGAGGCAGGAAATACGAGAATCATACTGAGAACGCCCTTGCTAT 838
*****

T0SRVPetrolinaDNA      TGTATATGGCATGTACTCATGCCTCTAACCCCGTGTATGCTACATTGAAAATTCGGATCT 900
DNAApimentao            TGTATATGGCATGTACTCATGCCTCTAACCCCGTGTATGCTACATTGAAAATTCGGATCT 898
*****

```

T0SRVPetrolinaDNAA ATTTTTATGATTCGATTACTAATTAATAAAAATTTAAATTTTATTGAATGATTTTCGAGTA 960
 DNAApimentao ATTTTTATGATTCGATTACTAATTAATAAAAATTTAAATTTTATTGAATGATTTTCGAGTA 958

T0SRVPetrolinaDNAA CAGCATTTACATATGATTTGTCTGTTGCAAAACGAACAGCTCTGATTACATTATTAATGG 1020
 DNAApimentao CAGCATTTACATATGATTTGTCTGTTGCAAAACGAACAGCTCTGATTACATTATTAATGG 1018

T0SRVPetrolinaDNAA AAATAACGCCTAATCGATCTAGATAACAATAAGACTAAATATTTAAATCTAGTTAAATATG 1080
 DNAApimentao AAATAACGCCTAATCGATCTAGATAACAATAAGACTAAATATTTAAATCTAGTTAAATATG 1078

T0SRVPetrolinaDNAA TCGTCCCAGAAGCTGTCAGTGAAGTCGTCCATATCTGGAAGTTGAGGAAGCTCTTGTGGA 1140
 DNAApimentao TCGTCCCAGAAGCTGTCAGTGAAGTCGTCCATATCTGGAAGTTGAGGAAGCTCTTGTGGA 1138

T0SRVPetrolinaDNAA GATGCAATGCTCTCCTCAGGTTGTGGTTGAACCGTATTTGGACGTGGTAGACTCTGCTCG 1200
 DNAApimentao GATGCAATGCTCTCCTCAGGTTGTGGTTGAACCGTATTTGGACGTGGTAGACTCTGCTCG 1198

T0SRVPetrolinaDNAA CGGTGTACATTGGATCCTCCACTCTGTTTATCTTGAAATAGAGGGGATTTGATATCTCCC 1260
 DNAApimentao CGGTGTACATTGGATCCTCCACTCTGTTTATCTTGAAATAGAGGGGATTTGATATCTCCC 1258

T0SRVPetrolinaDNAA AAATATAAACGCCATTTCTCTGCCTGACGTGCAGTGATGAGTTCCTGTGCGTGAATCCA 1320
 DNAApimentao AAATATAAGACGCCATTTCTCTGCCTGACGTGCAGTGATGAGTTCCTGTGCGTGAATCCA 1318

T0SRVPetrolinaDNAA TGTCTCTGCAGTCGATGTGTACGTAAATAGAGCACCCGCACTCTATATCAATTCGTCGT 1380
 DNAApimentao TGTCTCTACAGTCGATGTGTACGTAAATAGAGCACCCGCACTCTATATCAATTCGTCGT 1378

T0SRVPetrolinaDNAA CTCCTGATTCCTCGTTTTTTAGCAACTCTGTGTTGTACCTTGATAGAGGGGGGTGTTAAG 1440
 DNAApimentao CTCCTGATTCCTCGTTTTTTAGCAACTCTGTGTTGTACCTTGATAGAGGGGGGTGTTAAG 1438

T0SRVPetrolinaDNAA GAAGACGAATTTTCGATTGTGCTTTGTCCAATTATTTAGACTTGCATTTTCTTCTTTGTC 1500
 DNAApimentao GAAGACGAATTTTCGATTGTGCTTTGTCCAATTATTTAGACTTGCATTTTCTTCTTTGTC 1498

T0SRVPetrolinaDNAA GAGGAAACATTTATAGCTGGCCCCCTCGCCAGGATTGCAAAGCACGATGCATGGGATACC 1560
 DNAApimentao GAGGAAACATTTATAGCTGGCCCCCTCGCCAGGATTGCAAAGCACGATGCATGGGATACC 1558

T0SRVPetrolinaDNAA ACCTTTAATTTGAACTGGCTTTCCGATTTTGCAGTTTGATTGCCAATCCTTTTGGGCCCC 1620
 DNAApimentao ACCTTTAATTTGAACTGGCTTTCCGATTTTGCAGTTTGATTGCCAATCCTTTTGGGCCCC 1618

T0SRVPetrolinaDNAA AAGCAATTCTTTCCAGTGCTTTAACTTTAGATAGTGCGGTGCGATGTCATCAATGACGTT 1680
 DNAApimentao AAGCAATTCTTTCCAGTGCTTTAACTTTAGATAGTGCGGTGCGATGTCATCAATGACGTT 1678

T0SRVPetrolinaDNAA ATATTTCAACATGATTTGAATAAACCCTAGGATTGAAATCTAGGTGTCCACTCAAATAATT 1740
 DNAApimentao ATATTTCAACATGATTTGAATAAACCCTAGGATTGAAATCTAGGTGTCCACTCAAATAATT 1738

T0SRVPetrolinaDNAA ATGGGCCCTAATGCACGTGCCACATCGTCTTTCCCGTTTCGAGAATCACCTTCAATGAT 1800
 DNAApimentao ATGGGCCCTAATGCACGTGCCACATCGTCTTTCCCGTTTCGAGAATCACCTTCAATGAT 1798

T0SRVPetrolinaDNAA 1860 GATACTAATAGGTCGTTCCGGCCGCGCAGCGGCACCTCTCCCAAAGAGTCATCTGCCCA
 DNAApimentao 1858 GATACTAATAGGTCGTTCCGGCCGCGCAGCGGCACCTCTCCCAAATAGTCATCTGCCCA

T0SRVPetrolinaDNAA 1920 AGCTTGCATCTCTCTCGGTACGCTAGTGAAAGAGGAGAGGGGAAACGTAGGGGCCATGG
 DNAApimentao 1918 AGCTTGCATCTCTCTCGGTACGCTAGTGAAAGAGGAGAGGGGAAACGTAGGGGCCATGG

T0SRVPetrolinaDNAA 1980 CTCCGGAGCCCTTGTAATATCCTATCTAAATTACTATTTAGATTGTGAACTGAAATAA
 DNAApimentao 1978 CTCCGGAGCCCTTGTAATATCCTATCTAAATTACTATTTAGATTGTGAACTGAAATAA

T0SRVPetrolinaDNAA 2040 GAACTTTTCAGGCAGCTTCTCACGGATTATCTGCAAGGCGACGTCTTTGGAAGGTGCGTT
 DNAApimentao 2038 GAACTTTTCAGGCAGCTTCTCACGGATTATCTGCAAGGCGACGTCTTTGGAAGGTGCGTT

T0SRVPetrolinaDNAA 2100 CAAGGCTTCTGCGGCAGCGTCTGCTAGCTGTCTGGCAACCGCCTCTAGCACTTCTTCCGTC
 DNAApimentao 2098 CAAGGCTTCTGCGGCAGCGTCTGCTAGCTGTCTGGCAACCGCCTCTAGCACTTCTTCCGTC

T0SRVPetrolinaDNAA 2160 GATTTGGAATTCGCCCACTCGATAGTATCTCCGTCCTTATCGACATAGGATTTGACGTC
 DNAApimentao 2158 GATTTGGAATTCGCCCACTCGATAGTATCTCCGTCCTTATCGACATAGGATTTGACGTC

T0SRVPetrolinaDNAA 2220 GGACGATGACTTAGCTCTCTGAATGTTCCGGATGGAAATGTGTTGACCTTGTGGGGAGAC
 DNAApimentao 2218 GGACGATGACTTAGCTCTCTGAATGTTCCGGATGGAAATGTGTTGACCTTGTGGGGAGAC

T0SRVPetrolinaDNAA 2280 CAGGTCGAAGAATCGTTGATTTTGGCAGCAGTAGTTGCCCTCAAATGAAGAAGCAGCTG
 DNAApimentao 2278 CAGGTCGAAGAATCGTTGATTTTGGCAGCAGTAGTTGCCCTCAAATGAAGAAGCAGCTG

T0SRVPetrolinaDNAA 2340 GAGATGAGGCTCCCCATTTTCATGGAGCTCTCTGCAAACCTTGATGAACTTCTTATTTGT
 DNAApimentao 2338 GAGATGAGGCTCCCCATTTTCATGGAGCTCTCTGCAAACCTTGATGAACTTCTTATTTGT

T0SRVPetrolinaDNAA 2400 AGGAGTGTTTAGGGTTTTTAATTGGGAAAGTGCTTCTTCTTTTCGATAATGAGCATTGGG
 DNAApimentao 2398 AGGAGTGTTTAGGGTTTTTAATTGGGAAAGTGCTTCTTCTTTTCGATAATGAGCATTGGG

T0SRVPetrolinaDNAA 2460 ATATGTGAGGAAATAATTCTTCGCTTTTATTTGAAAGCGCTTTGGAGCTGATGGCATATT
 DNAApimentao 2458 ATATGTGAGGAAATAATTCTTCGCTTTTATTTGAAAGCGCTTTGGAGCTGATGGCATATT

T0SRVPetrolinaDNAA 2520 TGTAATATGACCCTTACTACCAATGGTAGCTGCTCTAAAACCTCATATCAATTGGTAGT
 DNAApimentao 2518 TGTAATATGACACTTACTACCAATGGTAGCTGCTCTAAAACCTCATATGAATTGGTAGT

T0SRVPetrolinaDNAA 2580 TATGGTAGCTCTTATATAGTAGAAGTTCTCTTTAAGGAGATTGCTACACGTGGCGCCAT
 DNAApimentao 2578 TATGGTAGCTCTTATATAGTAGAAGTTCTCTTTAAGGAGATTGCCACACGTGGCGCCAT

T0SRVPetrolinaDNAA CCGTTATAATATT 2593
 DNAApimentao CCGTTATAATATT 2591

Alinhamento de nucleotídeos do DNA B do isolado de pimentão (82A) proveniente da região de Santa Cruz do Rio Pardo com o ToRMV (número de acesso AF291706) obtido no GenBank.

Alinhamento do DNA B do genoma seqüenciado do isolado de pimentão e sequencia obtida no GenBank ToRMV (AF291706) por CLUSTAL 2.0

TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao	TGGCATATTTGTAAATATGACCCTTACTACCAATTGGTAGCTGCTCTAAA 50 TGGCATATTTGTAAATATGACACTTACTACCAATTGGTAGCTGCTCTAAA 50 *****
TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao	ACTCATATGAATTGGTAGTAATGGTAGCTCTTATATAGTAGAAGTTCCTT 100 ACTCATATGAATTGGTAGTTATGGTAGCTCTTATATAGTAGAAGTTCCTT 100 *****
TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao	CTAAGGAGATTGCTACACGTGGCCGCCATCCGTTATAATATTACCGGAT 149 CTAAGGAGATTGCCACACGTGGC-GCCATCCGTTATAATATTACCGGAT 149 *****
TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao	GGCCGCCGATTTTTCTTATCTGCTACGTGGCGAAATCGTGTACGTTGCC 199 GGCCGCCGATTTTTCTTATCTGCTACGTGGCGAAATCGTGTACGTTGCC 199 *****
TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao	TCGCGCTTTCATTTTAAATTGAGCGCTTTTTTGAAGTCCGCGAAATGAGT 249 TCGCGCTTTCATTTTAAATTGAGCGCATTTT-GAAGTCCGCGAAATGAGT 248 *****
TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao	TAATTGCTTTTTTGAATCCGCTGTTTATGAATCACCTTTAATTTGAATT 299 TAATTGCTTTTTTGAATCCGCT-TTTGTAATCACCTTTAATTTTAATT 297 *****
TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao	AAAGGTTGGATAGTTCGTATTGATCAATCATTTTCGCTGGTTTATTTCTCG 349 AAAGGTTGGATAGTTCGTATTGATCAATCATTTTCGCTGGTTTATTTCTCG 347 *****
TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao	TCGTGGTGTAAATTACAACCGTTCGTTAAAAATATAAGAAATTTACGACGT 399 TCGTGGTGTAAATTACAACCGTTCGTTAAAAATATAAGAAATTTACGACGT 397 *****
TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao	GGACTGTCTAAATTTTCATCTACATAGTTAATTTGACAAATGAATGCATAT 449 GGACTGTCTAAATTTTCATCTACATAGTTAATTTGACAAATGAAAGCATAT 447 *****
TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao	TTAAACTCTGCTTTCGTGTGGGTTTACACCACGTCTATACATATTGTCCA 499 TTAAACTCCGCTTTCGTGTGGGTTTACACCACGTCTATACATATTGTCCA 497 *****
TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao	GGTTATTTTGTCTAAGTATAATTTATATTTTGTCTTATCTTATTATCTGA 549 GGTTATTTTGTCTAAGTATAATTTATATTTTGTCTTATCTTATTATCTGA 547 *****
TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao	ACATGTATCCCATTAAGTATAGACGTGGAATGTTGTTAATCATCGACGA 599 ACATGTATCCCATTAAGTATAGACGTGGAATGTTGTTAATCATCGACGA 597 *****
TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao	GGTTACTCATCTAATCCCGTGTTTAAGCGTTTACACGGAGCGAAACGAAG 649 GCTTACTCATCTAATCCCGTATTTAAGCGTTTACACGGAGCGAAACGAAG 647 * *****
TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao	TGATTTCAAGCGTCGTTTCGAGTAATCAGATTAAGAGCATGGATGAGACTA 699 TGATTTCAAGCGTCGTTTCGAGTAATCAGATTAAGAGCATGGATGAGACTA 697 *****

TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao AAATGTCTGTTTCAGCGGATTCATGAGAACCAGTTTGGCCCTGAATTTGTA 749
AAATGTCTGTTTCAGCGGATTCATGAGAACCAGTTTGGCCCTGAATTTGTA 747

TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao ATTGGCCACAATTCTGCCATATCCACATTCATTACATTCCCTACTCTTTG 799
ATTGGCCACAATTCTGCAATATCCACATTCATTACATTCCCTACTCTTTG 797

TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao TAAGACTGTCCCGAACCCTGTAGGTCATACATAAAGTTAAGACGACTAC 849
TAAAACTGTCCCGAACCCTGTAGGTCATACATAAAGTTAAGACGACTAC 847
*** *****

TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao GTTTTAAAGGAACAATCAAGATTGACCGTGTTCATGCTGAGGTGAATATG 899
GTTTTAAAGGTACAATCAAGATTGACCGTGTTCATGCTGAGGTGAATATG 897

TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao GACGGTACAAGTCCAATGATTGAAGGAGTCTTCTCTCTGGTTGTAGTCGT 949
GACGGTACAAGTCCAATGATTGAAGGAGTCTTCTCTCTGGTTGTAGTCGT 947

TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao TGATCGCAAACCTCATTGGGCTCATCTGGAACCTGCACTCTTTTGATG 999
TGATCGCAAACCTCATTGGGCTCATCTGGAACCTGCACTCTTTTGATG 997

TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao AGATATTTGGTGCAAGGATTCATAGCCATGGTAACCTGGCAATAGTATCA 1049
AGATATTTGGTGCAAGGATTCATAGCCATGGTAACCTGGCAATAGTATCA 1047

TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao TCTCTGAAAGAGCGTTTTTACATACGTCACGTTTGGAAGAAAGTAAATATC 1099
TCTCTGAAAGAGCGTTTTTACATACGTCACGTTTGGAAGAAAGTAAATATC 1097

TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao TGTGAGAAGGATACAACCATGGTTGATGTTGAAGGAAGTACTATTTTAT 1149
CGTTGAGAAGGATACAACCATGGTTGATGTTGAAGGAAGTACTATTTTAT 1147

TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao CTAACAGGCGTTTTTAATTGT-GGTCATCCCTTTAAGGATATTGACCGTGA 1198
CTAACAGGCGTTTTTAATTGTTGGTCATCC-TTTAAGGATATTGACCGTGA 1196

TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao ATCATGTAATGGTGTTTATGCAAACATAAGCAAGAACGCCCTGTAGTTT 1248
ATCATGTAATGGTGTTTATGCAAACATAAGCAAGAACGCCCTGTAGTTT 1246

TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao ATTACTGTTGGATGTCTGATAATGTGTCTAAGGCATCGACATTTGTATCA 1298
ATTACTGTTGGATGTCTGATAATGTGTCTAAGGCATCGACATTTGTATCA 1296

TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao TTGATCTTGATTATGTTGGTTAAATAGTAAGTGAATACGTGATTAGTA 1348
TTGACCTTGATTATGTTGGCTAAATAGTAAGTGAATACATGATTATTA 1346

TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao ATAATGTTTAACTCGCTTTAATAATAAATAACAAGTACTTGTTCAGTAATA 1398
ATAATGTTTAACTCTCTTTAATAATAAATAACAAGTACTTGTTCAGTAATA 1396

TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao ATGTTCAACTCGCATTAAATAACAAAAAAATGTGTATAATAATATAGAAT 1448
ATGTTCAACTCGCAGTAATATCAAAAAAA-TGTGTATAATAATATAGAAT 1445

TomatorugosemosaicDNA-B DNABpimentao TTATTTTAAAGATTTTGGCTGTGAAGGAGTACAGTTGCTGTTTATACATT 1498
TTATTTTAAAGATTTAGGCTGTGAAGGAGTACAGTTGCTGTTTATACATT 1495

TomatorugosemosaicDNA-B
DNABpimentao CATGGGCCGCTGCTTTAAACAAGTTCGTTAATTGGGCCATTGACAGTGTT 1548
CATGGGCCGCTGCTTTAAACAAGTTCGTTAATTGGGCCATTGACAATGTT 1545

TomatorugosemosaicDNA-B
DNABpimentao ATGTTTCGATTGGGCCCTTTGAGCACCAATTACGGACGCAGAATCACCTGG 1598
ATGTTTCGATTGGGCCCTTTGAGCACCAATTACGGATGCAGAATCACCTGG 1595

TomatorugosemosaicDNA-B
DNABpimentao GTCTAATGTGCCTGTACCCAGTCTATGTAATTGTCTGTATGGATGCATCG 1648
GTCTAATGTGCCTGTACCCAGTCTATGTAATTGTCTGTATGGATGCATCG 1645

TomatorugosemosaicDNA-B
DNABpimentao CGTTCTCTATATCTGAGCCCGCCTCTGATGGGCTTAAGCCTACAGTACTT 1698
CGTTCTCTATATCTGAGCCCGCCTCTGATGGGCTTAAGCCTATAGTACTT 1695

TomatorugosemosaicDNA-B
DNABpimentao CTAACAGCCCATGACTCTCCGGGCATTATTTCAAGTGGGTTGTGAAGGCC 1748
CTAACAGCCCATGACTCTCCGGGCATTATTTCAAGTGGGTTGTGAAGGCC 1745

TomatorugosemosaicDNA-B
DNABpimentao CAATCTTGATATTGAGGCGGATCTGATCATCTTCCCTTTCCATTGGCCAT 1798
CAATCTGGATATTGAAGCGGATCTGATCATCTTCTTTCCATTGGCCAT 1795

TomatorugosemosaicDNA-B
DNABpimentao AGCCTACGTGACTGAAATCAATGTCCTTATCTGTAATTGTTTTGAAAGG 1848
AGCCTACGTGACTGAAATCAATATCCTTTTCTGTAAGTGTGTTTTGAAAGG 1845

TomatorugosemosaicDNA-B
DNABpimentao ATCTTCACCGTTGGGGCACGAAAGGTATATCAACCGAATGTTTAGCCGT 1898
ATCTTCACCGTTGGGGCACGAAAGGTATATCAACCGAATGTTTAGCCGT 1895

TomatorugosemosaicDNA-B
DNABpimentao CGAGAGTTTCAGTCTCCCTTTGAATTTAGCGAAGTGGGTACTCTGGTGAA 1948
CGAGAGTTTCAGTCTCCCTTTGAATTTAGCGAAGTGGGTACTCTGGTGAA 1945

TomatorugosemosaicDNA-B
DNABpimentao CGTTCGTGTACATACTCTGTAGTACAATTTCCATGGAATTGGGTCCTTA 1998
CGTTCGTGTACATACTCTGTAGTACAATTTCCATGGAATTGGGTCCTTA 1995

TomatorugosemosaicDNA-B
DNABpimentao AGGGAGAAGAACGACGACGAAAAGTAGTGAAGATCTATGTTACATCTGAT 2048
AGGGAGAAGAACGACGACGAAAAGTAGTGAAGATCTATGTTACATCTGAT 2045

TomatorugosemosaicDNA-B
DNABpimentao AGGAAAGTCCACGACGCCTGTAGTGATTCATTTCCGTCAATCTTCTGT 2098
AGGAAAGTCCACGACGCCTGTAGTGATTCATTTCCGTCAATCTTCTGT 2095

TomatorugosemosaicDNA-B
DNABpimentao CATGAATCTCCACTATAACTGAACCTACGGCGTTAATTGGTACCTGTTGT 2148
CATGAATTTGACTATAACTGAACCTACGGCGTTAATTGGTACCTGTTGT 2145

TomatorugosemosaicDNA-B
DNABpimentao CTGTATTCTATTACGCAATGGTCGATTTTCATACAGCTACGACTAAGCCT 2198
CTGTATTCTATTACGCAATGGTCGATTTTCATACAGCTACGACTAAGCCT 2195

TomatorugosemosaicDNA-B
DNABpimentao TGCGCTTAATTGAGACGCCGTTGAAGGGAATTGAAGCATAATCTCGGTTA 2248
TGCGCTTAATTGAGACGCCGTTGAAGGGAATTGAAGCATAATCTCGGTTA 2245

TomatorugosemosaicDNA-B
DNABpimentao GATCATGGGAAAGCTGATATTATCAGCCTTAGATTCTATATAATTAAT 2298
GATCATGGGAAAGCTGATATTATCAGCCTTAGATTCTATATAATTAAT 2295

Tabela 1. Locais de coleta de amostras de pimentão e pimenta, número de amostras coletadas, e análise das amostras.

Data	Município	Propriedade	Variedade	Amostras	Resultado positivo		
					PCR	RCA	
24/01/2007	Pirajú	1	Prador R	1A - 1N	14	4	4
24/01/2007	Pirajú	2	Prador R	3A	1	0	-
24/01/2007	Pirajú	3	Prador R	4A - 4K	11	4	4
24/01/2007	Óleo	5	Wando	5A - C	3	0	-
24/01/2007	Sta Cruz do Rio Pardo	6	Eppo	8A -F	6	2	2
24/01/2007	Sta Cruz do Rio Pardo	7	Eppo	9A - G	7	6	6
24/01/2007	Sta Cruz do Rio Pardo	7	Margarita	10A - D	4	0	-
24/01/2007	Sta Cruz do Rio Pardo	7	Max	11A e B	2	0	-
26/02/2007	São Miguel Arcanjo	1	Dahra R	12A - F	6	0	0
26/02/2007	São Miguel Arcanjo	2	Rubia	13A - H	8	0	2
26/02/2007	São Miguel Arcanjo	2	Magali R	14A e B	2	0	0
26/02/2007	São Miguel Arcanjo	2	Silver	15 A - D	4	0	0
26/02/2007	São Miguel Arcanjo	2	Maximo	16 A - N	14	0	2
26/02/2007	São Miguel Arcanjo	2	Eppo	17 A - C	3	0	0
26/02/2007	São Miguel Arcanjo	2	Sandy	18 A - E	5	0	1
26/02/2007	São Miguel Arcanjo	3	P36	19 A - H	8	0	2
26/02/2007	São Miguel Arcanjo	3	Prador R	20 A - N	14	0	1
26/02/2007	Capão Bonito	4	Prador R	21 A - T	20	0	4
26/02/2007	Itapetininga	5	Sandy	22 A - I	9	1	6
26/02/2007	Itapetininga	5	Wando	23 A - J	10	3	6
23/05/2007	Reginópolis	1	Platania	24 A	1	0	0
23/05/2007	Reginópolis	1	Rubia	25 A - E	5	0	0
23/05/2007	Reginópolis	1	Eppo	26 A - E	5	0	0
23/05/2007	Reginópolis	2	Pimenta dedo-moça	27 A - F	6	0	3
23/05/2007	Reginópolis	2	Lipari	28 A - E	5	0	2
23/05/2007	Reginópolis	3	Eppo	29 A - E	5	1	2
23/05/2007	Reginópolis	3	Plateiro	30 A - C	3	0	3
23/05/2007	Avai	4	Margarita	31 A - K	11	1	5
19/09/2007	Itapetininga	1	7086 Sakata	32 A e B	2	0	2

19/09/2007	Itapetininga	1	7302	33 A - H	8	0	4
19/09/2007	Itapetininga	1	7125	34 A - N	14	0	8
19/09/2007	Itapetininga	1	Rubia R	35 A - J	10	0	3
19/09/2007	Itapetininga	2	Rubia R	36 A - C	3	0	0
19/09/2007	Itapetininga	2	Margarita	37 A - C	3	0	3
19/09/2007	São Miguel Arcanjo	3	P36	38 A - D	4	0	3
03/10/2007	Lins	1	Maximos	39 A - X	23	0	1
03/10/2007	Lins	1	Magali R	40 A - E	5	0	3
03/10/2007	Lins	2	Magali R	41 A - N	14	0	1
03/10/2007	Reginópolis	3	Eppo	42 A - H	8	0	2
03/10/2007	Reginópolis	3	Margarita	43 A - E	5	1	3
03/10/2007	Reginópolis	4	Margarita	44 A - G	7	1	7
03/10/2007	Avaí	5	Eppo	45 A - C	3	0	3
22/10/2007	Tejupá	1	Prador R	46 A - O	15	10	14
22/10/2007	Tejupá	1	Paloma	47 A	1	0	1
22/10/2007	Tejupá	1	Plateiro	48 A - B	2	0	1
22/10/2007	Tejupá	1	Wando	49 A - C	3	0	2
22/10/2007	Tejupá	1	Astro	50 A - G	7	4	7
22/10/2007	Tejupá	1	Atlantis	51 A - B	2	0	1
22/10/2007	Tejupá	2	P 36	52 A - H	8	1	5
22/10/2007	Tejupá	2	Magali R	53 A - E	5	0	4
22/10/2007	Tejupá	2	Atlantis	54 A - D	4	0	4
22/10/2007	Tejupá	3	P 36	55 A - F	6	0	0
22/10/2007	Tejupá	3	Quantum R	56 A - E	5	0	0
22/10/2007	Sta Cruz do Rio Pardo	5	7086	57 A - L	12	0	4
22/10/2007	Sta Cruz do Rio Pardo	5	Creme	58 A - F	6	0	1
22/10/2007	Sta Cruz do Rio Pardo	5	Roxo	A e B	2	0	1
22/10/2007	Sta Cruz do Rio Pardo	5	Margarita	59 A - G	7	0	2
04/12/2007	Itapetininga	1	Sandy (F2)	60 A - N	14	14	14
04/12/2007	Itapetininga	1	Ducato	61 A - D	4	4	4
04/12/2007	Itapetininga	1	Fouk	62 A - B	2	1	2
04/12/2007	Itapetininga	1	Belconi	63 A - B	2	2	2

04/12/2007	Itapetininga	1	AF 2125	64 A - C	3	1	3
04/12/2007	São Miguel Arcanjo	2	Prador	65 A	1	0	1
04/12/2007	São Miguel Arcanjo	2	Wando	66 A	1	0	1
04/12/2007	São Miguel Arcanjo	3	Prador R	67 A - D	4	0	2
04/12/2007	São Miguel Arcanjo	4	Maximos	68 A	1	0	1
04/12/2007	São Miguel Arcanjo	5	Wando	69 A - E	5	0	4
05/12/2007	Cafelândia	1	Magali R	70 A - H	8	0	5
05/12/2007	Cafelândia	2	Magali R	71 A - J	10	0	5
05/12/2007	Reginópolis	3	7186	72 A - I	9	0	4
08/01/2008	Pirajú	1	Zarco	73 A e B	2	1	2
08/01/2008	Pirajú	1	Paloma	74 A - E	5	4	5
08/01/2008	Pirajú	1	P 36	75 A - F	6	2	5
08/01/2008	Tejupá	2	Astro	76 A - L	12	2	11
08/01/2008	Tejupá	2	Prador R	77 A - G	7	2	5
08/01/2008	Tejupá	3	Plateiro	78 A - G	7	2	5
08/01/2008	Tejupá	3	Magali R	79 A - C	3	0	2
08/01/2008	Tejupá	3	Atlantis	80 A e B	2	0	1
08/01/2008	Tejupá	3	Wando	81 A - K	11	1	9
08/01/2008	Sta Cruz do Rio Pardo	4	Prador R	82 A - I	9	0	3
08/01/2008	Sta Cruz do Rio Pardo	4	Lilac-Roxo	83 A - M	13	13	14
08/01/2008	Sta Cruz do Rio Pardo	4	Impacto	84 A-D	4	0	4
04/03/2008	Itapetininga	1	Atlantis	85 A - F	6	0	2
04/03/2008	Itapetininga	2	Rubia R	86 A - S	19	1	8
04/03/2008	Itapetininga	2	P36	87 A - F	6	0	1
04/03/2008	São Miguel Arcanjo	3	Atlantis	89 A - H	8	0	5
04/03/2008	São Miguel Arcanjo	3	Diplomata	90 A - H	8	0	5
08/04/2008	Sabino	1	Magali R	91 A - E	5	0	0
08/04/2008	Pirajú	3	Margarita	92 A - L	12	0	9
08/04/2008	Pirajú	3	Eppo	93 A e B	2	0	0
08/04/2008	Pirajú	3	Linea	94 A e B	2	0	2
09/04/2008	Iacanga	1	Margarita	95 A - D	4	0	2
09/04/2008	Iacanga	1	Eppo	96 A-G	7	0	0
28/04/2008	Timburí	1	Prador R	97 A - C	3	0	0

28/04/2008	Timburí	1	P36	98 A – G	7	0	0
28/04/2008	Timburí	1	Dínamo	99 A – E	5	0	0
28/04/2008	Timburí	1	Lípari	100 A – H	8	0	0
28/04/2008	Pirajú	3	Zarco	101 A – G	7	1	2
28/04/2008	Pirajú	3	P36	102 A – G	7	7	7
28/04/2008	Tejupá	4	Paloma	103 A - H	8	1	2
028/04/2008	Tejupá	4	Prador R	104 A – L	12	0	3
28/04/2008	Sta Cruz Rio Pardo	5	Eppo	105 A – B	2	0	2
28/05/2008	Itapetininga	1	Atlantis	106 A – J	10	0	6
28/05/2008	Itapetininga	2	Dahra	107 A- B	2	0	2
28/05/2008	Itapetininga	2	Rubia R	108 A - D	4	0	4
28/05/2008	Itapetininga	3	P36	109 A-C	3	0	2
28/05/2008	Itapetininga	3	Sandy	110 A- C	3	0	0
28/05/2008	Itapetininga	3	Dahra	111 A- B	2	0	2
28/05/2008	São Miguel Arcanjo	4	Wando	112 A- D	4	0	3
28/05/2008	São Miguel Arcanjo	5	Dahra	112 A- D	4	0	2
28/05/2008	São Miguel Arcanjo	6	Maximos	113 A- E	5	0	0
20/07/2008	São Manuel	1	-	114 A-C	3	0	2
TOTAL					709	98 (13,82%)	332 (46,83%)

Tabela 2. Locais de coleta de amostras de tomateiro, número de amostras coletadas, e análise das amostras.

Data	Município	Propriedade	Variedade	Número de Amostras		Resultado positivo	
						PCR	RCA
08/04/2008	Sabino	1	Carmen	1-4	4	3	4
28/05/2008	São Miguel Arcanjo	4	Rubi	5-14	10	0	2
28/05/2008	São Miguel Arcanjo	5	Santa Clara	15-38	24	6	18
02/06/2008	São Pedro do Turvo	1	Cordilheira	39-49	11	8	11
12/08/2008	Pirajú	1	Cordilheira	50-51	2	0	2
12/08/2008	Pirajú	1	Colibri	52-55	3	0	3
12/08/2008	Pirajú	1	Débora	56-64	9	0	4
12/08/2008	Santa Cruz do Rio Pardo	3	Colibri	65-69	5	4	5
12/08/2008	Santa Cruz do Rio Pardo	4	Colibri	70-75	6	5	6
12/08/2008	Santa Cruz do Rio Pardo	5	Colibri	76-82	7	5	7
20/08/2008	Sabino	1	Helen	83-85	3	0	1
20/08/2008	Sabino	1	Maiorca	86	1	0	1
20/08/2008	Sabino	1	Paron	87-90	4	2	4
20/08/2008	Lins	2	Paron	91-93	3	3	3
20/08/2008	Lins	2	Caroline	94-95	2	0	2
20/08/2008	Lins	2	Helen	96-97	2	0	2
20/08/2008	Lins	3	Paty	98-99	2	1	2
20/08/2008	Lins	5	Sweet grape	100	1	0	1
20/08/2008	Lins	5	Momotaro	101-104	4	2	4
				TOTAL	103	39 (37,86%)	82 (79,61%)