

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

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE BEGOMOVÍRUS EM
TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* Mill) NO CENTRO-OESTE
PAULISTA**

MARCO ANTONIO DE ANDRADE COTRIM

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia (Proteção de plantas)

BOTUCATU-SP
Maio - 2005

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

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE BEGOMOVÍRUS EM
TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* Mill) NO CENTRO-OESTE
PAULISTA**

MARCO ANTONIO DE ANDRADE COTRIM

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Renate Krause Sakate

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia (Proteção de plantas)

BOTUCATU - SP

Maior – 2005

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela graça da vida, aos meus pais Marco e Denise, por terem me ensinado os valores da vida e pelo apoio incondicional, a minha irmã Patrícia e a minha avó Aida, que sempre me incentivaram em minha caminhada, e a todas as pessoas que acompanharam a minha vida acadêmica e pessoal que com certeza estarão sempre comigo em pensamento.

À minha linda e doce noiva, Karina Carnielli Zamprogno, que tanto me incentiva e compreende. Sou abençoado por ter uma pessoa tão especial ao meu lado.

À minha orientadora, Prof. Dr^a. Renate Krause Sakate, pela competência, pelos ensinamentos e pela paciência ao longo deste difícil caminho.

Ao Prof. Dr. Francisco Murilo Zerbini e a Nobuioshi Narita pela ajuda na condução do experimento, pelas valiosas informações e conselhos.

Aos companheiros de laboratório Márcia César, Jorge Massaki e Marcio Sanches por todo apoio, amizade e lealdade.

Aos amigos Fabio Scudeler, Marcel Bonini, Anderson Parussolo e Tatiana Paulossi pela amizade sincera, pela força e pelos momentos de descontração.

A todos os professores e funcionários que de alguma forma me auxiliaram durante a pesquisa, não apenas pelos serviços prestados, mas pela convivência e amizade. Em especial aos Professores Marcelo Agenor Pavan, Antônio Carlos Maringoni, Edson Luiz Furtado e Nilton Luiz de Souza pela formação.

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

SUMÁRIO

	Página
1. Resumo.....	1
2. Summary.....	2
3. Introdução.....	3
4. Revisão de Literatura.....	6
4.1. <i>Geminiviridae</i>	6
4.2. <i>Begomovirus</i>	8
5. Material e Métodos.....	16
5.1. Fonte dos vírus utilizados.....	16
5.2. Extração do DNA viral.....	18
5.3. PCR.....	19
5.4. Sequenciamento do produto de PCR.....	20
5.5. Análises comparativas das seqüências.....	21
5.6. Obtenção de primers específicos para as espécies ToRSV e ToYVSV.....	21
6. Resultados e Discussão.....	22
7. Conclusões.....	35
8. Referências Bibliográficas.....	36

LISTA DE FIGURAS

	Página
1.Representação esquemática do genoma de um begomovírus típico. Linhas pretas representam o genoma viral, dividido em dois componentes com aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada. Setas indicam os genes e proteínas virais e a direção em que ocorre a transcrição. A região comum (RC) também está indicada.....	14
2.Sintomas observados no campo: a) amarelecimento das nervuras; b) mosaico generalizado; c) enfezamento da planta.....	17
3.Localização dos 8 municípios da mesoregião de Marília, onde foram realizadas as coletas de amostras de tomateiro exibindo sintomas semelhantes àqueles causados por begomovírus.....	18
4.Representação da região do genoma amplificada com o uso dos oligonucleotídeos PAL1v1978 / PAR1c496, em vermelho, e PAL1v1978 / PAV1c715, em verde. Setas azuis representam os genes virais. A linha preta representa o genoma viral, contendo a região comum, em cinza.....	20
5.Vetor (<i>Bemisia tabaci</i>) presente em altas populações nas áreas da coleta.....	23
6.Produto de amplificação em gel de agarose 2,0% dos fragmentos obtidos via PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos PAL1v1978/PAR1c715. M: marcador 1 Kb Ladder.-Invitrogen; + : controle positivo; - : controle negativo; B : branco e 1e, 2b, 3b, 9a, 19c, 28a, 30a, 31a, 31b correspondem a amostras provenientes do campo.....	24
7.Alinhamento múltiplo da seqüência de nucleotídeos correspondentes à parte da região N-terminal da capa protéica dos begomovírus encontrados infectando tomate no Centro-Oeste do estado de São Paulo e de espécies já relatadas infectando tomate no Brasil com o uso do programa MultAling (CORPET, 1988).	29

8.Árvore filogenética preparada com o uso do programa Mega 2.1 dos nucleotídeos correspondentes a parte da região N-terminal da capa protéica. Valores de bootstrap 2000. Outgroup: ACMV.....	30
9.Alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos das amostras encontradas no campo infectando tomateiro e das sequências do ToRSV e ToYVSV depositadas no GenBank, com os primers desenhados para ToYVSV (a) e ToSRV (b).....	31
10.Ocorrência de begomovírus infectando tomateiro no estado de São Paulo.....	33

LISTA DE QUADROS

	Página
1. Begomovírus que infectam tomateiro no Brasil. Vírus em itálico foram reconhecidos pelo ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses).....	11
2. Begomovírus detectados via PCR utilizando-se os oligonucleotídeos universais PAL1v1978/ PAR1c496 e PAL1v1978/PAV1c715 (ROJAS et al., 1993) e caracterizados por sequenciamento direto.....	25
3. Espécies virais, siglas e números de acesso de 13 espécies de begomovírus utilizados nas comparações e citados no texto. As espécies em itálico foram reconhecidas pelo ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses).....	26
4. Porcentagem de identidade de nucleotídeos de parte da região codificadora para a capa protéica entre isolados analisados. As cores representam os maiores valores de identidade entre os isolados coletados e as espécies de vírus conhecidas.....	28

1 RESUMO

A variabilidade genética dos vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* que infectam o tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) foi avaliada em regiões produtoras do Centro-Oeste paulista. No período de janeiro de 2003 a fevereiro de 2004, 166 amostras de tomate apresentando sintomas típicos de doenças causadas por begomovírus, foram coletadas em propriedades produtoras de tomate. Após a extração do DNA, a infecção viral foi verificada por meio de PCR nessas amostras, utilizando-se oligonucleotídeos universais para o gênero. A presença de begomovírus foi observada em 60% das amostras coletadas. O sequenciamento direto dos produtos de PCR de 17 dessas amostras e comparação com seqüências de nucleotídeos depositadas no GenBank indicou a possível presença do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), da espécie tentativa *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), do *Sida mottle virus* (SiMoV) e de uma possível nova espécie. A presença do ToSRV e do SiMoV ainda não havia sido reportada no estado de São Paulo. Estes resultados indicam alta diversidade de espécies de begomovírus infectando tomate, servindo como um alerta para melhoristas que trabalham na busca de fontes de resistência de tomate a este importante grupo de patógenos.

GENETIC DIVERSITY OF BEGOMOVIRUS INFECTING TOMATO (*Lycopersicon esculentum* Mill) FROM SÃO PAULO MIDLE-WEST. Botucatu, 2005. 42p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MARCO ANTONIO DE ANDRADE COTRIM

Adviser: RENATE KRAUSE-SAKATE

2 SUMMARY

The genetic variability of viruses belonging to the *Begomovirus* genus infecting tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill) was evaluated in production areas from mid-western region of São Paulo state. From January 2003 to February 2004, 166 tomato samples with typical symptoms of begomovirus infection were collected from the field. After DNA extraction, the presence of begomoviruses was verified by PCR using universal primers. The presence of begomoviruses was observed on 60% of the collected samples. Direct sequencing of PCR products of 17 selected samples and comparison with nucleotide sequences deposited in GenBank indicated the possible presence of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), the tentative species *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Sida mottle virus* (SiMoV) and a possible new specie of begomovirus. The presence of ToSRV and SiMoV had not yet been reported in São Paulo state. These results indicate the existence of a high degree of genetic diversity of begomovirus species infecting tomatoes, and serve as an alert for breeders searching for resistance against this important group of pathogens

3 INTRODUÇÃO

A cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) é de grande importância econômica para nosso país, com uma área cultivada de mais de 61 mil hectares no ano de 2004, produção de mais de 3,6 milhões de toneladas e um rendimento médio de 59 ton/ha (IBGE, 2004). Além do aspecto econômico, o cultivo e processamento do tomate são atividades de grande importância social como fonte geradora de empregos.

No Brasil e demais países produtores de tomate, seu cultivo durante o ano inteiro propicia condições favoráveis ao surgimento de doenças causadas por fungos, bactérias e principalmente por fitovírus (BROWN et al., 1992). Dentre elas, as causadas pelos begomovírus, transmitidas por moscas-brancas do complexo *Bemisia tabaci* podem ser consideradas como limitantes à produção comercial do tomate (FARIA et al., 2000).

A família *Geminiviridae* é dividida em quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* (FARIA et al., 2000; VAN REGENMORTEL et al., 2000). Os geminivírus em geral e os begomovírus em particular, são considerados grupos emergentes de vírus de plantas, devido ao grande aumento na incidência e severidade das

doenças por eles causadas nas últimas décadas (FARIA et al., 2000; MORALES & ANDERSON, 2001; POLSTON & ANDERSON, 1997). Uma explicação para a alta ocorrência de begomovírus está possivelmente relacionada à presença do biótipo B de *Bemisia tabaci* (Homoptera: *Aleyrodidae*), que possui uma maior gama de hospedeiros e maior fecundidade em relação ao biótipo A (NARANJO & ELLSWORTH, 2001). Atualmente *B. tabaci* é considerada uma das pragas que mais causa danos em diversas culturas ao redor do globo, sendo responsável pela transmissão de mais de 80 tipos diferentes de vírus de plantas (LIMA et al., 2002; VAN REGENMORTEL et al., 2000). O biótipo B de *B. tabaci* é uma espécie polífaga com mais de 500 hospedeiros e distribuída pelas regiões tropicais e subtropicais do globo (MORALES & ANDERSON, 2001), e coloniza o tomateiro e outras solanáceas com alta eficiência (BEDFORD et al., 1994) além de um grande número de espécies de plantas da vegetação espontânea (FARIA & MAXWELL, 1999).

A presença do novo biótipo da mosca-branca, no estado de São Paulo, pôde ser notada a partir de 1992, possivelmente após ser introduzida da Europa ou EUA pela importação de plantas ornamentais (LOURENÇÃO & NAGAI, 1994). No Distrito Federal a presença do biótipo B foi confirmada em 1993 associada a sintomas de infecção por begomovírus em plantas de tomateiro para processamento industrial. (FRANÇA et al., 1996). Nos últimos anos, pôde-se observar um aumento na incidência das doenças causadas por begomovírus nas regiões produtoras de tomate nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Pernambuco, e no Distrito Federal, causando danos de 40 a 100% (FARIA et al., 1997; RIBEIRO et al., 1998; RIBEIRO et al., 2003). Begomovírus também foram detectados na Serra de Ibiapaba, principal região produtora de tomate do Ceará (LIMA et al., 1999).

Essas epidemias parecem estar associadas a conjunções favoráveis de vários fatores, como abundância de plantas hospedeiras suscetíveis e a rápida disseminação da *Bemisia tabaci* biótipo B. A co-infecção de plantas com diferentes begomovírus, favoreceu o surgimento de novas variantes/espécies (ZHOU et al., 1998; LEGG & THRESH, 2000; RIBEIRO et al., 2001), devido a eventos de recombinação ou pseudo-recombinação (reagrupamento dos componentes genômicos) dos genomas desses vírus (HARRISON & ROBINSON, 1999).

No Brasil já foram identificados 14 begomovírus infectando tomate, sendo que alguns destes ainda não foram reconhecidos como novas espécies. No estado de São Paulo, nos últimos anos, o geminivírus comumente encontrado infectando tomateiros pertence à espécie tentativa Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) (FARIA et al., 1997), além do *Tomato severe mosaic virus* (TSMV) (COLARICCIO et al., no prelo).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi o estudo da diversidade genética de begomovírus infectando tomate em áreas produtoras do Centro-Oeste paulista.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 *Geminiviridae*

Os vírus da família *Geminiviridae* possuem como principal característica a morfologia icosaédrica e partículas geminadas de seus capsídeos, além do genoma composto por DNA circular de fita simples. Essas partículas virais são formadas por icosaédros incompletos de 18-20 x 30-32 nm unidos, sendo cada icosaédro composto de 11 subunidades (LAZAROWITZ, 1992). Os icosaédros são constituídos por aproximadamente 80% de proteínas e possuem massa molecular de 28-34 KDa (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999).

A família é dividida em quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* com base no número de componentes do genoma, tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros e relacionamento filogenético (VAN REGENMORTEL et al., 2000).

Os *Mastrevirus* incluem os vírus com um único componente genômico, que infectam monocotiledôneas e são transmitidos por cigarrinhas (homóptera: *Cicadellidae*). O *Maize streak virus* (MSV) é a espécie-tipo, do qual o gênero deriva seu nome. Este gênero inclui alguns patógenos importantes de culturas como o milho e o trigo. Possuem DNA com duas regiões intergênicas, uma curta (SIR), com aproximadamente 50 nucleotídeos, e uma longa (LIR), com aproximadamente 200 nucleotídeos. Há duas ORFs (open reading frames) no sentido viral, *mp* e *cp*, e duas no sentido complementar, *repA* e *repB*. O *Tobacco yellow dwarf virus* (TobYDV) e *Bean yellow dwarf virus* (BeyDB) são exceções ao gênero, já que esses são patógenos de dicotiledôneas (RYBICKI et al., 2000).

O gênero *Curtovirus* é constituído por vírus com um único componente genômico, infetam dicotiledôneas, são transmitidos por cigarrinhas e possuem somente a região intergênica longa. Há três ORFs no sentido viral, *mp*, *V3* e *cp*, e quatro no sentido complementar, *C4*, *rep*, *C2* e *ren*. O *Beet curly top virus* (BCTV) é a espécie-tipo do gênero *Curtovirus* (RYBICKI et al., 2000).

Os membros do gênero *Begomovirus* possuem dois componentes genômicos, infectam dicotiledôneas e são transmitidos por mosca-branca (homóptera: *Aleurodidae*). Esses componentes possuem cerca de 2,6 kpb cada, sendo encapsidados em partículas geminadas distintas. O *Bean golden mosaic virus – Puerto Rico* (BGVM) é a espécie-tipo deste gênero (RYBICKI et al., 2000). Alguns isolados do TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus* - nome dado a um complexo de begomovírus que infectam tomate) possuem apenas um componente genômico e podem ser transmitidos de uma maneira sexo-dependente, na ausência de qualquer outra fonte de vírus. Em um experimento, TYLCV foi transmitido de machos virulíferos a fêmeas, e de fêmeas virulíferas a machos, mas não entre insetos do mesmo sexo (GHANIM & CZOSNEK, 2000). Além disso, o DNA do TYLCV pôde ser constatado na progênie de insetos que tinham adquirido o vírus, indicando a transmissão transovariana (GHANIM et al., 1998). Uma vez adquirido, o genoma do vírus acompanha o inseto por toda a sua vida. Esta longa relação está associada com o decréscimo na taxa de transmissão do vírus, longevidade e fecundidade do inseto. O TYLCV pode ser transmitido pelo ovo para pelo menos duas gerações seguintes. Os insetos ao receber o vírus são capazes de eficientemente inocular o vírus em plantas saudias, produzindo sintomas típicos

da doença (GHANIM & CZOSNEK, 2000; KNELL & WEBBERLEY, 2004). A transmissão vertical e horizontal na ausência de um hospedeiro alternativo é de extrema importância, já que o vetor pode servir como um reservatório do vírus na ausência de um hospedeiro (CZOSNEK et al., 2002).

O espécie-tipo e a única espécie do gênero *Topocuvirus* é o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), transmitido por cigarrinhas (Homóptera; *Auchenorrhyncha*) para dicotiledôneas e com um único componente genômico. O sequenciamento do genoma completo indicou que a espécie surgiu da recombinação entre um ancestral do BCTV e um vírus sem semelhança com qualquer outro geminivírus conhecido. A criação desse novo gênero foi baseada na organização do genoma e no relacionamento filogenético com outras espécies de geminivírus, indicando que a taxonomia de vírus pode envolver não só características filogenéticas, número de componentes do genoma, o modo de transmissão e a gama de espécies hospedeiras, mas também parâmetros relacionados com o processo evolutivo das espécies (RYBICKI et al., 2000).

De acordo com ICTV (2005) atualmente são reconhecidas 99 espécies de geminivírus nos 4 gêneros que compõem a família: o gênero *Mastrevirus* possui 12 espécies, com 2 espécies candidatas; *Curtovirus* com 5 espécies e 2 candidatas; *Begomovirus*, com 82 espécies e 37 candidatas; e *Topocuvirus* com apenas 1 espécie.

4.2 *Begomovirus*

O nome do gênero *Begomovirus* (VAN REGENMORTEL et al., 2000) é derivado da primeira fitovirose transmitida por mosca-branca a ganhar notoriedade na América do Sul, causada pelo “*Bean golden mosaic virus*” (BGMV). A relação entre os begomovírus e a mosca branca, incluindo diversas características de transmissão do vírus pelo vetor, tais como período de aquisição, de inoculação, de latência, de retenção, passagem transovariana, entre outras é variável e relacionada à estirpe viral envolvida, à região geográfica e às condições locais (SANTOS et al., 2003). O BGMV foi primeiramente observado em 1961 no estado de São Paulo, Brasil, infectando *Phaseolus vulgaris* (feijão

comum) e *Phaseolus lunatus* (feijão-de-lima) (MORALES & JONES, 2004). Costa (1965) descreveu o agente etiológico como de importância econômica insuficiente para que medidas de controle fossem necessárias. Uma década mais tarde o mesmo relator reportou que o BGMV estava “agora presente em todas as culturas de feijão importantes do país” (COSTA, 1975).

Atualmente, as espécies virais classificadas no gênero *Begomovirus* incluem alguns dos principais patógenos de plantas em regiões tropicais e subtropicais do globo (BROWN & BIRD, 1992; POLSTON & ANDERSON, 1997), ocorrendo em culturas alimentares básicas como mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (LEGG & THRESH, 2000), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (MORALES & ANDERSON, 2001), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (BRIDDON et al., 2001), pimentão (*Capsicum annum*) e tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) (FARIA et al., 2000). No mundo, já foram descritas 53 espécies reconhecidas e 13 espécies candidatas de begomovírus capazes de infectar tomate, sendo que mais de 20 ocorrem nas Américas e 14 destas espécies (tentativas e reconhecidas) ocorrem aqui no Brasil (Quadro 1) (GeminiDetective, 2005).

A América Latina é atualmente a região mais afetada em termos de número total de espécies conhecidas de begomovírus, de culturas afetadas, de perdas na produção e do tamanho da área agrícola atingida por esses patógenos. No momento, 5 milhões de hectares de terra agricultável em 20 países latino-americanos estão sob o ataque de mais de 30 geminivírus distintos (MORALES & ANDERSON, 2001).

No Brasil uma “clorose infecciosa” em tomate foi primeiramente relatada no final da década de 50 (FLORES et al., 1960). Esta doença, causada por um vírus transmitido pela mosca-branca, foi posteriormente caracterizada por Matys et al. (1975) e identificada como “mosaico dourado do tomateiro”. Outra doença do tomateiro (mosaico amarelado), associada com a mosca-branca, foi descrita no começo dos anos 60 na Venezuela (DEBROT et al., 1963). Esta doença era denominada “mosaico amarelo do tomateiro” (ANZOLA & LASTRA, 1985; LASTRA & UZCÁTEGUI, 1975).

Na região do Triângulo Mineiro, a ocorrência de sintomas típicos de begomovírus em tomateiros tem sido observada desde 1995. Um levantamento de campo

realizado em junho de 2000 nos municípios de Araguari, Indianópolis e Uberlândia indicou a prevalência do *Tomato rugose mosaic virus* - ToRMV em tomateiros: das 148 amostras coletadas e positivas para begomovírus, 108 (73%) estavam infetadas pelo ToRMV (FERNANDES, 2001).

Na Zona Metalúrgica de Minas Gerais, um begomovírus foi identificado em amostras de tomateiro (ZERBINI et al., 1996) e caracterizado biológica e molecularmente por Ambrozevicius et al. (1999) e Andrade et al. (2002). A comparação da seqüência de nucleotídeos completa dos componentes A e B com outros begomovírus demonstrou tratar-se de uma nova espécie, denominada *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV (ANDRADE et al., 2002; RIBEIRO et al., 2003). A homologia de seqüência entre o ToCMV e o ToRMV é de aproximadamente 85% para o componente A e 80% para o componente B, indicando tratar-se de vírus distintos, porém altamente relacionados. Outros isolados do ToCMoV foram identificados no Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Pernambuco (RIBEIRO et al., 2003).

O ToSRV quando comparado ao ToRMV possui 89% de identidade para os aminoácidos da capa protéica, indicando tratar-se de uma nova espécie. Ribeiro et al. (2003), relataram o *Tomato chlorotic vein virus* (ToCVV) e as espécies candidatas *Tomato crinkle leaf yellow virus* (ToCLYV-Bz) e *Tomato infectious yellows virus* (ToIYV) também no estado de Minas Gerais.

No estado de São Paulo, nos últimos anos, o geminivírus comumente encontrado infectando tomateiros pertence à espécie tentativa descrita por Faria et al. (2000) como *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV). A alta incidência de ToYVSV em lavouras de tomate em São Paulo, no início desta década, tem produzido decréscimos significativos na produção. Também foi verificada recentemente a espécie *Tomato severe mosaic virus* (TSMV) (COLARICCIO et al., no prelo).

Vírus	Número de acesso das seqüências depositadas no GenBank	Isolados prováveis pertencentes à espécie
<i>Sida micrantha mosaic virus</i> (SimMV)	SimMV AJ557451	
<i>Sida mottle virus</i> (SiMoV)	SiMoV-BZ AY090555	
Tomato chlorotic vein virus (ToCVV)	ToCVV-BZ AY049205	
Tomato crinkle leaf yellow virus (ToCLYV)	ToCLYV-BZ (Brazil) AY090556	
Tomato crinkle virus (ToCV)	ToCV-BZ (Brazil) AY049218	
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i> (ToCMoV)	ToCMoV-BZ (BA-Se1) AF490004 ToCMoV-Cr (crumple) AY090557 ToCMoV-PE-Pq1 AY049223 ToCMoV-PE-Pt4 AY049220 ToCMoV-BA-Ju2 AY049213 ToCMoV-PE-Be1 AY049210 ToCMoV-RJ-Sf1 AY049209 ToCMoV-Mg-Ig1 AY049206	
Tomato infectious yellows virus (ToIYV)	ToIYV -AY049208	
<i>Tomato golden mosaic virus</i> (TGMV)	TGMV-Com - EUA (Common) M73794 TGMV-YV - EUA (Yellow Vein) K02029	
Tomato golden vein virus (TGVV)	TGVV AY751742	
Tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV)	ToMoLCV-BZ (Brazil) AY049227	ToMoLCV-BA-Ju1 AY049212 ToMoLCV-PePt1 AY049217 ToMoLCV-PePt2 AY049219 ToMoLCV-PePt3 AY049215 ToMoLCV-PePt5 AY049222 ToMoLCV-PePt6 AY049221 ToMoLCV-PB-Cg3 AY049211 ToMoLCV-PE-Pq2 AY049216
<i>Tomato rugose mosaic virus</i> (ToRMV)	ToRMV AF291705	
<i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV)	ToSRV AY029750	
Tomato severe mosaic virus (TSMV)	TSMV AY049207	
Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV)	ToYVSV U79998	

Quadro 1. Begomovírus que infectam tomateiro no Brasil. Vírus em itálico foram reconhecidos pelo ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses).

Recentemente, o surgimento e a disseminação de diversos novos begomovírus infetando tomateiros nas Américas veio ressaltar de forma dramática o impacto causado por esses patógenos na agricultura (POLSTON & ANDERSON, 1997). Essas epidemias têm sido associadas a mudanças drásticas nos sistemas de exploração agrícola, com expansão de culturas como a soja, que funcionam como excelentes hospedeiras para a mosca-branca (MORALES & ANDERSON, 2001). Além de vetora de vírus, a mosca-banca pode ocasionar danos diretos pela sucção da seiva e pela ação toxicogênica, além da liberação de secreções açucaradas que propiciam o desenvolvimento de fumagina. No tomateiro ela pode ocasionar o amadurecimento irregular dos frutos (“irregular ripening of tomato”) causado pela injeção de toxinas durante a alimentação do inseto (HOKKO, 2005).

Os begomovírus possuem várias características que dificultam o uso de técnicas tradicionais para sua detecção, dentre elas: dificuldade de transmissão de muitos desses vírus via extrato vegetal tamponado, presença de sintomas idênticos em plantas infectadas por espécies de vírus distintos, difícil purificação das partículas na sua forma estável, vírions pouco imunogênicos e proteínas capsidiais antigenicamente indistintas. Durante muitos anos esses vírus foram pouco estudados, em parte porque as doenças por eles causadas não resultavam em perdas importantes, mas principalmente devido à dificuldade para diagnosticá-las. Este é o caso de BGMV, que, embora seja uma doença importante no Brasil há pelo menos três décadas, seus estudos só foram intensificados nos últimos 15 anos, com a utilização de técnicas baseadas na detecção do DNA viral (MELLO, 2001).

As técnicas mais utilizadas na detecção e identificação de begomovírus em plantas e no inseto-vetor têm sido as reações em cadeia da polimerase, ou PCR (ROJAS et al., 1993), e a hibridização de ácidos nucleicos (MELLO, 2001). A aplicação das ferramentas moleculares não se restringe à diagnose, pois, também permite a determinação da concentração de vírus nos tecidos vegetais, a localização das partículas virais no nível sub celular, e o estudo das interações vírus hospedeiro, possibilitando assim, um maior entendimento dos mecanismos moleculares da infecção. As técnicas moleculares também se aplicam a estudos taxonômicos, através da comparação de seqüências de nucleotídeos ou de aminoácidos, a fim de determinar de forma mais precisa o relacionamento entre isolados. Padidam et al. (1995), comparando seqüências genômicas de 36 geminivírus, sugeriram que a

análise da seqüência de uma pequena região do genoma (a região 5' do gene *cp*) seria suficiente para classificar um isolado em espécie. Porém verificada a ocorrência de novos geminivírus por meio de recombinações, Padidam et al. (1999) verificaram a fragilidade de se analisar uma pequena porção do genoma, de forma que diferentes critérios (número de componentes do genoma, tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros e relacionamento filogenético) devem ser analisados antes de se classificar um isolado como uma nova espécie. Um dos critérios indicativos da presença de espécies distintas esta na análise da identidade da seqüência nucleotídica da capa protéica. Isolados com identidade superior a 90% podem ser considerados à primeira instância como pertencentes a uma mesma espécie. Porém a classificação definitiva poderá ser obtida, entre outros parâmetros, com o sequenciamento completo do componente A (FAUQUET et al., 2003).

O genoma dos begomovírus existe sob variadas formas. A variação mais evidente é a ausência do DNA-B em algumas espécies. No caso do TYLCV, o DNA-A mostrou-se suficiente para desempenhar todas as funções essenciais ao vírus, tanto as relacionadas com a replicação quanto as relacionadas ao movimento (KHEYR-POUR et al., 1991). Geminivírus com genoma monopartido podem estar associados a uma molécula de ssDNA que é encapsidada pela CP do vírus, replicada pela Rep viral e que contém o nonanucleotídeo TAATATTAC, chamada de DNA- β (BRIDDON, et al., 2003). Estas moléculas modulam os sintomas da infecção viral e já foram associadas a diversas espécies de plantas no Velho Mundo, onde ocorrem os geminivírus monopartidos. Sem estes satélites estes begomovírus não são capazes de causar infecção ou são pouco agressivos ao hospedeiro do qual foram isolados. Apesar da função destas moléculas ainda não ter sido totalmente esclarecida, sabe-se que o DNA- β é essencial para a indução de sintomas por esses vírus e aumenta o nível de ácido nucléico viral nas plantas infectadas (BRIDDON et al., 2004; BULL et al., 2004).

Para aqueles begomovírus que apresentam genoma com dois componentes, sabe-se que existe maior variabilidade de seqüência no DNA-B, entre diferentes isolados, do que na seqüência do DNA-A. É a região comum (RC) a parte do genoma que mostra maior variação entre diferentes espécies de begomovírus. Entre os dois componentes de DNA de uma mesma espécie de begomovírus ela é idêntica ou muito similar, exceto para o

Cabbage leaf curl virus (CLCV), no qual foram encontradas 80% de homologia entre as seqüências das RCs do DNA-A e do DNA-B (HOU et al., 1998). A RC é onde se inicia o processo de replicação dos geminivírus (FONTES et al., 1994a, b). Ela é formada por cerca de 200 nucleotídeos com elementos de seqüência altamente conservados, tais como a referida seqüência TAATATTAC, sítio de clivagem da proteína Rep, as “caixas” TATA, envolvidas na iniciação da transcrição do gene *cp*, na fita viral, e a do gene *rep*, na fita complementar (ARGUELLO-ASTORGA et al., 1994) (Figura 1).

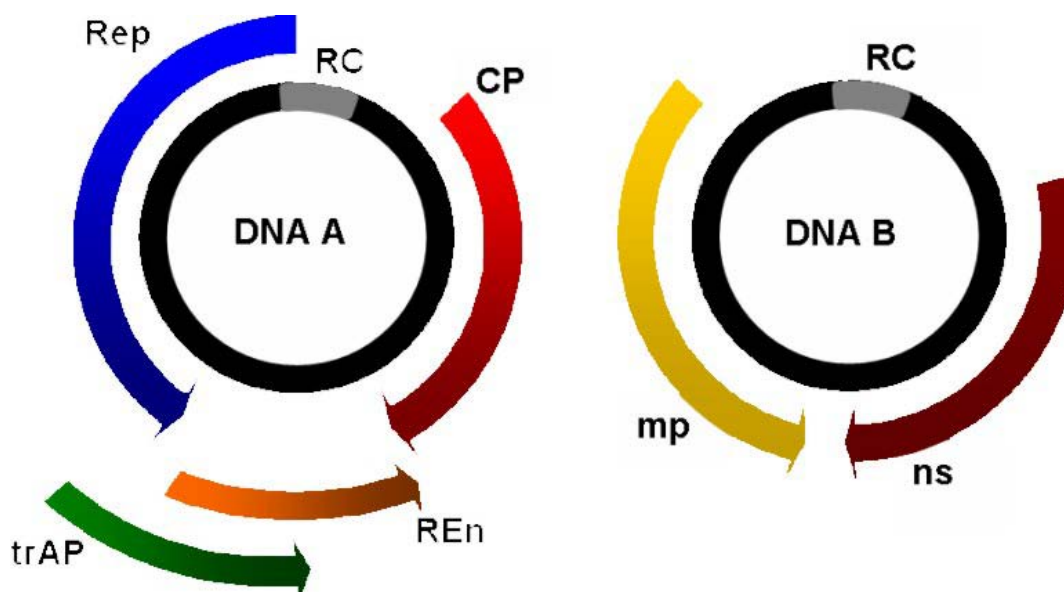


Figura 1. Representação esquemática do genoma de um begomovírus típico. Linhas pretas representam o genoma viral, dividido em dois componentes com aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada. Setas indicam os genes e proteínas virais e a direção em que ocorre a transcrição. A região comum (RC) também está indicada.

O produto do gene *rep*, a proteína Rep, é essencial para a replicação viral, pois cliva a forma replicativa do vírus (dsDNA) no nonanucleotídeo conservado TAATATTAC, iniciando a replicação, e religa as novas unidades genômicas virais ao fim da replicação, uma vez concluído o processo de replicação via círculo rolante (GUTIERREZ,1999). A proteína Rep é a mais variada dentre todas as proteínas codificadas

pelos genes presentes no DNA-A, refletindo a grande variação encontrada na RC, uma vez que Rep se liga aos “iterons” (sítios de ligação da proteína Rep de alta afinidade) da RC de maneira específica com base na sequência de nucleotídeos desses iterons. Essa especificidade de interação mantém a similaridade entre as RCs dos DNAs-A e -B, visto que ambos necessitam de Rep para a replicação. Assim como para CP, existe uma clara divisão entre as Reps de diferentes espécies de begomovírus.

Ren é uma proteína acessória, que amplifica a replicação viral, e TrAp, é ativadora da transcrição dos genes de sentido viral, *cp* e *ns* (GUTIERREZ, 1999). Os genes do DNA-B, *mp* e *ns* estão envolvidos no movimento do vírus na planta. A proteína NS é responsável pelo tráfego do DNA viral do núcleo para o citoplasma, enquanto a proteína MP está envolvida na passagem intercelular do DNA viral, via plasmodesmas (NOUEIRY et al., 1994; SANDERFOOT et al., 1996).

Outras ORFs, como AV2 e AC4, são encontradas em alguns, mas não em todos os begomovírus. A AC4 está inserida no gene *rep*, mas em outra fase de leitura (ELMER et al., 1988).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Fonte e manutenção das amostras

Foram coletadas 166 amostras foliares de *Lycopersicon esculentum* pertencentes a cultivares e híbridos de tomateiro para mercado *in natura* plantados no Brasil, apresentando clorose, nanismo, encrespamento das folhas, mosaico, pouca floração e/ou frutos com áreas descoloridas (Figura 2). As coletas foram realizadas nos municípios de Marília, Alvinlândia, Campos Novos Paulista, Pederneiras, Oriente, Vera Cruz, Ubirajara e Ocaçu entre janeiro de 2003 e fevereiro de 2004 (Figura 3, Quadro 2).

As amostras, constituídas das folhas de plantas exibindo os sintomas anteriormente descritos, foram coletadas aleatoriamente dentro da área de plantio, acondicionadas em sacos de plástico individuais e transportadas em caixas de isopor até o laboratório, onde foram identificadas e armazenadas em ultracongelador (-80°C) até a extração do ácido nucléico.

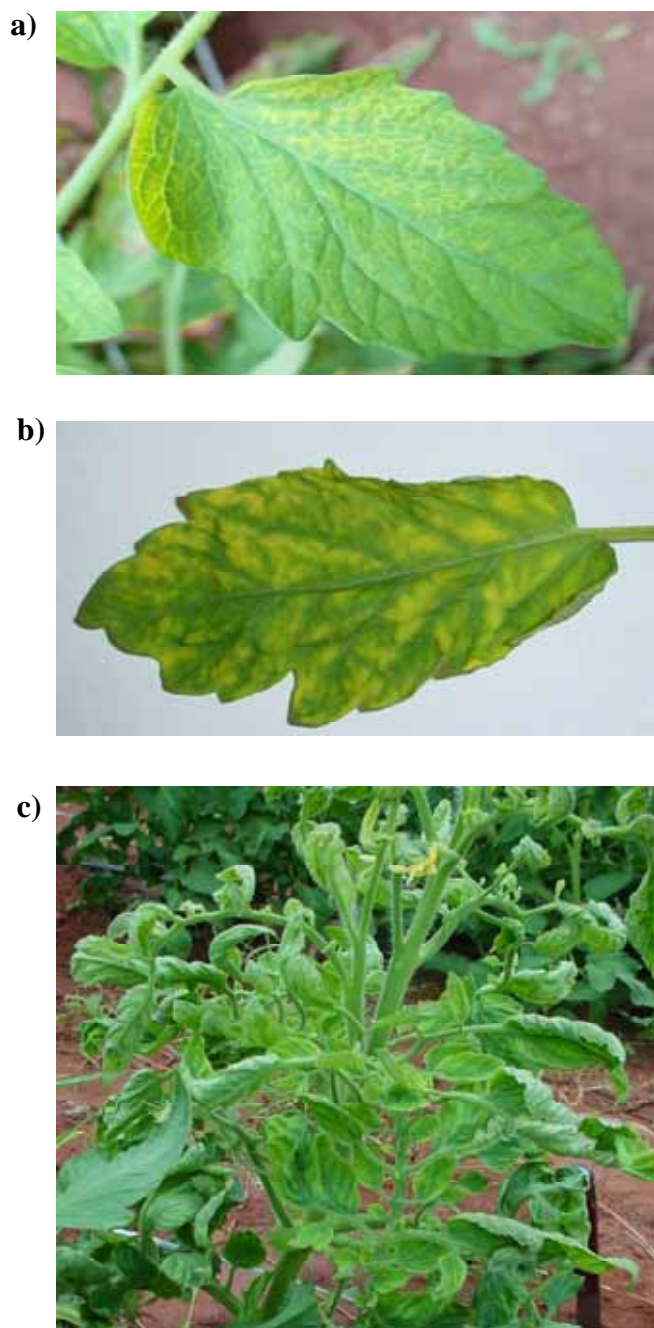


Figura 2. Sintomas observados no campo: a) amarelecimento das nervuras; b) mosaico generalizado; c) enfezamento da planta.



Figura 3. Localização dos 8 municípios da mesoregião de Marília, onde foram realizadas as coletas de amostras de tomateiro exibindo sintomas semelhantes àqueles causados por begomovírus.

5.2 Extração do DNA viral

O DNA viral foi extraído segundo Dellaporta et al. (1983). Um pequeno pedaço de tecido foliar (correspondente a um disco com 1 cm de diâmetro) foi macerado em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, na presença de 500 µl de tampão de extração (100 mM TRIS pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoetanol). Foram adicionados 33 µl de SDS 20% e o conteúdo agitado no vortex por dois minutos e incubado a 65°C. Após dez minutos foram adicionados 160 µl de acetato de potássio 5M e o conteúdo agitado novamente e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 300 µl de isopropanol. Após agitação e centrifugação por dez minutos o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µl de etanol 70%. A solução foi centrifugada por cinco minutos e todo o sobrenadante removido. O "pellet"

foi seco a vácuo e ressuspenso em 150 µl de água Milli-Q. As centrifugações foram realizadas a 12.000 g.

5.3 PCR

Fragmentos do DNA-A dos vírus presentes nas amostras foram amplificados via PCR. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR (PAL1v1978/PAR1c496 e PAL1v1978/PAR1c715) (ROJAS et al., 1993) são universais para o gênero *Begomovirus*, e amplificam um fragmento correspondente a dois terços do gene *rep*, toda a região comum e um terço (1978/496) ou metade (1978/715) do gene *cp* (Figura 4). A combinação PAL1v1978 (5' GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT 3') e PAR1c715 (5' GATTTCTGCAGTTDATRRTTYTCRTCCATCCA 3') foi utilizada preferencialmente para sequenciamento dos isolados, pois abrange um fragmento maior da região codificadora para a capa protéica.

A reação de PCR foi preparada em um volume total de 25 µl, contendo tampão 10x (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3 e KCl 500 mM), MgCl₂ 5 mM, mistura de dNTPs a 0,5 mM, 1,0 µM de cada oligonucleotídeo, uma unidade de *Taq* DNA polimerase e 5 µl de DNA molde, completando-se o volume com água.

Foram realizados 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (0,9% p/v) contendo brometo de etídeo. Após a eletroforese verificou-se a presença de fragmentos com aproximadamente 1.200 nucleotídeos (PAL1v1978/ PAR1c496) e 1.400 nucleotídeos (PAL1v1978/PAV1c715). Controles positivo, negativo e branco (reação de PCR com água substituindo o DNA molde) foram incluídos na extração e nas reações de PCR a fim de validar e confirmar a especificidade do método utilizado.

Não foi realizada detecção do componente B nas amostras analisadas pois a finalidade deste trabalho foi analisar a diversidade genética, sendo utilizada para tal uma porção da região codificadora para a capa protéica, localizada no componente A (FAUQUET et al., 2003).

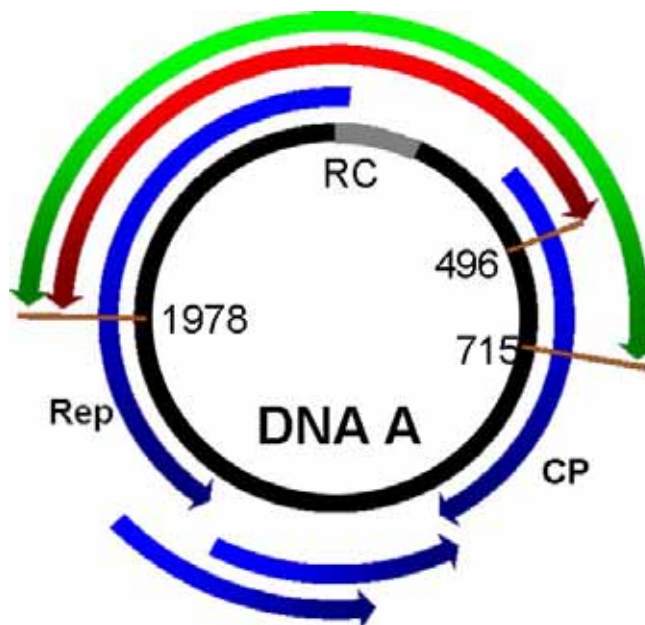


Figura 4. Representação da região do genoma amplificada com o uso dos oligonucleotídeos PAL1v1978 / PAR1c496, em vermelho, e PAL1v1978 / PAV1c715, em verde. Setas azuis representam os genes virais. A linha preta representa o genoma viral, contendo a região comum, em cinza.

5.4 Sequenciamento do produto de PCR

As amostras que após a reação de PCR com o par de primers PAL1v1978/PAV1c715, apresentaram uma banda nítida e algumas amostras em que só foi possível uma amplificação de qualidade com o uso dos primers PAL1v1978/PAR1c496 foram escolhidas para o sequenciamento. Novas reações, em um volume total de 100 μ l foram realizadas com o DNA extraído destas amostras, utilizando-se os mesmos reagentes e condições descritos no item anterior. Os produtos amplificados foram purificados utilizando-se o kit "Concert Rapid PCR Purification System" (Gibco-Invitrogen). A concentração final de DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose (2% p/v). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos PARc496 e PARc715.

5.5 Análises comparativas das seqüências

As seqüências foram analisadas inicialmente pelo programa Blast n (BRIDDON et al., 2001), Clustal X (THOMPSON et al., 1997) e Mega versão 2.1 (KUMAR et al., 2001). Para obtenção da árvore filogenética foram utilizados os seguintes parâmetros: Neighbor Joining, Kimura 2 e Bootstrap 2000.

5.6 Obtenção de oligonucleotídeos específicos para as espécies ToSRV e ToYVSV

O desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos teve como objetivo efetuar a identificação dos isolados sem a necessidade de sequenciamento. Fragmentos correspondentes a regiões do genoma desses vírus, depositadas no GenBank e as amostras seqüenciadas, foram então utilizadas como molde para o desenho dos primers para amplificação dos fragmentos específicos : ToSRV forward 5'-ATCATATTGGGCCTGTCG-3' - T_m 54°C e ToSRV reverse 5'-TCTCGTCATGATGTTTCCC-3' - T_m 56°C; ToYVSVforward 5'-AGAATCTATTTGCCACGTGG-3' - T_m 58°C e ToYVSV reverse 5'-AGGTATACCCAAGCGTGATG-3' - T_m 60°C. A reação de PCR foi preparada conforme o item 4.3 e os pares de oligonucleotídeos (ToSRV forward / ToSRV reverse e ToYVSV forward / ToYVSV reverse) foram então testados em amostras positivas para ToSRV e ToYVSV respectivamente, anteriormente seqüenciadas.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira etapa do projeto permitiu avaliar a incidência dos begomovírus infectando tomateiro nos municípios de Marília, Alvinlândia, Campos Novos Paulista, Pederneiras, Oriente, Vera Cruz, Ubirajara e Ocaúçu. A coleta das amostras foi realizada em plantas apresentando sintomas possivelmente causados por begomovírus (dos cultivares Débora Max, Débora Plus, Santa Clara e Colibri). Em algumas propriedades observou-se alta população do inseto vetor mesmo com a prática de rodízio de inseticidas (Figura 5), favorecida pelo cultivo de pepino (*Cucumis sativus*) ao lado de estufas de tomate. Esta elevada população propicia o aumento na incidência das doenças causadas por begomovírus.

Após a extração do DNA viral das 166 amostras coletadas confirmou-se por PCR a presença de vírus em 100 destas, ou 60% das amostras. A reação de PCR desta etapa foi realizada com os oligonucleotídeos PAL1v1978/ PAR1c496 (ROJAS et al., 1993) já

que para diagnose estes são mais indicados que os PAL1v1978/PAV1c715 (ROJAS et al., 1993).



Figura 5. Vetor (*Bemisia tabaci*) presente em altas populações nas áreas da coleta.

Nas amostras em que o resultado foi negativo, pode ter ocorrido uma baixa concentração viral, infecção tardia ou distribuição irregular de vírus na planta, considerando que estas plantas apresentavam sintomas característicos àqueles causados por geminivirus. Muitas plantas apresentavam amadurecimento irregular dos frutos, causado pela injeção de toxinas durante a alimentação da mosca-branca.

Em uma segunda etapa foi realizado o levantamento das espécies de begomovírus em tomateiro. Foi feita uma nova reação de PCR para um volume total de 100 µl com os oligonucleotídeos PAL1v1978/ PAR1c715. A confirmação da amplificação do fragmento foi feita em gel de agarose 2% (Figura 6). O produto da PCR foi submetido a sequenciamento direto para obtenção da seqüência correspondente a região 5' do gene *cp*.

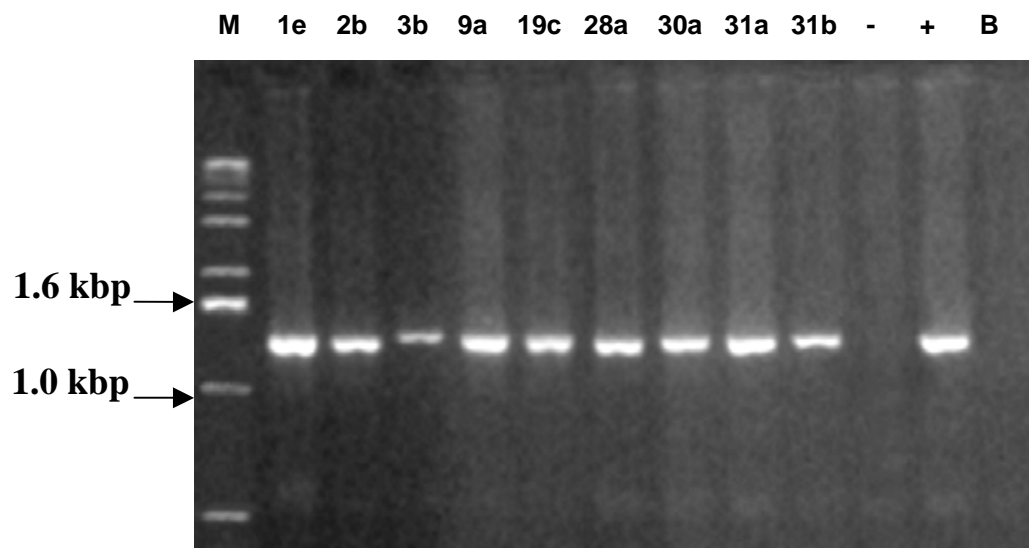


Figura 6. Produto de amplificação em gel de agarose 2,0% dos fragmentos obtidos via PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos PAL1v1978/PAR1c715. M: marcador 1 Kb Ladder.- Invitrogen; + : controle positivo; - : controle negativo; B : branco e 1e, 2b, 3b, 9a, 19c, 28a, 30a, 31a, 31b correspondem a amostras provenientes do campo.

Dentre as 37 amostras enviadas para sequenciamento, obteve-se seqüências de boa qualidade para 21 delas. Destas 21 amostras, 17 foram sequenciadas com o primer PARc715 e usadas na elaboração da árvore filogenética. Aquelas sequenciadas com PARc496 não foram computadas na elaboração da árvore, pois o fragmento amplificado corresponde a uma pequena porção da capa protéica (Figura 4, Quadro 2).

Amostra	Primer	Município	Variedade	Produtor	Blast n > homologia
1e	715	Oriente	Colibri	Homero Mosquini	ToYVSV
2b	715	Oriente	Débora Plus	Dorival Mosquini Junior	ToSRV
3b SDA	496	Sumaré	Carmem	Sakata Seed Sudamérica	ToYVSV
9a	496	Pederneiras	Débora Plus	Produtos Rainer Bracht	ToYVSV
19c	715	Ubirajara	Débora Max	Amarildo Bordin	ToSRV
26a	715	Campos Novos Paulista	Santa Clara	José Barbosa	ToYVSV
28a	715	Ocauçu	Débora Plus	Alberto Fonseca	ToYVSV
30a	715	Ocauçu	Colibri	Alberto Fonseca	ToYVSV
31a	715	Ocauçu	Débora Plus	Alberto Fonseca	ToYVSV
31b	715	Ocauçu	Débora Plus	Alberto Fonseca	ToYVSV
33f	496	Marília	Débora Plus	Valmir	ToYVSV
49	715	Alvinlândia	Débora max	Silvio de Almeida	Pssivelmente SiMoV
51	715	Alvinlândia	Débora max	Silvio de Almeida	ToSRV
73	715	Ubirajara	-	Domingos Inácio	ToSRV
74	715	Ubirajara	-	Domingos Inácio	ToSRV
90a	715	Marília	Débora Max	Vanderlei Tonezzi	ToSRV
91c	715	Vera Cruz	Débora Max	Paulo Haraguchi	ToYVSV
86	715	Ubirajara	Débora Max	Toninho Soares	ToYVSV
21	715	Alvinlândia	Débora Max	Amarildo Bordim	ToSRV
2609	715	Araguari	Densus	Sakata Seed Sudamérica	ToSRV

Quadro 2. Begomovírus detectados via PCR utilizando-se os oligonucleotídeos universais PAL1v1978/ PAR1c496 e PAL1v1978/PAV1c715 (ROJAS et al., 1993) e caracterizados por sequenciamento direto.

Vírus	Sigla	Acesso no GenBank
<i>African cassava mosaic virus</i> <i>Nigéria</i>	ACMV-NG	X17095
<i>Bean golden mosaic virus</i>	BGMV	M88686
<i>Bean golden yellow mosaic virus – Porto Rico</i>	BGYMV-PR	M10070
<i>Sida mottle virus</i>	SiMoV	AY090555
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	ToCMoV	AY049206
<i>Tomato chlorotic vein virus</i>	ToCVV	AY049205
<i>Tomato golden mosaic virus- Yellow vein</i>	TGMV-YV	K02029
Tomato golden vein virus	TGVV	AY751742
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	ToRMV	AF291705
<i>Tomato severe rugose virus</i>	ToSRV	AY029750
Tomato yellow vein streak virus	ToYVSV-Faria	U79998
Tomato yellow vein streak virus	ToYVSV-IAC	AY829113

Quadro 3. Espécies virais, siglas e números de acesso de 13 espécies de begomovírus utilizados nas comparações e citados no texto. As espécies em itálico foram reconhecidas pelo ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses).

Das 17 amostras escolhidas para identificação da espécie viral, pôde-se determinar que oito destas (26a, 28a, 31b, 30a, 31a, 86, 91c e 1e) encontravam-se possivelmente infectadas por ToYVSV (espécie tentativa) e seis (19c, 51, 90a, 2609, 2b e 21) pelo ToSRV. As amostras 26a, 28a, 31b, 30a, 31a, 86, 91c e 1e apresentaram identidade superior a 94% com o ToYVSV e TGVV. As amostras 19c, 51, 90a, 2609, 2b, 21 apresentaram identidade superior a 93% com o ToSRV e ToCVV. Porém neste último caso, mesmo entre ToSRV e ToCVV a identidade na região analisada foi de 93%, indicando que estes dois vírus denominados como espécies distintas tratam-se possivelmente da mesma espécie viral. A amostra 49 apresentou maior identidade (94%) com o SiMoV e as de números 73 e 74 somente 87% de identidade com o SiMoV, além de não terem sido agrupados na árvore filogenética com esta espécie. Este resultado sugere, que as amostras 73 e 74 podem representar uma possível nova espécie de begomovírus (Figura 7).

Utilizando-se os programas Clustal X (THOMPSON et al., 1997) e Mega (KUMAR et al., 2001), uma árvore filogenética foi preparada (Figura 8) com base em parte dos nucleotídeos da região N terminal da proteína capsidial para os isolados previamente selecionados (Quadro 4). Pôde-se verificar que os isolados puderam ser agrupados com as espécies ToYVSV, ToSRV e SiMoV, com exceção das amostras To-73 e To74.

Apesar dos primers desenhados específicos para ToYVSV e ToSRV terem apresentado alta identidade no alinhamento com as seqüências depositadas no GenBank e com as amostras coletadas (Figura 9, Quadro 2), mesmo após mudanças na temperatura de anelamento (55°C) e na concentração de MgCl₂ e dNTPs, não foi possível obter o produto de amplificação esperado.

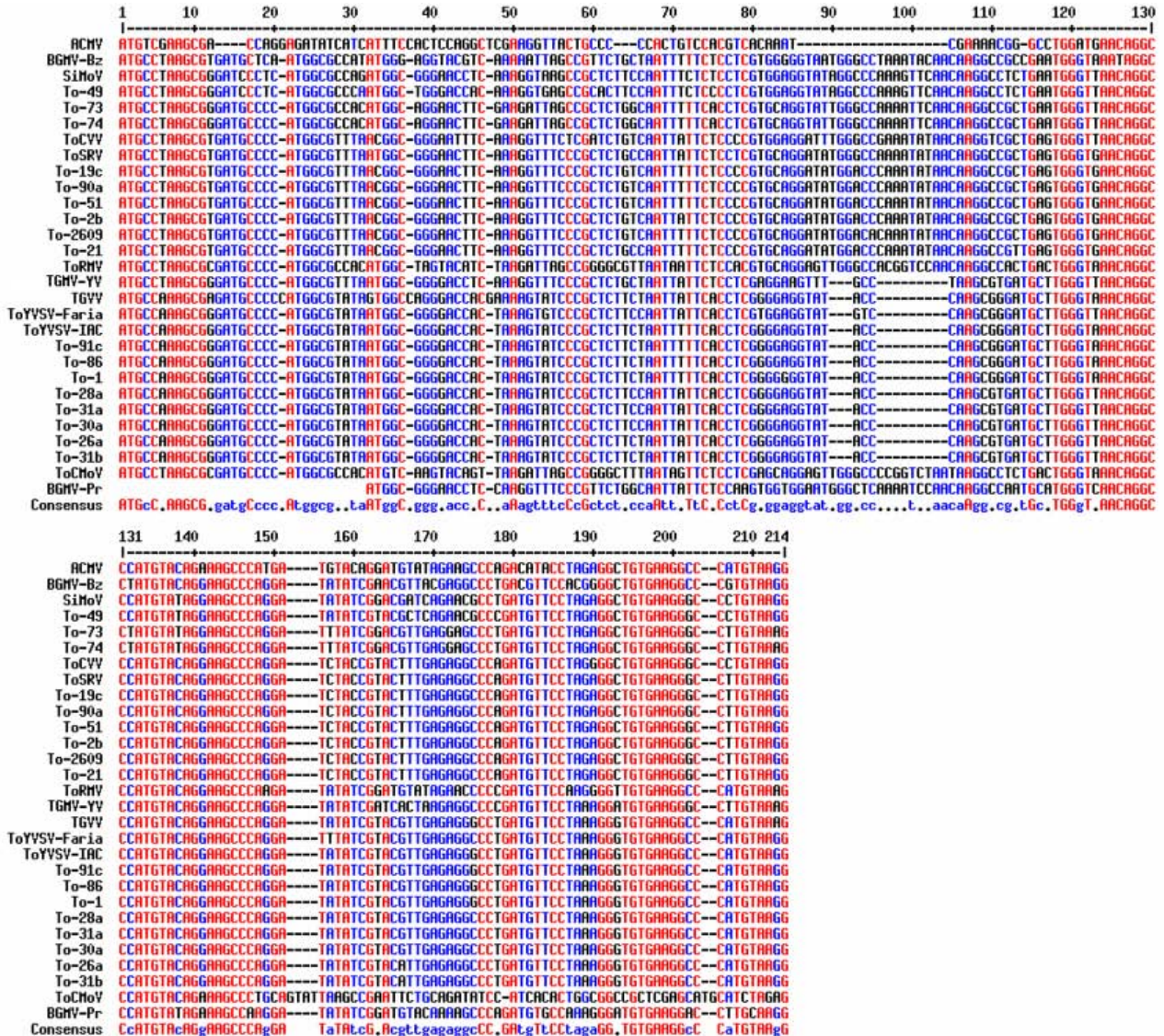


Figura 7. Alinhamento múltiplo da sequência de nucleotídeos correspondentes à parte da região N-terminal da capa protéica dos begomovírus encontrados infectando tomate no Centro-Oeste do estado de São Paulo e de espécies já relatadas infectando tomate no Brasil com o uso do programa MultAling (CORPET, 1988).

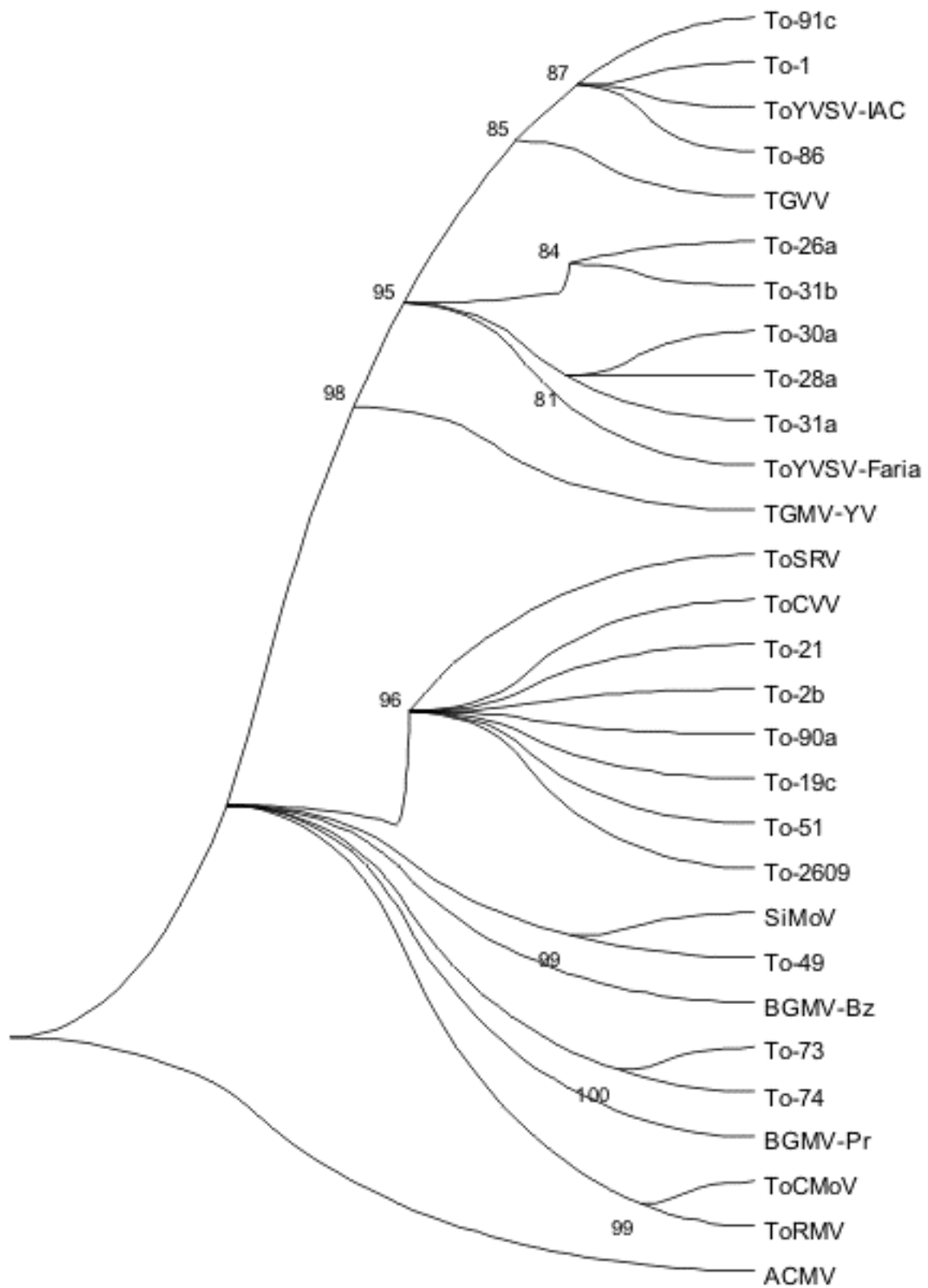


Figura 8. Árvore filogenética preparada com o uso do programa Mega 2.1 dos nucleotídeos correspondentes a parte da região N-terminal da capa protéica. Valores de bootstrap 2000. Outgroup: ACMV.

a)

```

ToYVSV          AATTGGGGAAAGGGTCTCAATATATAGTAGAGTCCATTATAGAATATATTTGCCACGTGG 60
ToYVSVforward  -----AGAACTATTTGCCACGTGG 20
91c-PAR1c715  AATTGGGGAATGGGTCTCAATATATAGTAGAGTCCATTATAGAATCTATTTGCCACGTGG 60
86-PAR1c715   AATTGGGGAATGGGTCTCAATATATAGTAGAGTCCATTATAGAATCTATTTGCCACGTGG 60
1e-PAR1c715   AATTGGGGAATGGGTCTCAATATATAGTAGAGTCCATTATAGAATCTATTTGCCACGTGG 60
26a-PAR1c715  AATTGGGGAATGGGTCTCAATATATAGTAGAGTCCATTATAGAATCTATTTGCCACGTGG 60
31b-PAR1c715  AATTGGGGAATGGGTCTCAATATATAGTAGAGTCCATTATAGAATCTATTTGCCACGTGG 60
28a-PAR1c715  AATTGGGGAATGGGTTCGAATATATAGTAGAGTCCATTATAGAATCTATTTGCCACGT-- 57
ToYVSVreverse  -----
30a-PAR1c715  AATTGGGGAATGGGTCTCAATATATAGTAGAGTCCATTATAGAATCTATTTGCCACGT-- 58
31a-PAR1c715  AATTGGGGAATGGGTCTCAATATATAGTAGAGTCCATTATAGAATCTATTTGCCACGT-- 58
                *****

ToYVSV          ATTATTCACCTCGTGGAGGTATGTCCAAGCGGGATGCTTGGGTAAACAGGCCCATGTACA 359
ToYVSVforward  -----
91c-PAR1c715  ATTTTTCACCTCGGGGAGGTATAACCAAGCGGGATGCTTGGGTAAACAGGCCCATGTACA 358
86-PAR1c715   ATTTTTCACCTCGGGGAGGTATAACCAAGCGGGATGCTTGGGTAAACAGGCCCATGTACA 358
1e-PAR1c715   ATTTTTCACCTCGGGGAGGTATAACCAAGCGGGATGCTTGGGTAAACAGGCCCATGTACA 358
26a-PAR1c715  ATTATTCACCTCGGGGAGGTATAACCAAGCGTGATGCTTGGGTAAACAGGCCCATGTACA 358
31b-PAR1c715  ATTATTCACCTCGGGGAGGTATAACCAAGCGTGATGCTTGGGTAAACAGGCCCATGTACA 358
28a-PAR1c715  ATTATTCACCTCGGGGAGGTATAACCAAGCGTGATGCTTGGGTAAACAGGCCCATGTACA 357
ToYVSVreverse  -----AGGTATAACCAAGCGTGATG----- 20
30a-PAR1c715  ATTATTCACCTCGGGGAGGTATAACCAAGCGTGATGCTTGGGTAAACAGGCCCATGTACA 358
31a-PAR1c715  ATTATTCACCTCGGGGAGGTATAACCAAGCGTGATGCTTGGGTAAACAGGCCCATGTACA 358
                *****

```

b)

```

51-PAR1c715     ATCATATTGGGCCTGTCCAGCTTAGATATTTGTAACAACCTAAGGCCCAAGTTGTTAAAC 60
ToSRVreverse    -----
2b-PAR1c715     ATCATATTGGGCCTGTCTAGCTTAGATATTTGTAACAACCTAAGGCCCAAGTTGTTAAAC 60
Sakata-PAR1c715 ATCATATTGGGCCTGTCTAGCTTAGATATTTGTAACAACCTAAGGCCCAAGTTGTTAAAC 60
73-PAR1c715     ATCATATTGGGCCTGTCTAGCTTAGATATTTGTAACAACCTAAGGCCCAAGTTGTTAAAC 60
90a-PAR1c715    ATCATATTGGGCCTGTCTAGCTTAGATATTTGTAACAACCTAAGGCCCAAGTTGTTAAAC 60
19c-PAR1c715    ATCATATTGGGCCTGTCTAGCTTAGATATTTGTAACAACCTAAGGCCCAAGTTGTTAAAC 60
90a-PAR1c715    ATCATATTGGGCCTGTCTAGCTTAGATATTTGTAACAACCTAAGGCCCAAGTTGTTAAAC 60
ToSRV           ATCATATTGGGCCTGTCTAGCTTAGATAGTTGTATCAACTAAGGCCCAAGTTGTTAAAC 60
ToSRVforward    ATCATATTGGGCCTGTCTAGCTTAGATATTTGTAACAACCTAAGGCCCAAGTTGTTAAAC 18
                *****

51-PAR1c715     CTTGTAAGGTTTCAGTCTTACGAGTCTCGTCATGATGTTTCCCATGTCGGGAAGGTGATTT 359
ToSRVreverse    -----TCTCGTCATGATGTTTCCC----- 19
2b-PAR1c715     CTTGTAAGGTTTCAGTCTTACGAGTCTCGTCATGATGTTTCCCATGTCGGGAAGGTGATTT 359
Sakata-PAR1c715 CTTGTAAGGTTTCAGTCTTACGAGTCTCGTCATGATGTTTCCCATGTCGGGAAGGTGATTT 359
73-PAR1c715     CTTGTAAGGTTTCAGTCTTACGAGTCTCGTCATGATGTTTCCCATGTCGGGAAGGTGATTT 359
90a-PAR1c715    CTTGTAAGGTTTCAGTCTTACGAGTCTCGTCATGATGTTTCCCATGTCGGGAAGGTGATTT 360
19c-PAR1c715    CTTGTAAGGTTTCAGTCTTACGAGTCTCGTCATGATGTTTCCCATGTCGGGAAGGTGATTT 359
90a-PAR1c715    CTTGTAAGGTTTCAGTCTTACGAGTCTCGTCATGATGTTTCCCATGTCGGGAAGGTGATTT 359
ToSRV           CTTGTAAGGTTTCAGTCTTACGAGTCTCGTCATGATGTTTCCCATGTCGGGAAGGTGATTT 359
ToSRVforward    -----
                *****

```

Figura 9. Alinhamento múltiplo das seqüências de nucleotídeos das amostras encontradas no campo infectando tomateiro e das seqüências do ToRSV e ToYVSV depositadas no GenBank, com os primers desenhados para ToYVSV (a) e ToSRV (b).

A existência no campo de begomovírus capazes de infectar solanáceas naturalmente, a presença destes vírus em hospedeiras alternativas, e a ampla disseminação da “mosca-branca”, formam uma combinação potencialmente perigosa para esta cultura, visto que podem favorecer a ocorrência de infecções múltiplas e, com isso, favorecer o aparecimento de novas variantes virais.

É possível que após a verdadeira explosão na incidência de begomovírus, que ocorreu com a introdução do biótipo B de *B. tabaci*, uma ou poucas espécies que se mostrem mais adaptadas ao novo hospedeiro passem a predominar. Essas espécies provavelmente serão o resultado de recombinação e/ou pseudo-recombinação entre espécies pré-existentes em plantas daninhas ou silvestres. Resultados obtidos por diversos grupos de pesquisadores sugerem que esse processo de evolução, adaptação e seleção de espécies de begomovírus pode, ocorrer em períodos de tempo relativamente curtos, da ordem de 10 a 20 anos (HOU & GILBERTSON, 1996; SANZ et al., 2000; SCHNIPPENKOETTER et al., 2001; TORRES-PACHECO et al., 1993). Deste modo, estaríamos ainda passando por este processo de adaptação de espécies de begomovírus no campo.

A multiplicidade de variantes encontradas entre isolados de begomovírus tem implicações na taxonomia destes vírus e em muitos casos dificulta o delineamento preciso das espécies virais. Um dos problemas taxonômicos fundamentais neste grupo de vírus é o de como nomear espécies distintas e causadoras de doenças macroscopicamente indistinguíveis. O outro problema está relacionado aos vírus recombinantes. A aplicação do conceito de espécie em begomovírus permanece, portanto controversa, e os limites entre espécies têm sido estabelecidos mais por uma questão de conveniência do que de lógica (HARRISON & ROBINSON, 1999).

Nenhuma estratégia de controle, quando utilizada isoladamente, tem demonstrado ser efetiva para as doenças causadas por begomovírus (MATOS, 2003). O controle químico das moscas-brancas é prejudicado pela constante migração de grandes populações do inseto de lavouras mais velhas para as mais novas, e também devido a possibilidade de se tornarem resistentes aos inseticidas. Portanto, as medidas de controle devem enfatizar a eliminação ou a redução das fontes de vírus, a redução da população do inseto vetor existente e, finalmente, alterações do nível de suscetibilidade do hospedeiro.

Nesta última linha, pesquisas para identificação de fontes de resistência começaram por volta de 1970 (LATERROT, 1995).

Os programas de melhoramento visando à resistência de tomate a begomovírus precisam levar em consideração o alto grau de variabilidade genética existente nos begomovírus que infectam tomateiros no Brasil. Um gene de resistência específico pode ser extremamente eficiente contra uma espécie de begomovírus em particular e totalmente ineficiente contra espécies distintas ou não relacionadas. Como a taxa de evolução dos begomovírus parece ser extraordinariamente alta (PADIDAM et al., 1999), a emergência de novas estirpes ou espécies pode contornar genes de resistência. Portanto, a durabilidade da resistência baseada em um único gene é questionável e a ocorrência de outras espécies em outras regiões do Brasil deve ser levada em consideração em programas de melhoramento (AMBROZEVICIUS, 2002).



Figura 10. Ocorrência de begomovírus infectando tomateiro no estado de São Paulo.

A análise da diversidade genética avaliada nesta região indicou que a espécie ToSRV e SiMoV que anteriormente não haviam sido relatadas no estado de São Paulo, já se encontram presentes nos tomateiros. Atualmente, cinco espécies de begomovírus encontram-se presentes neste estado (Figura 11). A presença de diversidade genética entre isolados de begomovírus aqui observada corrobora com resultados observados em outras regiões do país (FARIA, et al, 2000; MELLO, 2001; AMBROZEVICIUS et al., 2002) independente da cultura analisada.

7 CONCLUSÕES

- Begomovírus ocorrem em alta incidência na região Centro-Oeste paulista e com considerável diversidade genética em tomateiro.
- Duas espécies novas, ToSRV e SiMoV, foram verificadas ocorrendo nesta cultura no estado de São Paulo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROZEVICIUS, L. P. et al. Incidence and host range of TGV-Ig, a bipartite Begomovirus from the "Zona Metalúrgica" of Minas Gerais, Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 4, p. 155, 1999.

AMBROZEVICIUS L. P. et al. Molecular detection and phylogenetic analysis of tomato and weed infecting geminiviruses in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 372-377, 2002.

ANDRADE, E. C. et al. Molecular cloning and characterization of Tomato chlorotic mottle virus (TCMV), a new tomato-infecting begomovirus. **Virus Reviews and Research**, v. 7, p. 153, 2002.

ARGUELLO-ASTORGA G. R. et al. Geminivirus replication origins have a group specific organization of iterative elements: A model for replication. **Virology**, v. 203, p. 90-100, 1994.

ANZOLA, D.; LASTRA, R. Whitefly populations and their impact on the incidence of tomato yellow mosaic virus in Venezuela. **Journal of Phytopathology**, v. 112, p. 363–366, 1985.

BEDFORD, I. D. et al. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. **Annals of applied biology**, Great Britain, v. 125, p. 311-325, 1994.

BLAST. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acesso em: 15 fev. 2005.

BRIDDON, R. W. et al. Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease. **Virology**, v. 285, p. 234-243, 2001.

BRIDDON, R. W. et al. Diversity of DNA β : a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. **Virology**, v. 312, p. 106-121, 2003.

BRIDDON, R. W. et al. Diversity of DNA β : a satellite-like molecule associated with monopartite begomovirus-DNA beta complexes. **Virology**, v. 1, p.462-474, jul, 2004.

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

BULL, S. E. et al. Diversity of begomovirus DNA β satellites of non-malvaceous plants in east and south East Asia Brief Report. **Archives of Virology**, Austria, v. 149, p. 1193-1200, 2004.

COLARICCIO, A.; BERGMANN, J. C.; EIRAS, M.; CHAVES, A. L. R.; ZERBINI, F. M.; CHAGAS, C. M. Presence of *Tomato rugose mosaic virus* on tomato crops in São Paulo state, Brazil, **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, 377, 2005 (no prelo).

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 10881-10890, 1988.

COSTA, A. S. Three whitefly-transmitted diseases of beans in the State of São Paulo, Brazil, **Plant Protection Bull**, v. 13, p. 121-130, 1965.

COSTA, A. S. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legume crops in Brazil. **Tropical Diseases of Legumes**, New York, p. 27-49, 1975.

CZOSNEK, H.; GHANIM, M. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci* insights from studies with Tomato yellow leaf curl virus. **Annals Of Applied Biology**, Great Britain, v. 140, p. 215-231, 2002.

DEBROT, E.; HEROLD, F.; DAO, F. Nota preliminar sobre un 'Mosaico amarillento del tomate en Venezuela. **Agronomía Tropical**, v. 13, p. 33-41, 1963.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA miniprep: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, p. 19-21, 1983.

ELMER, J. S. et al. Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 7043-7060, 1988.

FARIA, J. C. et al. A new geminivirus associated with tomato in the state of Sao Paulo, Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, MN, v. 81, p. 423, 1997.

- FARIA, J.C.; MAXWELL, D. P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. **Phytopathology**, v. 89, p. 262-268, 1999.
- FARIA, J. C. et al. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 125-137, 2000.
- FAUQUET, C. M. et al. 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.
- FERNANDES, J. J. **Caracterização e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro na região do Triângulo Mineiro**. 2001. 57 f. Tese (Doutorado em Agronomia (Fitopatologia)) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K.; KRAMER, M. Observações da clorose infecciosa das malváceas em tomateiros do campo. **Biológico**, v. 26, p. 65-69, 1960.
- FONTES, E. P. B. et al. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **Journal Biological Chemistry**, v. 269, p. 8459-8465, 1994a.
- FONTES, E. P. B. et al. Geminivirus replication origins have a modular organization. **Plant Cell**, v. 6, p. 405-416, 1994b.
- FRANÇA, F. H.; VILLAS-BOAS, G. L.; CASTELO-BRANCO, M. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera:Aleyrodidae) no Distrito Federal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, p. 369-372, 1996.
- GEMINI DETECTIVE**. Disponível em: <http://geminivirus.biosci.arizona.edu/virus_index.htm>. Acesso em: 15 fev. 2005.
- GHANIM, M. et al. Evidence for transovarial transmission of Tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. **Virology**, v. 20, p. 295-303, 1998.
- GHANIM, M.; CZOSNEK, H. Tomato yellow leaf curl Geminivirus (TYLCV) is transmitted among whiteflies (*Bemisia tabaci*) in a sex-related manner. **Journal of Virology**, v. 74, p. 4738 -7745, 2000.
- GIORDANO, L.B. Avaliação de fontes de resistência a isolados de geminivírus com genoma bipartido transmitido por *Bemisia argentifolii* em *Lycopersicon* spp.. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p.131-135, 1999.
- GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, p. 313-329, 1999.

HANLEY-BOWDOIN, L. et al. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, p.71-106, 1999.

HARRISON, B. D.; ROBINSON, D. J. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (begomoviruses). **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 369-398, 1999.

HOKKO. Disponível em: <<http://www.hokko.com.br/>>. Acesso em: 15 fev. 2005

HOU, Y. M.; GILBERTSON, R. L. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. **Journal of Virology**, v. 70, p. 5430-5436, 1996.

HOU, Y.; PAPLOMATAS, E. J.; GILBERTSON, R. L. Host adaptation and replication properties of two bipartite geminiviruses and their pseudorecombinants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, p. 208-217, 1998.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 15 fev. 2005.

ICTV - **International Committee on Taxonomy of Viruses**. van Regenmortel, M.H.V. et al., Academic Press, 2000. Disponível em: <<http://www.virustaxonomyonline.com/virtax/lpext.dll?f=templates&fn=main-h.htm>>. Acesso em: 15 fev. 2005.

KHEYR-POUR, A. et al. Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. **Nucleic Acids Research**, v.19, p. 6763-6769, 1991.

KNELL, R.J.; WEBBERLEY, M. K. Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behavior. **Biology Review**, v. 79, p. 557-581, 2004.

KUMAR, S. et al. Molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, v.17, p. 1244-1245, 2001.

LASTRA, J. R.; UZCÁTEGUI, R. C. Viruses affecting tomatoes in Venezuela. **Phytopathology**, St. Paul, MN, EUA, v. 84, p. 253-258, 1975.

LATERROT, H. Present state of the genetic control of Tomato yellow leaf curl virus and of the EEC-supported breeding programme. In: PROCEEDINGS XII **THE EUCARPIA MEETING ON TOMATO GENETICS AND BREEDING**, 1995, Bulgaria. **Eucarpia Tomato-93**, Bulgaria, Stamova, L., 1995, p.19-24.

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

LEGG, J. P.; THRESH, J. M. Cassava mosaic virus disease in East Africa: a dynamic disease in a changing environment. **Virus Research**, v. 71, p. 94-100, 2000.

LIMA, J.A.A. et al. Immunochemical and PCR identification of a Begomovirus infecting tomato fields in Ibiapaba Mountain, Ceará. In: *Virologica*, 1999, Curitiba. **Vírus: Reviews and Research**, v. 4, p.150, 1999.

LIMA, L. H. C. et al. Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) populations in Brazil revealed by RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25 n. 2, 2002.

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

MATOS, E. S. et al. Resistência de genótipos de tomateiro a um isolado de geminivírus do cinturão verde de Campinas, São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 159-165, 2003.

MATYS, J. C. et al. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 1, p. 267-274, 1975.

MEGA. Disponível em: <www.megasoftware.net>. Acesso em: 15 fev. 2005.

MELLO, R. N. **Begomovirus em soja no Brasil e ferramentas moleculares para sua identificação**. 2001. 57 f. Tese (Doutorado em Agronomia (Fitopatologia)) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

MORALES, F.J. Conventional breeding for resistance to *Bemisia tabaci*-transmitted geminiviruses. **Crop Protection**, v. 20, p. 825-834, 2001.

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

MORALES, F. J.; JONES, P. G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses. In: LATIN AMERICA INTERNATIONAL CENTER FOR TROPICAL AGRICULTURE (CIAT), 2004, Cali, Colombia, **Plant Virus Epidemiology: First steps into the new millennium**, v. 100, n. 1, 2004, Pages 57-65.

MultAling. Disponível em: <<http://probes.toulouse.inra.fr/MultAling/>>. Acesso em: 15 fev. 2005.

NARANJO, S. E.; ELLSWORTH, P. C. Challenges and opportunities for pest management of *Bemisia tabaci* in the new century. **Crop Protection**, v. 20, p. 707, 2001.

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. 925-932, 1994.

- PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C. M. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 249-263, 1995.
- PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C. M. Possible emergence of new geminivirus by frequent recombination. **Virology**, v. 265, p. 218-225, 1999.
- 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.
- RIBEIRO, S.G. et al. 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. et al. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting geminiviruses in Brazil. In: **3RD INTERNATIONAL GEMINIVIRUS SYMPOSIUM**, 2001, Norwich, UK. Norwich, 2001, p. 116.
- RIBEIRO, S G. et al. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, Austria, v. 148, p. 281-295, 2003.
- ROJAS, M. R. et al. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v. 77, p. 340-347, 1993.
- RYBICKI, E. P. et al. Family Geminiviridae. **VIRUS TAXONOMY: CLASSIFICATION AND NOMENCLATURE OF VIRUSES**, Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2000, San Diego. **Annals...** San Diego, Academic Press, CA., 2000, p. 285-297.
- SANDERFOOT, A. A.; INGHAM, D. L.; 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.
- SANTANA, F.M. et al. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. **Euphytica**, v. 122, p. 45-51, 2001
- 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**, Brasília, v. 28, 2003.
- SANZ, A. I. et al. Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 1839-1849, 2000.
- SCHNIPPENKOETTER, W. H. et al. Forced recombination between distinct strains of Maize streak virus. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 3081-3090, 2001.

THOMPSON, J. D. et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

TORRES-PACHECO, I. et al. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: Analysis and comparison with bipartite geminiviruses. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 2225-2231, 1993.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. et al. Virus Taxonomy. In: INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, Seventh Report of the ICTV, 2000, San Diego, Academic Press, 2000.

ZAKAY, Y. et al. Screening of *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.

ZERBINI, F. M. et al. A new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Minas Gerais, Brazil. **Phytopathology**, v. 86, p. 51, 1996.

ZHOU, X.; ROBINSON, D. J.; HARRISON, B. D. Types of variation in DNA-A among isolates of *East African cassava mosaic virus* from Kenya, Malawi and Tanzania. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 2835-284, 1998.