



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

**EFICIÊNCIA DE NOVAS FONTES DE RESISTÊNCIA EM
TOMATEIRO CONTRA DIFERENTES ESPÉCIES DE
Begomovirus BIPARTIDOS E LOCALIZAÇÃO
CROMOSSÔMICA DO LOCUS *tcm-1*.**

MARIANA RESENDE MACHADO

Brasília – DF

2013

MARIANA RESENDE MACHADO

**EFICIÊNCIA DE NOVAS FONTES DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO CONTRA
DIFERENTES ESPÉCIES DE *Begomovirus* BIPARTIDOS E LOCALIZAÇÃO
CROMOSSÔMICA DO LOCUS *tcm-1*.**

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília como
requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em
Fitopatologia pelo Programa de
Pós Graduação em Fitopatologia

Orientador

Dr. Leonardo Silva Boiteux

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA

Machado, Mariana Resende. Eficiência de novas fontes de resistência em tomateiro contra diferentes espécies de *Begomovirus* bipartidos e localização cromossômica do locus *tcm-1*. Mariana Resende Machado.

Brasília, 2013.

122 p.

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

1. Begomovirus – Tomate.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. . Eficiência de novas fontes de resistência em tomateiro contra diferentes espécies de *Begomovirus* bipartidos e localização cromossômica do locus *tcm-1*.

Aos meus pais Nelma e José João, ao meu namorado Thiago e à minha irmã Letícia. É com o mesmo amor e carinho que vocês me dão que eu dedico este trabalho a vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a força e a paciência necessária para concluir mais esta etapa da minha vida.

À Universidade de Brasília e todos os professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia, obrigada pela oportunidade e grande contribuição na minha formação profissional.

A todos os colegas do curso de Pós-graduação em Fitopatologia, Vanessa, Daniela, Fabiane, Samara, Lorena, Larissa, Amanda, Guilherme, Lúcio, Fred e Nancy.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e ajuda financeira.

Ao Dr. Leonardo Silva Boiteux e à Dr^a. Maria Esther de Noronha Fonseca, pela orientação, confiança e conhecimentos compartilhados, que contribuíram muito na minha formação como pesquisadora.

À Dr^a Rita de Cássia Pereira Carvalho e Dr^a Simone da Graça Ribeiro pela grande colaboração na realização deste trabalho, pela paciência, por todos os ensinamentos e também pela amizade.

À Embrapa Hortaliças – CNPH, pelo espaço e infraestrutura necessária. À equipe de laboratório: Getúlio, Chico e William. Um agradecimento especial à Daniela e Niday, pois sem vocês a rotina do laboratório não seria a mesma. Obrigada pelo incentivo, sugestões e importantes contribuições para este trabalho.

À Embrapa Cenargen, em especial ao pessoal do LPP III: Karol, Lorena, Raquel, Kaka, Uiára, Bruna, Lígia, Andressa, Maurício e Paulinha. Obrigada pelo acolhimento, pela alegria, pelas conversas, mas principalmente pelo companheirismo.

Ao Sr. Fábio, pelo auxílio na manutenção dos trabalhos desenvolvidos em casa de vegetação da Estação Biológica da UnB.

Aos membros da banca examinadora Professores Renato Resende, Érico Dianese e Rita de Cássia Pereira Carvalho, pelas contribuições adicionadas ao presente trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Finalmente, agradeço a toda a minha família, em especial meus tios e primos, que sempre se preocuparam comigo, meus avós que sempre me ajudaram da melhor forma

possível, meus pais e minha irmã, que sempre me incentivam a nunca desistir de minhas metas, me ajudando, sempre que possível, para alcançá-las.

Ao meu namorado, companheiro de Brasília e de todas as horas, Thiago Parente. Obrigada pelas palavras de apoio, por enxergar e me mostrar a nobreza do meu trabalho quando tudo parecia tão difícil. Obrigada por ser meu porto seguro longe de casa, meu melhor amigo, pelas palavras de carinho e por toda a paciência que exigi nos últimos anos, principalmente quando os nematoides reinavam em minha vida.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Dr. Leonardo Silva Boiteux**, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e institucional da Embrapa Hortaliças e Cenargen.

**EFICIÊNCIA DE NOVAS FONTES DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO
CONTRA DIFERENTES ESPÉCIES DE *Begomovirus* BIPARTIDOS E
LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DO LOCUS *tcm-1*.**

MARIANA RESENDE MACHADO

DISSERTAÇÃO APROVADA em 25/03/2013 por:

Dr. Érico de Campos Dianese
Universidade Federal de Goiás (Examinador externo)

Dr. Renato de Oliveira Resende
Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília (Examinador interno)

Dr^a. Rita de Cássia Pereira Carvalho
Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília (Examinador interno - suplente)

Dr. Leonardo Silva Boiteux
Orientador (Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2013

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO GERAL	xii
GENERAL ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVO GERAL	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
CAPÍTULO 1: Revisão de literatura	6
1. A cultura do tomate.....	7
2. Família <i>Geminiviridae</i>	10
2.1. Aspectos taxonômicos.....	10
2.2. Organização genômica do gênero <i>Begomovirus</i>	12
2.3. Replicação.....	15
2.4. Diversidade genética em <i>Begomovirus</i>	16
2.5. Transmissão de <i>Begomovirus</i>	18
2.6. Gênero <i>Begomovirus</i> no Brasil: aspectos econômicos.....	20
3. Genes de resistência a <i>Begomovirus</i>	23
4. Marcadores moleculares e marcadores baseados na amplificação de DNA.....	26
4.1. Marcadores genéticos.....	26
4.2. Marcadores baseados em análise de restrição de DNA.....	27
4.2.1. RFLP (‘Restriction Fragment Length Polymorphism’).....	27
4.3. Marcadores baseados na amplificação de DNA.....	28
4.3.1. RAPD (‘Randomly Amplified Polymorphic DNA’).....	28
4.3.2. SSR (‘Simple Sequence Repeats’).....	29
4.3.3. AFLP (‘Amplified Fragment Length Polymorphism’).....	29
5. Literatura citada.....	30
CAPÍTULO 2: Expressão fenotípica e espectro de eficiência de novas fontes de resistência em tomateiro contra quatro espécies de <i>Begomovirus</i> bipartidos	45
RESUMO	46
ABSTRACT	48
1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAIS E MÉTODOS	53
2.1. Local do ensaio e acessos avaliados.....	53
2.2. Preparo dos clones infecciosos para bombardeamento.....	53
2.3. Ensaio de bombardeamento com clones viriais infectivos.....	54
2.4. Avaliação fenotípica e extração de DNA.....	55
2.5. Hibridização via <i>Southern Blot</i>	55
2.6. Confirmação do acúmulo viral.....	56
2.7. Análises dos acessos de tomateiro com marcadores moleculares ligados a regiões genômicas contendo genes de resistência a begomovírus previamente caracterizado.....	56

3.	RESULTADOS	58
3.1.	Eficiência da metodologia de bombardeamento.....	58
3.2.	Resposta ao ToCMoV.....	59
3.3.	Resposta ao ToYVSV.....	59
3.4.	Resposta ao ToRMV.....	60
3.5.	Resposta ao ToSRV.....	61
3.6.	Confirmação do acúmulo viral.....	63
3.7.	Análise dos diferentes acessos de tomateiro com marcadores moleculares ligados a regiões genômicas contendo genes de resistência a begomovírus.....	63
4.	DISCUSSÃO	65
5.	CONCLUSÕES	70
6.	LITERATURA CITADA	71

CAPÍTULO 3: Mapeamento molecular e localização cromossômica do gene recessivo *tcm-1* que confere resistência do tomateiro a múltiplas espécies de begomovírus bipartidos.....

		77
RESUMO		78
ABSTRACT		80
1. INTRODUÇÃO		82
2. MATERIAL E MÉTODOS		86
2.1. Material genético e desenvolvimento da população F ₂ segregante empregada para mapeamento do locus <i>tcm-1</i>		86
2.2. Inoculação e avaliação fenotípica da resposta ao ToSRV.....		87
2.3. Confirmação da espécie viral empregada como inóculo.....		87
2.4. Extração de DNA e material genético contrastante utilizado na busca por marcadores RAPD polimórficos.....		88
2.5. Seleção de marcadores RAPD potencialmente associados ao gene/locus <i>tcm-1</i>		89
2.6. Avaliação da população F ₂ para marcadores do cromossomo 6.....		89
2.6.1. Avaliação com o ‘primer’ <i>Mi23</i>		89
2.6.2. Avaliação com o ‘primer’ <i>SCAR C19</i>		90
2.6.3. Avaliação com o ‘primer’ <i>REX-1</i>		90
2.6.4. Avaliação com os ‘primers’ <i>JB-1</i> e <i>APS-1</i>		91
2.6.5. Avaliação com o marcador CAPS ‘primers’ ‘UWTy1F/UWTy1R’.....		92
2.7. Avaliação da população F ₂ para os marcadores do cromossomo 04.....		93
2.7.1. Avaliação com o ‘primer’ <i>SINAC 1</i>		93
2.8. Elaboração do mapa genético e do mapa físico do locus <i>tcm-1</i>		95
3. RESULTADOS		96
3.1. Avaliação fenotípica da resposta ao ToSRV de população F ₂ segregante para o locus <i>tcm-1</i>		96
3.2. Identificação de marcadores RAPD.....		98
3.3. Avaliação da população F ₂ com o ‘primer’ <i>Mi23</i>		102
3.4. Avaliação da população F ₂ com o ‘primer’ <i>SCAR C19</i>		103
3.5. Avaliação da população F ₂ com o ‘primer’ <i>REX 1</i>		105
3.6. Avaliação da população F ₂ com o ‘primer’ <i>SINAC 1</i>		107
3.7. Avaliação com os ‘primers’ <i>JB-1</i> e <i>APS-1</i>		109

3.8.	Avaliação com o marcador CAPS ‘primers’ ‘UWTy1F/UWTy1R’.....	110
4.	DISCUSSÃO	111
5.	CONCLUSÕES	114
6.	LITERATURA CITADA	115
	CONCLUSÕES GERAIS:	121

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2: Expressão fenotípica e espectro de eficiência de novas fontes de resistência em tomateiro contra quatro espécies de *Begomovirus* bipartidos.

Tabela 1. Relação de plantas sintomáticas e com infecção sistêmica (hibridização positiva) de sete acessos de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) inoculados via bombardeamento com clones infectivos de quatro espécies virais: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV); *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV). 58

CAPÍTULO 3: Mapeamento molecular e localização cromossômica do gene recessivo *tcm-1* que confere resistência do tomateiro a múltiplas espécies de *Begomovirus* bipartidos.

Tabela 1. Sequência dos ‘primers’ utilizados para amplificação via PCR de fragmentos de DNA do tomateiro utilizados para análise de polimorfismos entre os parentais e na progênie F₂ do cruzamento entre a cultivar de tomate ‘Tospodoro’ (suscetível a begomovírus) e a linhagem ‘TX-468-RG’ (resistente a begomovírus, locus *tcm-1*). ‘Primers’ em negrito foram inicialmente detectados em ligação com o gene *Mi* (resistência a *Meloidogyne* spp.); ‘primers’ em itálico foram identificados em ligação com o locus *Ty-1* (resistência a begomovírus), todos específicos para o cromossomo 6. O par de ‘primers’ sublinhado foi identificado em ligação com o locus *Ty-5/ty-5* no cromossomo 4..... 94

Tabela 2. Distribuição e fenotipagem de indivíduos F₂, provenientes do cruzamento de *Solanum lycopersicum* ‘TX-468-RG’ (resistente a *Begomovirus*) e ‘Tospodoro’ (suscetível a *Begomovirus*) frente ao begomovírus bipartido *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). Os fenótipos das plantas inoculadas foram avaliados de acordo com a escala de notas adaptada de Lapidot *et al.* (2006). A avaliação foi feita 14 dias após inoculação via mosca-branca virulífera em casa de vegetação..... 97

Tabela 3. Conjunto de ‘primers’ RAPD que geraram polimorfismos entre os parentais *S. lycopersicum* acesso ‘TX-468-RG’ e *S. lycopersicum* ‘Tospodoro’..... 101

Tabela 4. Distribuição em classes genotípicas de indivíduos F₂, provenientes do cruzamento de *Solanum lycopersicum* ‘TX-468 RG’ (resistente a *Begomovirus*) e ‘Tospodoro’ (suscetível a *Begomovirus*), com o ‘primer’ *Mi23* frente ao begomovírus bipartido *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). As amostras foram coletadas aos 14 dias após inoculação via mosca-branca virulífera em casa de vegetação..... 103

Tabela 5. Distribuição e genotipagem de indivíduos F₂, provenientes do cruzamento de *Solanum lycopersicum* ‘TX-468-RG’ (resistente a *Begomovirus*) e ‘Tospodoro’ (suscetível a *Begomovirus*), com o ‘primer’ *SCAR C19* frente ao begomovírus bipartido *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). As amostras foram coletadas aos 14 dias após inoculação via mosca-branca virulífera em casa de vegetação..... 105

Tabela 6. Distribuição em classes genotípicas de indivíduos F₂, provenientes do cruzamento de *Solanum lycopersicum* ‘TX-468-RG’ (resistente a *Begomovirus*) e ‘Tospodoro’ (suscetível a *Begomovirus*), com o ‘primer’ *REX-1* frente ao begomovírus bipartido *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). As amostras foram coletadas aos 14 dias após inoculação via mosca-branca virulífera em casa de vegetação..... 107

virulífera em casa de vegetação.....

Tabela 7. Distribuição em classes genotípicas de indivíduos F₂, provenientes do cruzamento de *Solanum lycopersicum* 'TX-468-RG' (resistente a *Begomovirus*) e 'Tospodoro' (suscetível a *Begomovirus*), com o 'primer' *SINAC-1* frente ao begomovírus bipartido *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). As amostras foram coletadas aos 14 dias após inoculação via mosca-branca virulífera em casa de vegetação.....

109

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1: Revisão de literatura.

Figura 1. Representação esquemática da organização genômica de um begomovírus bipartido. Cada círculo representa um componente do genoma viral (DNA-A e DNA-B). As setas indicam as regiões genômicas e a direção em que ocorre a transcrição. As setas azuis indicam as ORFs (“open reading frames” ou regiões abertas de leitura) com transcrição no sentido viral. As setas vermelhas indicam as ORFs com transcrição no sentido complementar. A região comum (RC) está representada em cor verde. A RC contém uma sequência de nove nucleotídeos (5'-TAATATTAC-3') altamente conservada e que constitui o domínio funcional da origem de replicação (Orozco & Hanley-Bowdoin, 1996). A ORF AV2* está presente apenas em espécies de *Begomovirus* de genoma monopartido do “Velho Mundo”..... 13

CAPÍTULO 2: Expressão fenotípica e espectro de eficiência de novas fontes de resistência em tomateiro contra quatro espécies de *Begomovirus* bipartidos.

Figura 1. Detecção de *Begomovirus* em amostras foliares dos acessos ‘TX-468-RG’, ‘LAM 100’, ‘LAM 156’, ‘LAI 132’, ‘Ty-198’, ‘H-24’ e do controle suscetível ‘Viradoro’. Amostras foram coletadas aos 14 dias após bombardeamento de micropartículas com *Tomato severe rugose virus* (ToSRV); *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV). Eletroforese em gel de agarose 1%. Marcador molecular: 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen). As amostras foram transferidas para membrana de nylon N+ (Hybond) pelo método Southern Blot. Para a hibridização do DNA foi utilizada sonda radioativa para detecção de *Begomovirus*..... 62

Figura 2. Análise via PCR com o par de ‘primers’ degenerados PAL1v1978 / PARc715 da acumulação de DNA viral no tecido foliar de acessos de *S. lycopersicum*. **1ª linha:** Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen); **2ª linha:** ‘LAM 100’ inoculado com *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV); **3ª linha:** ‘H-24’ inoculado com *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV); **4ª linha:** ‘LAM 156’ inoculado com *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); **5ª linha:** ‘LAM 100’ inoculado com *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); **6ª linha:** ‘TX-468-RG’ inoculado com *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); **7ª linha:** ‘Viradoro’ inoculado com *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV). As amostras foram coletadas aos 14 dias após o bombardeamento com micropartículas. Eletroforese em gel de agarose 1,5%..... 63

Figura 3 Análise via PCR com o par de ‘primers’ degenerados PAL1v1978 / PARc715 da acumulação de DNA viral no tecido foliar de acessos de *S. lycopersicum*. **1ª linha:** Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen); **2ª linha:** ‘LAM 100’ inoculado com *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV); **3ª linha:** ‘H-24’ inoculado com *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV); **4ª linha:** ‘LAM 156’ inoculado com *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); **5ª linha:** ‘LAM 100’ inoculado com *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); **6ª linha:** ‘TX-468-RG’ inoculado com *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); **7ª linha:** ‘Viradoro’ inoculado com *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV). As amostras foram coletadas aos 14 dias após o bombardeamento com micropartículas. Eletroforese em gel de agarose 1,5%..... 64

CAPÍTULO 3: Mapeamento molecular e localização cromossômica do gene recessivo *tcm-1* que confere resistência do tomateiro a múltiplas espécies de begomovírus bipartidos.

Figura 1. Mapa físico e alguns dos genes anotados na região do cromossomo 6 flanqueada pelos marcadores *SCAR C19* e *REX-1* detectados em estreita ligação com o locus *tcm-1* 96

(resistência ao *Tomato severe rugose virus*).....

Figura 2. Exemplo de um ensaio de reavaliação da estabilidade dos polimorfismos gerados entre os parentais ‘Tospodoro’ – To (suscetível a begomovírus e resistente a *Meloidogyne* spp. devido à presença do locus *Mi*) e ‘TX-468-RG’ – Tx (suscetível a *Meloidogyne* spp. e resistente ao *Begomovirus*, gene *tcm-1*) por um subconjunto de ‘primers’ RAPD. As setas apontam amplicons polimórficos e estáveis obtidos com os ‘primers’ OP-K2, OP-K07 e OP-N19. Os polimorfismos obtidos com os demais ‘primers’ não foram confirmados no presente ensaio. As amostras foram coletadas aos 14 dias após inoculação com *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) via mosca-branca virulífera em casa de vegetação. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Marcador molecular: 1Kb Plus DNA Ladder[®] (Invitrogen).....

98

Figura 3. Resultado da análise de indivíduos com o ‘primer’ RAPD OP-C19. Amplicon ausente no parental suscetível ‘Tospodoro’ – To (suscetível a begomovírus e resistente a *Meloidogyne* spp. devido à presença do locus *Mi*) e presente no parental ‘TX-468-RG’ – Tx (suscetível a *Meloidogyne* spp. e resistente ao *Begomovirus*, gene *tcm-1*) e nos indivíduos resistentes da população F₂. As amostras foram coletadas aos 14 dias após inoculação com *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) via mosca-branca virulífera em casa de vegetação. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Marcador molecular: 1 Kb Plus DNA Ladder[®] (Invitrogen).....

99

Figura 4. Exemplos de ‘primers’ RAPD que apresentaram consistentes polimorfismos nos dois acessos parentais ‘TX-468-RG’ – Tx e ‘Tospodoro’ – To, porém se mostraram instáveis ou não ligados ao gene *tcm-1* na população F₂. As amostras foram coletadas aos 14 dias após inoculação com *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) via mosca-branca virulífera em casa de vegetação. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Marcador molecular: 1 Kb Plus DNA Ladder[®] (Invitrogen).....

100

Figura 5. Padrão de amplicons observados com os ‘primers’ específicos para o locus *Mi23* (localizado no topo do cromossomo 6) usando como molde o DNA genômico da população F₂ de *Solanum lycopersicum* provenientes do cruzamento entre ‘Tospodoro’ (suscetível a begomovírus e resistente a *Meloidogyne* spp. devido à presença do locus *Mi*) e ‘TX-468-RG’ (suscetível a *Meloidogyne* spp. e resistente ao *Begomovirus*, gene *tcm-1*). As amostras foram coletadas aos 14 dias após inoculação com *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) via mosca-branca virulífera em casa de vegetação. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Marcador molecular: 1 Kb Plus DNA Ladder[®] (Invitrogen).....

102

Figura 6. Padrão de amplicons com os ‘primers’ específicos para o locus *SCAR C19* (localizado no topo do cromossomo 6) usando como molde o DNA genômico da população F₂ de *Solanum lycopersicum* provenientes do cruzamento entre ‘Tospodoro’ (suscetível a begomovírus e resistente a *Meloidogyne* spp. devido à presença do locus *Mi*) e ‘TX-468-RG’ (suscetível a *Meloidogyne* spp. e resistente ao *Begomovirus*, gene *tcm-1*). As amostras foram coletadas aos 14 dias após inoculação com *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) via mosca-branca virulífera em casa de vegetação. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Marcador molecular: 1 Kb Plus DNA Ladder[®] (Invitrogen).....

104

Figura 7. Padrão de amplicons observados com os ‘primers’ específicos para o locus *REX-1* (localizado no topo do cromossomo 6) obtidos usando como molde o DNA genômico de uma amostra de indivíduos de uma população F₂ de *Solanum lycopersicum* provenientes do cruzamento entre ‘Tospodoro’ (suscetível a begomovírus e resistente a *Meloidogyne* spp. devido à presença do locus *Mi*) e ‘TX-468-RG’ (suscetível a *Meloidogyne* spp. e resistente ao *Begomovirus*, gene *tcm-1*). As amostras foram coletadas aos 14 dias após inoculação com *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) via mosca-branca virulífera em casa de vegetação. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Marcador molecular: 1 Kb Plus DNA Ladder[®] (Invitrogen).....

106

(Invitrogen).....

Figura 8. Independência (não ligação) entre a resistência a *Tomato severe rugose virus* e o marcador *SINAC 1* (localizado no cromossomo 4 em estreita ligação com o locus *Ty-5/ty-5*). Padrão de amplicons observados com o ‘primer’ *SINAC-1* obtidos usando como molde o DNA genômico da população F₂ de *Solanum lycopersicum* provenientes do cruzamento entre ‘Tospodoro’ (suscetível a begomovírus e resistente a *Meloidogyne* spp. devido à presença do locus *Mi*) e ‘TX-468-RG’ (suscetível a *Meloidogyne* spp. e resistente ao *Begomovirus*, gene *tcm-1*). As amostras foram coletadas aos 14 dias após inoculação com *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) via mosca-branca virulífera em casa de vegetação. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Marcador molecular: 1 Kb Plus DNA Ladder[®] (Invitrogen)..... 108

Figura 9. Padrão monomórfico de todos os amplicons obtidos com os ‘primers’ específicos para os loci *APS-1* e *JB-1*, usando como molde o DNA genômico de cinco indivíduos resistentes (R) e de cinco indivíduos suscetíveis (S) de uma população F₂ proveniente do cruzamento entre os parentais *Solanum lycopersicum* ‘Tospodoro’ (suscetível a begomovírus e resistente a *Meloidogyne* spp. devido à presença do locus *Mi*) e *S. lycopersicum* ‘TX-468-RG’ (suscetível a *Meloidogyne* spp. e resistente ao *Begomovirus*, gene *tcm-1*). As amostras foram coletadas aos 14 dias após inoculação com *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) via mosca-branca virulífera em casa de vegetação. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Marcador molecular: 1 Kb Plus DNA Ladder[®] (Invitrogen)..... 110

Figura 10. Padrão monomórfico dos amplicons obtidos com os pares de ‘primers’ *UW**Ty 1 F/R*, capazes de detectar amplicons polimórficos entre o locus de resistência (*Ty-1*) e o locus de suscetibilidade (*ty-1*), e *FLUW 25F/R*, capazes de detectar amplicons polimórficos entre o locus de resistência (*Ty-3*) e o locus de suscetibilidade (*ty-3*) usando como molde o DNA genômico de *Solanum lycopersicum* ‘Tospodoro’ – To (suscetível a begomovírus e resistente a *Meloidogyne* spp. devido à presença do locus *Mi*) e *S. lycopersicum* ‘TX-468-RG’ – Tx (suscetível a *Meloidogyne* spp. e resistente ao *Begomovirus*, gene *tcm-1*). As amostras foram coletadas aos 14 dias após inoculação com *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) via mosca-branca virulífera em casa de vegetação. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Marcador molecular: 1 Kb Plus DNA Ladder[®] (Invitrogen)..... 111

RESUMO GERAL

MACHADO, Mariana Resende. **Eficiência de novas fontes de resistência em tomateiro contra diferentes espécies de *Begomovirus* bipartidos e localização cromossômica do locus *tcm-1***. 2013. 122p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A família *Geminiviridae* é caracterizada por espécies virais com partículas de morfologia geminada e genoma composto por DNA circular de fita simples, sendo o gênero *Begomovirus* o mais importante em termos de número de espécies e impacto econômico. Os begomovírus do Novo Mundo, em sua maioria, possuem dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B), são transmitidos por *Bemisia tabaci* (mosca-branca) e infectam plantas dicotiledôneas. A forma mais eficiente de controle tem sido o emprego de cultivares resistentes ao vírus e/ou ao vetor. No entanto, os dados referentes à eficiência e ao espectro da resposta das diferentes fontes de resistência para as espécies que compõe o complexo de begomovírus bipartidos do Brasil ainda são escassos. Os principais fatores de resistência empregados têm sido os loci *Ty-1* e *Ty-3* derivados de *S. chilense*. No entanto, a linhagem ‘TX-468-RG’ (portadora do gene recessivo *tcm-1*) derivada de ‘Tyking’ tem se destacado entre as diversas fontes por apresentar elevados níveis de resistência contra uma ampla gama de espécies de begomovírus de genoma bipartido do Brasil e monopartido da Europa. A estratégia de piramidização de genes de resistência aos begomovírus, para ser eficiente, requer o uso de marcadores moleculares em sistemas de melhoramento assistido para monitorar a incorporação de diferentes loci (dominantes e recessivos), especialmente por eles conferem idêntico fenótipo. No entanto, até o presente momento, não foram desenvolvidos trabalhos visando identificar a localização cromossômica ou desenvolver marcadores moleculares para monitorar a incorporação do locus *tcm-1* em programas de seleção assistida. No **Capítulo 2**, a linhagem ‘TX-468-RG’

(controle resistente) e cinco novas fontes/acessos de *S. lycopersicum* que se mostraram como promissoras fontes em ensaios conduzidos em telado e campo ('LAM 100', 'LAM 156', 'LAI 132', 'H-24' e 'Ty-198') foram inoculadas via bombardeamento de micropartículas com clones infectivos de quatro espécies do complexo de begomovírus bipartidos do Brasil: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV); *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV). A cultivar 'Viradoro' foi utilizada como controle suscetível. A acumulação do DNA viral nos diferentes acessos foi monitorada via *Southern Blot*. 'Viradoro' apresentou sintomas severos e alto acúmulo de DNA para todos os vírus. O acesso 'H-24' (fonte do locus *Ty-2* introgridido de *S. habrochaites*) se mostrou suscetível ao ToSRV e ToRMV. A linhagem 'LAI 132' mostrou resistência efetiva apenas contra ToCMoV. 'TX-468-RG' e os acessos 'LAM 100', 'LAM 156' e 'Ty-198' foram resistentes a todas as espécies virais, sendo, portanto, recomendados como fontes preferenciais em programas de melhoramento, para incorporar fatores de resistência de mais amplo espectro. Uma análise foi conduzida com um painel de marcadores moleculares ligados aos principais loci de resistência a begomovírus caracterizados em tomateiro (*Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4* e *Ty-5/ty-5*). Os resultados indicaram que os acessos 'LAI 132', 'LAM 100', 'LAM 156' e 'Ty-198' representam fontes de novos genes e/ou alelos de resistência. No **Capítulo 3** o objetivo foi identificar e ancorar marcadores moleculares associados com o gene/locus *tcm-1* no genoma-referência do tomateiro, permitindo a localização física desse fator de resistência. Os resultados da análise de uma população F₂ segregando para reação a um isolado do ToSRV e da caracterização molecular de um painel de marcadores do tipo SCAR e CAPS associados com a resistência indicaram que o gene *tcm-1* está localizado no topo do cromossomo 6. O locus *tcm-1* se encontra em ligação estreita com um grupamento ('cluster') de genes de resistência que engloba a região genômica contendo os genes *Ty-1* e *Mi*. Recentemente, um locus recessivo no cromossomo 4

controlando resistência a isolados da espécie de genoma monopartido *Tomato yellow leaf curl virus* foi reportado na Flórida. Essa região genômica contém o gene dominante *Ty-5* e uma provável variante alélica de natureza recessiva (também derivada do híbrido ‘Tyking’) nomeada como *ty-5*. Embora polimórficos na população de mapeamento utilizada no presente trabalho, os marcadores moleculares para o locus *Ty-5/ty-5* não se mostraram associados com a resposta de resistência ao ToSRV. Desta forma, nossos resultados indicam que *tcm-1* e *Ty-5/ty-5* são fatores genéticos distintos e que o híbrido ‘Tyking’ (fonte original do locus *tcm-1*) pode representar uma pirâmide de diferentes genes recessivos do tipo espécie-específico que, quando em associação, se mostram efetivos contra uma ampla gama de espécies de *Begomovirus* de genoma monopartido e bipartido de diferentes continentes.

Palavras-chave: *Begomovirus*, tomate, melhoramento genético, fontes de resistência.

GENERAL ABSTRACT

MACHADO, Mariana Resende. **Efficiency of new sources of resistance in tomato to distinct bipartite *Begomovirus* species and chromosomal localization of the *tcm-1* locus.** 2013. 122p. Dissertation (Master in Plant Pathology) – Universidade de Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

The *Geminiviridae* family is composed by virus species with geminated particles and circular, single-stranded DNA genome. The genus *Begomovirus* is the most important within this family in terms of number of species as well as in economic impact. The majority of begomoviruses from the New World has two genomic components (DNA-A and DNA-B), and they are transmitted to dicotyledonous plants by the whitefly *Bemisia tabaci*. The most efficient disease control strategy is the employment of cultivars with genetic resistance to either the virus or its vector. However, the amount of information available about the phenotypic expression, as well as the spectrum of efficiency of the distinct *Solanum* (section *Lycopersicon*) resistance sources to Brazilian begomovirus is still limited. So far, the *Ty-1* and *Ty-3* loci (introgressed from accessions of the wild species *S. chilense*) are the most employed resistance factors. The inbred line ‘TX-468-RG’ derived from the hybrid *S. lycopersicum* ‘Tyking’ is one of the most important sources of wide-spectrum resistance, being effective against a wide range of begomovirus isolates from both bipartite species from Brazil and monopartite species from Europe. To increase the efficiency of the pyramidization process, the establishment of a marker assisted selection system to all known (dominant and recessive) begomovirus resistance loci is necessary. However, molecular markers are still not available for the *tcm-1* locus and even its genomic location is yet unknown. In **Chapter 2**, ‘TX-468-RG’ (resistant control due to presence of the recessive locus *tcm-1*) and five new accessions identified as promising sources of resistance in assays conducted under either greenhouse or

field conditions (named as ‘LAM 100’, ‘LAM 156’, ‘LAI 132’, ‘H-24’ and ‘Ty-198’), were evaluated in biolistic assays with infective clones of four begomovirus of the Brazilian complex virus: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV); *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) and *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV). The tomato cultivar ‘Viradoro’ was employed as susceptible control. Virus accumulation was monitored in all accessions via Southern Blot assays using a universal probe. ‘Viradoro’ displayed severe symptoms and high viral DNA accumulation in all assays. The line ‘H-24’ (source of *Ty-2* locus introgressed from *S. habrochaites*) displayed a susceptible reaction to ToSRV and ToRMV. The accession ‘LAI 132’ displayed a peculiar species-specific resistant reaction only to ToCMoV. The ‘TX-468-RG’ as well as the accessions ‘LAM 100’, ‘LAM 156’ and ‘Ty-198’ were resistant to all virus species, being, therefore, recommended for preferential use in breeding programs aiming to develop lines with wider spectrum of resistance. Analyses conducted with a panel of molecular markers linked to all currently characterized begomovirus resistance loci in tomato (*Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4* e *Ty-5/ty-5*) indicated that ‘LAI 132’, ‘LAM 100’, ‘LAM 156’ and ‘Ty-198’ are sources of either new genes or alleles for begomovirus resistance. In **Chapter 3**, molecular markers were developed in association with *tcm-1* and were anchored in the reference tomato genome, aiming to develop efficient marker-assisted selection systems for this locus. Co-segregation analyses of an F₂ population inoculated with an ToSRV isolate and the molecular characterization of a panel of SCAR and CAPS markers linked to the resistant reaction indicated that *tcm-1* is located on the top of the chromosome 6 in linkage with a the well-characterized cluster of resistance genes, encompassing the *Ty-1* and *Mi* loci. More recently, a recessive resistance to Florida isolates of the monopartite *Tomato yellow leaf curl virus* was also characterized in inbred lines derived from the hybrid ‘Tyking’. This gene and its putative allelic variant (located in chromosome 4) have been tentatively named as *Ty-5/ty-5*. Even though

polymorphic in our mapping population, the molecular marker linked with the *Ty-5/ty-5* genomic region segregated independently from the resistant reaction to ToSRV. Therefore, our results indicated that *tcm-1* and *Ty-5/ty-5* are distinct resistance factors, and that ‘Tyking’ (the original source of the locus *tcm-1*) might represent a pyramid of distinct *Begomovirus* species-specific recessive genes, that in association might confer effective reaction observed against a range of monopartite and bipartite species in distinct continents.

Keywords: begomoviruses, tomato, genetic breeding, sources of resistance.

Advisor: Leonardo Silva Boiteux – Embrapa Hortaliças.

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro – *Solanum lycopersicum* L. (= *Lycopersicon esculentum* Mill.) – e as outras espécies silvestres do gênero *Solanum* (secção *Lycopersicon*) têm origem na Região dos Andes, na América do Sul, estando presentes em diferentes micro-habitats, topografias e climas (Boiteux *et al.*, 2012b). O fruto do tomateiro é apreciado em todo o mundo tanto na sua forma *in natura* como processado em molhos, concentrados ou sucos. De acordo com o *World Processing Tomato Council* (WPTC) o Brasil ocupa o sétimo lugar no ranking mundial, com 4% da produção. O Brasil tem produzido, em média, 1,2 milhão de toneladas de tomate industrial, sendo que o setor movimenta mais de R\$ 2,6 bilhões por ano (Vilela *et al.*, 2012).

O cultivo do tomateiro ocorre durante todo o ano e em quase todo o território nacional, favorecendo o surgimento de inúmeras pragas e doenças (Souza & Reis, 2003). Segundo Polston (2010), as doenças causadas por *Begomovirus* estão entre as mais problemáticas para a cultura do tomateiro. O complexo de espécies de begomovírus monopartidos, conhecido como ‘*Tomato yellow leaf curl disease*’ (TYLCD) é considerado o principal fator limitante para a produção de tomate em diversos países. De maneira similar, os geminivírus também representam um dos fatores mais limitantes para o cultivo do tomateiro no Brasil, causando severos efeitos deletérios em praticamente todas as regiões produtoras (Fernandes, 2010). Os begomovírus (*Geminiviridae*), transmitidos pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*), são caracterizados estruturalmente pela morfologia geminada da partícula viral, e, geneticamente, por possuir um genoma com uma (monopartidos) ou duas (bipartidos) moléculas de DNA fita simples (ssDNA) e circular (Lazarowitz, 1992).

O biótipo B de *B. tabaci* foi introduzido no Brasil na década de 1990 (Lourenção & Nagai, 1994; França *et al.*, 1996). Ao contrário do já existente biótipo A, o novo biótipo

mostrou-se extremamente adaptado ao tomateiro e se disseminou rapidamente pelas regiões produtoras do Brasil (Ribeiro *et al.*, 2003). A explicação mais provável para o surgimento repentino e disseminação de begomovírus não apenas na cultura do tomateiro, mas também em outras hortaliças é a capacidade do biótipo B de colonizar plantas silvestres e daninhas, possibilitando que vírus nativos presentes nessas plantas sejam transferidos para as hospedeiras cultivadas (Ribeiro *et al.*, 2003).

A variabilidade de espécies de *Begomovirus* é o principal desafio a ser enfrentado pelos programas de melhoramento do tomateiro, visando incorporar resistência ampla e durável. Dessa forma, as principais estratégias do melhoramento têm sido à busca de fontes com amplo espectro de resistência e/ou a “piramidização” de diferentes genes de resistência em linhagens-elite (Lapidot & Friedmann 2002; Boiteux *et al.*, 2012). Diversas fontes de resistência a *Begomovirus* foram identificadas em espécies silvestres do gênero *Solanum*. O locus *Ty-1*, introgridido de *S. chilense* ‘LA-1969’, foi mapeado próximo a um marcador molecular (TG97) no cromossomo 6 (Zamir *et al.*, 1994). Este locus tem sido amplamente utilizado em híbridos comerciais (de Castro *et al.*, 2007), se mostrando efetivo contra diferentes isolados de diferentes espécies de *Begomovirus* em diferentes continentes (Zamir *et al.*, 1994; Boiteux *et al.*, 2007a). No entanto, existem registros que indicam que o locus *Ty-1* não é efetivo contra isolados de *Tomato mottle virus* (ToMoV), um vírus de genoma bipartido da Flórida (Ji *et al.*, 2007). Além disso, sob alta pressão de inóculo, a resistência controlada pelo locus *Ty-1* pode ser quebrada (Michelson *et al.*, 1994; Picó *et al.*, 1996). O locus *Ty-2* foi introgridido a partir de um acesso de *S. habrochaites* (Kallo & Banerjee, 1990) e foi mapeado no braço longo do cromossomo 11. Acessos com esse locus apresentaram uma eficiência relativa contra isolados de begomovírus do Brasil (Boiteux *et al.*, 2007b) bem como contra isolados de TYLCV (Hanson *et al.*, 2000; Ji *et al.*, 2007). No entanto, o gene *Ty-2* também não se mostrou efetivo contra isolados de ToMoV (Ji *et al.*, 2007). O gene/locus *Ty-3*

derivado de *S. chilense* 'LA-2779' é parcialmente dominante e está localizado em estreita ligação com o locus *Ty-1* no cromossomo 6. A resistência controlada por este locus apresenta uma expressão mais complexa (de caráter aditivo), sendo efetiva contra alguns isolados de TYLCV e ToMoV (Agrama & Scott, 2006; Ji *et al.*, 2007). Por sua vez, o locus *Ty-4* é originado do acesso *S. chilense* 'LA-1932'. O locus *Ty-4* apresenta um efeito menor que o aquele conferido pelo *Ty-3* e não se mostrou efetivo contra todos os isolados de TYLCV (Ji *et al.*, 2009).

Entre as diversas fontes de resistência a begomovírus identificadas até o presente momento destaca-se a linhagem 'TX-468-RG' (portadora do gene recessivo *tcm-1*) derivada do híbrido comercial *S. lycopersicum* 'Tyking' (Royal Sluis, Enkhuizen, The Netherlands) (Giordano *et al.*, 2005b). Estudos adicionais com 'TX-468-RG' indicaram que essa linhagem se mostra resistente contra diferentes espécies de begomovírus de genoma bipartido do Brasil (Pereira-Carvalho, 2009) e de genoma monopartido da Europa (García-Cano *et al.*, 2008; Pereira-Carvalho *et al.*, 2010). Estudos realizados para elucidar os mecanismos genéticos associados com essa resistência foram conduzidos nos dois continentes e indicaram um controle do tipo monogênico recessivo, sendo o gene tentativamente denominado de *tcm-1* (Giordano *et al.*, 2005b; García-Cano *et al.*, 2008; Pereira-Carvalho *et al.*, 2010). Diversos genes virais recessivos têm sido descritos em diferentes patossistemas (Maule *et al.*, 2007; LeGall *et al.*, 2011). Mais recentemente, um gene de resistência também de natureza recessiva foi caracterizado (em distintas linhagens derivadas de 'Tyking') conferindo resistência a isolados de TYLCV na Flórida. Esse gene (localizado no cromossomo 4) foi nomeado como *ty-5* (Hutton *et al.* 2012). No entanto, *tcm-1* foi o primeiro gene recessivo descrito para resistência a begomovírus em tomateiro.

Nesse cenário, o locus *tcm-1* se constitui em um fator de resistência de extremo interesse devido a essa amplitude de eficiência contra uma ampla gama de variantes virais. De

fato, variedades de tomateiro contendo fatores de resistência de amplo espectro é uma característica imprescindível neste cenário de enorme diversidade de isolados virais no Brasil e no mundo (Pereira-Carvalho, 2009). No entanto, um fator limitante do ponto de vista do melhoramento genético tem sido o fato de que, até o presente momento, não foram identificados marcadores moleculares para monitorar o locus *tcm-1* em programas de seleção assistida.

Desta forma, um dos principais objetivos da presente dissertação foi avaliar a eficiência de novas fontes de resistência (ainda não amplamente caracterizadas do ponto de vista fenotípico e genético) frente a quatro espécies de begomovírus bipartidos componentes do complexo de espécies virais que infectam o tomateiro no Brasil (ToSRV, ToRMV, ToYVSV e ToCMoV). Um segundo objetivo foi identificar marcadores moleculares associados com a resistência a espécies de *Begomovirus* (locus *tcm-1*) presente na linhagem *S. lycopersicum* 'TX-468-RG', bem como a localização deste gene no genoma do tomateiro. Essa informação vai fornecer a base metodológica necessária para o estabelecimento de sistemas de seleção assistida eficientes para esse fator de resistência.

OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência de novas fontes de resistência frente a quatro espécies de begomovírus bipartidos (ToSRV, ToRMV, ToYVSV e ToCMoV), identificar marcadores moleculares associados com o gene *tcm-1* e ancorar tais marcadores no genoma referência do tomateiro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Inocular via bombardeamento de micropartículas quatro espécies de *Begomovirus* bipartidos (ToSRV, ToRMV, ToYVSV e ToCMoV) em sete acessos de *S. lycopersicum* ('LAM 100', 'LAM 156', 'LAI 132', 'Ty-198', 'H-24', 'TX-468-RG' e 'Tospodoro').
- Analisar o título viral via *Southern Blot*, e avaliar a eficiência dessas novas fontes de resistência contra as quatro espécies de *Begomovirus* citadas.
- Identificar 'primers' RAPD capazes de gerar amplicons polimórficos para os parentais 'TX-468-RG' e 'Tospodoro', bem como para uma população F₂ segregante para resistência ao ToSRV.
- Avaliar a co-segregação de marcadores moleculares para genes de resistência presentes no cromossomo 6 e identificar a associação desses marcadores com o gene/locus recessivo *tcm-1*.
- Mapear uma população F₂ com o 'primer' *SINAC 1* e avaliar se essa região genômica contribui na expressão fenotípica da resistência ao ToSRV.
- Localizar fisicamente o locus *tcm-1* no genoma-referência do tomateiro recentemente sequenciado (The tomato genome consortium, 2012).

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. A CULTURA DO TOMATE

O tomate *Solanum lycopersicum* L. (sin. *Lycopersicon esculentum* Mill.) tem a sua origem na zona andina da América do Sul, mas foi domesticado no México e posteriormente introduzido na Europa em meados do século XVI (Boiteux *et al.*, 2012b). Da Europa o tomateiro disseminou-se para a Ásia meridional e oriental, África e Oriente Médio. Posteriormente foi reintroduzido como uma espécie cultivada em toda a América do Sul (Naika *et al.*, 2006). O tomateiro e as espécies selvagens taxonomicamente relacionadas apresentam uma grande plasticidade fenotípica, ocupando diferentes habitats, topografias e climas tais como desertos, baixadas litorâneas e altitudes elevadas nos Andes (Boiteux *et al.*, 2012b).

O tomate se caracteriza com uma hortaliça muito versátil em termos de utilização tanto *in natura* como industrializada, o que justifica sua grande popularidade (Espinoza, 1991; Gualberto *et al.*, 2002). Cultivado em regiões tropicais e subtropicais durante todo o ano, o tomate é uma das mais importantes hortaliças no cenário mundial (Moreira *et al.*, 2005), apresentando boas perspectivas econômicas com indicado pelo contínuo incremento da área cultivada. Trata-se de uma cultura com um ciclo relativamente curto e de altos rendimentos. No entanto, o tomateiro exige constante atenção por parte dos produtores devido ao grande número de pragas e doenças que ocorrem durante o ciclo da cultura. O tomateiro é, portanto, uma cultura exigente em tratamentos fitossanitários (Moreira *et al.*, 2005). Os dois sistemas de cultivo predominantes para o tomateiro são aqueles conduzidos estaqueados e os rasteiros. O cultivo estaqueado é mais apropriado para o consumo *in natura*, podendo ser produzido em cultivo protegido ou em campo aberto. O cultivo rasteiro (= crescimento determinado) é, em geral, produzido para processamento industrial com plantio feito a campo aberto e com a presença de mecanização em diversas etapas de etapas do cultivo desde o semeio até a colheita.

Os principais países/regiões exportadores mundiais de tomate são México, Turquia, Estados Unidos, União Europeia, Canadá e China. Os principais importadores são Estados Unidos, Rússia, União Europeia e Canadá (USDA, 2012). Segundo o levantamento da FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, os 20 principais países produtores colheram cerca de 100 milhões de toneladas de tomate em 2008. Naquele ano a China foi o maior produtor, com 33,91 milhões de toneladas (FAO, 2011). De acordo com o *World Processing Tomato Council* (WPTC), organização internacional com sede na França, o Brasil ocupa o sétimo lugar no *ranking* mundial, com apenas 4% da produção. Em 2012 o Brasil produziu 1,2 milhão de toneladas de tomate industrial, ante 1,6 milhão em 2011. A indústria ainda importa por ano entre 60 e 70 toneladas de pasta da fruta, principalmente do Chile e da China. Este volume coloca o tomate na segunda posição em se tratando da produção de olerícolas no país, ficando atrás apenas da batata (*Solanum tuberosum* L.) (CNPq, 2008). De acordo com o IBGE, toda a produção brasileira de tomate industrial é feita por 23 indústrias, sendo que 13 delas estão sediadas em Goiás. Esse Estado concentra a maior fatia da produção nacional, que corresponde a 986,9 mil toneladas e a 55% do total produzido no país (IBGE, 2013).

O melhoramento genético trouxe características de precocidade, alta produtividade, resistência às pragas, às doenças e adaptação ao ambiente tropical e subtropical. O rendimento médio do tomate no Brasil é de aproximadamente 58 t/ha. Contudo, produtores mais tecnificados chegam a alcançar mais de 100 t/ha (Carvalho & Pagliuca, 2007). A difusão de técnicas de irrigação, o uso intensivo de insumos e a introdução de híbridos mais produtivos e com menores perdas na pós-colheita foram alguns dos principais fatores que contribuíram para o aumento da produtividade do tomate nacional. Outras características vantajosas dos híbridos modernos são a resistência ao transporte e sua baixa perecibilidade.

O custo de produção do tomate é um dos maiores em toda a atividade agrícola. De acordo com dados da ABCSEM (2010), o custo de produção apresenta grande variabilidade, ficando entre R\$ 30 mil e R\$ 55 mil por cada hectare plantado, dependendo da tecnologia empregada na produção. Já a rentabilidade depende fortemente da qualidade dos frutos, dos níveis de produtividade obtidos e da flutuação de preço que essa cultura tem no mercado, que está associada à lei de oferta e demanda (Carvalho & Pagliuca, 2007). Os gargalos mais evidentes do setor são a inexistência de um zoneamento de produção que regule oferta/demanda, a forte instabilidade dos preços, ausência de linhas de crédito e a informalidade na negociação da produção, levando à inadimplência e aumentando os riscos do negócio (Vilela *et al.*, 2012). Outra questão importante é o que diz respeito à segurança alimentar, por tratar-se de uma cultura conhecida pelo uso maciço de defensivos agrícolas, usados principalmente no tratamento de doenças fúngicas, bacterianas e no controle de insetos, incluindo os vetores de vírus.

Doenças causadas por vírus são um dos fatores mais limitantes para a cultura, com alto poder restritivo sobre a produção, em todas as regiões onde o tomate é cultivado. Segundo um levantamento feito por Polston (2010), foi estabelecido que, além dos begomovírus, os vírus e viroides mais preocupantes para a cultura do tomateiro são: PepMV (*Pepino mosaic virus – Potexvirus*), TSWV (*Tomato spotted wild virus – Tospovirus*), CMV (*Cucumber mosaic virus – Cucumovirus*), PSTVd (*Potato spindle tuber viroid – Pospiviroid*), TASVd (*Tomato apical stunt viroid – Pospiviroid*), TICV (*Tomato infectious chlorosis virus – Crinivirus*) e ToCV (*Tomato chlorosis virus – Crinivirus*). Os begomovírus (com mais de 50 espécies descritas) representam atualmente um dos mais sérios problemas na cultura do tomateiro. Em 1983 quatro espécies de begomovírus estavam identificadas. Em 2003, tinham sido reportadas 31 espécies aceitas e 22 espécies tentativas. Em 2005, o número havia subido para 50 espécies aceitas e 39 espécies tentativas (Polston, 2010). Atualmente, de acordo com o ICTV (Comitê

Internacional de Nomenclatura de Vírus) o número de espécies dentro do gênero *Begomovirus* é de 192.

Durante a domesticação do tomateiro, houve perda de alelos importantes presentes no conjunto gênico do gênero *Solanum* (secção *Lycopersicon*), principalmente no tocante à resistência a pragas e doenças. A domesticação pode ter causado um estreitamento na base genética, sendo um dos motivos que podem explicar a suscetibilidade das atuais cultivares a inúmeros patógenos e pragas (Gonçalves Neto *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2008). Neste cenário, uma das alternativas para a obtenção de melhor relação custo/benefício é o desenvolvimento de cultivares resistentes (Boiteux *et al.*, 2012)

2. FAMÍLIA GEMINIVIRIDAE

2.1. Aspectos taxonômicos

A família *Geminiviridae* é uma das mais numerosas dentre os vírus de plantas. Atualmente, 229 espécies foram descritas nessa família (ICTV, 2012). Até o presente momento, a família *Geminiviridae* tem sido oficialmente dividida em quatro gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*) de acordo com sua organização genômica, inseto vetor, círculo de plantas hospedeiras e relacionamento filogenético (Fauquet & Stanley, 2005; Fauquet *et al.*, 2008). No entanto, dois novos gêneros serão provavelmente incorporados na família *Geminiviridae* (ICTV, 2012).

Os geminivírus são caracterizados por possuírem partículas geminadas de 18-30 nm, icosaédricas, compostas por 22 capsômeros pentaméricos. O genoma é circular, monopartido ou bipartido composto DNA de fita simples (ssDNA). A replicação ocorre totalmente no núcleo da célula hospedeira e cada componente genômico possui de 2,5 a 3,0 Kb de extensão (Harrison, 1985). Geminivírus não são usualmente transmitidos por sementes ou por contato

manual. A transmissão ocorre preponderantemente via insetos vetores, envolvendo a passagem de partículas virais do intestino para a hemolinfa do inseto e da hemolinfa para as glândulas salivares.

Os vírus do gênero *Mastrevirus* apresentam genoma monopartido, infectam monocotiledôneas e são transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) (Fauquet & Stanley, 2005). A espécie-tipo do gênero é o *Maize streak virus* (MSV). Pelo menos dois vírus pertencentes a este gênero infectam dicotiledôneas, *Tobacco yellow dwarf virus* (TYDV) e *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV) (Gutierrez *et al.*, 2004; Rojas *et al.*, 2005).

O gênero *Curtovirus* apresenta genoma circular monopartido (Fauquet & Stanley, 2005). As espécies desse gênero infectam plantas hospedeiras dicotiledôneas e são também transmitidos por cigarrinhas. *Beet curly top virus* (BCTV) é espécie-tipo do gênero *Curtovirus*, sendo descrito em diferentes continentes. Uma característica peculiar do gênero *Curtovirus* é a presença de um genoma de provável origem híbrida, onde o gene da capa protéica se mostra similar ao do gênero *Mastrevirus* e o restante do genoma é mais similar ao do gênero *Begomovirus* (Padidam, 1999).

O gênero *Topocuvirus* apresenta genoma circular, monopartido, sendo reportado em dicotiledôneas e é o único transmitido por membracídeos (Homoptera: Auchenorrhyncha) (Fauquet & Stanley, 2005). Esse gênero foi estabelecido devido à presença desse vetor distinto e por ser o único grupamento taxonômico capaz de efetuar eventos de recombinação interespecífica entre vírus de distintos gêneros (Bridson *et al.*, 1996). *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV) é a única espécie descrita até o presente momento dentro do gênero *Topocuvirus* (Pringle, 1999; Fauquet & Stanley, 2005).

O gênero *Begomovirus* inclui 192 espécies descritas que podem possuir um ou dois componentes genômicos, monopartidos ou bipartidos, são transmitidos por diferentes biótipos e espécies de mosca-branca (*Bemisia tabaci*) (Hemiptera: Aleyrodidae) e infectam apenas

dicotiledôneas (Stanley *et al.*, 2005; De Barro *et al.*, 2011). *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) é a espécie-tipo do gênero (Fauquet *et al.*, 2008). Nos vírus que apresentam genoma bipartidos, os componentes A e B são encapsidados separadamente, e o processo de infecção somente ocorre quando as duas moléculas de DNA invadem simultaneamente os tecidos hospedeiros (Faria *et al.*, 2000).

Em termos taxonômicos, apenas a estrutura genômica completa do DNA-A tem sido considerada para análise, uma vez que um grupo numeroso de espécies virais monopartidas possui apenas este componente. O alto índice de recombinação entre espécies de begomovírus impossibilita a utilização de pequenos fragmentos de DNA-A para comparação, sendo recomendada a utilização do genoma completo deste componente (Fauquet *et al.*, 2008).

2.2. Organização genômica do gênero *Begomovirus*

Os begomovírus bipartidos possuem duas moléculas de DNA circular de fita simples (DNA-A e DNA-B). Esses dois componentes não possuem homologia de sequência, com exceção de um segmento com aproximadamente 200 nucleotídeos (região comum – RC) presente na região intergênica (RI). A RC é altamente conservada para os dois componentes de uma determinada espécie viral (acima de 90% de homologia) (Stanley & Gay, 1983; Harrison, 1985; Lazarowitz, 1992; Fauquet *et al.*, 2008).

O DNA-A possui genes que codificam fatores associados com replicação e encapsidação viral. Por sua vez, o DNA-B é composto por genes requeridos para o movimento célula-a-célula, para o movimento a longa distância nos tecidos vegetais, definição de gama de hospedeiros e expressão de sintomas (Timmermans *et al.*, 1994; Palmer & Rybicki, 1998). Espécies de *Begomovirus* monopartidos apresentam um único componente (DNA-A) que possui todos os genes necessários para a replicação, encapsidação, movimento e transcrição (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Lazarowitz & Beachy, 1999). A organização

genômica comparativa entre begomovírus monopartido e bipartido encontra-se representada na **Figura 1**.

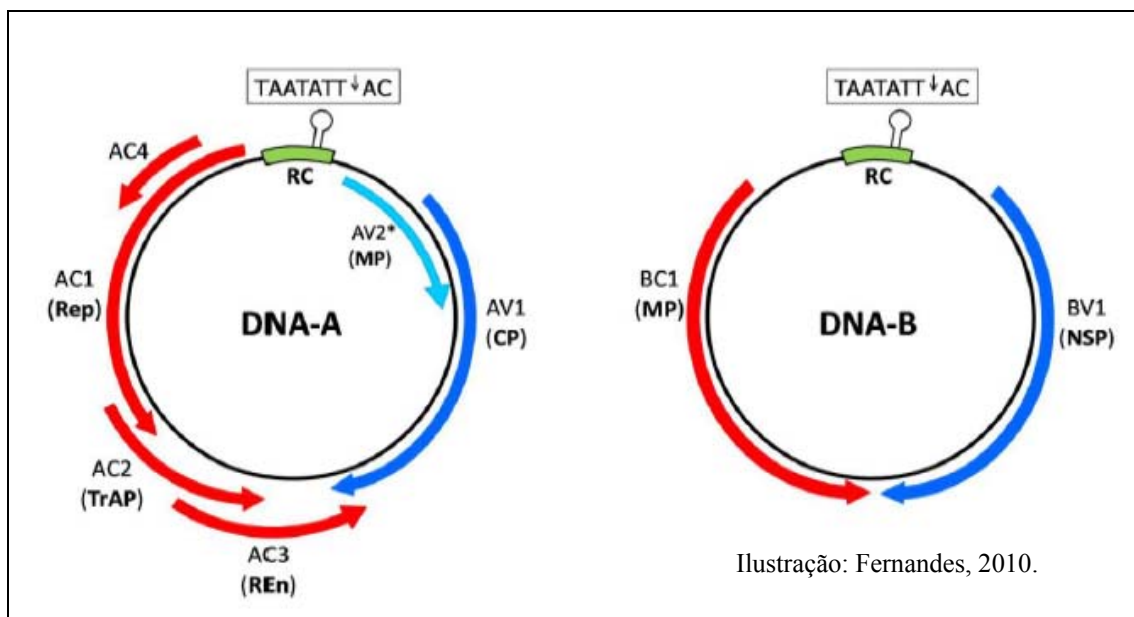


Figura 1 – Representação esquemática da organização genômica de um begomovírus bipartido. Cada círculo representa um componente do genoma viral (DNA-A e DNA-B). As setas indicam as regiões genômicas e a direção em que ocorre a transcrição. As setas azuis indicam as ORFs (“*open reading frames*” ou regiões abertas de leitura) com transcrição no sentido viral. As setas vermelhas indicam as ORFs com transcrição no sentido complementar. A região comum (RC) está representada em cor verde. A RC contém uma sequência de nove nucleotídeos (5’-TAATATTAC-3’) altamente conservada e que constitui o domínio funcional da origem de replicação (Orozco & Hanley-Bowdoin, 1996). A ORF AV2* está presente apenas em espécies de *Begomovirus* de genoma monopartido do “Velho Mundo”.

O DNA-A de um begomovírus bipartido possui uma ORF no sentido viral (AV1) que codifica a proteína capsial (CP) e três ORFs no sentido complementar (AC1, AC2, AC3) que codificam a proteína associada à replicação (Rep – “replication-associated protein”), ativadora de transcrição (TrAP – “transactivating protein”) e a proteína amplificadora da replicação do genoma viral (Ren – “replication-enhancer protein”), respectivamente (Palmer

& Rybicki, 1998; Harrison & Robinson, 1999; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Faria & Zerbini, 2000; Fauquet *et al.*, 2008).

A proteína capsidial (CP) é uma proteína multifuncional, responsável pela proteção do genoma contra degradação e está relacionada à aquisição, transmissão e especificidade do vírus ao inseto vetor e também relacionado com a infectividade e movimento sistêmico dentro da planta hospedeira (Briddon *et al.*, 1990; Pooma *et al.*, 1996; Rojas *et al.*, 2005).

A proteína Rep (= AC1) de aproximadamente 41kDa é a única proteína essencial para a replicação, sendo extremamente conservada (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). A proteína Rep é responsável pela reação de iniciação que envolve uma clivagem dentro do nonanucleotídeo conservado (5'-TAATATT↓AC-3') (Laufs *et al.*, 1995; Gutierrez, 2002). Além da sua atividade na replicação, a Rep está envolvida na repressão de sua própria síntese em nível de transcrição (Sunter *et al.*, 1993).

A TrAP (= AC2) é uma proteína de 15,7 kDa cuja localização nuclear contribui para a patogenicidade viral (Sunter & Bisaro, 1991; Gröning *et al.*, 1994; Rojas, 2004;). A proteína REn (= AC3), de aproximadamente 16 kDa, interage com a Rep aumentando o acúmulo de DNA viral por meio de um mecanismo ainda desconhecido (Hofer *et al.*, 1997; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Castillo *et al.*, 2003). Embora a REn não seja necessária para a infectividade, estudos envolvendo mutações dessa proteína conduzem a uma atenuação de sintomas (Elmer *et al.*, 1988; Etesami *et al.*, 1991).

A proteína produzida pela ORF AC4, de aproximadamente 11 kDa, encontra-se inserida dentro de gene Rep (Wezel *et al.*, 2002; Vanitharani *et al.*, 2004). Acredita-se que a proteína afeta o círculo de hospedeiras, a severidade de sintomas e que em begomovírus monopartidos ela está envolvida junto com AV2 no movimento célula-a-célula. A ORF AC4 está aparentemente envolvida na supressão de mecanismos de defesa antiviral presentes nas células hospedeiras (Vanitharani *et al.*, 2004).

O DNA-B possui duas ORFs (BC1 e BV1). A ORF BV1 codifica para uma proteína que controla o movimento intracelular, núcleo-citoplasma (NPS – “nuclear shuttle protein”). A BC1 codifica a proteína responsável pelo movimento célula-a-célula (“movement protein”) via plasmodesmata (Palmer & Rybicki, 1998; Fauquet *et al.*, 2008). O DNA viral é replicado no núcleo e o transporte do DNA (tanto ssDNA como dsDNA) para o citoplasma é mediado pela NSP (Noueiry *et al.*, 1994). A NSP interage com a MP, cujo complexo conduz o DNA viral através dos plasmodesmata (Sanderfoot & Lazarowitz, 1996). Estas proteínas de movimento interagem diretamente com o DNA viral, reconhecendo-o de maneira específica com base na forma e no tamanho, refletindo o estado replicativo do vírus (ds-DNA) e o tamanho do genoma (2,5 – 3,0 kb) (Noueiry *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 1998).

2.3. Replicação

O núcleo da célula infectada é o sítio de replicação dos geminivírus. A replicação do genoma viral é totalmente dependente da maquinaria do hospedeiro. Em linhas gerais, o DNA de fita simples (ssDNA) é convertido em DNA de fita dupla (dsDNA intermediário), denominado forma replicativa (RF), utilizando o mecanismo de círculo rolante (Saunders *et al.*, 1991; Stenger *et al.*, 1991).

O ciclo replicativo inicia quando o inseto vetor deposita as partículas virais nas células do floema da planta hospedeira (Lazarowitz, 1992). Essas partículas ativam o sistema enzimático do hospedeiro, que libera proteases, degradando a capa proteica e expondo o genoma viral. O DNA viral é transportado até o núcleo das células do hospedeiro com o auxílio da proteína NS. Uma vez no núcleo, a amplificação do genoma ocorre em três estádios distintos (Saunders *et al.*, 1991; Stanley, 1995). O primeiro estágio envolve a conversão do ssDNA circular em um intermediário de dsDNA ‘supercoiled’ circular covalentemente fechado, denominado forma replicativa I (RFI) (Gutierrez, 1999; 2000). O segundo estágio

envolve a utilização do dsDNA como molde para a amplificação do ssDNA pelo mecanismo do círculo rolante, onde a proteína viral *rep* é necessária. A proteína *rep* promove um corte (↓) dentro do nonanucleotídeo conservado (5'–TAATATTAC–3'), localizado no *loop* da estrutura em forma de grampo presente na região intergênica (Rojas *et al.*, 2005a). Tal sequência nucleotídica forma a origem da replicação juntamente com íterons. Os íterons são altamente específicos à Rep, participando da iniciação da replicação e controle da expressão dos genes no sentido complementar (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). A extrema especificidade do íteron com a proteína Rep impede, muitas vezes, que um dado begomovírus apresente compatibilidade com a origem de replicação de outro vírus distinto. O último estágio do ciclo viral é a produção seguida da encapsidação do ssDNA dentro das partículas (Gutierrez, 1999). Quando os produtos dos genes CP e NSP estão presentes, estes se ligam ao ssDNA para encapsidá-lo ou transportá-lo para fora do núcleo. No citoplasma, o vírus move-se para células vizinhas mediado pela proteína MP através dos plasmodesmata e finalmente para o floema, onde é transportado a longas distâncias. A replicação viral faz com que a célula hospedeira retome os processos de divisão celular, ativando a transcrição dos genes da hospedeira envolvidos na síntese das proteínas que necessitam (Zerbini *et al.*, 2002).

2.4. Diversidade genética em *Begomovirus*

A geração de diversidade genética em populações de vírus fornece novas oportunidades para a adaptação a novas hospedeiras e mudanças das condições ambientais. Novas espécies ou espécies já conhecidas de *Begomovirus* têm causado grandes problemas em diversas culturas em todo o mundo (Navas-Castillo *et al.*, 2011). Diversos fatores contribuem para o aparecimento de geminivírus em todo o mundo, tais como: a evolução de novas variantes do vírus, presença de complexos virais, mudanças no panorama varietal, aparecimento de vetores mais eficientes, mudanças climáticas mais favoráveis ao vírus e/ou vetor, mudanças nos

sistemas de produção e movimento de material infectado (Varma & Malathi, 2003; Boiteux *et al.*, 2012a).

A variabilidade genética nos begomovírus pode ser gerada via três principais mecanismos: mutação, recombinação e pseudo-recombinação (Padidam *et al.*, 1999; Monci *et al.*, 2002). As mutações são alterações na estrutura dos genes resultando em modificações hereditárias com perda, ganho ou mesmo com inalteração (mutação silenciosa) de uma característica fenotípica (Roossinck, 1997). As mutações ocorrem com maior frequência em genomas constituídos de RNA, devido a falhas da RNA polimerase em corrigir erros de leitura durante a replicação. Já em vírus de DNA, como os begomovírus a atividade da DNA polimerase resulta em níveis de mutações comparativamente mais baixos (Roossinck, 1997).

A existência de dois componentes genômicos na maioria dos begomovírus possibilita a troca de componentes genômicos entre vírus distintos, fenômeno conhecido como pseudo-recombinação (Harrison, 1999). A produção de pseudo-recombinantes viáveis exige uma interação altamente específica da proteína Rep com a região em torno da origem de replicação (Arguello-Astorga *et al.*, 1994).

A recombinação é, sem dúvida, o principal mecanismo gerador de diversidade genética dentro do gênero *Begomovirus* (Zhou *et al.*, 1997; Padidam *et al.*, 1999). A recombinação consiste na incorporação de segmentos genômicos de outro componente durante a replicação. A recombinação pode ocorrer tanto entre variantes de um mesmo vírus bem como entre vírus da mesma espécie e de mesmo gênero, o que pode resultar em recombinantes viáveis (Seal, 2006). Os vírus recombinantes podem tanto perder características quanto adquirir novas informações genéticas de outros vírus (Padidam *et al.*, 1999). O vírus recombinante pode apresentar um novo perfil patogênico e, eventualmente, conferir alguma vantagem seletiva (Monci *et al.*, 2002). Estudos têm mostrado que, em condições de campo, a recombinação em begomovírus ocorre, principalmente, entre moléculas de DNA-A de vírus diferentes (Zhou *et*

al., 1997; Sanz *et al.*, 2000). Em *Begomovirus* três fatores podem contribuir para o aumento de recombinações: infecções mistas; replicação via forma replicativa de dupla fita produzindo um grande número de cópias; e a presença de biótipos dos vetores com um círculo mais amplo de hospedeiras e um grau de adaptação e dispersão mais elevado (Kanevsk *et al.*, 1992; Accoto *et al.*, 1993; Bedford *et al.*, 1994; Padidam *et al.* 1995; Umaharan *et al.*, 1998). O relacionamento filogenético observado entre alguns vírus de gêneros diferentes dentro da família *Geminiviridae* indica que a evolução desses organismos pode ter ocorrido via recombinação entre vírus distintos (Rybicki, 1994; Galvão *et al.*, 2003).

2.5. Transmissão de *Begomovirus*

Os begomovírus são transmitidos quase exclusivamente pela ação da mosca-branca (*Bemisia tabaci* Genn.). Pesquisas recentes demonstraram que existe de fato um complexo de biótipos e espécie crípticas denominado de “complexo *B. tabaci*” (De Barro *et al.*, 2011). O complexo de espécies se encontra amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais, sendo considerada uma das pragas mais destrutivas para a agricultura (Polston & Anderson, 1999; França *et al.*, 2000; De Barro *et al.*, 2011). A distribuição de *B. tabaci* está relacionada à expansão de monoculturas, às condições dos sistemas agrícolas modernos e, principalmente, à grande facilidade de adaptação a uma ampla gama de hospedeiros (Brown, 1994). A mosca-branca pode, além de atuar como vetor, causar danos diretos na planta como: redução de nutrientes ao sugarem a seiva; alterações fisiológicas, como o amadurecimento irregular dos frutos de tomate; e liberação de excreções açucaradas que favorecem o desenvolvimento de fumagina na superfície foliar, interferindo no processo de fotossíntese (Villas-Bôas *et al.*, 1997).

No Brasil a presença de *B. tabaci* foi inicialmente relatada na década de 1920 na Bahia (Lima *et al.*, 2000). A partir de década de 1950, foi proposta a existência de biótipos devido à

observação de que populações morfológicamente idênticas podiam apresentar características distintas quanto à transmissão de vírus e colonização de plantas (Brown *et al.*, 1995). O biótipo A foi predominante no Brasil até 1990/1991, quando foi relatada a introdução do biótipo B, provavelmente via plantas ornamentais importadas dos EUA (França *et al.*, 1996). Desde então, o biótipo B vem se espalhando por todas as regiões produtoras de tomate do Brasil causando severas perdas. O biótipo B apresenta maior grau de adaptação e dispersão, taxas maiores de ovoposição (capacidade reprodutiva mais alta), e uma mais ampla gama de plantas hospedeiras, incluindo o tomateiro e outras solanáceas (Bedford *et al.*, 1994; de Barro *et al.*, 2005). O biótipo Q, ainda exótico para o Brasil, é extremamente importante devido à similaridade com o biótipo B (Scott *et al.*, 2007).

Bemisia tabaci apresenta hábito alimentar polífago colonizando em torno de 600 espécies de plantas hospedeiras em 74 famílias botânicas (Brown *et al.*, 1995; De Barro *et al.*, 2011). Os adultos da mosca-branca se caracterizam por possuírem dois pares de asas membranosas, recobertos por uma substância pulverulenta de cor branca, corpo amarelo-pálido recoberto por cera extra-cuticular e tamanho variando de 1 a 2 mm de comprimento. (Villas-Bôas *et al.*, 1997). Existe um marcante dimorfismo sexual, sendo as fêmeas de tamanho maior que os machos. Todos os estádios do inseto habitam a face abaxial das folhas e apenas o adulto é capaz de migrar para novas plantas (Villas-Bôas *et al.*, 1997). Em média, *B. tabaci* pode apresentar de 11 a 15 gerações por ano e as fêmeas podem depositar de 130 a 300 ovos em 3 a 6 semanas de vida (Silva, 2006). O ciclo de vida do inseto está diretamente ligado à espécie de planta hospedeira e com a temperatura ambiente, sendo que em temperaturas baixas o ciclo de vida tende a aumentar (Villas-Bôas *et al.*, 2002).

A transmissão de begomovírus por mosca-branca é do tipo circulativa (Brown, 1997; Rubinstein & Czosnek, 1997; Ghanin *et al.*, 1998; Morin *et al.*, 1999), de maneira que as partículas virais presentes no floema são ingeridas através do estilete e transportadas pelo

esôfago. As partículas virais são transportadas através da parede do intestino para a hemocele, alcançando as glândulas salivares. Os vírus são então translocados pelo ducto da glândula salivar e excretados pela saliva durante o processo de alimentação (Ghanin *et al.*, 1998).

Para o TYLCV os períodos mínimos de aquisição e inoculação são de 15 e 30 minutos, sendo que a eficiência de transmissão aumenta à medida que esses períodos se ampliam. O período de latência após a aquisição é de 17-24 horas. Uma mosca adulta tem a capacidade de reter o vírus por um período de 7 a 20 dias (Mansour & Al-Musa, 1992; Mehta *et al.*, 1994). A passagem transestadial em adultos de *B. tabaci* biótipo B foi demonstrada com um isolado de begomovírus do Brasil Central, sendo o vírus detectado em ovos, ninfas e adultos provenientes de fêmeas virulíferas. No entanto, a transmissão do vírus por insetos adultos não foi observada (Santos *et al.*, 2003). Por sua vez, TYLCV foi transmitido por duas gerações de *B. tabaci* biótipo B (Ghanin *et al.*, 1998), enquanto *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) teve seu DNA detectado em ovos, ninfas e adultos até a terceira geração (Bosco *et al.*, 2004).

2.6. Gênero *Begomovirus* no Brasil: aspectos econômicos

Os *Begomovirus* são responsáveis pelas principais doenças de plantas em diversas culturas em todo o mundo, entre elas destacam-se o feijão, caupi, tomate, mandioca e algodão (Faria *et al.*, 2000; Morales & Anderson, 2001). No Brasil são os patógenos que mais causam danos econômicos à cultura do tomate (Boiteux *et al.*, 2012). *Begomovirus* vêm sendo relatados no Brasil desde a década de 1930, porém os problemas econômicos começaram a surgir a partir da década de 1980. A intensificação da atividade agrícola é considerada como uma das principais causas de surtos epidêmicos destas doenças (Varma & Malathi, 2003; Navas-Castillo *et al.*, 2011), assim como o surgimento de um novo biótipo (biótipo B) da mosca-branca e a sua explosão populacional (Ribeiro *et al.*, 2003).

Na década de 1960 foram observados sintomas severos de *Begomovirus* em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), que causou pequenas perdas nas lavouras (Costa, 1965). Com o aumento da área de soja no país observou-se um crescimento populacional da *B. tabaci*, o que fez com que a partir da década de 1970 esta doença se tornasse um fator limitante para a produção de feijão no Brasil (Faria, 1994).

Infecções causadas por geminivírus em tomateiro chegaram a causar perdas estimadas em até 100% em algumas áreas no Submédio do Vale do São Francisco (Lima & Haji, 1998). Perdas econômicas provocadas devido à infecção por begomovírus em tomate foram estimadas em 140 milhões de dólares na Flórida (Moffat, 1999). Os *Begomovirus* que infectam tomateiro no Brasil estão distribuídos nas principais regiões produtoras do país desde a década de 1990 (Ribeiro et al., 1994). Geralmente, tomateiros infectados por begomovírus apresentam amarelecimento na base dos folíolos e clareamento das nervuras, evoluindo para mosaico amarelo. Estes sintomas se tornam presentes em toda a planta, seguidos de rugosidade, redução de tamanho e enrolamento das bordas das folhas. Em estágio avançado, a planta apresenta redução na floração e paralisação do crescimento, com consequente perda na produção, principalmente se a infecção ocorrer nos estádios iniciais de desenvolvimento (Pereira-Carvalho, 2009). O “mosaico dourado” e a “clorose infecciosa” foram as primeiras doenças causadas por uma espécie do gênero *Begomovirus* no tomateiro no Brasil (Flores et al., 1960). Matys et al. (1975) purificaram o *Tomato golden mosaic virus* – TGMV, confirmaram que o vírus agente causal destas doenças possuía partículas geminadas.

O TGMV não se tornou importante, tendo apenas relatos esporádicos no Estado de São Paulo na década de 1960 (Flores et al., 1960). Foi a partir de 1992 que se observou a presença de *B. tabaci* biótipo B, introduzido, possivelmente, da Europa ou Estados Unidos pela importação de plantas ornamentais (Melo, 1992). Devido à sua alta taxa de multiplicação,

excelente adaptação às condições climáticas brasileiras e a capacidade de colonizar múltiplas plantas hospedeiras, o biótipo B de *B. tabaci* disseminou-se rapidamente pelo Brasil, incluindo todas as principais regiões produtoras de tomate (Lourenção & Nagai, 1994). Regiões produtoras de tomate na Venezuela, América Central, México, Caribe, Flórida, Espanha e Itália também sofrem os efeitos de uma alta incidência de *Begomovirus*, acarretando grandes perdas na produção (Polston & Anderson, 1997).

Novos relatos de doenças do tipo “mosaico dourado” e “mosaico rugoso” passaram a se intensificar no Brasil após a introdução do biótipo B (Ribeiro *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2008). O sequenciamento parcial da extremidade 5’ do gene da proteína da capa protéica, confirmou a grande diversidade genética de begomovírus nos primeiros surtos epidêmicos registrados em tomateiro no Brasil (Ribeiro *et al.*, 1998; 2003). Em levantamentos conduzidos com amostras coletadas entre os anos de 2001 e 2010, foram identificadas sete diferentes espécies de *Begomovirus* infectando o tomateiro no Distrito Federal: *Tomato rugose mosaic virus*, *Tomato yellow vein streak virus*, *Tomato severe rugose virus*, *Tomato chlorotic mottle virus*, *Tomato mottle leaf curl virus*, *Tomato chlorotic vein virus* e *Okra mottle virus* (Fernandes, 2010). Em levantamentos realizados em plantios de tomate no Sudeste do país, foram encontrados o *Tomato chlorotic mottle virus*, ToYVSV e ToRMV (Souza-Dias, 1996; Faria *et al.*, 1997; Colariccio *et al.*, 2001; Ambrozevicius *et al.*, 2002; Eiras *et al.*, 2002). Para a mesma região, Fernandes (2010) identificou isolados de nove espécies de begomovírus: *Tomato rugose mosaic virus*, *Tomato severe rugose virus*, *Tomato yellow vein streak virus*, *Tomato common mosaic virus*, *Sida mottle virus*, *Tomato leaf distortion virus*, *Okra mottle virus*, *Tomato golden mottle virus* e *Euphorbia yellow mosaic virus*. Nos Estados do Nordeste já foram encontrados o *Tomato mottle leaf curl virus*, *Tomato chlorotic mottle virus*, *Tomato golden mottle virus*, *Tomato severe rugose virus*, *Tomato*

golden mosaic virus e *Tomato yellow vein streak virus* (Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes 2010), com uma predominância do primeiro.

Apesar dos avanços na caracterização dos begomovírus que infectam tomateiro no Brasil ainda é constante a preocupação com este grupo de patógenos, visto que há frequentes relatos de incidência destes variando de 20 a 100% nos campos de produção de tomateiros (Faria *et al.*, 1997; Colariccio, *et al.*, 2001; Giordano *et al.*, 2005a).

3. GENES DE RESISTÊNCIA A *Begomovirus*

Nenhuma estratégia de manejo cultural empregada isoladamente tem demonstrado ser efetiva contra as geminiviruses (Faria *et al.*, 2000). O controle químico de *B. tabaci* apresenta controle relativo, sendo prejudicado pela constante migração de grandes populações do inseto de lavouras mais velhas para lavouras mais novas, e também devido à possibilidade das populações do vetor se tornarem resistentes aos inseticidas. Nesse cenário, as medidas de controle integrado devem enfatizar a eliminação ou a redução das fontes de vírus, a redução da população do inseto vetor e, necessariamente, aumentar os níveis de resistência da planta hospedeira (Harrison, 1985; Gerling 1990).

Os programas de melhoramento de *S. lycopersicum* têm se baseado na busca por genes/alelos de resistência em espécies selvagens e na sua introgressão em genótipos comerciais, visando à obtenção de uma resistência ampla e estável (Boiteux *et al.*, 2012a). Uma estratégia interessante é a piramidização de genes de resistência, que consiste na introgressão de um conjunto de genes efetivos a um ou mais patógenos em um único genótipo, proporcionando uma resistência durável (Vidavisky *et al.*, 2008). Pesquisas para identificação de fontes de resistência começaram por volta de 1970 (Laterrot, 1995). Um

grande número de genes de resistência a pragas e patógenos foram mapeados no genoma do tomateiro, com especial destaque para o cromossomo 6 (Hutton *et al.*, 2012).

As variedades de tomate disponíveis no mercado brasileiro são portadoras, principalmente, do gene *Ty-1*, que confere resistência ao begomovírus monopartido TYLCV, e bons níveis de tolerância também aos begomovírus bipartidos presentes no Brasil (Santana *et al.*, 2001; Boiteux *et al.*, 2007a). A expressão fenotípica do locus *Ty-1* é aumentada em linhas homocigotas, sendo mais eficiente em condições de baixo inóculo. O alelo *Ty-1*, proveniente de *S. chilense* acesso 'LA-1969', foi mapeado por Zamir *et al.* (1994) próximo ao marcador TG97 no cromossomo 6. Localizado próximo à região do centrômero, está intimamente ligado em fase de repulsão (< 1cM) com o gene *Mi*, que confere resistência a espécies de *Meloidogyne*. O *Ty-1* interfere na circulação (movimento célula-a-célula) do vírus no interior da planta (Laterrot, 1993; Giordano, *et al.*, 1994; Zamir, *et al.*, 1994).

O gene *Mi* constitui-se em um dos mais caracterizados locus de resistência a fitopatógenos. Confere resistência efetiva às três espécies mais importantes de nematoides das galhas, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (Roberts & Thomason, 1989). O *Mi* também controla resistência a organismos distintos dos nematoides, tais como o pulgão da batata, *Macrosiphum euphorbiae* (Rossi *et al.*, 1998), e a mosca-branca, *B. tabaci* biótipo Q (Nombela *et al.*, 2003). Entretanto, a resistência conferida pelo gene *Mi* é comprometida por temperaturas do solo acima de 18°C (Dropkin, 1969). O gene *Mi* está localizado no braço curto do cromossomo 6 e pertence a uma classe de genes de resistência denominada NBS-LRR (nucleotide-binding/leucine-rich repeat) (Brommonschenkel *et al.*, 2000; Spassova *et al.*, 2001). O marcador molecular microssatélite SSR-47 é mapeado num 'cluster' gênico no cromossomo 6 do tomateiro a uma distância menor que 1cM do gene *Mi* (Sol Genomics Network, 2008), por sua vez intimamente ligado ao locus *Ty-1* (Zamir *et al.*, 1994).

O alelo *Ty-2* (Hanson *et al.*, 2000), originário do acesso ‘B6013’ da espécie selvagem *S. habrochaites* (Kalloo & Banerjee, 1990), situa-se no braço longo do cromossomo 11 (Hanson *et al.*, 2006). Este gene tem mostrado níveis de resistência contra isolados asiáticos de begomovírus (Hanson, 2000). O gene de resistência *Ty-3* foi relatado em linhagens resistentes derivadas dos acessos de *S. chilense* ‘LA-1932’ e ‘LA-2779’, mapeado no braço longo do cromossomo 6 e está a 15cM do alelo *Ty-1* (Ji *et al.*, 2007). Recentes resultados moleculares e citogenéticos indicaram que o *Ty-3* introgridido de *S. chilense* ‘LA-2779’ sobrepõe-se à localização do *Ty-1* introgridido de *S. chilense* ‘LA-1969’, sugerindo que estes dois genes de resistência podem ser formas alélicas ocupando o mesmo locus (Verlaan *et al.*, 2011). O gene de resistência *Ty-4* foi introgridido de *S. chilense* ‘LA-1932’ e mapeado no braço longo do cromossomo 3. Este gene apresenta um efeito menor que o locus *Ty-3*, não sendo efetivo para todos os isolados de TYLCV (Ji *et al.*, 2009).

Entre as diversas fontes de resistência a begomovírus identificadas destaca-se a linhagem ‘TX-468-RG’, linhagem portadora do gene recessivo *tcm-1*, derivada de *S. lycopersicum* ‘Tyking’ (Royal Sluis, Enkhuizen, The Netherlands) que foi inicialmente caracterizada no Brasil (Giordano *et al.*, 2005b). Estudos adicionais conduzidos para elucidar os mecanismos genéticos e moleculares governados por essa fonte de resistência indicaram que o locus *tcm-1* é efetivo contra espécies de begomovírus de genoma bipartido do Brasil (Pereira-Carvalho *et al.*, 2010) e de genoma monopartido da Europa (García-Cano *et al.*, 2008; Pereira-Carvalho *et al.*, 2010). Estudos de herança nos dois continentes indicaram que a resistência é monogênica recessiva (Giordano *et al.*, 2005b; García-Cano *et al.*, 2008; Pereira-Carvalho, 2009). Diversos genes virais recessivos têm sido descritos em diferentes patossistemas (Maule *et al.*, 2007; LeGall *et al.*, 2011). Mais recentemente, um gene de resistência também de natureza recessiva foi caracterizado em distintas linhagens derivadas de ‘Tyking’ conferindo resistência a isolados de TYLCV na Flórida. Esse gene localizado no

cromossomo 4 foi nomeado como *ty-5* (Hutton *et al.*, 2012). No entanto, o *tcm-1* foi o primeiro gene recessivo descrito para resistência a begomovírus em tomateiro. Até o presente momento, não foram desenvolvidos trabalhos visando identificar marcadores moleculares para monitorar o locus *tcm-1* em programas de seleção assistida.

4. MARCADORES MOLECULARES E MARCADORES BASEADOS NA AMPLIFICAÇÃO DE DNA

4.1. Marcadores genéticos

Existem três tipos de marcadores genéticos: os morfológicos, os bioquímicos e os moleculares. Até meados da década de 1960, os marcadores utilizados em melhoramento eram associados a caracteres morfológicos.

Os **marcadores morfológicos** são aqueles controlados por características fenotípicas de fácil identificação (porte da planta, deficiência de clorofila, cor de flores) associadas e/ou ligadas com outra característica de interesse (Rick & Yoder, 1988). Este tipo de marcador, porém apresenta uma aplicação muito limitada devido ao número restrito dessas mutações.

Os **marcadores bioquímicos** incluem formas (variantes) moleculares de uma mesma enzima (isoenzima) que pode apresentar uma função idêntica ou similar (Markert & Moller, 1959). As principais desvantagens de marcadores bioquímicos é que eles são também limitados em número e são influenciados por fatores ambientais ou pela fase de desenvolvimento da planta (Winter & Kahl, 1995). Apesar de todas essas limitações, os marcadores bioquímicos têm sido ainda extremamente úteis no melhoramento de plantas (Weeden *et al.*, 1994; Eagles *et al.*, 2001).

Os **marcadores moleculares** são aqueles que revelam sítios de variação no DNA genômico ou organelar (Winter & Kahl, 1995; Jones *et al.*, 1997). Esses marcadores

correspondem a diferenças de sequência em regiões do genoma que possíveis de serem detectadas em ensaios analíticos (Gostimsky *et al.*, 1999). Marcadores moleculares de DNA correspondem a segmentos de DNA fisicamente ligados aos loci que determinam características de interesse. Os marcadores de DNA foram inicialmente utilizados no melhoramento de plantas no início da década de 1980 (Soller & Beckmann, 1983). Podem ser evidenciados por métodos que combinam o uso de enzimas de restrição à hibridização entre sequências complementares de DNA, como no caso do “Restriction Fragment Length Polymorphisms” (RFLP) ou pela técnica de “Polymerase Chain Reaction” (PCR). Ao contrário dos marcadores morfológicos e bioquímicos, os marcadores moleculares são praticamente ilimitados em número e não são afetados por fatores ambientais e/ou pela fase de desenvolvimento da planta. Além disso, vários sistemas de marcadores apresentam fácil detecção e análise e se comportarem como “caracteres” de herança simples (Winter & Kahl, 1995).

No processo de transferência de alelos de resistência, os marcadores moleculares podem ser uma ferramenta bastante útil. Esses marcadores, se extremamente ligados aos alelos de resistência, podem ser usados na **seleção assistida por marcadores (MAS)**. O uso de marcadores moleculares é imprescindível na seleção assistida durante o processo de piramidização de alelos de resistência para um mesmo patógeno ou grupo de patógenos. Essa estratégia vem sendo considerada como uma forma de desenvolver cultivares com resistência duradoura e de amplo espectro.

4.2. Marcadores baseados em análises de restrição de DNA

4.2.1. RFLP (‘Restriction Fragment Length Polymorphism’)

O primeiro tipo de marcador de DNA utilizado no melhoramento de plantas foi o RFLP (Helentjaris *et al.*, 1986). Nessa técnica, o DNA total de um indivíduo é inicialmente isolado e

clivado com enzimas de restrição. Os fragmentos obtidos são separados por eletroforese e transferidos para uma membrana de celulose ou náilon. Em seguida, fragmentos específicos podem ser detectados pela incubação da membrana com uma sonda (uma sequência de DNA marcada). Essa sonda irá, por complementaridade entre as bases nitrogenadas, parear com um ou mais dos fragmentos contidos na membrana. A posição da membrana onde a sonda hibridiza pode ser determinada por autorradiografia. O polimorfismo entre diferentes indivíduos decorre de variações nas sequências primárias dos sítios de restrição ou na mudança de suas posições devido a inserções e/ou deleções. As dificuldades inerentes à técnica são o grande número de etapas e o uso, em muitos casos, de sondas radioativas. Esta técnica foi amplamente utilizada na caracterização de germoplasma, estudos filogenéticos, seleção e localização de genes específicos associados com características agronômicas importantes.

4.3. Marcadores baseados na amplificação de DNA

4.3.1. RAPD ('Randomly Amplified Polymorphic DNA')

O "Randomly Amplified Polymorphic DNA" (RAPD) é uma técnica que utiliza a reação de PCR para detectar fragmentos específicos de DNA (Williams *et al.*, 1990). Ao contrário do PCR convencional, o RAPD utiliza apenas um 'primer' curto (cerca de dez nucleotídeos) que, devido ao seu pequeno tamanho, pode parear em diversos pontos do genoma. Caso duas cópias desse 'primer' se liguem às fitas opostas do DNA, a uma distância entre 200 e cerca de 2.000 pares de nucleotídeos, pela reação de PCR, a região flanqueada pelos 'primers' pode ser amplificada. Portanto, é uma técnica que não exige o conhecimento prévio da sequência que está sendo amplificada, ao contrário do PCR convencional. Logo, um mesmo conjunto de 'primers' pode ser usado para amplificar o DNA dos mais diversos tipos de organismos. O RAPD, no entanto, apresenta uma desvantagem que limita, até certo ponto,

o seu uso generalizado. A baixa temperatura necessária para a ligação do ‘primer’ ao molde torna o processo bastante dependente das condições de amplificação. Portanto, modificações no termociclador utilizado, na DNA polimerase e em outros reagentes do mix de reação podem alterar o padrão de amplificação. Para contornar essa limitação, marcadores RAPD podem ser transformados em marcadores SCAR (‘Sequence Characterized Amplified Region’). Neste caso, a banda de DNA correspondente ao marcador RAPD é clonada, sequenciada e dois ‘primers’ (mais longos que o original) são sintetizados e utilizados para amplificar o mesmo marcador, só que agora em uma temperatura de anelamento mais elevada. Nessa condição, o processo de amplificação é mais estável e específico (Paran & Michelmore, 1993).

4.3.2. SSR (‘Simple Sequence Repeats’)

O genoma dos eucariotos apresenta diferentes classes de sequências repetidas. Tais repetições podem ser classificadas de acordo com a sua extensão em: satélites, minissatélites e microsatélites. Marcadores microsatélites ou sequências simples repetidas (SSR) têm sido preferidos a outros tipos de marcadores, pois utilizam a agilidade da técnica de PCR, são codominantes e estão espalhados no genoma em uma frequência alta (Akkaya *et al.*, 1992). Essas sequências são constituídas de repetições de nucleotídeos que ocorrem naturalmente no genoma. Devido a erros que podem ocorrer durante a replicação do DNA, diferentes indivíduos de uma mesma espécie podem apresentar um número variado de repetições dentro de um mesmo microsatélite (Akkaya *et al.*, 1992). Para que o microsatélite seja útil como marcador, ele deve ser inicialmente clonado, sequenciado e amplificado a partir de ‘primers’ que o flanqueiem. Em seguida, os produtos de amplificação são separados em eletroforese conduzida em gel de poliacrilamida devido à pequena diferença de tamanho entre os fragmentos alélicos.

4.3.3. AFLP (‘Amplified Fragment Length Polymorphisms’)

AFLP é uma técnica que combina a clivagem de fragmentos de DNA com enzimas de restrição e a amplificação desses fragmentos via PCR (Vos *et al.*, 1995). Nessa técnica, o DNA é inicialmente clivado com enzimas de restrição e às suas extremidades são ligados adaptadores, que servem de sítios de ligação para ‘primers’ numa reação de PCR. Apesar de ser um tipo de marcador bastante útil para a realização de “fingerprints” de DNA, principalmente quando existem poucas informações disponíveis a respeito do genoma de interesse, o seu uso no melhoramento de plantas tem sido limitado devido a dificuldades metodológicas inerentes à técnica e ao seu elevado custo.

5. LITERATURA CITADA

- ACCOTTO, G. P.; MULLINEAUX, P. M.; BROWN, S. C. & MARIE, D. 1993. Digitaria streak geminivirus replicative forms are abundant in S phase nuclei of infected cells. *Virology*. 195: 257–259.
- AGRAMA, H.A.; J.W. SCOTT. 2006. Quantitative trait loci for *Tomato yellow leaf curl virus* and *Tomato mottle virus* resistance in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131: 267–272.
- AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A. & CREGAN, P.B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*. 132: 1131–1139.
- AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. 2002. Genetic diversity of *Begomovirus* infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*. 27: 372–377.
- ARGUELLO-ASTORGA, G.R.; GUEVARA-GONZALEZ, R.G.; HERRERA-ESTRELLA, L.R.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. 1994. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology*. 203: 90–100.
- BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; ROSELL, R.C.; MARKHAM, P.G. 1994. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci*

- (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Annals of Applied Biology*. 125: 311–325.
- BOITEUX, L.S.; OLIVEIRA, V.R.; SILVA, C.H.; MAKISHIMA, N.; INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; GIORDANO, L.B. 2007a. Reaction of tomato hybrids carrying the *Ty-1* locus to Brazilian bipartite *Begomovirus* species. *Horticultura Brasileira*. 25: 20–23.
- BOITEUX, L.S.; PEREIRA-CARVALHO, R.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; RESENDE, R.O.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. 2007b. Reação de acessos de tomateiro portando o gene *Ty-2* (introgridido de *Solanum habrochaites* f. *glabratum*) a um isolado de begomovírus de genoma bipartido. *Horticultura Brasileira*. 25: S97.
- BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; VIEIRA, J.V.; PEREIRA-CARVALHO, R.C. 2012a. Melhoramento para resistência a doenças virais. p. 89–119 *In*: Melhoramento de Planas para Condições de Estresses Bióticos (BORÉM A; FRITSCH-NETO R, editores). Editora Suprema, Visconde de Rio Branco, MG. 240 pp.
- BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; GIORDANO, L.B.; MELO, P.C.T. 2012b. Melhoramento Genético. *In*: CLEMENTE, F.M.V.T.; BOITEUX, L.S., organizadores. Produção de Tomate para Processamento Industrial. 1ª ed. Brasília, DF: Embrapa, v.1, 31–50.
- BRIDDON, R.W.; BEDFORD, I.D.; TSAI, J.H.; MARKHAM, P.G. 1996. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, *Tomato pseudocurly top virus*, suggests a recombinant origin. *Virology*. 219: 387–394.
- BRIDDON, R.W.; PINNER, M.S.; STANLEY, J.; MARKHAM, P.G. 1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*. 177: 85–94.
- BROMMONSCHENKEL, S.H.; FRARY, A.; TANKSLEY, S.D. 2000. The broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 13: 1130–1138.
- BROWN, J.K. 1994. The status of *Bemisia tabaci* (Genn.) as a pest and vector in world agroecosystems. *FAO Plant Protection Bulletin*. 42: 3–32.
- BROWN, J.K.; FROHLICH, D.R.; ROSELL, R.C. 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annual Review of Entomology*. 40: 511–534.
- CARVALHO, J.L.; PAGLIUCA, L.G. 2007. Tomate: um mercado que não para de crescer globalmente. *Hortifruti Brasil*. 6(58): 6–14.

- CASTILLO, A.G.; COLLINET, D.; DERET, S.; KASHOGGI, A. & BEJARANO, E.R. 2003. Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (REn) and viral replication protein (Rep). *Virology*. 312: 381–394.
- CNPH – Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças (Embrapa Hortaliças). http://www.cnph.embrapa.br/paginas/hortalicas_em_numeros/hortalicas_em_numeros.htm. Consultado em: 10/05/2012.
- COLARICCIO, A.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; CHAGAS, C.M.; SAWAZAKI, H.E.; CHAVES, A.L.R.; EIRAS, M. 2001. Novo surto de geminivirus em *Lycopersicon esculentum* na região de Campinas. *Summa Phytopathologica*. 27(1): 105.
- COSTA, A.S. 1965. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. *FAO Plant Protection Bulletin*. 13: 121–130.
- DE BARRO, P.J.; TRUEMAN, J.W.H.; FROHLICH, D.R. 2005. *Bemisia argentifolii* is a race of *B. tabaci*: The molecular genetic differentiation of *B. tabaci* populations around the world. *Bulletin of Entomological Research*. 95: 193–203.
- DE CASTRO, A.P.; BLANCA, J.M.; DÍEZ, M.J.; VINALS, F.N. 2007. Identification of a CAPS marker tightly linked to the *Tomato yellow leaf curl* disease resistance gene *Ty-1* in tomato. *European Journal of Plant Pathology*. 117: 347–356.
- DROPKIN, V.H. 1969. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: Reversal by temperature. *Phytopathology*. 59 (11): 1632–1637.
- EIRAS, M.; COLARICCIO, A.; CHAVES, A.L.R.; TAVARES, C.A.M.; HAKAWA, R. 2002. Levantamento preliminar de geminivirose em tomateiro no estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*. 28(1): 97.
- EAGLES, H.; BARIANA, H.; OGBONNAYA, F.; REBETZKE, G.; HOLLAMBY, G.; HENRY, R.; HENSCHKE, P.; CARTER, M. 2001. Implementation of markers in Australian wheat breeding. *Australian Journal of Agricultural Research*. 52: 1349–1356.
- ELMER, J. S.; SUNTER, G.; GARDINER, W. E.; BRAND, L.; BROWNING, C. K.; BISARO, D. M. & ROGERS, S.G. 1988. *Agrobacterium*-mediated inoculation of plants with tomato golden mosaic virus DNAs. *Plant Molecular Biology*. 10: 225–234.
- ESPINOZA, W. 1991. Manual de produção de tomate industrial no Vale do São Francisco. 1ª ed. Tropical Gráfica Editora. Brasília, Brasil.
- ETESSAMI, P.; SAUNDERS, K.; WATTS, J. & STANLEY, J. 1991. Mutational analysis of complementary-sense genes of African cassava mosaic virus DNA A. *Journal General Virology*. 72: 1005–1012.

- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT: Agricultural Production/tomato. <http://faostat.fao.org>. Consultado em: 04/05/2012.
- FARIA, J.C. 1994. Mosaico dourado. *In*: SARTORATO, A.; RAVA, C.A. (eds.). Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. 1ª ed. Embrapa – CNPAF. Goiânia, GO. p.262–284.
- FARIA, J.C.; ZERBINI, F.M. 2000. Família *Geminiviridae* – taxonomia, replicação e movimento. Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP). 8: 27–57.
- FARIA, J.C.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; SLACK, S.A.; MAXWELL, D.P. 1997. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease*. 81: 423.
- FARIA, J. C.; BEZERRA, I.C.; ZERBINI, F.M.; RIBEIRO, S.G.; LIMA, M.F. 2000. Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*. 25: 125–137.
- FAUQUET, C.M.; STANLEY, J. 2005. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Archives of Virology*. 150: 2151–2179.
- FAUQUET, C.M.; MAXWELL, D.P.; GRONENBORN, B.; STANLEY, J. 2000. Revised proposal for naming geminiviruses. *Archives of Virology*. 145: 1743–1761.
- FAUQUET, C. M.; BRIDDON, J.; BROW, E.; MORIONES, J.; STANLEY 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology*. 153: 783–821.
- FERNANDES, N.A.N. 2010. Variabilidade genômica e geográfica de espécies de *Begomovirus* em tomateiro e em dois gêneros de plantas daninhas no Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.
- FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K.; KRAMER, M. 1960. Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico*. 26:65-9.
- FONTENELLE, M.R.; LUZ, D.F.; GOMES, A.P.S.; FLORENTINO, J.H.; ZERBINI, F.M.; FONTES, E.P.B. 2007. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus *Tomato Chlorotic mottle virus*. *Virus Research*. 126: 262-267.
- FOOLAD, M.R. 2007. Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *International Journal of Plant Genomics*. 2007:1-53.
- FRANÇA, F.H.; VILLAS-BOAS, G.L.; BRANCO, M.C. 1996. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Annals da Sociedade Brasileira de Entomology Society*. 25:369–372.

- FRANÇA, F.H.; VILLAS-BOAS, G.L.; CASTELO BRANCO, M.; MEDEIROS, M.A. 2000. Manejo integrado de pragas. In: SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B. (eds.). Tomate para processamento industrial. 1ª ed. EMBRAPA-Comunicação para Transferência de Tecnologia. Brasília, DF. p.112-127.
- GALVÃO, R.M.; MARIANO, A.C.; LUZ, D.F.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, E.C.; ZERBINI, F.M.; ALMEIDA, M.R.; FONTES, E.P.B. 2003. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *Journal of General Virology* 84: 715–726.
- GARCÍA-CANO, E.; RESENDE, R.O.; BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L.B.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MORIONES, E. 2008. Phenotypic expression, stability, and inheritance of a recessive resistance to monopartite begomoviruses associated with tomato yellow leaf curl disease in tomato. *Phytopathology*. 98: 618–627.
- GERLING, D. 1990. Whiteflies: Their bionomics, pest status, and management. Intercept, England.
- GHANIM, M.; MORIN, S.; ZEIDAN, M.; CZOSNEK, H. 1998. Evidence for transovarial transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* by its vector the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology* 240: 295–303.
- GIORDANO, L.B.; FONSECA, M.E.N.; SILVA, J.B.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; BOITEUX, L.S. 2005a. Efeito da infecção precoce por *Begomovirus* com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. *Horticultura Brasileira* 23: 815–818.
- GIORDANO, L.B.; SILVA-LOBO, V.L.; SANTANA, F.M.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S. 2005b. Inheritance of resistance to the bipartite *Tomato chlorotic mottle begomovirus* derived from *Lycopersicon esculentum* cv. ‘Tyking’. *Euphytica*. 143: 27–33.
- GONÇALVES NETO, A.C.; SILVA, V.F.; MALUF, W.R.; MACIEL, G.M.; NIZIO, D.A.C.; GOMES, L.A.A.; AZEVEDO, S.M. 2010. Resistência à traça-do-tomateiro em plantas com altos teores de acilglicólidos nas folhas. *Horticultura Brasileira*. 28: 203–208.
- GOTMISKY, S.A.; KOKAEVA, Z.G.; BOBROVA, V.K. 1999. Use of molecular markers for the analysis of plant genome. *Research Journal Genetics*. 11: 538–549.

- GRÖNING, B.R.; HAYES, R.J.; BUCK, W. 1994. Simultaneous regulation of tomato golden mosaic virus coat protein and AL1 gene expression: expression of the AL4 gene may contribute to suppression of the AL1 gene. *Journal of General Virology*. 75: 721–726.
- GUALBERTO, R.; BRAZ, L.T.; BANZATTO, D.A. 2002. Produtividade, adaptabilidade e estabilidade fenotípica de cultivares de tomateiro sob diferentes condições de ambiente. *Pesquisa Agropecuária*. 37: 81–88.
- GUTIERREZ, C. 1999. Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 56: 313–329.
- GUTIERREZ, C. 2000. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *The EMBO Journal*. 19: 792–799.
- GUTIERREZ, C. 2002. Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 60: 219–230.
- GUTIERREZ, C.; RAMIREZ-PARRA, E.; MAR CASTELLANO, M.; SANZ-BURGOS, A.P.; LUQUE, A.; MISSICH, R. 2004. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Veterinary Microbiology*. 98: 111–119.
- HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR, S.; ROBERTSON, D. 1999. Geminivirus: models for plant DNA replication, transcription and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 18: 71–106.
- HANSON, P.M.; BERNACCHI, D.; GREEN, S.; TANKSLEY, S.D.; MUNIYAPPA, V.; PADMAJA, A.S.; MEI, C.H.; KUO, G.; FANG, D.; TZU, C.J. 2000. Mapping a wild tomato introgression associated with *Tomato yellow leaf curl virus* resistance in a cultivated tomato line. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 125: 15–20.
- HANSON, P.M.; GREEN, S.K.; KUO, G. 2006. *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Tomato Genetics Cooperative Report*. 56: 17–18.
- HARRISON, B.D. 1985. Advances in geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology* 23: 83–96.
- HARRISON, B.D.; ROBINSON, D.J. 1999. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (Begomoviruses). *Annual Review of Phytopathology*. 37: 369–398.
- HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAEFER, A.; NIENHUIS J. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*. 72: 761–769.

- HÖFER, P.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G.; JESKE, H.; FRISCHMUTH, T. 1997. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology*. 236: 288–295.
- HUTTON, S.F.; SCOTT, J.W.; SCHUSTER, D.J. 2012. Recessive resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from the tomato cultivar Tyking is located in the same region as *Ty-5* on chromosome 4. *HortScience*. 47: 324–327
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://www.ibge.gov.br/home/>. Consultado em: 28/02/2013.
- ICTV. 2012. ICTV Virus Taxonomy: 2012 Release. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>. Consultado em: 26/06/2012.
- JI, Y.; SCOTT, J.W.; HANSON, P.; GRAHAM, E.; MAXWELL, D.P. 2007. Sources of resistance, inheritance, and location of genetic loci conferring resistance to members of the tomato-infecting begomoviruses. *In: CZOSNEK H (eds.) Tomato yellow leaf curl virus disease: Management, molecular biology, breeding for resistance*. Kluwer, Dordrecht.
- JI, Y.; SCOTT, J.W.; SCHUSTER, D.J. 2009. Molecular mapping of *Ty-4*, a new tomato yellow leaf curl virus resistance locus on chromosome 3 of tomato. *Journal of the American Society for Horticultura Science* 134(2):281–288
- JONES, N.; OUGHAM, H.; THOMAS, H. 1997. Markers and mapping: We are all geneticists now. *New Phytologist* 137: 165–177.
- KALLOO, G.; BANERJEE, M.K. 1990. Transfer of tomato leaf curl virus resistance from *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to *L. esculentum*. *Plant Breeding* 105: 156–159
- KANEVSKI, I. F.; THAKUR, S.; COSOWSKY, L.; SUNTER, G.; BROUGH, C.; BISARO, D.; MALIGA. 1992. Tobacco lines with high copy number of replicating recombinant geminivirus vectors after biolistic DNA delivery. *Plant Journal*. 2: 457–463.
- LAPIDOT, M.; FRIEDMANN, M. 2002. Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Annals of Applied Biology*. 140: 109–127.
- LATERROT, H. 1993. Present state of the genetic control of Tomato yellow leaf curl virus and of the EEC-supported breeding programme. *In: Stamova, L. (eds.). Eucarpia Tomato-93. Proceedings XII the Eucarpia Meeting on Tomato Genetics and Breeding*. 1ª ed. Bulgaria. p.19–24.

- LATERROT, H. 1995. Breeding network to create tomato varieties resistant to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Fruits*. 50: 439–444.
- LAUFS, J.; TRAUT, W.; HEYRAUD, F.; MATZEIT, V.; ROGERS, S.G.; SCHELL, J.; GRONENBORN, B. 1995. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replicator initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 92: 3879–3883.
- LAZAROWITZ, S.G. 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Science*. 11: 327–349.
- LAZAROWITZ, S.G.; BEACHY, R.N. 1999. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell*. 11: 535–548.
- LEGALL, O.; ARANDA, M.A.; CARANTA, C. 2011. Plant resistance to viruses mediated by translation initiation factors. In: *Recent Advances in Plant Virology*. Horizon Scientific Press. 177–194.
- LIMA, L.H.C.; NÁVIA, D.; INGLIS, P.W.; OLIVEIRA, M.R.V. 2000. Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera, Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*. 23:1–5.
- LIMA, M.F.; HAJI, F.N.P. 1998. Mosca-branca \times geminivírus na cultura do tomate no Submédio do Vale do São Francisco. *Horticultura Brasileira*. 15: contracapa.
- LOURENÇÃO, A.L. & NAGAI, H. 1994. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. *Bragantia*. 53: 53–59.
- MANSOUR, A.; AL-MUSA, A. 1992. *Tomato yellow leaf curl virus*: Host range and virus vector relationship. *Plant Pathology*. 41: 122–125.
- MARKERT, C.L.; MOLLER, F. 1959. Multiple forms of enzymes: Issue, ontogenetic and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 45: 753–763.
- MATYIS, J.C.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.A.R; COSTA, A.S. 1975. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica*. 1: 267–274.
- MAYO, M.A.; PRINGLE, C.R. 1998. Virus taxonomy – 1997. *Journal of General Virology*. 79: 649–657.
- MAULE, A.J.; CARANTA, C.; BOULTON, M.I. 2007. Sources of natural resistance to plant viruses: Status and prospects. *Molecular Plant Pathology*. 8: 223–231.

- MEHTA, P.; WYMAN, J.A.; NAKHLA, M.K.; MAXWELL, D.P. 1994. Transmission of Tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology*. 87: 1291–1297.
- MELO, P.C.T. 1992. Mosca-branca ameaça produção de hortaliças. Campinas: Asgrow Sementes. Informe Técnico.
- MICHELSON, I.; ZAMIR, D.; CZOSNEK, H. 1994. Accumulation and translocation of *Tomato yellow leaf curl virus* in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* tolerance gene *Ty-1*. *Phytopathology*. 84: 928–933.
- MOFFAT, A.S. 1999. Geminiviruses emerge as serious crop threat. *Science*. 286:1835–1835.
- MONCI, F.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. 2002. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*. 303: 317–326.
- MOREIRA, G.R.; SILVA, D.J.H.; PICANÇO, M.C.; PETERNELLI, L.A.; CALIMAN, F.R.B. 2005. Divergência genética entre acessos de tomateiro infestados por diferentes populações da traça-do-tomateiro. *Horticultura Brasileira*. 23(4): 893–898.
- NAIKA, S.; JEUDE, J.V.L.; GOFFAU, M.; HILMI, M.; VAN DAM, B. 2006. A cultura do tomate: Produção, processamento e comercialização. *Agrodok 17*. Wageningen: Fundação Agromisa e CTA.
- NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E; SÁNCHEZ-CAMPOS, S. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology*. 49: 219–248.
- NOMBELA, G.; V.M. WILLIAMSON & M. MUNIZ. 2003. The root-knot nematode resistance gene *Mi-1.2* of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16(7): 645–649.
- NOUEIRY, A. O.; LUCAS, W. J.; GILBERTSON, R. L. 1994. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*. 76(5): 925–932.
- OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN, L.A. 1996. DNA structure is required for geminivirus replication origin function. *Journal of Virology*. 70: 148–158.
- PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C.M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*. 265:218–225.
- PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; FOUQUET, C.M. 1995. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology*. 76:249–263.

- PALMER, K.E.; RYBICKI, E.P. 1998. The molecular biology of mastreviruses. *Advances in Virus Research*. 50:183–234.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. 1993. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*. 85:985–993.
- PEREIRA-CARVALHO, R.C.P. 2009. Expressão fenotípica e mecanismo de ação de genes envolvidos na resistência ampla a *Begomovirus* monopartidos e bipartidos em tomate. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília. Brasil, Brasília.
- PEREIRA-CARVALHO, R.C.; BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; DÍAZ-PENDÓN, J.A.; MORIONES, E.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; CHARCHAR, J.M.; RESENDE, R.O. 2010. Multiple resistance to *Meloidogyne* spp. and to bipartite and monopartite *Begomovirus* spp. in wild *Solanum (Lycopersicon)* accessions. *Plant Disease*. 94: 179–185.
- PEREIRA, G.V.N.; MALUF, W. R.; GONÇALVES, L.D.; NASCIMENTO, I.R.; GOMES, L.A.A.; LICURSI, V. 2008. Seleção para alto teor de acilólucos em genótipos de tomateiro e sua relação com a resistência ao ácaro vermelho (*Tetranychus evansi*) e à traça (*Tuta absoluta*). *Ciência agrotecnologia*. 32(3): 996–1004.
- PICÓ, B.; DÍEZ, M. J.; NUEZ, F. 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. 2. The *Tomato yellow leaf curl virus*. A review. *Sci. Horti*. 67:151–196.
- POLSTON, J.E.; ANDERSON, P.K. 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease*. 81(12):1358–1369.
- POLSTON, J.E.; ANDERSON, P.K. 1999. Surgimiento y distribución de geminivirus transmitidos por moscas blancas en tomate en el Hemisferio Occidental. *Manejo Integrado de Plagas*. 53: 24–42.
- POLSTON, J.E. Viral threats to Solanaceous crops in the U.S. http://dpm.ifas.ufl.edu/plant_pest_risk_assessment/documents/EMERGINGVIRUSESINSOLANACEOUSCROP.pdf. Consultado em: 27/05/2012.
- POOMA, W.; GILLETTE, W.K.; JEFFREY, J.L.; PETTY, I.T.D. 1996. Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus systemic movement. *Virology*. 218: 264–268.

- PRINGLE, C.R. 1999. Virus taxonomy – 1999 – The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. *Archives of Virology* 144: 421–429.
- RIBEIRO, S.G.; MELO, L.V.; BOITEUX, L.S.; KITAJIMA, E.W.; FARIA, J.C. 1994. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 19: 330.
- 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, E.M. 1998. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. *Plant Disease*. 82: 830.
- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVÍCIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGÁRIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H.; ZERBINI, F.M. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*. 148: 281–295.
- RICK, C.M.; YODER, J.I. 1988. Classical and molecular genetics of tomato highlights and perspectives. *Annual Review of Genetics*. 22: 281–300.
- ROBERTS, P.A. & I.J. THOMASON. 1989. A review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. *Agricultural Zoology Reviews*. 3: 225–252.
- ROJAS, A. 2004. A Complex of Begomoviruses Affecting Tomato Crops in Nicaragua. Tese de Doutorado. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala, Suécia.
- ROJAS, M.R.; HAGEN, C.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. 2005. Exploiting chinks in the plants armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 361–394.
- ROJAS, M.R.; NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. 1998. Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in form- and Size-specific manner. *Cell*. 95:105–113.
- ROOSSINCK, M.J. 1997. Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology*. 35: 191–209.
- ROSSI, M.; GOGGIN, F.L.; MILLIGAN, S.B.; KALOSHIAN, I.; ULMAN D.E.; WILLIAMSON, V.M. 1998. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 95(17): 9750–9754.

- RYBICKI, E.P. 1994. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of *Geminiviridae*. *Archives of Virology*. 134: 49–77.
- SANDERFOOT, A.A. & LAZAROWITZ, S.G. 1996. Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends Cell Biology*. 6(9): 353–358.
- SANTANA, F.M.; RIBEIRO, S. da G.; MOITA, A.W.; MOREIRA, D.J.; GIORDANO, L. 2001. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. *Euphytica*. 122: 45–51.
- SANTOS, C.D.G.; ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O. 2003. Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca-branca. *Fitopatologia Brasileira*. 28: 664–673.
- SANZ, A.I.; FRAILE, A.; GARCÍA-ARENAL, F.; ZHOU, X.; ROBINSON, D. J.; KHALID, S.; BUTT, T.; HARRISON, B. 2000. Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *Journal General Virology*. 81:1839–1849.
- SAUNDERS, K.; LUCY, A.; STANLEY, J. 1991. DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus are consistent with a rolling circle mechanism of replication. *Nucleic Acids Research*. 19: 2325–2330.
- SCOTT, I.A.W.; WORKMAN, P.J.; DRAYTON, G.M.; BURNIP, G.M. 2007. First record of *Bemisia tabaci* biotype Q in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*. 60: 264–270.
- SEAL, S.E.; VANDENBOSCH, F.; JEGER, M.J. 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 25: 23–46.
- SILVA, S.J.C. 2006. Detecção, caracterização molecular e diversidade genética de *Begomovirus* que infectam Fava (*Phaseolus lunatus* L.). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas. Alagoas, Brasil.
- SOLLER, M.; BECKMANN, J.S. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theoretical Applied Genetics*. 67: 25–33.
- SOUZA-DIAS, J.A.C.; YUKI, V.A.; RIBEIRO, S.G.; RAVAGNANE, V.A. 1996. Risca amarela da nervura do tomateiro é causada por geminivírus que infecta batata. *Summa Phytopathologica*. 22(1): 57.
- SOUZA, J.C.; REIS, P.R. 2003. Principais pragas do tomate para mesa: bioecologia, dano e controle. *Informe Agropecuário*. 24: 79–92.

- SPASSOVA, M.I.; PRINS, T.W.; FOLKERTSMA, R.T.; KLEIN-LANKHORST, R.M.; HILLE, J.; GOLDBACH, R.W.; PRINS, M. 2001. The tomato gene *Sw-5* is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. *Molecular Breeding*. 7: 151–161.
- STANLEY, J. 1995. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggest strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology*. 206: 707–712.
- STANLEY, J.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P.; STENGER, D.C. 2005. *Geminiviridae*. In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (eds.) *Virus Taxonomy*. 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, CA, USA. Elsevier Academic Press. p. 301–326.
- STANLEY, J.; GAY, M.R. 1983. Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. *Nature*. 301: 260–262.
- STENGER, D.C.; REVINGTON, G.N.; STEVENSON, M.C.; BISARO, D.M. 1991. Replication release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: Evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. (PNAS)* 88: 8029–8033.
- SUNTER, G.; BISARO, D.M. 1991. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for a coat protein expression. *Virology*. 180: 416–419.
- SUNTER, G.; HARTITZ, M.D.; BISARO, D.M. 1993. Tomato golden mosaic virus leftward gene expression: Autoregulation of geminivirus replication protein. *Virology*. 195: 275–280.
- TIMMERMANS, M.C.P.; DAS, O.P.; MESSING, J. 1994. Geminiviruses and their use as extrachromosomal replicons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 45: 79–112.
- UMAHARAN, P.; PADIDAM, M.; PHELPS, R.H.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. 1998. Distribution and diversity of geminiviruses in Trinidad and Tobago. *Phytopathology*. 88: 1262–1268.
- UNSELD, S.; FRISCHMUTH, T.; JESKE, H. 2004. Short deletions in nuclear targeting sequences of African cassava mosaic virus coat protein prevent geminivirus twinned particle formation. *Virology*. 318: 90–101.

- USDA – United States Department of Agriculture. www.fas.usda.gov. Consultado em: 19/05/2012.
- VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J.S.; FAUQUET, C. 2004. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal Virology*. 78: 9487–9498.
- VARMA, A.; MALATHI, V.G. 2003. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Ann. appl. Biol.* 142: 145–164.
- VERLAAN, M.G.; SZINAY, D.; HUTTON, S.F.; DE JONG, H.; KORMELINK, R.; RISSER, R.G.F.; SCOTT, J.W.; BAI, Y. 2011. Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping and breeding of the TYLCV resistance gene *Ty-1*. *Plant Journal*. 68: 1093–1103
- VIDAVSKI, F.; CZOSNEK, H.; GAZIT, S.; LEVY, D.; LAPIDOT, M. 2008. Pyramiding of genes conferring resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from different wild tomato species. *Plant Breeding*. 127: 625–631.
- VILELA, N.J.; MELO, P.C.T., BOITEUX, L.S.; CLEMENTE, F.M.V.T. 2012. Perfil Socioeconômico da Cadeia Agroindustrial no Brasil. *In*: CLEMENTE, F.M.V.T.; BOITEUX, L.S., organizadores. *Produção de Tomate para Processamento Industrial*. 1ª ed. Brasília-DF: Embrapa, v.1, 17–27.
- VILLAS-BÔAS, G.L.; FRANCA, F.H.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C. 1997. Manejo integrado da mosca-branca. *Bemisia argentifolli*. Brasília: Embrapa-CNPq. Circular técnica 9.
- VILLAS-BÔAS, G.L.; FRANCA, F.H.; MACEDO, N. 2002. Potencial biótico da mosca-branca *B. tabaci* a diferentes plantas hospedeiras. *Horticultura Brasileira*. 20(1): 71–79.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23: 4407–4414.
- WEEDEN, N.; TIMMERMAN, G. & LU, J. 1994. Identifying and mapping genes of economic significance. *Euphytica*. 73:191–198.
- WEZEL, R.V.; DONG, X.; BLAKE, P.; STANLEY, J.; HONG, Y. 2002. Differential roles of geminivirus Rep and AC4 (C4) in the induction of necrosis in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology*. 3: 461–471.

- WILLIAMS, J.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.; RAFALSKI, A.; TINGEY, S. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531–6535.
- WINTER, P.; KAHL, G. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 11: 438–448.
- ZAMIR, D.; EKSTEIN-MICHELSON, I.; ZAKAY, Y.; NAVOT, N.; ZEIDAN, M.; SARFATTI, M.; ESHED, Y.; HAREL, E.; PLEBAN, T.; VAN-OSS, H.; KEDAR, N.; RABINOWITCH, H.D.; CZOSNEK, H. 1994. Mapping and introgression of *Tomato yellow leaf curl virus* tolerance gene, *Ty-1*. *Theoretical and Applied Genetics*. 88: 141–146.
- ZERBINI, JR. F.M.; DE CARVALHO, M.G.; ZAMBOLIM, E.M. 2002. *Introdução à Virologia Vegetal*. 1ª ed. Editora UFV. Viçosa - Brasil.
- ZHOU, X.; LIU, Y.; CALVERT, L.; MUNOZ, D.; OTIM-NAPE, G. W.; ROBINSON, D.J.; HARRISON, B.D. 1997. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology*. 78: 2101–2111.

CAPÍTULO 2

**EXPRESSÃO FENOTÍPICA E ESPECTRO DE EFICIÊNCIA DE NOVAS
FONTES DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO CONTRA QUATRO
ESPÉCIES DE *Begomovirus* BIPARTIDOS**

EXPRESSÃO FENOTÍPICA E ESPECTRO DE EFICIÊNCIA DE NOVAS FONTES DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO CONTRA QUATRO ESPÉCIES DE *Begomovirus* BIPARTIDOS

RESUMO

Espécies virais do gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) são os patógenos que causam os maiores danos econômicos ao cultivo do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) no mundo. No Brasil, um complexo de espécies de begomovírus de genoma bipartido transmitido por *Bemisia tabaci* biótipo B foi caracterizado infectando o tomateiro. A forma de controle mais eficaz tem sido o emprego de cultivares resistentes aos vírus. No entanto, os dados referentes à eficiência e ao espectro da resposta das diferentes fontes de resistência para as espécies que compõem o complexo de begomovírus bipartidos do Brasil ainda são escassos. Os principais fatores de resistência empregados têm sido os loci *Ty-1* e *Ty-3* derivados de *S. chilense*. No entanto, cinco novos acessos de *S. lycopersicum* com fatores de resistência aparentemente distintos de *Ty-1* e *Ty-3* ('LAM 100', 'LAM 156', 'LAI 132', 'H-24' e 'Ty-198') se mostraram como promissoras fontes em ensaios conduzidos em telado e campo. No presente trabalho, esses acessos foram avaliados via bombardeamento de micropartículas com clones infectivos visando caracterizar a resposta à infecção por quatro espécies do complexo de begomovírus bipartidos do Brasil: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV); *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV). A cultivar 'Viradoro' foi utilizada como controle suscetível e o acesso 'TX-468-RG' (fonte do gene recessivo *tcm-1*) como controle resistente. Os sintomas foram avaliados aos 14, 21, 28 e 45 dias após a inoculação. A acumulação do DNA viral foi confirmada via *Southern Blot* em amostras foliares. 'Viradoro' apresentou sintomas severos e alto acúmulo de DNA para todos os vírus. O acesso 'H-24' (locus *Ty-2* de *S. habrochaites*) se

mostrou suscetível ao ToSRV e ToRMV. A linhagem ‘LAI 132’ mostrou resistência restrita ao ToCMoV. ‘TX-468-RG’, ‘LAM 100’, ‘LAM 156’ e ‘Ty-198’ foram resistentes para todas as espécies virais, sendo, portanto, recomendados como fontes preferenciais em programas de melhoramento para incorporar fatores de resistência de amplo espectro. Uma análise foi conduzida com um painel de marcadores moleculares ligados aos principais loci de resistência a begomovírus caracterizados em tomateiro (*Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4* e *Ty-5/ty-5*). Os resultados indicaram que os acessos ‘LAI 132’, ‘LAM 100’, ‘LAM 156’ e ‘Ty-198’ representam fontes de novos genes e/ou alelos de resistência begomovírus de genoma bipartido.

Palavras-chave: begomovírus, tomate, melhoramento, fontes de resistência.

PHENOTYPIC EXPRESSION AND EFFICIENCY SPECTRUM OF NOVEL TOMATO RESISTANCE SOURCES TO FOUR BIPARTITE *Begomovirus* SPECIES

ABSTRACT

Begomovirus species (family *Geminiviridae*) are the most economically important pathogens of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) throughout the world. In Brazil, a begomovirus complex transmitted by *Bemisia tabaci* biotype B and composed exclusively by species with bipartite genomes has been reported infecting tomatoes. The most efficient control strategy has been the employment of cultivars with virus resistance. However, the amount of information available about the phenotypic expression as well as the spectrum of efficiency of distinct *Solanum* (section *Lycopersicon*) resistance sources to Brazilian begomovirus is still limited. So far, the *Ty-1* and *Ty-3* loci (introgressed from accessions of the wild species *S. chilense*) are the most frequently employed resistance factors. Five new accessions (named as ‘LAM 100’, ‘LAM 156’, ‘LAI 132’, ‘H-24’ and ‘Ty-198’) without the *Ty-1* and *Ty-3* loci were identified as promising sources of resistance after preliminary greenhouse or field assays. In the present work, individual plants of these five accessions as well as the tomato cultivar ‘Viradoro’ (susceptible control) and ‘TX-468-RG’ (resistant control due to the recessive locus *tcm-1*) were evaluated in biolistic assays with infective clones of four begomovirus of the Brazilian complex: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV); *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) and *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV). Plant reaction to each virus was evaluated at 14, 21, 28 and 45 days after inoculation. Virus accumulation was evaluated with Southern Blot assays using a universal probe. ‘Viradoro’ displayed severe symptoms and high virus DNA accumulation in all assays. The line ‘H-24’ (source of *Ty-2* locus introgressed from *S. habrochaites*) displayed a susceptible reaction to ToSRV and ToRMV. The accession ‘LAI

132' displayed a peculiar species-specific resistant reaction only to ToCMoV. The 'TX-468-RG' as well as the accessions 'LAM 100', 'LAM 156' and 'Ty-198' were resistant to all virus species, being, therefore, recommended for preferential use in breeding programs aiming to develop lines with a wide spectrum of resistance. Analyses conducted with a panel of molecular markers linked to all currently characterized begomovirus resistance loci in tomato (*Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4* e *Ty-5/ty-5*) indicated that 'LAI 132', 'LAM 100', 'LAM 156' and 'Ty-198' are sources of either new genes or alleles related to begomovirus resistance.

Keywords: begomoviruses, tomato, breeding, sources of resistance.

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais importantes do ponto de vista do mercado global, sendo um componente essencial na alimentação diária tanto *in natura* quanto como em forma de itens industrializados (Melo *et al.*, 2009). O processo de domesticação do tomateiro favoreceu, aparentemente, uma maior suscetibilidade a uma ampla gama de fatores bióticos e abióticos que influenciam negativamente a sua produtividade, sendo que mais de 200 agentes fitopatogênicos já foram reportados para a cultura (Foolad, 2007). Dentre esses patógenos, destacam-se as espécies virais do gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) que têm sido limitantes para a produção comercial de tomate em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Moriones & Navas-Castillo, 2000; Navas-Castillo *et al.*, 2011). Os begomovírus são transmitidos por um complexo de distintas espécies crípticas relacionadas com *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyrodidae) (De Barro *et al.*, 2011). O material genético desse grupo de vírus é composto por DNA de fita simples (ssDNA) podendo apresentar genoma monopartido (apenas com o componente DNA-A) ou bipartido (DNA-A e DNA-B) (Fauquet *et al.*, 2008). Um número grande de espécies/estirpes de *Begomovirus* já foi relatado infectando naturalmente plantas de tomateiro nas diferentes regiões produtoras do mundo (Jones, 2003; Navas-Castillo *et al.*, 2011).

Os primeiros relatos de doenças causadas por espécies do gênero *Begomovirus* em tomateiro no Brasil foram registrados no Estado de São Paulo na década de 1960 (Flores *et al.*, 1960). Estudos adicionais resultaram na identificação da espécie *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), que foi a primeira a ter a infectividade dos dois componentes (DNA-A e DNA-B) demonstrada e o seu genoma completamente caracterizado (Hamilton *et al.*, 1984). Imediatamente após o primeiro registro do ingresso de *Bemisia tabaci* biótipo B no país no início da década de 1990 (Melo, 1992; Nagai & Lorenção, 1994), foi observada no ano de

1993 uma epidemia de geminivírus em tomateiros em campos experimentais da Embrapa Hortaliças e em dois núcleos rurais no Distrito Federal, se caracterizando como o primeiro registro no país de ocorrência de begomovírus associados com a presença de adultos de *B. tabaci* biótipo B (Ribeiro *et al.*, 1994). Posteriormente, foi feita a primeira caracterização molecular de um begomovírus (*Tomato yellow vein streak virus* – ToYVSV) associado com a cultura do tomateiro após a introdução do biótipo B no Brasil (Faria *et al.*, 1997; Colariccio *et al.*, 2007). Desde então, as doenças causadas por begomovírus têm sido consideradas como o principal fator limitante na produção de tomate no país (Giordano *et al.*, 2005a).

A ampla gama de hospedeiros e a rápida dispersão de *B. tabaci* biótipo B contribuíram para a transferência natural das novas espécies de *Begomovirus* de plantas daninhas e de espécies nativas de solanáceas para o tomate cultivado, resultando no crescimento significativo do número de novas espécies de begomovírus infectando esta cultura (Fernandes *et al.*, 2008). Até o presente, foram caracterizadas em torno de duas dezenas de begomovírus em tomateiro no Brasil, com destaque para as espécies *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e o *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) por apresentarem maior incidência e dispersão geográfica (Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2008; Fernandes, 2010).

A Embrapa Hortaliças e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia mantêm uma coleção de cerca de 1000 isolados de begomovírus de tomateiro e que contém virtualmente todas as espécies do complexo viral descritas infectando essa hortaliça no Brasil e algumas novas em processo de caracterização (Fernandes, 2010). Essa variabilidade do patógeno apresenta uma potencial utilização em programas de melhoramento genético do tomateiro devido à tecnologia disponível para produzir clones infectivos a partir de DNA de espécies de *Begomovirus* mantidas *in vitro* (Ferreira *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008). Desta forma, essas coleções de isolados podem ser exploradas, de maneira mais detalhada, na avaliação de

acessos do gênero *Solanum* (secção *Lycopersicon*), facilitando a caracterização e identificação de fontes de resistência mais específicas e aquelas com um espectro de ação mais amplo (Pereira-Carvalho *et al.*, 2010).

De fato, variedades de tomateiro contendo fatores de resistência de amplo espectro é uma característica imprescindível neste cenário de enorme diversidade de isolados virais no Brasil. Diversas fontes de resistência a espécies de *Begomovirus* foram identificadas em espécies silvestres. Entre essas destacam o locus *Ty-1*, introgridido de *S. chilense* ‘LA-1969’ (Michelson *et al.*, 1994; Zamir *et al.*, 1994) e o locus *Ty-2*, identificado em acessos de *S. habrochaites* (Hanson *et al.*, 2006). O locus *Ty-3* é parcialmente dominante e foi derivado de *S. chilense* ‘LA-2779’, conferindo elevados níveis de resistência a isolados do complexo *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) bem como espécies de genoma bipartido presentes nos Estados Unidos (Ji *et al.*, 2007). O locus dominante *Ty-4* também é derivado de acessos de *S. chilense* e apresenta elevada eficiência contra isolados de TYLCV (Ji *et al.*, 2009). O primeiro gene de resistência a begomovírus de caráter recessivo descrito em tomateiro foi o *tcm-1* presente na linhagem ‘TX-468-RG’ derivada do híbrido comercial *S. lycopersicum* ‘Tyking’ (Giordano *et al.*, 2005b). Esse fator confere resistência a diferentes espécies de begomovírus bipartidos (Giordano *et al.*, 2005b) e monopartidos da Europa (García-Cano *et al.*, 2008; Pereira-Carvalho *et al.*, 2010). Mais recentemente, o locus dominante *Ty-5* (Anbinder *et al.*, 2009) foi caracterizado em acessos derivados de *S. peruvianum* e sua provável variante alélica recessiva (*ty-5*) foi caracterizada, coincidentemente, em linhagens derivadas do híbrido ‘Tyking’ (Hutton *et al.*, 2012).

A informação sobre a expressão fenotípica e o espectro de eficiência dessas fontes de resistência contra as múltiplas espécies do complexo de vírus bipartidos presentes no Brasil ainda permanece incipiente. Essa informação é de grande valia para guiar os programas de melhoramento genético no sentido de identificar genes de interesse para os processos de

incorporação e piramidização em linhagens, cultivares e híbridos adaptados às regiões neotropicais e subtropicais do Brasil. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar via biobalística a eficiência de novos acessos promissores e também de novas fontes de resistência (ainda não caracterizadas) frente a quatro espécies de begomovírus bipartidos (ToSRV, ToRMV, ToYVSV e ToCMoV), componentes do complexo de espécies virais que infectam o tomateiro no Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local do ensaio e acessos avaliados – As inoculações e avaliações foram conduzidas em condição de casa de vegetação na Estação Biológica da UnB e na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Cinco novos acessos de tomateiro foram avaliados no presente ensaio: ‘LAM 100’ (linhagem do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças), ‘LAM 156’ (linhagem de frutos alongados derivada de LAM 100), ‘LAI 132’ (material rasteiro para processamento), a linhagem ‘H-24’ fonte do gene/locus *Ty-2* derivado de *S. habrochaites* (Hanson *et al.*, 2006) e a linhagem ‘Ty-198’ derivada de *S. peruvianum* (Friedmann *et al.*, 1998; Anbinder *et al.*, 2009). A linhagem ‘TX-468-RG’ (fonte do gene *tcm-1*) foi utilizada como controle resistente. Como controle suscetível foi utilizada a cultivar ‘Viradoro’ (Giordano *et al.*, 2000) que é resistente a *Tospovirus* e *Meloidogyne* spp., mas extremamente sensível a begomovírus.

2.2. Preparo dos clones infecciosos para bombardeamento – Para a transformação via eletroporação (eletroporador BIO-RAD), foram utilizadas células competentes de *Escherichia coli* XL-1 blue, conforme as recomendações do fabricante. As células competentes transformadas com o DNA-A e o DNA-B de cada espécie viral foram transferidas para tubos Falcon[®] contendo meio de cultura LB líquido com ampicilina (1 µL /1

mL de ampicilina) e mantidas a 37°C/18 horas sob constante agitação (180-200 rpm). Os plasmídeos contendo o inserto foram purificados utilizando-se o Kit QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol[®] (QIAGEN), de acordo com as especificações do fabricante. O segmento do DNA-A viral foi separado do vetor através da digestão do clone com a enzima de restrição *Kpn*-I (Biolabs) e o segmento de DNA-B foi digerido com a enzima de restrição *Hind*-III (Biolabs). A ligação foi feita utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e mantida a 16°C por 20 horas. O produto da ligação foi visualizado em gel de agarose 1% em TAE 1X corado com brometo de etídeo.

2.3. Ensaios de bombardeamento com clones viriais infectivos – Os componentes de DNA-A e DNA-B de cada uma das espécies virais foram precipitados sobre micropartículas de tungstênio e inoculados através de bombardeamento nos acessos e nas testemunhas. Para a precipitação, 1,3 µg de cada componente genômico foi misturado a 50 µL da suspensão de micropartículas de tungstênio (60 mg/mL), 50 µL de CaCl₂ (2,5 M) e 20 µL de espermidina (0,1 M) e mantidas em temperatura ambiente sob lenta agitação por 10 minutos. A solução foi centrifugada por 10 segundos e lavada com 150 µL de etanol absoluto. Após a lavagem as partículas foram ressuspensas em 30 µL de etanol absoluto. Aliquotas de 3,2 µL da solução foram distribuídas nas membranas carreadoras. Para o bombardeamento a pressão do gás hélio (He) foi ajustada para 1200 psi, duas membranas de ruptura, previamente imersas em isopropanol, foram posicionadas na extremidade da câmara de alta pressão de gás. A tela de retenção e a membrana carreadora (contendo as micropartículas com DNA) foram posicionadas no cilindro de suporte. As plantas a serem bombardeadas foram posicionadas dentro da câmara de vácuo. Em seguida, foi aberta a válvula de entrada de vácuo e depois a válvula de entrada de gás hélio para a câmara de alta pressão. Quando a pressão de vácuo atingiu 27 polegadas de Hg a válvula foi fechada e após 3 segundos foi liberada a onda de

choque através do ativador da válvula solenoide, bombardeando as plantas com as partículas de tungstênio + DNA. Após o bombardeamento as plantas foram mantidas cobertas com plástico transparente durante 48 horas (em câmara de crescimento) e regadas de acordo com a demanda hídrica. As plantas foram posteriormente aclimatadas e transferidas para condições de casa de vegetação.

2.4. Avaliação fenotípica e extração de DNA – As plantas foram avaliadas visualmente aos 14, 21, 28 e 45 dias após o bombardeamento. Foram anotadas as frequências de plantas isentas de sintomas e de plantas exibindo sintomas típicos de infecção por begomovírus (amarelecimento, mosaico, epinastia, clorose internerval, enrugamento severo ou nanismo). Foram coletadas amostras foliares aos 14 dias após o bombardeamento. O DNA total foi extraído de cada planta utilizando uma adaptação do método CTAB (Boiteux *et al.*, 1999).

2.5. Hibridização via Southern Blot – Uma quantidade de 15 µg do DNA total, de cada amostra, foi submetida à eletroforese em gel de agarose (1%). Utilizou-se uma cuba marcada com régua e marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder[®] (Invitrogen). Para realizar a hibridização os géis foram tratados por 10 minutos em HCl (0,125 M), 30 minutos em Solução de Desnaturação (87,66 g NaCl e 20 g NaOH / L de solução) e 30 minutos em Solução de Neutralização (87,66 g de NaCl, 60,5 g de Trizma base, pH 7,5). Estas etapas foram realizadas a temperatura ambiente e sob agitação constante. O gel foi lavado com água destilada entre cada etapa. Em seguida, o DNA foi transferido do gel para a membrana N+ (Amersham Hybond) por capilaridade usando a solução SSC 20X por 18 horas. A hibridização consistiu de duas horas de pré-hibridização com 30 mL de tampão de pré-hibridização (5X SSC, 0,1% N-lauroylsarcosine, 0,02% SDS) suplementado com 1% do agente bloqueador (Roche) em tubos de hibridização a 55 °C em forno de hibridização. Após

este período, foram adicionados 45 µL da sonda previamente desnaturada (95 °C / 5 minutos) para hibridização e os tubos foram mantidos sob agitação a 55 °C por 16 horas. Em seguida, as membranas foram lavadas uma vez por 15 minutos com solução de Lavagem 2X (SSC 2X, 0,1% SDS), à temperatura ambiente, e depois duas vezes por 15 minutos em Solução de Lavagem 1X (SSC 1X, 0,1% SDS) a 55°C sob agitação. Após este período a membrana foi exposta a um filme de revelação. Após a exposição (de no mínimo 18 horas) o filme foi escaneado no aparelho Fujifilm FLA 3000.

2.6. Confirmação do acúmulo viral – Amostras dos acessos ‘LAM 100’ e ‘LAM 156’ bombardeados com ToRMV, do acesso ‘H-24’ bombardeado com ToYVSV, do acesso ‘LAM 100’ bombardeado com ToCMoV e das testemunhas ‘TX-468-RG’ e ‘Viradoro’, foram submetidos a análise via PCR com o par de ‘primers’ degenerados PAL1v1978 (5’-GCA-TCT-GCA-GGC-CCA-ACT-YGT-CTT-TYC-CNG-T-3’) e PARc715 (5’-GAT-TTC-TGC-AGT-TDA-TRT-TYT-CRT-CCA-TCC-A-3’), desenvolvidos para detecção de diferentes espécies de *Begomovirus* (Rojas *et al.*, 1993). O mix para a PCR constituiu de 2 µL de Tampão 10X da enzima *Taq* Polymerase (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 e 500 mM KCl, Invitrogen), 2 µL de dNTPs (2,5 mM, Invitrogen), 0,5 µL de cada ‘primer’, 1,2 µL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 0,2 µL da enzima *Taq* Polimerase (5U/µL, Invitrogen), 10,48 µL de água Milli-Q e 3 µL de DNA, totalizando um mix de volume igual a 20 µL. As amplificações foram efetuadas em termociclador Gene Amp[®] PCR System 9700 programado para 35 ciclos, sendo cada ciclo constituído pelos seguintes parâmetros: Etapa inicial de desnaturação a 94°C durante 4 minutos, seguida por 35 ciclos – desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 52 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 3 minutos – e finalização com uma etapa de extensão a 72 °C durante 7 minutos.

2.7. Análises dos acessos de tomateiro com marcadores moleculares ligados a regiões genômicas contendo genes de resistência a *Begomovirus* previamente caracterizados – Para confirmar e/ou excluir a presença de genes/loci de resistência já previamente caracterizados, os acessos ‘Viradoro’, ‘TX-468-RG’, ‘LAM 100’, ‘LAM 156’, ‘LAI 132’, ‘H-24’ e ‘Ty-198’ foram avaliados com um painel de marcadores moleculares ligados ao locus *Ty-1* (Maxwell *et al.*, 2006); ao locus *Ty-2* (Hanson *et al.*, 2006; Maxwell *et al.*, 2006); ao locus *Ty-3* (Maxwell *et al.*, 2006; Ji *et al.*, 2007); ao locus *Ty-4* (Ji *et al.*, 2009) e à região genômica contendo o locus dominante *Ty-5* (Anbinder *et al.*, 2009) bem como o seu correspondente alelo recessivo *ty-5* (Hutton *et al.*, 2012). O DNA total foi extraído de amostras foliares de acordo com a metodologia de CTAB com algumas modificações (Boiteux *et al.*, 1999). O mix dos ensaios com PCR constituiu de 1,25 µL de Tampão 10X da enzima *Taq* Polymerase (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 e 500 mM KCl, Invitrogen), 1,25 µL de dNTPs (2,5 mM, Invitrogen), 0,5 µL de cada ‘primer’, 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 0,2 µL da enzima *Taq* Polimerase (5 U/µL, Invitrogen), 5,05 µL de água Milli-Q e 3 µL de DNA, totalizando um mix de volume igual a 12,5 µL. As amplificações foram efetuadas em termociclador Gene Amp[®] PCR System 9700 programado para 35 ciclos, sendo cada ciclo constituído pelos seguintes parâmetros: Etapa inicial de desnaturação a 94 °C durante 3 minutos, seguida por 35 ciclos – desnaturação a 94 °C por 30 segundos; anelamento de acordo com cada marcador, extensão a 72 °C por 1 minuto – e finalização com uma etapa de extensão ajustada para 72 °C durante 10 minutos.

Os amplicons obtidos após a reação de PCR para os loci *Ty-1* e *Ty-5/ty-5* foram clivados com a enzima de restrição *Taq-I* e os marcadores dos alelos *Ty-4* foram clivados com *Nal-III*, visando revelar os alelos alternativos (resistente vs. suscetível). O mix das enzimas de restrição apresentou a seguinte composição: 3,01 µL de água Milli-Q, 1,75 µL do tampão 10X, 0,12 µL de BSA e 0,12 µL da enzima de restrição *Taq-I* (10U/ µL, Invitrogen),

totalizando um volume final de 5 µL. O regime utilizado para a enzima *Taq-I* foi de quatro horas a temperatura constante de 65 °C, e pela enzima *Nal-III* foi de uma hora a 37°C. Os marcadores para os loci *Ty-2* e *Ty-3* são do tipo SCAR codominantes que não necessitam de clivagem enzimática. A cada amostra foram adicionados 5 µL de azul de bromofenol e então foram aplicadas em gel de agarose 1,5%, já suplementado com brometo de etídeo. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em tampão TBE (Tris-Borato 45 mM e 1 mM EDTA), a 110V, por um período de aproximadamente 3 horas. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, tendo-se utilizado o marcador 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen) para análise do tamanho dos amplicons/fragmentos obtidos.

3. RESULTADOS

3.1. Eficiência da metodologia de bombardeamento – A maioria das plantas do controle suscetível (‘Viradoro’) apresentou sintomas severos e alto acúmulo de DNA após inoculação com todos os isolados virais, exceto no ensaio utilizando um isolado de *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (**Tabela 1**). Por sua vez, a maioria das plantas do controle resistente ‘TX-468-RG’ se mostrou isenta ou apresentou apenas sintomas suaves após ensaios de inoculação com todas as quatro espécies de begomovírus utilizadas no presente trabalho (**Tabela 1**). Esses resultados indicam que a técnica de bombardeamento com clones infectivos fornece condições metodológicas adequadas para minimizar escapes; reproduzir os sintomas da doença e para avaliar/discriminar acessos com reações contrastantes para infecção por essas quatro espécies virais.

Tabela 1 – Relação de plantas sintomáticas e com infecção sistêmica (hibridização positiva) de sete acessos de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) inoculados via bombardeamento com clones infectivos de quatro espécies virais: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV); *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV).

Espécie viral	LAM 100		LAM 156		LAI 132		H-24		Ty-198		Viradoro		TX-468-RG	
	*PS	**IS	*PS	**IS	*PS	**IS	*PS	**IS	*PS	**IS	*PS	**IS	*PS	**IS
ToCMoV	0/8	0/8	0/8	4/8	0/8	1/8	0/8	5/8	0/8	3/8	8/8	8/8	0/8	5/8
ToYVSV	0/8	3/8	0/8	2/8	8/8	4/8	8/8	0/8	0/8	6/8	4/8	8/8	0/8	4/8
ToRMV	0/8	0/8	0/8	0/8	8/8	8/8	6/8	8/8	0/8	5/8	8/8	8/8	0/8	3/8
ToSRV	0/8	7/8	0/8	6/8	8/8	8/8	4/8	8/8	0/8	0/8	8/8	8/8	2/8	8/8

*PS = número total de plantas sintomáticas / número total de plantas inoculadas; **IS = total de plantas com infecção sistêmica (hibridização positiva) / número total de plantas inoculadas.

3.2. Resposta ao ToCMoV – A análise conjunta da expressão de sintomas (**Tabela 1**) e do acúmulo de DNA de ToCMoV nos tecidos das plantas individuais de cada acesso após análise via hibridização com sondas específicas (**Figura 1**) indicaram que todos os cinco acessos avaliados ('LAM 100', 'LAM 156', 'LAI 132', 'H-24' e 'Ty-198') bem como o controle 'TX-468-RG' são resistentes a esse isolado. Todas as plantas do controle suscetível 'Viradoro' apresentaram sintomas típicos de infecção de begomovírus após inoculação com um isolado de ToCMoV. Na linhagem 'LAM 156' foram detectadas quatro plantas com acúmulo viral inferior à testemunha resistente ('TX-468-RG') e quatro plantas com nenhuma evidência de acúmulo viral (**Figura 1**). No acesso 'LAM 100', não houve acúmulo viral em nenhuma das oito plantas avaliadas. O acesso 'LAI 132' apresentou um acúmulo de ToCMoV quase imperceptível em sete das oito plantas avaliadas. Cinco plantas da linhagem 'Ty-198' não tiveram nenhum acúmulo viral e três apresentaram acúmulo reduzido. Três plantas do acesso 'H-24' não mostraram acúmulo viral e cinco plantas tiveram valores ligeiramente superiores aos da testemunha resistente, no entanto, ainda inferior quando comparado à testemunha suscetível.

3.3. Resposta ao ToYVSV – Apenas o acesso 'LAI 132' se mostrou suscetível ao ToYVSV como indicado pela análise de visual de sintomas (**Tabela 1 e Figura 1**). No entanto, a linhagem 'LAI 132' apresentou duas plantas com acúmulo viral maior que 'TX-

468-RG', duas plantas tiveram acúmulo inferior e quatro plantas não apresentaram nenhum acúmulo viral. O resultado da hibridização indica que essa linhagem apresenta uma resposta peculiar de extrema resistência a replicação do ToYVSV que não impede, contudo, que o vírus possa induzir sintomas severos mesmo em condições de baixo título/acumulação. No acesso 'LAM 156' foram detectadas duas plantas com nenhum acúmulo viral e seis plantas com acúmulo viral semelhante ao observado na testemunha resistente ('TX-468-RG') (**Figura 1**). Na 'LAM 100', um acúmulo viral igual à testemunha resistente foi detectado em cinco plantas, não houve acúmulo viral em três plantas. Três plantas do acesso 'Ty-198' apresentaram acúmulo maior que a testemunha resistente ao passo que outras três plantas apresentaram um menor acúmulo e outras duas plantas com nenhum acúmulo viral. Não foi detectado nenhum acúmulo viral em todas as plantas avaliadas do acesso 'H-24'. Mesmo assim, este acesso foi considerado como sendo suscetível devido à avaliação visual dos sintomas, uma vez que todas as plantas bombardeadas apresentaram sintomas intensos. Quatro plantas (50%) da testemunha suscetível 'Viradoro' não mostraram sintomas evidentes. No entanto, todas as plantas apresentaram evidências de acúmulo viral sistêmico tanto por hibridização quanto via PCR com *primers* universais (**Figura 2**).

3.4. Resposta ao ToRMV – Os acessos 'H-24' e 'LAI 132' foram suscetíveis ao ToRMV de acordo com a frequência de plantas com sintomas severos e pelas hibridizações de DNA (**Tabela 1 e Figura 1**). No entanto, 'LAI 132' teve um acúmulo viral maior que a testemunha resistente e menor que a testemunha suscetível em quatro das oito plantas avaliadas. Para o acesso 'H-24', cinco plantas apresentaram acúmulo viral maior ou igual ao da cultivar suscetível 'Viradoro'. Todas as plantas avaliadas de 'LAM 100' e 'LAM 156' não apresentaram indícios de acúmulo viral sistêmico. No acesso 'Ty-198' cinco plantas avaliadas apresentaram acúmulo viral muito baixo e três não apresentaram nenhum acúmulo.

3.5. Resposta ao ToSRV – A análise conjunta da avaliação visual dos sintomas e do acúmulo de DNA de ToSRV indicou que os acessos ‘H-24’ e ‘LAI 132’ são suscetíveis a essa espécie viral (**Tabela 1**). Todas as plantas do acesso ‘H-24’ exibiram sintomas severos, sendo que seis plantas apresentaram elevado acúmulo viral, maior inclusive que aquele observado na testemunha suscetível (‘Viradoro’). Por sua vez, o acesso ‘LAI 132’ teve um acúmulo viral maior que a testemunha resistente em todas as plantas avaliadas. ‘LAM 156’ apresentou seis plantas com acúmulo viral menor em relação à testemunha resistente (‘TX-468-RG’) e duas plantas com nenhum acúmulo (**Figura 1**). No acesso ‘LAM 100’, um acúmulo viral menor que o da testemunha resistente foi detectado em sete plantas, não havendo acúmulo viral em uma planta. No acesso ‘Ty-198’ oito plantas apresentaram acúmulo menor que a testemunha resistente.

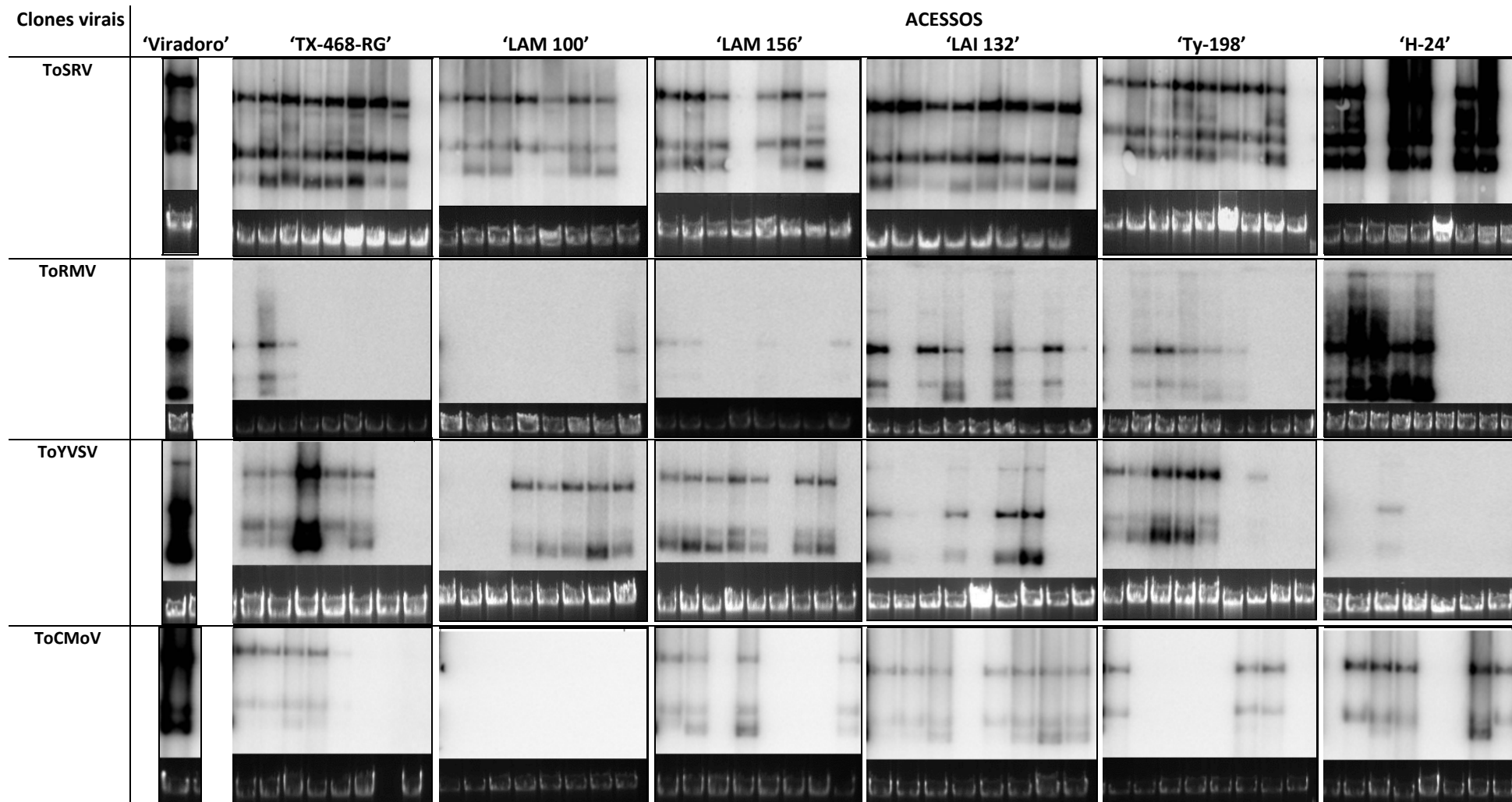


Figura 1 – Detecção de *Begomovirus* em amostras foliares dos acessos 'TX-468-RG', 'LAM 100', 'LAM 156', 'LAI 132', 'Ty-198', 'H-24' e do controle suscetível 'Viradoro'. Amostras foram coletadas aos 14 dias após bombardeamento de micropartículas com *Tomato severe rugose virus* (ToSRV); *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV). Eletroforese em gel de agarose 1%. Marcador molecular: 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen). As amostras foram transferidas para membrana de nylon N+ (Hybond) pelo método Southern Blot. Para a hibridização do DNA foi utilizada sonda radioativa para detecção de *Begomovirus*.

3.6. Confirmação do acúmulo viral via PCR – Foi detectada a presença de *Begomovirus* via PCR com os ‘primers’ universais PAL1v1978 / PARc715 (Rojas *et al.*, 1993) apenas em plantas da testemunha suscetível ‘Viradoro’, como ilustra a Figura 2.

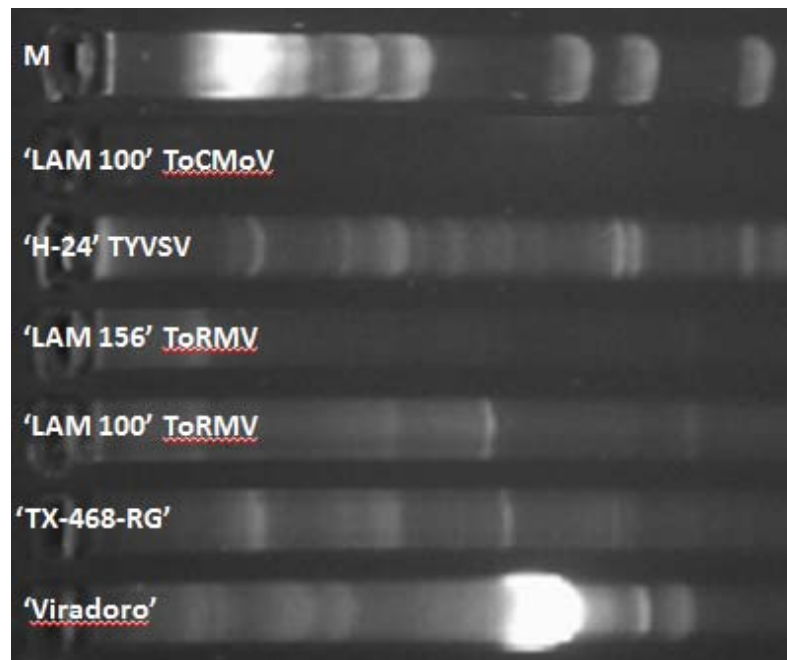


Figura 2 – Análise via PCR com o par de ‘primers’ degenerados PAL1v1978 / PARc715 da acumulação de DNA viral no tecido foliar de acessos de *S. lycopersicum*. **1ª linha:** Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen); **2ª linha:** ‘LAM 100’ inoculado com *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV); **3ª linha:** ‘H-24’ inoculado com *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV); **4ª linha:** ‘LAM 156’ inoculado com *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); **5ª linha:** ‘LAM 100’ inoculado com *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); **6ª linha:** ‘TX-468-RG’ inoculado com *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); **7ª linha:** ‘Viradoro’ inoculado com *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV). As amostras foram coletadas aos 14 dias após o bombardeamento com micropartículas. Eletroforese em gel de agarose 1,5%.

3.7. Análises dos diferentes acessos de tomateiro com marcadores moleculares ligados a regiões genômicas contendo genes de resistência a begomovírus – Os marcadores moleculares disponíveis para os cinco loci de resistência descritos em tomateiro

indicou, como esperado, que o acesso ‘H-24’ possui apenas o marcador ligado ao locus *Ty-2*. O acesso ‘TX-468-RG’ apresentou apenas o marcador associado com o locus *Ty-5/ty-5* (**ver capítulo 3 da presente tese**). Por sua vez, os acessos ‘LAI 132’, ‘Ty-198’ e as linhagens ‘LAM 156’ e ‘LAM 100’ (ambas derivadas de uma fonte ainda não caracterizada) não apresentaram nenhum dos marcadores moleculares associados com todos os genes/loci de resistência descritos até o presente momento em tomateiro. A **Figura 3** ilustra o resultado obtido com os marcadores moleculares relatados acima.

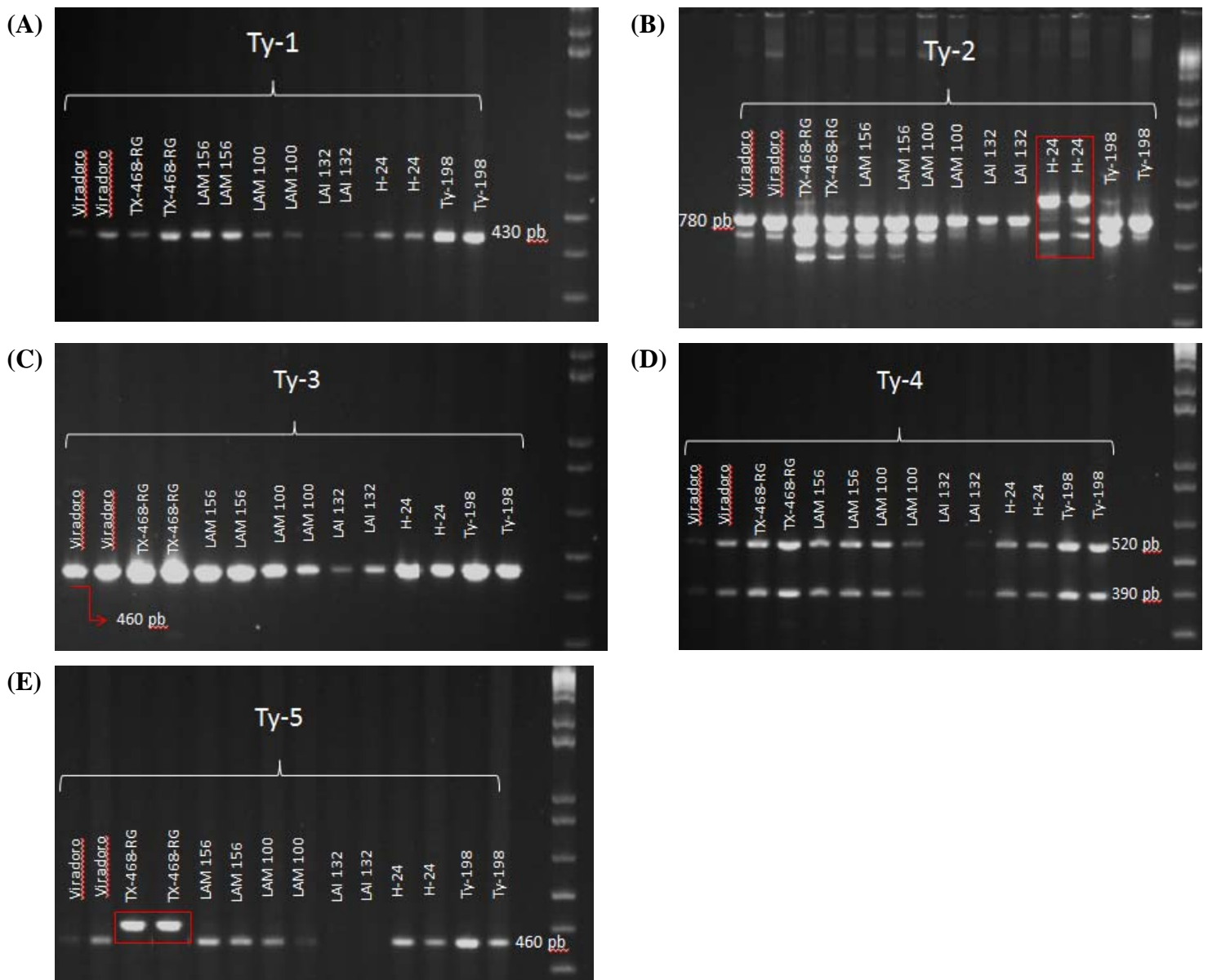


Figura 3 – Análises de acessos de *S. lycopersicum* (‘Viradoro’, ‘TX-468-RG’, ‘LAM 156’, ‘LAM 100’, ‘LAI 132’, ‘H-24’, ‘Ty-198’) com marcadores moleculares ligados a regiões genômicas contendo loci de resistência a *Begomovirus*. **Painel (A)**: locus *Ty-1* (‘primer’ *UW_{Ty} 1*), **Painel (B)**: locus *Ty-2* (‘primer’ *TO302*), **Painel (C)**: locus *Ty-3* (‘primer’ *FLUW 25*), **Painel (D)**: locus *Ty-4* (‘primer’ *Ty4B*) e **Painel (E)**: locus *Ty-5/ty-5* (‘primer’ *SINAC 1*). As amostras foram coletadas aos 14 dias após o bombardeamento com *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder[®] (Invitrogen).

4. DISCUSSÃO

As doenças causadas por *Begomovirus* representam o principal problema biótico para a cultura do tomateiro no Brasil (Boiteux *et al.*, 2012). O grande número de espécies virais que ocorre infectando a cultura e a sua diversidade agravam ainda mais o problema da busca por resistência durável nessa hortaliça. Como solução para o controle dos begomovírus, programas de melhoramento têm buscado fontes de amplo espectro de resistência e introgridindo tais genes no tomateiro cultivado (Vidavski *et al.*, 2008).

Fontes de resistência para *Begomovirus* têm sido identificadas em germoplasma das espécies *S. peruvianum*, *S. habrochaites*, *S. cheesmaniae*, *S. chilense* e *S. pimpinellifolium* (Hassan *et al.*, 1984; Picó *et al.*, 1996; Picó *et al.*, 1999; Vidavski & Czosnek 1998; Ferreira *et al.*, 1999; Santana *et al.*, 2001). No presente trabalho, cinco novos acessos (que se mostraram como promissoras fontes de resistência em ensaios preliminares) foram avaliados contra quatro importantes espécies do complexo de *Begomovirus* de genoma bipartido no Brasil.

A análise via marcadores moleculares indicou que algumas dessas fontes não apresentam os principais genes (ou suas conhecidas variantes alélicas) caracterizados em tomateiro. Análises foram conduzidas para identificar a presença de marcadores moleculares sabidamente ligados aos locus *Ty-1* (introgridido a partir de *S. chilense*); *Ty-2* introgridido de

S. habrochaites (Hanson *et al.*, 2006); *Ty-3* (derivado de ‘LA-2779’); *Ty-4*, também derivado de acessos de *S. chilense* (Ji *et al.*, 2009), e o *Ty-5* (Anbinder *et al.*, 2009) e sua provável variante alélica recessiva (*ty-5*) derivados de *S. peruvianum* (Hutton *et al.*, 2012). Esses ensaios permitiram confirmar que o acesso ‘H-24’ possui apenas o marcador ligado ao locus *Ty-2*. O acesso ‘TX-468-RG’ possui apenas o marcador para o locus *Ty-5/ty-5* presente em algumas linhagens provenientes do híbrido *S. lycopersicum* ‘Tyking’ (ver capítulo 3 da presente tese; Giordano *et al.*, 2005b; Bian *et al.*, 2007 e García-Cano *et al.*, 2008). Todos os demais novos acessos se mostraram desprovidos dos marcadores associados com os loci *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4* e *Ty-5/ty-5*.

Desta forma, uma novidade de grande interesse para o melhoramento genético foi a constatação de que os acessos ‘LAI 132’ (derivado do híbrido ‘Gempride’), ‘Ty-198’ linhagem derivada de acessos de *S. peruvianum* (Friedmann *et al.*, 1998; Anbinder *et al.*, 2009) bem como as linhagens ‘LAM 156’ e ‘LAM 100’ (ambas derivadas de uma mesma fonte ainda não caracterizada) podem representar novas fontes de resistência. Esses acessos poderão contribuir para ampliar a base genética da resistência e para potencial piramidização de diferentes fatores de resistência a esse complexo grupo de patógenos do tomateiro.

Durante o processo de evolução e diversidade genética da planta hospedeira, mecanismos capazes de alterar processos específicos do ciclo infectivo podem ser produzidos e, eventualmente, resultar em respostas de resistência ou tolerância, restringindo ou reduzindo a carga viral em tecidos hospedeiros (Fraser, 1990). No patossistema tomate/begomovírus, títulos virais diferentes podem ser observados dependendo do órgão infectado, da posição da planta, do tempo transcorrido desde o início do processo de infecção e também da constituição genética da planta hospedeira (Pereira-Carvalho, 2009). Em cultivares suscetíveis, a replicação viral e a translocação acontecem antes do aparecimento de sintomas típicos de begomovírus por dias ou semanas (Wege & Pohl, 2007). Entretanto, em cultivares

resistentes, a replicação e translocação podem se manifestar de maneira quase latente com a produção de sintomas atenuados e/ou com atraso temporal quando comparado com plantas suscetíveis (Rom *et al.*, 1993; Picó *et al.*, 1996).

Neste contexto, a resistência da linhagem ‘TX-468-RG’ pode ser, de fato, atribuída à restrição do acúmulo de ToSRV, ToRMV, ToYVSV e ToCMoV, como demonstrou Giordano *et al.* (2005a) para ToCMoV e Pereira-Carvalho (2009) com ToSRV e com espécies de *Begomovirus* monopartido. Desta forma, o acesso ‘TX-468-RG’ apresenta resposta do tipo ‘tolerância’ a doença. De fato, García-Cano *et al.* (2008) identificaram uma limitação no acúmulo sistêmico do vírus e ausência de sintomas como a expressão fenotípica mais marcante da resistência conferida por essa fonte. Estes resultados foram confirmados no presente trabalho, onde o acúmulo viral verificado nas amostras de ‘TX-468-RG’ via hibridização por sonda marcada foram sempre inferiores ao do controle suscetível ‘Viradoro’ (**Figura 1**). O acesso ‘TX-468-RG’ apresentou apenas o marcador associado com o locus *Ty-5* (Anbinder *et al.*, 2009) e sua provável variante alélica recessiva (*ty-5*) (Hutton *et al.*, 2012) que mostraram eficiência contra espécies de genoma monopartido. A presença desse marcador na linhagem ‘TX-468-RG’ sugere que o locus *Ty-5/ty-5* pode também conter os fatores responsáveis por essa ampla gama de respostas de resistência às diferentes espécies de genoma bipartido avaliadas no presente trabalho. Neste sentido, trabalhos adicionais de mapeamento se tornam necessários para demonstrar essa hipótese (ver **Capítulo 3**).

A ausência de acúmulo viral observada na linhagem ‘LAM 100’ quando inoculada com ToRMV e ToCMoV, na linhagem ‘LAM 156’ quando inoculada com ‘ToRMV’ e no acesso ‘H-24’ após inoculação com ToYVSV (**Figura 1**), pode estar relacionada à uma barreira genética à translocação viral a longas distâncias dentro dos tecidos da planta. A movimentação célula-a-célula do vírus é necessária para que aconteça o acúmulo sistêmico do mesmo e o desenvolvimento de sintomas. O fenômeno de restrição à invasão sistêmica pode

resultar do bloqueio físico do vírus para a entrada no floema, ou pela inibição de fatores requeridos pelo vírus para o movimento, ou ainda limitação do movimento viral no floema causado por um sinal produzido pelo reconhecimento do vírus pela hospedeira (Hull, 2002).

Um menor número de plantas infectadas e menor acúmulo viral tem impacto direto na dispersão do vírus pelo vetor (*B. tabaci*). Este aspecto é importante uma vez que a incidência de begomovírus relaciona-se diretamente com a densidade populacional de moscas-brancas. Ou seja, um menor acúmulo sistêmico do vírus em linhagens resistentes pode implicar em menor Y_0 (inóculo inicial) o que pode afetar diretamente a curva de progresso da doença. A resistência observada na linhagem ‘LAI 132’ e de híbridos envolvendo essa linhagem em ensaios a campo pode estar relacionada à eficiência de transmissão do vírus pelo vetor, o que implica em fatores de resistência ao vetor (Pereira-Carvalho, 2009). Isso explica o fato deste acesso ter sido suscetível a três das quatro espécies de *Begomovirus* avaliadas neste trabalho (**Tabela 1**). O mesmo foi observado com o acesso ‘H-24’ que mostrou boa tolerância a um isolado de ToSRV após inoculação via mosca-branca (Boiteux et al., 2007b). A suscetibilidade da linhagem ‘LAI 132’ e do acesso ‘H-24’ identificada em nossos ensaios com bombardeamento em contraste com sua boa resposta em condições de campo e/ou telado indica algum mecanismo de resistência do tipo pré-infeccional (Gómez et al., 2009) como, por exemplo, uma possível não preferência ou repelência desse acesso pela mosca-branca. Essa resposta deve ser confirmada e caracterizada, e em caso positivo, empregada como uma estratégia adicional e complementar de manejo de *Begomovirus*.

A diversidade genética e a dispersão geográfica das espécies de begomovírus devem ser consideradas pelos programas de melhoramento visando aumentar a eficiência e a amplitude das respostas de resistência em cultivares melhoradas. A espécie viral ToYVSV, por exemplo, foi caracterizada inicialmente em tomateiro no Estado de São Paulo (Faria et al., 1997; Colariccio et al., 2007). Em trabalhos posteriores, conduzidos entre os anos de 2003 e 2004

constatou a predominância de ToSRV e ToYVSV e uma potencial nova espécie em isolados coletados em lavouras de tomateiro do Centro-Oeste do Estado de São Paulo (Cotrim *et al.*, 2007). Trabalhos adicionais conduzidos por Castillo-Urquiza (2008) com uma coleção de 115 isolados obtidos em Paty de Alferes (RJ) coletados em 2005 indicou a espécie ToYVSV como sendo predominante. Um levantamento nacional conduzido por Ribeiro *et al.* (2003) em diferentes regiões produtoras do Distrito Federal, Nordeste e Sudeste, mostrou que a ocorrência de ToRMV foi restrita à região Sudeste. Um levantamento conduzido entre os anos de 2004 e 2005 no Distrito Federal, Pernambuco, São Paulo, Bahia, Goiás e Minas Gerais indicou que 61% dos 138 isolados (principalmente de tomateiro para processamento) eram da espécie ToSRV (Fernandes *et al.*, 2008). Outra análise realizada na região Sudeste com 137 isolados coletados durante o ano de 1999 indicou que o ToCMoV foi uma das espécies predominantes em Minas Gerais (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Fernandes, 2010). Estudos conduzidos por Fernandes (2010) envolvendo 252 amostras foliares de tomateiro coletadas entre 2001 e 2010, nas principais áreas produtoras de tomate do Brasil indicaram que na região Nordeste a espécie ToCMoV corresponde a 13,63% dos isolados e na região Centro-Oeste a 1,72%. Por sua vez, a espécie ToRMV corresponde a 17,77% dos isolados da região Sudeste e 29,31% da região Centro-Oeste. O ToYVSV correspondeu a 37,7 % dos isolados da região Sudeste e 32,75 % da região Centro-Oeste. O ToSRV corresponde a 9,09 % dos isolados de região Nordeste, 8,88 % da região Sudeste, 29,31 % da região Centro-Oeste e 100 % da região Sul. Esse cenário de ampla diversidade e distribuição geográfica das espécies virais utilizadas no presente trabalho reforça mais ainda a necessidade de desenvolvimento de linhagens com múltiplos fatores de resistência e/ou com fatores de resistência ampla, visando evitar as indesejáveis “quebras de resistência”. Nesse aspecto as linhagens ‘TX-468-RG’, ‘LAM 100’, ‘LAM 156’ e ‘Ty-198’ se mostram como fontes preferenciais em programas de melhoramento para incorporar fatores de resistência de amplo espectro.

Seria de extremo interesse expandir ainda mais essas avaliações com uma maior gama de espécies virais, incluindo monopartidos. Esses novos ensaios poderão indicar quão amplo pode ser o espectro de resistência dessas linhagens. Para tal podem ser utilizados representantes da coleção de cerca de 1000 isolados de begomovírus de tomateiro mantida pela Embrapa e que contém virtualmente todas as espécies do complexo viral descritas infectando essa hortaliça no Brasil (Fernandes, 2010). Como exemplificado no presente trabalho, essa coleção de isolados, englobando uma ampla variabilidade desse grupo de patógenos, apresenta uma potencial utilização em programas de melhoramento genético do tomateiro devido à tecnologia disponível para produzir clones infectivos a partir de DNA de espécies de *Begomovirus* mantidos *in vitro* (Ferreira *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008).

5. CONCLUSÕES

Diversos fatores afetam a evolução das espécies de *Begomovirus* e que decorrem das complexas interações dessas espécies virais com o vetor, ambiente e planta hospedeira, aumentando as chances de patógenos recombinantes (com um novo conjunto de características biológicas) emergirem (Padidam *et al.*, 1999; Boiteux *et al.*, 2012). Além disso, a alta taxa de recombinação observada em espécies virais do gênero *Begomovirus* pode contribuir para: a emergência de novas doenças, a variabilidade na expressão dos sintomas, expansão do círculo de hospedeiras, para expandir ou regionalizar geograficamente e ecologicamente as epidemias de cada nova espécie viral e também “quebra de resistência (Fernandes, 2010; Boiteux *et al.*, 2012). Devido à vulnerabilidade das variedades comerciais, a rotineira ocorrência de novas espécies de *Begomovirus* e as desvantagens apresentadas pelo controle do inseto vetor uma das alternativas mais eficientes para o manejo baseia-se no uso de variedades resistentes. Neste contexto, as principais estratégias do melhoramento genético têm sido a busca por fontes de resistência duráveis, estáveis e de amplo espectro em espécies

silvestres pertencentes ao gênero *Solanum* (secção *Lycopersicon*) e sua respectiva introgressão em materiais comerciais e/ou a ‘piramidização’ de diferentes genes de resistência em linhagens elite. Dentro dessa estratégia, o presente trabalho representou um importante avanço indicando novas e promissoras fontes de resistência contra importantes espécies do complexo de begomovírus de genoma bipartido presentes no Brasil. Nesse aspecto, as linhagens ‘TX-468-RG’, ‘LAM 100’, ‘LAM 156’ e ‘Ty-198’ se mostram como fontes preferenciais em programas de melhoramento para incorporar fatores de resistência de mais amplo espectro.

6. LITERATURA CITADA

- ANBINDER, I.; REUVENI, M.; AZARI, R.; PARAN, I.; NAHON, S.; SHLOMO, H.; CHEN, L.; LAPIDOT, M.; LEVIN, I. 2009. Molecular dissection of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 119: 519–530.
- AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. 2002. Molecular detection and phylogenetic analysis of tomato- and weed infecting geminiviruses in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*. 27: 372–377.
- BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; SIMON, P.W. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 124: 32–38.
- BOITEUX, L.S.; OLIVEIRA, V.R.; SILVA, C.H.; MAKISHIMA, N.; INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; GIORDANO, L.B. 2007a. Reaction of tomato hybrids carrying the *Ty-1* locus to Brazilian bipartite *Begomovirus* species. *Horticultura Brasileira*. 25: 20–23.
- BOITEUX, L.S.; PEREIRA-CARVALHO, R.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; RESENDE, R.O.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. 2007b. Reação de acessos de tomateiro portando o gene *Ty-2* (introgredido de *Solanum habrochaites* f. *glabratum*) a um isolado de begomovírus de genoma bipartido. *Horticultura Brasileira*. 25: S97.

- BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; VIEIRA, J.V.; PEREIRA-CARVALHO, R.C. 2012. Breeding for Resistance to Viral Diseases. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. (eds.). Plant Breeding for Biotic Stress Resistance. 1ªed. Berlin–Heidelberg: Springer–Verlag. v.1. p.57–79.
- CASTILLO-URQUIZA, G.P.; BESERRA-JÚNIOR, J.E.A.; BRUCKNER, F.P.; LIMA, A.T.M.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; ZERBINI, F.M. 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. Archives of Virology. 153: 1985–1989.
- COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A.L.R.; BERGMANN, J.C.; ZERBINI, F.M.; HARAKAVA, R.; CHAGAS, C.M. 2007. *Tomato yellow vein streak virus*, a new *Begomovirus* on tomato from Brazil: Complete DNA-A sequence and some molecular and biological features. Journal of Plant Pathology. 89: 385–390.
- COTRIM, A.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; NARITA, N.; ZERBINI, F.M.; PAVAN, M.A. 2007. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. Summa Phytopathologica. 33: 300–303.
- DE BARRO, P.J.; LIU, S.S.; BOYKIN, L.M.; DINSDALE, A.B. 2011. *Bemisia tabaci*: A statement of species status. Annual Review of Entomology. 56: 1–19.
- FARIA, J.C.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; SLACK, S.A.; MAXWELL, D.P. 1997. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. Plant Disease. 81: 423.
- FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; MORIONES, E.; STANLEY, J.; ZERBINI, M.; ZHOU, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. Archives of Virology. 153: 783–821.
- FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUE, L.C.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; AVILA, A.C.; INOUE-NAGATA, A.K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite *Begomovirus* species associated to tomatoes. Virus Genes. 36: 251–258.
- FERNANDES, N.A.N. 2010. Variabilidade genômica e geográfica de espécies de begomovírus em tomateiro e em dois gêneros de plantas daninhas no Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.
- FERREIRA, P.T.O.; BEZERRA, I.C.; VILLAS BÔAS, G.L.; RIBEIRO, S.G.; GIORDANO, L.B. 1999. Avaliação de fontes de resistência a isolado de geminivírus com genoma bipartido transmitido por *Bemisia argentifolli* em *Lycopersicon* spp. Fitopatologia Brasileira. 24: 131–135.

- FERREIRA, P.T.O.; LEMOS, T.O.; NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A.K. 2008. One-step cloning approach for construction of agroinfectious begomovirus clones. *Journal of Virological Methods*. 147: 351–354.
- FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K.; KRAMER, M. 1960. Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico*. 26: 65–69.
- FOOLAD, M.R. 2007. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*. 2007:1–53.
- FRASER, R.S.S. 1990. The genetics of resistance to plant-viruses. *Annual Review of Phytopathology*. 28:179–200.
- FRIEDMANN, M., M. LAPIDOT, S. COHEN, M. PILOWSKY, 1998: Novel source of resistance to tomato yellow leaf curl virus exhibiting a symptomless reaction to viral infection. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123: 1004–1007.
- GARCÍA-CANO, E.; RESENDE, R.O.; BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L.B.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MORIONES, E. 2008. Phenotypic expression, stability and inheritance of a recessive resistance to monopartite begomoviruses associated with tomato yellow leaf curl disease in tomato. *Phytopathology*. 98: 618–627.
- GIORDANO, L.B.; DE ÁVILA, A.C.; CHARCHAR, J.M.; BOITEUX, L.S.; FERRAZ, E. 2000. ‘Viradoro’: A Tospovirus-resistant processing tomato cultivar adapted to tropical environments. *HortScience* 35: 1368–1379.
- GIORDANO, L.B.; FONSECA, M.E.N.; SILVA, J.B.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; BOITEUX, L.S. 2005a. Efeito da infecção precoce por *Begomovirus* com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. *Horticultura Brasileira*. 23: 815–818.
- GIORDANO, L.B.; SILVA-LOBO, V.L.; SANTANA, F.M.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S. 2005b. Inheritance of resistance to the bipartite *Tomato chlorotic mottle begomovirus* derived from *Lycopersicon esculentum* cv. ‘Tyking’. *Euphytica*. 143: 27–33.
- GÓMEZ, P.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A.M.; MOURY, B.; ARANDA, M.A. 2009. Genetic resistance for the sustainable control of plant virus diseases: Breeding, mechanisms and durability. *European Journal of Plant Pathology*. 125: 1–22.
- GONZÁLEZ-CABEZUELO, J.M.; CAPEL, J.; ABDAD, J.; TOMÁS, D.M.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MORIONES, E.; LOZANO, R. 2012. Genotyping selection for resistance

- against *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) conferred by *Ty-1* and *Ty-3* genes in tomato. *Molecular Breeding*. 30: 1131–1142.
- HAMILTON, W.D.O.; STEIN, V.E.; COUTTS, R.H.A.; BUCK, K.W. 1984. Complete nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of tomato golden mosaic virus: potential coding regions and regulatory sequences. *The EMBO Journal*. 3: 2197–2205.
- HANSON, P.; GREEN, S.K.; KUO, G. 2006. *Ty-2*, a gene in chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Tomato Genetic Cooperative Report*. 56: 17–18.
- HASSAN, A.A.; MAZYAD, H.M.; MOUSTAFA, S.E.; NAKLA, M.K.; SIMS, W.L. 1984. Inheritance of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* derived from *Lycopersicon cheesmanii* and *Lycopersicon hirsutum*. *Hortscience*. 19: 574–575.
- HULL, R. 2002. *Matthews Plant Virology*, 4th ed. Academic Press. San Diego. ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. In: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>. Consultado em 07/11/2012.
- HUTTON, S.F.; SCOTT, J.W.; SCHUSTER, D.J. 2012. Recessive resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from the tomato cultivar Tyking is located in the same region as *Ty-5* on chromosome 4. *HortScience*. 47: 324–327.
- JI, Y.; SCOTT, J.W.; HANSON, P.; GRAHAM, E.; MAXWELL, D.P. 2007. Sources of resistance, inheritance, and location of genetic loci conferring resistance to members of the tomato-infecting begomoviruses. In: CZOSNEK H (eds.) *Tomato yellow leaf curl virus* disease: Management, molecular biology, breeding for resistance. Kluwer, Dordrecht.
- JI, Y.; SCOTT, J.W.; SCHUSTER, D.J. 2009. Molecular mapping of *Ty-4*, a new tomato yellow leaf curl virus resistance locus on chromosome 3 of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 134: 281–288.
- JONES, D.R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology*. 109: 195–219.
- LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H. 1994. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. *Bragantia*. 53: 53–59.
- MAXWELL, D.P.; MARTIN, C.; SALUS, M.S.; MONTES, L.; MEJÍA, L. 2006. Tagging begomovirus resistance genes. www.plantpath.wisc.edu/GeminivirusResistantTomatoes/Markers. Consultado em 07/11/2012.

- MELO, P.C.T. 1992. Mosca-branca ameaça produção de hortaliças. Campinas: Asgrow Sementes. Informe Técnico Asgrow.
- MELO, P.C.T.; MELO, A.M.T.; BOITEUX, L.S. 2009. Overview and perspectives of tomato breeding for fresh market adapted to mild tropical climates of Brazil. *Acta Horticulturae*. 821: 55–62.
- MICHELSON, I.; ZAMIR, D.; CHOSNEK, H. 1994. Accumulation and translocation of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gene *Ty-1*. *Phytopathology*. 34: 928–933.
- MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. 2000. *Tomato yellow leaf curl virus* an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research*. 71:123–134.
- NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E; SÁNCHEZ-CAMPOS, S. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology*. 49: 219–248.
- PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C.M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*. 265: 218–225.
- PEREIRA-CARVALHO, R.C. 2009. Expressão fenotípica e mecanismos de ação de genes envolvidos na resistência ampla de Begomovírus monopartidos e bipartidos em tomate. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.
- PEREIRA-CARVALHO, R.C.; BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; DÍAZ-PENDÓN, J.A.; MORIONES, E.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; CHARCHAR, J.M.; RESENDE, R.O. 2010. Multiple resistance to *Meloidogyne* spp. and to bipartite and monopartite *Begomovirus* spp. in wild *Solanum* (*Lycopersicon*) accessions. *Plant Disease*. 94:179–185.
- PICÓ, B.; DÍEZ, M.J.; NUEZ, F. 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The *Tomato yellow leaf curl virus* – A review. *Scientia Horticulturae*. 67:151–196.
- PICÓ, B.; DÍEZ, M. J.; NUEZ, F. 1999. Improved diagnostic techniques for *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato breeding programs. *Plant Disease*. 83: 1006–1012.
- RIBEIRO, S.G.; MELO, L.V.; BOITEUX, L.S.; KITAJIMA, E.W.; FARIA, J.C. 1994. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia brasileira*. 19: 330.
- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVÍCIUS, L.P.; DE ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H.;

- ZERBINI, F.M. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*. 148: 281–295.
- ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L.; RUSSELL, D.R.; MAXWELL, D.P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease*. 77: 340–347.
- ROM, M.; ANTIGNUS, Y.; GIDONI, D.; PILOWSKY, M.; COHEN, S. 1993. Accumulation of *Tomato yellow leaf curl virus* DNA in tolerant and susceptible tomato lines. *Plant Disease*. 77: 253–257.
- SANTANA, F.M.; RIBEIRO, S.G.; MOITA, A.W.; MOREIRA-JUNIOR, D.J.; GIORDANO, L.B. 2001. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. *Euphytica*. 122: 45–51.
- VIDAVSKI, F.; CZOSNEK, H. 1998. Tomato breeding lines resistant and tolerant to *Tomato yellow leaf curl virus* issued from *Lycopersicon hirsutum*. *Phytopathology*. 88: 910–914.
- VIDAVSKI, F.; CZOSNEK, H.; GAZIT, S.; LEVY, D.; LAPIDOT, M. 2008. Pyramiding of genes conferring resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from different wild tomato species. *Plant Breeding*. 127: 625–631.
- WEGE, C.; POHL, D. 2007. *Abutilon mosaic virus* DNA B component supports mechanical virus transmission, but does not counteract begomoviral phloem limitation in transgenic plants. *Virology*. 365: 173–186.
- WU, C.Y.; LAI, Y.C.; LIN, N.S.; HSU, Y.H.; TSAI, H.T.; LIAO, J.Y.; HU, C.C. 2008. A simplified method of constructing infectious clones of begomovirus employing limited restriction enzyme digestion of products of rolling circle amplification. *Journal of Virological Methods*. 147: 355–359.
- ZAMIR, D.; EKSTEIN-MICHELSON, I.; ZAKAY, Y.; NAVOT, N.; ZEIDAN, M.; SARFATTI, M.; ESHED, Y.; HAREL, E.; PLEBAN, T.; VAN-OSS, H.; KEDAR, N.; RABINOWITZ, H.D.; CZOSNEK, H. 1994. Mapping and introgression of *Tomato yellow leaf curl virus* tolerance gene, *Ty-1*. *Theoretical and Applied Genetics*. 88: 141–146.

CONCLUSÕES GERAIS

- O presente trabalho representou um importante avanço no sentido de indicar novas e promissoras fontes de resistência que podem ser úteis em programas de melhoramento genético visando incorporar resistência contra importantes espécies do complexo de *Begomovirus* de genoma bipartido presentes no Brasil.
- As linhagens ‘TX-468-RG’, ‘LAM 100’, ‘LAM 156’ e ‘Ty-198’ se mostraram como as fontes preferenciais em programas de melhoramento para incorporar fatores de resistência de mais amplo espectro.
- Os resultados da análise de uma população segregante F₂, proveniente do cruzamento entre ‘TX-468-RG’ e ‘Tospodoro’, avaliada com um isolado do ToSRV, indicaram que o gene *tcm-1* está localizado no topo do cromossomo 6 em ligação estreita com um caracterizado grupamento (‘cluster’) de genes de resistência que engloba os loci *Ty-1* e *Mi*.
- A população de mapeamento analisada mostrou uma independência entre a resposta ao ToSRV e o marcador molecular para o locus *Ty-5/ty-5*, indicando que *tcm-1* e *Ty-5/ty-5* são fatores genéticos distintos e que essa região do cromossomo 4, aparentemente, não contribui na expressão da resistência a essa espécie viral.
- Os nossos resultados e os obtidos com outros grupos de pesquisa usando linhagens derivadas do híbrido ‘Tyking’ indicam que esse material genético possui, aparentemente, uma pirâmide de diferentes genes recessivos do tipo espécie-específico que, quando em associação, se mostram efetivos contra uma ampla gama de espécies de *Begomovirus* de genoma monopartido e bipartido.