



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE BEGOMOVÍRUS EM
TOMATEIROS (*Solanum lycopersicum*) DA REGIÃO
NORDESTE DO BRASIL**

JULIANA OSSE DE SOUZA

Brasília – DF

2014

JULIANA OSSE DE SOUZA

ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIROS (*Solanum lycopersicum*) DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL.

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

Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL**

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Juliana Osse de.

Análise da diversidade de begomovírus em tomateiros (*Solanum lycopersicum*) da região Nordeste do Brasil. / Juliana Osse de Souza.

Brasília, 2014.

p. 101.

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

1. Diversidade – Begomovírus.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Análise da diversidade de begomovírus em tomateiros (*Solanum lycopersicum*) da região Nordeste do Brasil.

*Aos meus pais Eduardo e Cleuser,
pelo apoio durante toda a minha
vida acadêmica, **dedico.***

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata pela dedicação, atenção dispensada, paciência, profissionalismo e principalmente pelos ensinamentos que me possibilitaram um grande crescimento pessoal e profissional.

Ao meu pai Eduardo Carvalho de Souza Filho e à minha mãe Cleuser Maria Campos Osse pelo incentivo e pelas escolhas que fizeram durante toda a minha vida acadêmica que possibilitaram que eu tivesse uma educação de qualidade e chegasse onde estou hoje, além do apoio nos momentos de desânimo e frustração.

À minha irmã Camila Osse de Souza pelo companheirismo e amizade incondicionais.

À minha avó Cleuser de Lourdes Campos Osse que soube entender e perdoar as minhas ausências durante o período do mestrado.

Ao meu namorado Felipe Castelo Branco Medeiros pelo amor, compreensão e paciência em qualquer momento.

À Marina Castelo Branco pelos conselhos e incentivos.

Aos meus colegas de graduação Luís Felipe Alvim, Ismael de Andrade, Felipe Campos, Felipe Cossul, Annelise Mendes, Laryssa Maria, Kleiton Rodrigues pela amizade e momentos de descontração.

Às minhas colegas de mestrado Rafaela Borges, Rayane Lima, Marcella Teles e Josiane Goulart pelo companheirismo e ajuda durante o primeiro ano do mestrado.

Aos meus colegas de laboratório Lúcio Flávio, Oneílson Medeiros, Tadeu de Souza, Leonardo Albuquerque, Sarah Barreto, Mônica Macedo e Pedro Lemos pela paciência e ensinamentos.

À Mariana Hallwass pelas conversas, apoio e ensinamentos durante o meu início no laboratório.

Aos funcionários e professores do Departamento de Fitopatologia pela orientação e atenção dispensada e ensinamentos.

À Universidade de Brasília pela oportunidade de realização da minha graduação e pós-graduação.

À CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

À Embrapa Hortaliças pelo apoio com a infraestrutura para a realização dos trabalhos.

Aos membros da banca examinadora pela atenção dispensada, em especial ao Dr. Robert Gilbertson pela disponibilidade.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da **Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata**, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças – EMBRAPA Hortaliças e Universidade de Brasília (UnB).

ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIROS (*Solanum lycopersicum*) DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL.

JULIANA OSSE DE SOUZA

DISSERTAÇÃO APROVADA em __/__/____ por:

Dr. Robert L. Gilbertson

Plant Pathology Department University of California, Davis (Examinador Externo)

Dr. Renato de Oliveira Resende

Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília (Examinador Interno)

Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata
Embrapa – CNPH (Orientador – Presidente)

Dra. Anelise Franco Orfílio
Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília (Suplente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2014

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO GERAL.....	vii
GENERAL ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVO GERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO 1	6
1. Cultura do tomateiro.....	7
2. Cultivo de tomateiro no Nordeste do Brasil.....	10
3. Doenças no Tomateiro	11
4. Vírus em tomateiro.....	12
5. Família <i>Geminiviridae</i>	13
5.1 Taxonomia da família <i>Geminiviridae</i>	15
5.2 <i>Begomovirus</i>	20
6. <i>Tospovirus</i>	35
7. <i>Tobamovirus</i>	38
8. Controle de viroses em tomateiro.....	40
9. Indução de resistência sistêmica adquirida	42
10. Literatura Citada.....	46
CAPÍTULO 2	60
RESUMO	61
ABSTRACT	62
1. INTRODUÇÃO	63
2. MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1 Amostras de trabalho.....	65
2.2 Amplificação do DNA circular viral por círculo rolante-polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos e restrição do DNA viral (RCA/RFLP)	65
2.3 Escolha das amostras.....	65
2.4 Seleção das enzimas de restrição para clonagem	66
2.5 Digestão com a enzima selecionada.....	66
2.6 Preparação do vetor pBlueScript.....	66
2.7 Ligação, Transformação e Clonagem.....	67
2.8 Sequenciamento e análise das sequências	67
3. RESULTADOS	69

3.1. Amostras do trabalho	69
3.2 Amplificação do DNA circular viral por círculo rolante-polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos e restrição do DNA viral (RCA/RFLP)	70
3.3. Escolha das amostras.....	70
3.4. Seleção das enzimas de restrição para clonagem	71
3.5. Montagem das sequências	71
3.6. Análise das sequências	72
3.7. Análise filogenética.....	75
4. DISCUSSÃO.....	77
5. CONCLUSÕES.....	81
6. LITERATURA CITADA.....	82
CAPÍTULO 3	85
RESUMO	86
ABSTRACT	87
1. INTRODUÇÃO	88
2. MATERIAL E MÉTODOS	90
2.1 Estudo em casa de vegetação, primeiro ano.....	90
2.2 Estudo em casa de vegetação segundo ano	90
2.3 Fonte de inóculo	90
2.4 Produtos e doses	91
2.5 Aplicações	92
2.6 Inoculação	92
2.7 Avaliação dos sintomas	92
3. RESULTADOS	94
3.1 Avaliação dos sintomas	94
4. DISCUSSÃO.....	96
5. CONCLUSÃO	97
6. LITERAURA CITADA	98
CONCLUSÕES GERAIS	100

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Vinte e oito amostras de DNA total, extraído de folhas de tomateiro expressando típicos sintomas de begomovírus da coleção de begomovírus da Embrapa Hortaliças. 69
- Tabela 2. Dezesesseis amostras selecionadas para clonagem do genoma completo do begomovírus e as enzimas de restrição que foram capazes de clivá-las em um único ponto gerando um fragmento de 2,6 kb. 71
- Tabela 3. Primers internos desenhados a partir das primeiras sequências obtidas no sequenciamento dos clones para o sequenciamento do genoma viral completo. 72
- Tabela 4. Comparação entre porcentagem de nucleotídeos da sequência 12098-1 com as sequências de vírus presentes no GenBank mais proximamente relacionadas. 73
- Tabela 5. Tabela que representa a distância entre as sequências das amostras do trabalho e as sequências mais próximas em porcentagem de identidade da sequência de nucleotídeos, cores em tons mais escuros representam porcentagem de identidade de nucleotídeos mais alta, enquanto cores em tons mais claros representam porcentagem de identidade de nucleotídeos mais baixas. 74
- Tabela 6. Sequências de vírus presentes no GenBank que foram escolhidas para o alinhamento e posterior construção da árvore filogenética, com seus acrônimos e números de acesso no GenBank. 75
- Tabela 7. Dose em mililitros de produto em um litro de água, ou em gramas de produtos em um litro de água, dos produtos pulverizados no ensaio em casa de vegetação ano de 2012. 91
- Tabela 8. Quantidade de cada componente presente em cada um dos produtos utilizados no trabalho tanto para o ano de 2012, quanto para o ano de 2013. 91
- Tabela 9. Doses em mililitros de produto em um litro de água, ou em gramas de produtos em um litro de água, dos produtos pulverizados no ensaio em casa de vegetação ano de 2013. 92

Tabela 10. Resultado da infecção viral em cada uma das plantas avaliadas no trabalho, treze dias após a inoculação no ensaio em casa de vegetação ano 2012. 95

Tabela 11. Resultado da infecção viral, em cada uma das plantas avaliadas no trabalho, doze dias após a inoculação no ensaio em casa de vegetação ano 2013. 95

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ordem dos treze primeiros países do mundo em área plantada em hectares de tomateiro. Fonte: FAO (2013). 8
- Figura 2. Ordem dos doze primeiros países do mundo produtores de tomateiros em relação à produção em toneladas. Fonte: FAO (2013). 9
- Figura 3. Rendimento em toneladas por hectare dos doze primeiros países do mundo em produtividade de tomateiro. Fonte: FAO (2013). 9
- Figura 4. Representação esquemática da organização genômica de um begomovírus monopartido. Fonte: King et al. (2011). 23
- Figura 5. Representação esquemática da organização genômica de um begomovírus bipartido. Fonte: King et al. (2011) . 24
- Figura 6. Representação esquemática da organização genômica dos três segmentos dos tospovírus. Fonte: ViralZone (2013b). 36
- Figura 7. Representação esquemática da organização genômica e dos RNAs subgenômicos dos tobamovírus. Fonte: ViralZone (2013a). 39
- Figura 8. Gel de agarose 1% com o polimorfismo de restrição das vinte e oito amostras iniciais do trabalho com o produto da digestão do RCA a partir de DNA total de folhas de tomateiro expressando típicos sintomas de begomovírus com a enzima de restrição MspI. Marcador: 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 70
- Figura 9. Gel de agarose 1% da digestão com MspI de DNA total, extraído de folhas de tomateiro expressando típicos sintomas de begomovírus amplificado por RCA. Os perfis diferentes estão destacados por retângulos e as amostras selecionadas apontadas pelas setas. Marcador: 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 70

Figura 10. Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-Joining, a partir de um alinhamento feito no MUSCLE. Cada sequência é identificada com o acrônimo e o número de acesso. Consultar a Tabela 6 para a identificação dos acrônimos. 76

Figura 11. Foto com a imagem da embalagem de todos os produtos comerciais utilizados em nos anos de 2012 e 2013 no trabalho. 93

RESUMO GERAL

SOUZA, Juliana Osse de. **Análise da diversidade de begomovírus em tomateiros (*Solanum lycopersicum*) da região Nordeste do Brasil**. 2014. 101p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma cultura de grande importância econômica, em todo o mundo, incluindo o Brasil. O cultivo é realizado em todo o Brasil, mas sua produção está concentrada nos estados da região centro-sul, sendo Goiás o maior estado produtor, tanto em área quanto em volume de produção. Apesar da importância da região centro-sul para a tomaticultura, a região Nordeste possui uma expressiva área de cultivo, todavia esta região apresenta uma baixa produtividade. Dentre os problemas fitossanitários que atingem o tomateiro podem-se citar doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus, as viroses mais importantes estão o complexo de espécies do gênero *Tospovirus* que causam o vira-cabeça do tomateiro, o mosaico do tomateiro causado pelo *Tomato mosaic virus*, os potyvírus *Potato virus Y* e *Pepper yellow mosaic virus*, o crinivírus *Tomato chlorosis virus* e o mosaico dourado do tomateiro, causado por várias espécies do gênero *Begomovirus*. Esses vírus são transmitidos por aleirodídeos (moscas-brancas) e causam a doença mais séria do tomateiro na atualidade. Os vírus do gênero *Begomovirus* são caracterizados por partícula icosaédrica geminada e possuir DNA circular de fita simples. O seu genoma é constituído de apenas um componente (monopartido) ou dois componentes conhecidos como DNA-A e DNA-B (bipartido). A identificação do vírus é baseada na análise e comparação do genoma do DNA-A dos isolados. As espécies de begomovírus apresentam uma distribuição geográfica bem definida, em geral, os monopartidos são encontrados no Velho Mundo e os bipartidos são encontrados no Novo Mundo. No Brasil foram relatadas onze espécies de begomovírus infectando tomateiro, além delas existem mais, pelo menos, seis espécies ainda em processo de caracterização. As espécies de begomovírus em tomateiros relatadas no Brasil são encontradas apenas no país e todas são bipartidas. Dentro do Brasil, há uma aparente distribuição diferenciada de espécies. Sabe-se que o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) é predominante na região centro-sul, por outro lado o *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV) parece ser predominante na região Nordeste. O estudo de diversidade e distribuição dos begomovírus ainda é deficiente para a região nordeste brasileira.

O controle de vírus é complexo, mas técnicas de prevenção da entrada dos vírus no campo são altamente eficientes. Contudo, uma vez que, o vírus estão instalados na lavoura, a

única forma de acabar com a infecção viral é através da eliminação das plantas, técnica essa, muitas vezes inviável para o produtor. A resistência sistêmica adquirida induzida por produtos químicos é uma realidade no combate a infecções por fungos e bactérias, entretanto o efeito desses produtos na prevenção de infecções virais é pouco conhecido.

Baseado nessas demandas de pesquisa, os objetivos desse trabalho foram avaliar a diversidade de espécies de begomovírus em tomateiros, a partir de amostras coletadas entre os anos de 2009 e 2011 em diversos estados da região Nordeste do Brasil e norte de Minas Gerais, realizar a caracterização molecular das espécies encontradas e avaliar o efeito de oito produtos comercializados como indutores de resistência às infecções causadas pelos vírus das espécies: *Tomato mosaic virus* (ToMV) e *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Um total de 28 amostras foram avaliadas dos estados de Pernambuco, Bahia, Ceará e Minas Gerais. A primeira análise constituiu na comparação do padrão de restrição de produtos amplificados por círculo rolante (específicos para DNA circular). Por meio dessa análise, dez padrões distintos foram identificados e dezesseis amostras selecionadas para a clonagem do genoma viral. Vinte e dois clones de DNA-A foram obtidos, todos de Tomato mottle leaf curl virus. Na análise filogenética os vírus foram separados em dois grupos, um formado por isolados provenientes dos estados da Bahia e Pernambuco e outro composto por isolados coletados no Ceará, o isolado coletado em Minas Gerais, se agrupou junto com os isolados da Bahia e Pernambuco. Conclui-se, portanto, que Tomato mottle leaf curl virus ainda predomina nos estados localizados na região da caatinga brasileira. Como resultado da avaliação do efeito de indutores de resistência, verificou-se que nenhum dos oito produtos comercializados apresentou efeito de redução de taxa de infecção, retardamento de aparecimento de sintomas ou diminuição da severidade de sintomas após a inoculação mecânica com os vírus ToMV e TSWV. Concluiu-se que, para as condições avaliadas no ensaio, o uso desses produtos não é recomendado para o manejo de vírus como ToMV e TSWV.

Palavras-chave: caatinga, geminivírus, indução de resistência, TMoLCV, ToMV, TSWV.

Orientadora – Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata – Embrapa CNPH

GENERAL ABSTRACT

Souza, Juliana Osse de. **Diversity of begomoviruses in tomato plants cultivated in the north-east part of Brazil.** 2014. 101 p. Dissertation (Master in Plant Pathology) – Universidade de Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

Tomato plants are one of the most important crop in the world and in Brazil. The cultivation is done throughout the country, but its production is concentrated in the states of the south-central regions. Prominent among those is Goiás the largest tomato producing state, on both cultivated area and in raw production. Despite the importance of the south-central region for tomatoes production, the North-East region has also a significant growing area, but a low yield. Among the phytosanitary issues that affect tomatoes, it is listed those caused by fungi, bacteria, nematodes and viruses. Within, the most important viruses there are the species complex of the *Tospovirus* genus that cause the tomato spotted wilt disease, the tomato mosaic caused by *Tomato mosaic virus*, the potyviruses *Potato virus Y* e *Pepper yellow mosaic virus*, the crinivirus *Tomato chlorosis virus* and the tomato golden mosaic disease, caused by several species of the genus *Begomovirus*. These viruses are transmitted by whiteflies and are the source of some of the most serious disease of tomatoes today. The viruses of the *Begomovirus* genus are characterized by icosahedral twinned particles and possess a single stranded DNA. Its genome consists of only one component (monopartite) or two components known as DNA-A and DNA-B (bipartite). The identification of the viruses is based on the analysis and comparison of DNA-A genome of the isolates. The begomoviruses species have a distinct geographic distribution, in general, the monopartites are found in the Old World and the bipartites are found in the New World. In Brazil eleven begomovirus species infecting tomatoes plants were reported and from those there are at least six species still in the characterization process. The begomovirus species in tomato plants reported in Brazil are found only in Brazil and all of them are bipartites. Within Brazil, there is an apparent species differential distribution. It is known that the *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) is prevalent in south-central region, on the other hand the *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV) seems to be prevalent in North-East region. The diversity study and distribution of begomoviruses is poorly done for the Brazilian North-East region isolates.

The viruses control is complex, but prevention techniques of viruses entering in the field are highly efficient. However, once the viruses are established in the field, the only way to stop the viral infection is through the roguing technique that is often impractical for the

grower. The systemic acquired resistance induced by chemical products is a reality in the fight against fungi and bacteria, however, the effect of these products in the prevention of viral infections is poorly understood.

Based on these research demands, the objective of this study was to evaluate the species diversity of the begomoviruses in tomatoes plant, from samples collected from 2009 to 2011 in various states of the North-East region of Brazil and northern Minas Gerais, and to perform molecular characterization of the found species. Also evaluate of the effect of eight products sold as resistance inducers to viral infection: *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). A total of twenty eight samples were evaluated from the states of Pernambuco, Bahia, Ceará and Minas Gerais. The first analysis consisted of the comparison of the restriction profile of the amplified products by rolling circle (specific to circle DNA). From this analysis, ten distinct restriction profiles were identified and sixteen samples were selected for cloning of viral genome. Twenty two DNA-A clones were obtained, all of them of the Tomato mottle leaf curl virus. In the phylogenetic analysis the isolates were separated into two groups, one comprising isolates from Bahia and Pernambuco states and another composed by isolates collected in Ceará state, the isolated from Minas Gerais was grouped together with Bahia and Pernambuco isolates. Therefore, it is concluded that Tomato mottle leaf curl virus still prevails in states located in Brazilian caatinga region. As a result of the evaluating the effect of resistance inducers, it was found that none of the eight market products was effective in reducing the infection rate, delay to the onset of symptoms or decrease in severity symptoms after mechanical inoculation with the viruses ToMV and TSWV. It was concluded that to the conditions assessed in the trial, the use of these products is not recommended for the management of viruses as ToMV and TSWV.

Keywords: caatinga, geminiviruses, inducing resistance, TMoLCV, ToMV, TSWV.

Supervisor: Alice Kazuko Inoue Nagata – Embrapa CNPH

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma hortaliça da família das Solanáceas de grande importância econômica mundial e anualmente são produzidas mais de 159 milhões de toneladas dessa hortaliça em todo o mundo (FAO, 2013). O Brasil é um grande produtor de tomate. Ocupa o oitavo lugar em relação à produção mundial, produzindo em média mais de 4,4 milhões de toneladas por ano. Entretanto sua produtividade é relativamente mais baixa: 61,79 ton/ha, enquanto que o país com maior produtividade do mundo é a Holanda com 478,85 ton/ha (FAO, 2013).

Essa grande discrepância das produtividades entre Brasil e Holanda se deve na maioria dos casos às práticas de condução da cultura que são bem diferentes. Por exemplo, na Holanda a produção de tomateiro é feita em grande parte em estufas de vidro, com o uso de substratos específicos, enquanto que no Brasil a maior parte da produção de tomateiro se dá em campo aberto (Meijaard, 1992, IBGE, 2006, FAO, 2013).

Dentro do Brasil também ocorrem diferenças entre produtividades, porém não tão discrepantes quanto Brasil e Holanda, mas diferentes. Segundo dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (IBGE, 2013), o estado de Goiás é o maior estado produtor de tomate no Brasil, sua área representa 27% da área total de produção de tomateiro no Brasil. O Nordeste brasileiro produz tomate em uma área equivalente a 23% da área nacional, semelhante à área de Goiás. No entanto a produção anual de Goiás gira em torno de 1,4 milhões de toneladas, enquanto que a do Nordeste gira em torno de 633 mil toneladas. Essa diferença deve-se à discrepância da produtividade, já que em Goiás a produtividade foi 78,8 ton/ha e no Nordeste esta foi de aproximadamente 42,1 ton/ha (IBGE, 2013).

A baixa produtividade do Nordeste deve-se em grande parte a fatores como baixo uso de tecnologias, menor apoio da assistência técnica, maior ocorrência de pragas e despreparo

dos produtores rurais (Vidal, 2010). Por outro lado, no estado de Goiás há o predomínio de grandes propriedades rurais com alto uso de tecnologia.

No entanto, apesar das diferenças entre as regiões, sem dúvida, um dos fatores preponderantes para a baixa da produtividade brasileira é a alta incidência de insetos-pragas e doenças. Doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides são muito importantes em campos de produção em todo o Brasil.

Dentre as doenças, aquelas causadas por vírus destacam-se pela complexidade do seu controle. Diversas viroses de importância econômica ocorrem no país: mosaico dourado do tomateiro causado por diversas espécies de begomovírus, mosaico do tomateiro, causado pelo *Tomato mosaic virus*, vira-cabeça do tomateiro causado por diversas espécies do gênero *Tospovirus*, o crinivírus *Tomato chlorosis virus*, o potyvírus *Potato virus Y* e *Pepper yellow mosaic virus* estão entre as viroses mais importantes (Lopes and Ávila, 2005, Cunha et al., 2001, Barbosa et al., 2008, Fernandes et al., 1983). Atualmente a virose de maior ocorrência em campos de tomateiro de todo o Brasil é o mosaico dourado do tomateiro, causado por begomovírus.

Begomovírus apresentam uma grande variabilidade. No Brasil são descritas onze espécies de begomovírus que infectam tomateiro (Flores et al., 1960, Matyis et al., 1975, Fernandes et al., 2006, Ribeiro et al., 2003, Calegario et al., 2007, Fernandes et al., 2008, Castillo-Urquiza et al., 2008, Albuquerque et al., 2012b). Além dessas onze espécies existem pelo menos mais sete novas espécies propostas e a serem caracterizadas (Ribeiro et al., 2003, Ambrozevicius et al., 2002, Inoue-Nagata et al., 2006, Fernandes et al., 2008, Albuquerque et al., 2012b).

As espécies de begomovírus encontradas no Brasil não são relatadas em outros países. Isso sugere que essas espécies são nativas. Provavelmente já estavam presentes em plantas voluntárias e foram transferidos para as plantas cultivadas pelo vetor *Bemisia tabaci* biótipo B

quando da sua introdução no Brasil, estimada para o início da década de 90. (Lourenção and Nagai, 1994, Rocha et al., 2013).

Estudar a diversidade genética de begomovírus permite compreender a dinâmica do surgimento, adaptação de novas espécies, estirpes ou isolados. Entender esses temas é fundamental para se elaborar recomendações adequadas e eficientes de manejo da doença para servir de suporte para os programas de melhoramento com o objetivo de desenvolver materiais com resistência ampla e durável.

Além da diversidade de espécies virais encontradas em tomateiro e a alta incidência de diferentes viroses, o maior problema que os agricultores possuem em relação às viroses é o seu controle, pois não existe como eliminar as viroses sem causar danos às próprias plantas.

Novos produtos, chamados de indutores de resistência têm sido lançados no mercado e possuem uma alta eficiência para controlar doenças causadas por outros patógenos, como fungos e bactérias. Como a resistência sistêmica adquirida (RSA) é uma resposta natural da planta à infecção por patógenos, induzir essa RSA em plantas que possam se infectar por vírus é uma alternativa promissora para o controle de viroses, se não controle, uma redução da infecção por vírus e com isso diminuição nas perdas causadas por viroses.

OBJETIVO GERAL

Estudar a diversidade genética de vírus do gênero *Begomovirus*, a partir de amostras de tomateiro expressando sintomas típicos da doença coletadas entre os anos de 2009 e 2011 em diferentes estados da região Nordeste do Brasil e norte de Minas Gerais, bem como realizar a caracterização biológica e molecular dos isolados encontrados nas amostras. Além de avaliar o efeito de produtos vendidos como indutores de resistência às infecções causadas pelos vírus: *Tomato mosaic virus* (ToMV) e *Tomato spotted wilt virus* (TSWV).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho para análise de diversidade das amostras de tomateiro coletadas entre os anos de 2009 e 2011 foram:

- Analisar a diversidade pela diferença no polimorfismo de restrição de DNA viral amplificado por círculo rolante (RCA/RFLP);
- Selecionar as amostras mais divergentes entre os perfis de restrição;
- Clonar, sequenciar e identificar o DNA-A nas amostras;
- Analisar a relação entre os vírus através da análise filogenética e análise de recombinação;

Os objetivos específicos do trabalho para a avaliação do efeito de indutores de resistência à infecção viral foram:

- Aplicar produtos indutores de resistência encontrados no mercado, antes e depois da inoculação de duas espécies virais;
- Inocular mecanicamente ToMV e TSWV;
- Avaliar o tempo para o aparecimento de sintomas em comparação com o controle de aplicação com água;

- Avaliar a severidade dos sintomas em comparação com o controle de aplicação com água;
- Avaliar diferenças entre os tratamentos com diferentes produtos.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. Cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma dicotiledônea da família das Solanáceas, cujo centro primário de origem é um estreito território limitado pela Cordilheira dos Andes, oceano Pacífico, norte do Chile e do Equador na América do Sul, onde se encontra seu maior centro de diversidade (Filgueira, 2008).

Como a temperatura em sua região de origem é mais amena, com médias entre 15 e 19°C, e altitudes maiores de 1.000 metros, o tomateiro se desenvolve melhor nessas condições, porém a planta pode se desenvolver em diferentes climas, como tropical de altitude, subtropical e temperado, sendo, portanto, possível o seu cultivo em várias partes do mundo (Filgueira, 2008, Silva et al., 2006).

É recomendável que se plante o tomateiro em épocas nas quais a precipitação e a umidade relativa do ar sejam mais baixas, para evitar a alta incidência de doenças que são favorecidas pela alta umidade. O tomateiro é uma planta com grandes exigências nutricionais, a correção do solo é essencial e é importante evitar o plantio em solo com alta retenção de água e suscetível ao encharcamento (Filgueira, 2008, Silva et al., 2006).

A condução e manejo da cultura são variáveis e a característica mais importante para definir o tipo de condução e o seu manejo é o hábito de crescimento. Este é em geral dividido em duas categorias, de crescimento determinado e de crescimento indeterminado.

No tipo de crescimento determinado, a planta tem crescimento limitado e com a emissão dos botões florais há uma redução no seu crescimento. Esse tipo é conhecido popularmente como tomateiro rasteiro e sua produção é destinada principalmente para o processamento agroindustrial. Em geral, a colheita é mecanizada (Filgueira, 2008, Clemente and Boiteux, 2012).

Já no tipo de crescimento indeterminado, a planta continua o seu crescimento mesmo após o aparecimento e desenvolvimento dos primeiros botões florais, portanto, em uma

mesma planta podem existir frutos maduros e botões florais ainda se abrindo. Neste caso, a colheita tem de ser parcelada, podendo ser feita até mais de uma vez por semana. A fase de colheita pode durar até quatro meses dependendo do tipo de manejo empregado. A planta de tomateiro deve ser conduzida com estacas ou filhote e amarradas. Nesse tipo de condução podem existir dois tipos de manejo diferenciado, em campo aberto e em estufas (Filgueira, 2008, Shankara Naika, 2006).

O tomateiro é uma das hortaliças mais cultivadas no mundo inteiro. O principal produtor de tomate é a China tanto em área colhida, quanto em volume de produção (Fig. 1). Entretanto, a produtividade chinesa é baixa, com 49,27 ton/ha, colocando-a em 47º lugar. A produção brasileira comporta-se de forma semelhante. O Brasil ocupa o 13º lugar em área colhida e 8º em produção (Fig. 1 e 2), porém é o 18º em produtividade, com uma média de 61,79 ton/ha, bastante inferior a Holanda, primeira colocada, com produtividade superior a 400 ton/ha (Fig. 3) (FAO, 2013).

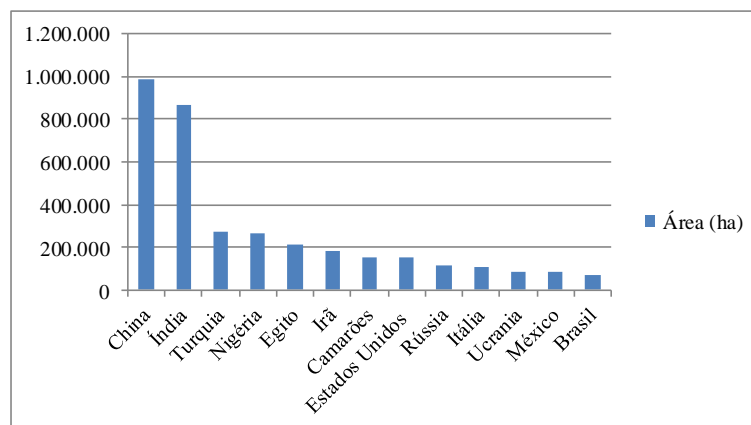


Figura 1. Ordem dos treze primeiros países do mundo em área plantada em hectares de tomateiro. Fonte: FAO (2013).

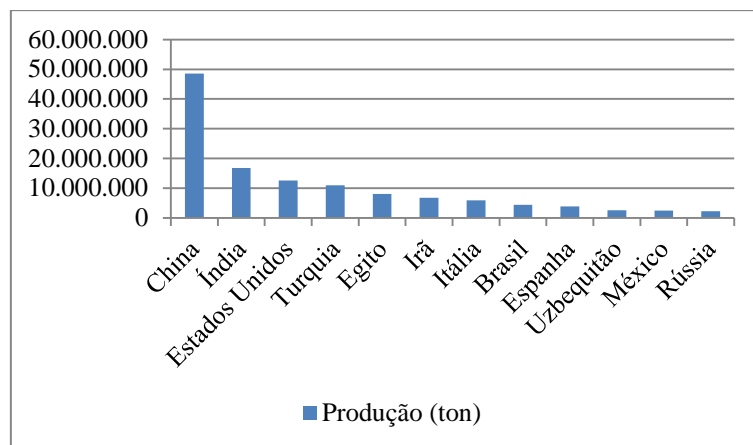


Figura 2. Ordem dos doze primeiros países do mundo produtores de tomateiros em relação à produção em toneladas. Fonte: FAO (2013).

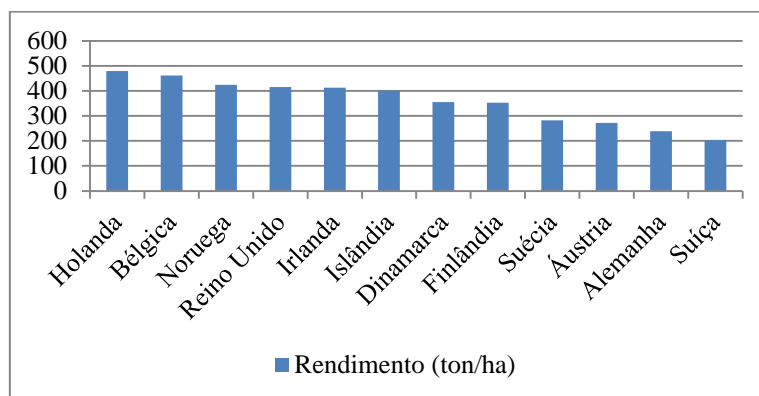


Figura 3. Rendimento em toneladas por hectare dos doze primeiros países do mundo em produtividade de tomateiro. Fonte: FAO (2013).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2006), a produção de tomateiro em cultivo de forma estaqueada foi de 929.962 ton, enquanto que a produção em tomateiro rasteiro foi de 374.893 ton. No levantamento sistemático da produção agrícola do ano de 2013, os principais estados produtores em relação à área plantada são: Goiás (17.662 ha), São Paulo (10.160 ha) e Minas Gerais (7.186 ha). Com relação à produção, Goiás também lidera com 1.392.016 ton, seguido por São Paulo com 675.196 ton e em terceiro lugar Minas Gerais com 473.323 ton. Em termos de produtividade a situação muda um pouco,

sendo que Goiás (78,81 ton/ha) continua em primeiro lugar, mas em segundo vem o Distrito Federal (77,67 ton/ha) e em terceiro lugar Santa Catarina (68,72 ton/ha) (IBGE, 2013).

2. Cultivo de tomateiro no Nordeste do Brasil

Na região Nordeste do Brasil o tomateiro é cultivado principalmente por pequenos produtores rurais, sendo por isso uma cultura de grande importância socioeconômica para a região (Vidal, 2010). Os principais estados produtores de tomate são: Ceará, Bahia e Pernambuco. A média de produtividade gira em torno de 42,18 ton/ha, ou seja, 35% inferior à média nacional de 63, 21 ton/ha (IBGE, 2013). Esses dados demonstram que o cultivo do tomateiro no Nordeste precisa ser melhorado para alcançar as médias nacionais.

No estado do Ceará a produção gira em torno de 279.009 ton, enquanto que o rendimento é de 46,1 ton/ha (IBGE, 2013). Já na Bahia a produção está em torno de 239.967 ton e o rendimento em 43,5 t/ha e no estado de Pernambuco a produção é de 79.564 ton e o rendimento em torno de 38 ton/ha. De acordo com esses dados, podemos notar que, apesar do Ceará ser o maior estado produtor dentro da região Nordeste, ainda assim, é bem inferior ao da média nacional, sendo que sua produção representa aproximadamente 6% da produção nacional de tomate.

No início da década de 1990, o cultivo de tomateiro para processamento industrial era concentrado na Região Nordeste, sendo que os estados de Pernambuco, Bahia e Paraíba detinham as maiores áreas produtoras brasileiras (Clemente and Boiteux, 2012). Atualmente esta produção está concentrada nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, os estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais são os principais estados produtores de tomate para processamento industrial (IBGE, 2006).

Esse deslocamento de áreas de cultivos juntamente com empresas processadoras de tomate, se deu devido a vários problemas fitossanitários decorrentes da monocultura intensiva de tomateiro. Os principais problemas fitossanitários foram viroses, como as tospoviroses e as

geminivírose, esta transmitida por mosca-branca (*Bemisia tabaci*), aquelas transmitidas por diversas espécies de tripses, o que culminou em uma maior debilidade das plantas permitindo uma alta infestação da traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*) tomasse conta (Clemente and Boiteux, 2012). Muitas empresas fecharam as fábricas e abandonaram a região, no entanto a partir do ano de 2009, pequenas áreas de plantios de tomateiro com destino de processamento industrial foram retomadas (Clemente and Boiteux, 2012).

Atualmente existem três empresas de processamento industrial de tomate instalados na região Nordeste, entre elas, Asa indústria e comércio Ltda., localizada no município de Belo Jardim, interior de Pernambuco; Tambaú indústria alimentícia, localizada no município de Custódia, estado de Pernambuco; Popular Alimentos, em Arapiraca, estado de Alagoas. Considerando a similaridade climática, pode-se incluir duas fábricas localizadas no norte de Minas Gerais: Best Pulp, localizada no município de Janaúba e Karambi, no município de Itacarambi.

3. Doenças no Tomateiro

A cultura do tomateiro é caracterizada por ter um manejo fitossanitário difícil, na qual vários patógenos como fungos, bactérias, nematoides e vírus são de expressiva importância.

Entre as doenças fúngicas que causam perdas econômicas podemos citar:

- Requeima, cujo agente causal é *Phytophthora infestans*;
- Pinta Preta, também conhecida como Mancha de Alternaria, seu agente causal é *Alternaria* spp.;
- Septoriose ou Mancha de Septoria, causado por *Septoria lycopersici*;
- Oídio, cujos agentes causais podem ser: *Leveillula taurica* ou *Oidium lycopersici*;
- Mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* ou *S. minor*.

Além de doenças como Murcha de Fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) e Murcha de Verticilium (*Verticilium dahliae*, *V. albo-atrum*) (Kimati et al., 2005, Lopes and Ávila, 2005).

Já em doenças bacterianas importantes para a cultura do tomateiro podemos citar:

- Mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.);
- Pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*);
- Murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*);
- Talo oco (*Pectobacterium carotovorum*);
- Cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) (Kimati et al., 2005, Lopes and Quezado-Soares, 1997).

Um patógeno importante, que pode inviabilizar a produção de tomateiro em uma determinada área, conhecido como Nematóide das Galhas, é problemático no Brasil pela dificuldade no seu controle e pela diversidade de espécies dentro do gênero *Meloidogyne* (Kimati et al., 2005, Lopes and Ávila, 2005).

As doenças causadas por vírus serão detalhadas a seguir.

4. Vírus em tomateiro

As viroses estão entre as doenças de maior importância, pois, além de seu difícil manejo e controle, estão espalhadas por todos os campos de produção, tanto de tomateiro de mesa quanto de tomateiro para indústria.

Entre os principais vírus e com maior importância econômica que infectam o tomateiro estão os gêneros: *Tobamovirus*, suas espécies (*Tomato mosaic virus* - ToMV e *Tobacco mosaic virus* - TMV) causam o mosaico do tomateiro; *Tospovirus*, entre suas espécies podem se citar *Tomato spotted wilt virus* - TSWV, *Tomato chlorotic spot virus* - TCSV e *Groundnut ringspot virus* - GRSV, que causam a doença do complexo do vira-cabeça-do-tomateiro;

Potyvirus, cuja espécie *Potato virus Y* (PVY) causa a risca do tomateiro e o *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), doença conhecida como mosaico amarelo do pimentão; *Crinivirus*, cuja espécie *Tomato chlorosis virus* (ToCV), foi relatada em 2008 no Brasil e sua incidência é alta nos estados da região Sudeste e Centro-Oeste; *Begomovirus*, com inúmeras espécies relatadas infectando o tomateiro no Brasil (Lopes and Ávila, 2005, Cunha et al., 2001, Barbosa et al., 2008, Fernandes et al., 1983).

Essa dissertação tem como tema o estudo da diversidade de begomovírus, que pertencem a família *Geminiviridae*, bem como a avaliação de produtos com potencial de indução de resistência em um tospovírus e a um tobamovírus. Será a seguir apresentada uma revisão mais aprofundada para os geminivírus e uma mais sucinta para os tospovírus e tobamovírus.

5. Família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* está entre as famílias de vírus que causam as doenças mais devastadoras para a agricultura. Causam grandes perdas nos campos de produção e juntamente com a família *Potyviridae* são as maiores e mais importantes famílias de vírus de plantas (Gibbs and Ohshima, 2010, Scholthof et al., 2011). Os geminivírus infectam tanto as monocotiledôneas, como o milho, quanto as dicotiledôneas, como tomate, feijão, mandioca, algodão, etc. Ao longo de mais de 20 anos, epidemias de geminivirose têm surgido em todo o mundo, mas elas ocorrem principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Fondong, 2013).

Os primeiros relatos sobre doenças causadas por geminivírus em tomateiro no Brasil datam da década de 60, quando Flores e colaboradores (1960), descreveram uma doença com as características do vírus do mosaico dourado do tomateiro. Porém somente na década de 1980 que surgiu o nome da espécie *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Elmer et al.,

1988a, Matyis et al., 1975) espécie esta pertencente ao gênero *Begomovirus*. Outras espécies, não tão bem descritas, foram citadas por Costa (1976). No entanto, apesar de relatos antigos, este grupo demorou a ser reconhecido devido a problemas, tais como instabilidade das partículas virais e ausência de transmissão mecânica, e somente no final da década de 70 a família foi reconhecida pelo International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV (Matthews, 1979).

O nome da família se dá devido à arquitetura da partícula, ou seja, a forma do capsídeo, que se assemelha a dois icosaedros incompletos unidos. Mumford (Mumford, 1974) conseguiu fazer a purificação da partícula do Curly top virus (CTV), atualmente conhecido como *Beet curly top virus* (BCTV), pertencente ao gênero *Curtovirus*, e em observação em microscópio eletrônico notou que o formato da partícula era geminado. Ele, porém, não afirmou que esse seria o formato definitivo da partícula e justificou que possivelmente seria um artefato do método utilizado na purificação viral que não permitiu a separação completa das partículas. A partir deste momento, vários autores fizeram a purificação viral de diversos geminivírus, inclusive como Bock e colaboradores (1974) que fizeram o isolamento de partículas de *Maize streak virus*, espécie, hoje, pertencente ao gênero *Mastrevirus*. Porém, apenas em 1992 os pesquisadores Lazarowitz e Shepherd (1992) confirmaram ser a partícula realmente geminada.

Os vírus desse grupo, além da partícula geminada, possuem genoma de DNA circular de fita simples (ssDNA), cujo tamanho varia entre 2,5 a 3,0 kb, monopartido ou bipartido, ou seja, podem possuir um ou dois componentes genômicos, chamados de DNA-A e DNA-B. Quando o vírus possui dois componentes genômicos, ambos são necessários à infecção (Francki et al., 1980, Howarth et al., 1985, King et al., 2011, Hamilton et al., 1983, Goodman et al., 1980, Howarth and Goodman, 1982). Há algumas exceções, em que o DNA-A de vírus bipartidos são capazes de infectar sistemicamente alguns hospedeiros, como o *Tomato*

chlorotic mottle virus (ToCMoV) que é capaz de infectar *Nicotiana benthamiana* (Galvao et al., 2003). Os vírions são compostos apenas por uma cópia do ssDNA e uma proteína estrutural: capa proteica (Francki et al., 1980).

Atualmente, a família é dividida em sete gêneros: *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, *Becurtovirus*, *Eragrovirus* e *Turncurtovirus*, sendo que os três últimos gêneros foram incluídos em 2013 à família (ICTV, 2013).

Os vírus dos gêneros *Becurtovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus* possuem genoma monopartido, enquanto apenas o gênero *Begomovirus* possui vírus com genoma monopartido ou bipartido.

O gênero *Begomovirus* sempre foi o mais numeroso em relação às espécies da família *Geminiviridae*, e nos últimos anos esse número cresceu ainda mais. Em 1999 o gênero possuía setenta e seis espécies (Van Regenmortel et al., 2000), em 2005 esse número cresceu para cento e dezessete (ICTV, 2013) e atualmente são cento e noventa e duas espécies aceitas pelo ICTV (ICTV, 2013). Esse alto crescimento a partir do início dos anos 2000 se deve ao fato, das técnicas para a descoberta de novas espécies e gêneros estarem mais acessíveis, ferramentas de detecção e de sequenciamento estarem cada vez mais baratas e mais simples de se executar. Além do mais, técnicas de clonagem, estão otimizadas e baratas e, além disso, novas técnicas foram otimizadas como RCA (amplificação por círculo rolante) (Inoue-Nagata et al., 2004), PCR (reação em cadeia da polimerase) e Deep sequencing.

5.1 Taxonomia da família *Geminiviridae*

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses) foi criado em 1966, com o intuito de organizar e regular a taxonomia dos vírus até então relatados (ICTV, 2013).

Após o isolamento de partículas virais de vírus do grupo dos geminivírus em 1973, vários estudos se seguiram. Em 1979, os geminivírus foram incluídos, como um grupo, no terceiro relatório do ICTV. Nesse relatório, quatro espécies haviam sido aceitas: *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Cassava latent virus* (CLV), *Chloris striate mosaic virus* (CSMV) e *Maize streak virus* (MSV), sem a divisão em grupos (Matthews, 1979).

Em 1991, no quinto relatório divulgado pelo ICTV, foram criados três subgrupos: I com MSV como espécie-tipo, II, cuja espécie-tipo era *Beet curly top virus* (BCTV); e III, o qual a espécie-tipo relacionada foi BGMV (Francki et al., 1991).

O grupo foi elevado à categoria de família em 1995 e os subgrupos foram elevados à categoria de gêneros, também chamados de gêneros I, II e III. Os gêneros receberam os nomes de *Mastrevirus*, *Curtovirus* e *Begomovirus*, respectivamente, apenas no ano 2000 no sétimo relatório elaborado pelo ICTV (Murphy et al., 1995).

O quarto gênero a ser aprovado pelo ICTV foi o *Topocuvirus*, cuja espécie-tipo *Tomato pseudo curly-top virus* (TPCTV), foi descrita pelos pesquisadores McDaniel e Tsai (1990). Mais tarde Briddon e colaboradores (1996) afirmaram que o TPCTV era fruto de recombinação entre vírus do gênero *Curtovirus* e *Begomovirus*, porém sua ORF V2 possui maior identidade com vírus do gênero *Mastrevirus*. Apenas no ano de 1999 o TPCTV foi aceito como membro de um novo gênero e seu registro foi realizado no oitavo relatório do ICTV (Fauquet and Stanley, 2003). Até então, a família *Geminiviridae* era dividida em quatro gêneros e, os critérios para distinção entre os gêneros eram baseados em organização genômica, inseto vetor, gama de hospedeiros e sequências relacionadas. Espécies pertencentes ao gênero *Mastrevirus* têm um único componente genômico que codifica quatro proteínas, infectam monocotiledôneas (com duas exceções) e são transmitidas por cigarrinha. Já espécies pertencentes ao gênero *Topocuvirus*, devem ter um componente genômico que codifica seis proteínas, infectar dicotiledôneas e ser transmitido por membracídeos. Membros

do gênero *Curtovirus* têm um componente genômico, que codifica sete proteínas, infectam dicotiledôneas e são transmitidos por cigarrinhas. Já os membros do gênero *Begomovirus* apresentam um ou dois componentes genômicos, infectam dicotiledôneas e são transmitidos por mosca-branca (Fauquet and Stanley, 2003).

Yazdi e colaboradores (2008) descreveram um novo vírus encontrado no Irã infectando beterraba. Na ocasião os autores propuseram o nome para o vírus de Beet curly top Iran virus (BCTIV). Esse vírus foi classificado dentro do gênero *Curtovirus*, mesmo apresentando diferenças com os demais curtovírus. Sua organização genômica sugeriu que seja fruto de recombinação entre espécies do gênero *Curtovirus* com espécies do gênero *Mastrevirus*.

Heydarnejad e colaboradores (2013) realizaram os postulados de Koch, a caracterização biológica e molecular de BCTIV e chegaram à conclusão que seria mais adequado classificá-lo em um novo gênero.

O novo gênero foi chamado de *Becurtovirus* e além do BCTIV outra espécie está incluída dentro desse mesmo gênero: *Spinach curly top Arizona virus* (SCTAV), que apresenta identidade de nts de 77% com o BCTIV e idêntica organização genômica.

A diferença entre esses novos becurtovírus e os demais membros da família *Geminiviridae*, reside no sítio do início da replicação, onde a proteína Rep se liga ao DNA e com isso a replicação tem início. Em geral, nos geminivírus a sequência de nucleotídeos dessa região é: TAATATT/AC. Entretanto, as novas espécies apresentam uma sequência distinta correspondente a: TAAGATT/CC, com uma troca de nucleotídeo de um “T” por um “G” na quarta posição e um “A” por um “C” na penúltima posição. Outra diferença observada é a presença de duas regiões intergênicas, uma entre o gene da capa proteica e da rep e outra logo após a capa proteica.

Varsani e colaboradores (2009) encontraram outra espécie de vírus divergente das outras espécies de geminivírus até então descritas. Esta espécie foi encontrada infectando um

tipo de capim (*Eragrostis curvula*) na África do Sul. Tal qual o BCTIV, essa nova espécie, denominada de *Eragrostis curvula streak virus* (ECSV), possui duas regiões intergênicas e o nonanucleotídeo distinto da origem de replicação dos geminivírus, mas igual ao do BCTIV.

Nesse trabalho, os autores sugeriram que um novo gênero fosse criado e que fosse chamado de Ecuivirus. Além disso, eles discutem que o ancestral comum entre os geminivírus se parecia com o ECSV, porém não conseguem afirmar com certeza se o ancestral dos geminivírus infectava plantas mono ou dicotiledôneas, apesar do ECSV infectar monocotiledôneas (Varsani et al., 2009).

Bridson e colaboradores (2010) relataram a descoberta de outra espécie divergente dos demais geminivírus. O vírus chamado de *Turnip curly top virus* (TCTV), isolado em folhas de nabo no Irã, possui organização genômica e inseto vetor distintos dos curtovírus (Razavinejad et al., 2013).

Devido à descoberta de três espécies virais distintas o ICTV em 2013 aprovou a criação de três novos gêneros:

- *Becurtovirus*, cuja espécie tipo é *Beet curly top Iran virus* e com mais um membro, o SCTAV;
- *Eragrovirus*, o qual a espécie-tipo designada foi *Eragrostis curvula streak virus*;
- *Turncurtovirus*, *Turnip curly top virus* foi designada como espécie-tipo.

Apesar da criação desses três novos gêneros em 2013, já estão sendo descobertas novas espécies que não se enquadram em nenhum dos sete gêneros existentes dentro da família, como é o caso do *Euphorbia caput-medusae latente virus* (EcmLV) (Bernardo et al., 2013).

5.1.1 Critérios para classificação na família *Geminiviridae*

Atualmente, para classificar taxonomicamente um isolado viral existem critérios que foram propostos pelo grupo de estudos de geminivírus (ICTV) e relatados por Fauquet e colaboradores (2008).

Nesse trabalho, além dos níveis taxonômicos de gêneros e espécies considera-se os conceitos de estirpes e variantes. Por definição “estirpes são melhores representadas por vírus pertencentes às mesmas espécies e tendo diferenças biológicas, sorológicas e moleculares estáveis e herdáveis” (Fauquet et al., 2008). Por outro lado define-se “variante como algo que seja pouco diferente da norma” (Fauquet et al., 2008).

Para se classificar em gêneros distintos usa-se entre 18 e 42% de identidade de nucleotídeos, do genoma completo para os monopartidos e do DNA-A em bipartidos, entre espécies observa-se uma porcentagem de identidade de nucleotídeos (nts) entre 38 e 89% (Fauquet et al., 2008).

Para o gênero *Begomovirus* quando a porcentagem de identidade é alta pode haver dificuldade na classificação de um novo isolado. Para tanto, Fauquet e colaboradores (2008) sugerem dois passos:

- 1) Comparar a sequência de nts do novo isolado com todas as sequências representativas de espécies conhecidas, se:
 - (a) Identidade de nts do novo isolado for menor que 88%, enquandra-se em uma nova espécie.
 - (b) Identidade de nts for entre 88 e 89%, considera-se tentativamente uma espécie próxima.
 - (c) Identidade de nts maior de 89% considera-se isolado da mesma espécie.
- 2) Comparar a sequência do novo isolado com todas as sequências de estirpes e variantes representativas conhecidas da espécie identificada, se:

(a) Identidade de nts menor que 93% considera-se uma nova estirpe da mesma espécie.

(b) Identidade de nts maior que 94% classifica-se como uma variante daquela estirpe da espécie.

Para que a comparação da porcentagem de identidade de nucleotídeos seja uniforme, os mesmos autores sugerem que o programa ClustalV (DNASStar, Lasergene, Wisconsin, EUA) seja utilizado para o pareamento e comparação das sequências. Recentemente, o grupo de estudos realizou um estudo avaliando os critérios taxonômicos dentro da família e uma nova regra será proposta (F. Murilo Zerbini, comunicação pessoal).

5.2 *Begomovirus*

Os vírus do gênero *Begomovirus* infectam mais de 100 espécies de dicotiledôneas, entre elas as culturas de tomate, soja, feijão e algodão, muito importantes para o agronegócio brasileiro. Os begomovírus causam grandes perdas e são de difícil controle (Varma and Malathi, 2003).

Os begomovírus são transmitidos pelo aleirodídeo *Bemisia tabaci* conhecido popularmente como mosca-branca, de maneira persistente, circulativa, porém ainda há controvérsias se o vírus se replica ou não no corpo do inseto vetor (Hunter et al., 1998). Primeiros relatos da existência da mosca-branca aqui no Brasil foram feitos por Bondar (Bondar, 1928), no estado da Bahia. A partir dos anos de 1990 surtos populacionais de mosca-branca surgiram no estado de São Paulo em diversas regiões, em diversas culturas, que até então não eram encontradas, como por exemplo, tomateiro, abóbora, berinjela, feijão, soja, brócolis e plantas ornamentais. Lourenção e Nagai (1994) realizaram estudos para descobrir o motivo desses surtos populacionais e descobriram então que até os anos de 1990 predominava o biótipo “A” da *B. tabaci* que permanecia em baixos níveis populacionais, porém nos anos

de 1990 houve a introdução do biótipo “B”, que é mais polífago e se reproduz mais rapidamente. Provavelmente a introdução do biótipo “B” se deu pelo trânsito de plantas ornamentais.

Acreditava-se, nessa época, que existia apenas uma espécie de *B. tabaci* que colonizava uma grande quantidade de hospedeiras e que transmitia uma enorme quantidade de vírus de plantas inclusive os geminivírus e o que as diferenciava era o biótipo (Lourenção and Nagai, 1994).

A diferenciação de biótipos de *B. tabaci* pode ser feita por diversos critérios como uso de ferramentas moleculares e fisiológicas, diferenças na gama de hospedeiros ou especialização de hospedeiros, grau de fecundidade, diferenças na eficiência da transmissão de vírus e habilidade de causar fitotoxidez (Brown, 2000).

Atualmente acredita-se que não são diferentes biótipos, mas sim diferentes espécies de mosca-branca que transmitem os begomovírus (Dinsdale et al., 2010, De Barro et al., 2011). Para diferenciação de espécies, Dinsdale e colaboradores (2010) propuseram que a comparação das sequências de nts de *B. tabaci* deve ser feita de acordo com o gene que codifica a citocromo oxidase mitocondrial.

Os autores alinharam e compararam das sequências presentes no GenBank mais as sequências que eles obtiveram e concluíram que existem vinte e quatro espécies e que elas se subdividem em onze grupos genéticos entre eles (Dinsdale et al., 2010):

1. Middle East-Asia Minor (MEAM1) relacionado com os biótipos “B” e “B2”;
2. Mediterranean species (MED) relacionado com os biótipos: “Q”, “J” e “L”;
3. New World species relacionado com os biótipos “A”, “C”, “D”, “F”, *Jatropha*, “N”, “R” e *Sida*.

Alemndri e colaboradores (2012), mais recentemente, relataram a existência de mais duas espécies de mosca-branca na Argentina, uma pertencente ao grupo New World e a outra espécie pertencente a um novo grupo genético, que os autores denominaram de New World 2.

Marubayashi e colaboradores (2013) realizaram uma pesquisa entre as espécies de mosca-branca presente nos estados de São Paulo e Mato Grosso entre os anos de 2008 e 2011. Nesse trabalho os autores encontraram espécies presentes nos seguintes grupos: MEAM1, New World 1 e New World 2.

5.2.1 Organização genômica dos begomovírus

O genoma dos begomovírus pode ser mono (Fig.4) ou bipartido (Fig.5) e, em alguns casos possui também DNAs satélites. Cada componente genômico tem entre 2,5 e 2,6 kb de tamanho.

O genoma monopartido é encontrado principalmente em países do Velho Mundo, como países pertencentes à Europa, Ásia e África. Já os vírus com genoma bipartido estão amplamente distribuídos entre Velho e Novo Mundo (King et al., 2011).

Em alguns casos, vírus monopartidos são acompanhados de moléculas de DNA satélites, chamados de alfa ou beta. Satélites são definidos como vírus ou ácidos nucleicos que dependem de um vírus auxiliar para sua replicação, mas não tem uma região de sequência de nt com alta homologia àquela do vírus auxiliar e é dispensável para sua proliferação (Fauquet et al., 2005). O satélite codifica uma única proteína estrutural para encapsidar seu material genético (Bridson and Stanley, 2006).

O primeiro satélite caracterizado foi isolado por Saunders e colaboradores (2000) que isolaram um DNA do *Ageratum yellow vein virus* (AYVV), que foi chamado de betasatellite. Mais tarde, um outro tipo de DNA foi isolado de *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMV) e chamado inicialmente de DNA-1 e atualmente como alfasatellite, com metade do tamanho de

um begomovírus (aproximadamente 1370 nts) e codificando uma proteína semelhante a Rep (Briddon and Stanley, 2006). A partir de então vários satélites associados a begomovírus monopartidos foram encontrados.

As funções dos DNAs satélites ainda não estão muito claras, dependem a quais begomovírus os satélites estão ligados, porém parecem estar associados com aumento da virulência do patógeno e supressão do silenciamento gênico da planta (Briddon and Stanley, 2006).

Begomovírus que possuem betasatellites são capazes de infectar as plantas hospedeiras na ausência dos satélites, porém com uma leve produção de sintomas ou sintomas não característicos da doença, além do baixo título viral. Tais evidências sugerem que os betasatellites têm papel na patogenicidade do vírus (Saunders et al., 2000, Briddon et al., 2001). Além disso, Mansoor e colaboradores (2003) demonstraram que diferentes begomovírus interagindo com o mesmo satélite são capazes de produzir sintomas idênticos, provando, com isso, que além do papel na patogenicidade os satélites estão envolvidos na expressão de sintomas. Cui e colaboradores (2005) mostraram que a proteína β C1 codificada pelo β satélite está envolvida na supressão do silenciamento gênico. Portanto, pode-se concluir que os DNAs satélites têm pelo menos três funções: patogenicidade, expressão de sintomas e supressão do silenciamento gênico.

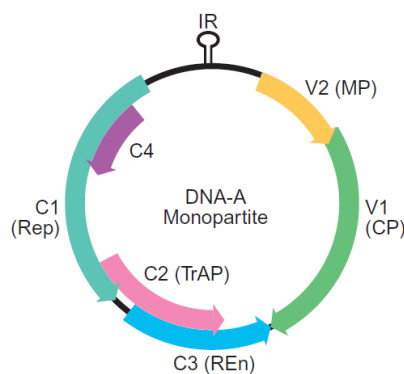


Figura 4. Representação esquemática da organização genômica de um begomovírus monopartido. Fonte: King et al. (2011).

Por outro lado, o genoma bipartido é composto pelo DNA-A e DNA-B, que codificam de 6 a 8 ORFs. O DNA-A e DNA-B possuem uma região conservada de alta identidade de nucleotídeos de aproximadamente 200 bases, denominada de região comum (RC) (Hamilton et al., 1984). A RC está relacionada com a replicação (Revington et al., 1989, Lazarowitz and Shepherd, 1992) e a transcrição (Hanley-Bowdoin et al., 1988, Sunter et al., 1989). Dentro dessa região há uma sequência que forma uma estrutura muito estável, em formato de grampo de cabelo, onde se localiza a origem de replicação dos geminivírus. Heyraud e colaboradores (1993) demonstraram que o nonanucleotídeo (TAATATT/AC), presente nessa estrutura em forma de grampo de cabelo, é um alvo da proteína Rep para o início da replicação.

Inicialmente Hamilton e colaboradores (1983) demonstraram que não é possível haver infecção e produção de sintomas sem a presença do DNA-A e do DNA-B, porém, mais tarde, mostrou-se que o DNA-A tem a capacidade de se replicar e produzir partículas virais independentemente (Rogers et al., 1986), porém necessita do DNA-B para localização celular e movimento sistêmico na planta (Revington et al., 1989).

O DNA-A no sentido viral codifica, em geral, 2 ORFs: AV1 e a AV2, já no sentido complementar viral codifica 4 ORFs: AC1, AC2, AC3 e AC4.

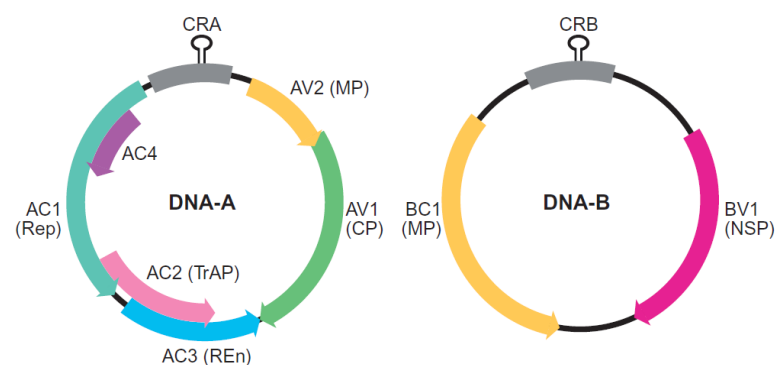


Figura 5. Representação esquemática da organização genômica de um begomovírus bipartido. Fonte: King et al. (2011) .

A ORF AC1 ou C1 (ou AL1) codifica a proteína associada à replicação, chamada de Rep, sendo sua sequência, posição e função conservada entre os geminivírus. Ela é essencial para o mecanismo de replicação por círculo rolante e para a expressão gênica. Sua tradução é

precoce, a partir de sua síntese a Rep faz a separação do ssDNA do vírus da sua fita complementar, para esta servir de molde e se iniciar a replicação do genoma viral (Fontes et al., 1992). A Rep cliva o DNA imediatamente depois do resíduo de timina na extremidade 3' do nonanucleotídeo (Hanley-Bowdoin et al., 1990).

A ORF AC2/C2 codifica a proteína ativadora da transcrição, TrAP. É uma proteína multifuncional, está envolvida na ativação gênica (Sunter and Bisaro, 1992, Sunter and Bisaro, 1997), na patogenicidade do vírus (Noris et al., 1996) e na supressão do silenciamento gênico (Trinks et al., 2005). A TrAP ativa a transcrição dos genes que codificam a proteína da capa proteica (CP) e a proteína de movimento (MP) (Sunter and Bisaro, 1991, Groning et al., 1994, Sunter et al., 1990).

A ORF AC3/C3 codifica a proteína que intensifica a replicação, a Ren (Xie et al., 1995). Essa proteína, apesar de não ser essencial para replicação viral, ela aumenta a acumulação de DNA viral na célula e ajuda no desenvolvimento de sintomas (Elmer et al., 1988b, Etesami et al., 1991, Sunter et al., 1990).

A ORF AC4/C4 está totalmente dentro da ORF AC1, porém em outra fase. É a ORF menos conservada dentro dos begomovírus e possui diferentes funções para os begomovírus mono e bipartidos. Para vírus monopartidos, a proteína pode estar envolvida no desenvolvimento de sintomas e movimento viral (Jupin et al., 1994). Para os vírus bipartidos, está envolvida no movimento viral, mas não é essencial para a infecção. A sua habilidade na supressão do silenciamento de RNA é conservada em várias espécies de vírus mono e bipartidos (Vanitharani et al., 2004, Gopal et al., 2007).

A ORF AV1/V1 codifica o gene da capa proteica (CP), um gene de tradução tardia e a única proteína estrutural para partículas de geminivírus. Além da função de proteger o material genético a CP está associada a outras funções como, transmissão pelo inseto vetor (Bridson et al., 1990), transporte do núcleo para o citoplasma e depois do citoplasma para a

parede celular em begomovírus monopartido (Unsel et al., 2001), e infecção sistêmica em TYLCV (Noris et al., 1998). Padidam e colaboradores (1996) estudando as funções da CP em *Tomato leaf curl virus* – Índia (ToLCV) provaram que a CP desse vírus influencia na acumulação de ssDNA e dsDNA na célula da hospedeira, mostrando com isso a influência da CP na replicação viral. Essa proteína contém regiões que são altamente conservadas, e também variáveis, sendo útil para fazer inferências filogenéticas com características bióticas e geográficas (Brown et al., 2001)

A ORF AV2/V2 tem seu códon de iniciação localizado antes da ORF AV1/V1. Essa ORF é somente observada em begomovírus do Velho Mundo. A função da proteína codificada por essa ORF permanece sem estar totalmente esclarecida, mas existem alguns estudos que tentam elucidar sua função. Rigden e colaboradores (1993) afirmaram que ela está envolvida na replicação viral. Há hipóteses também de sua função estar ligada à supressão do silenciamento gênico (Zrachya et al., 2007, Piroux et al., 2007, Gopal et al., 2007).

Por outro lado, o DNA-B no sentido viral codifica uma ORF (BV1) e no sentido complementar viral uma segunda ORF (BC1).

A ORF BV1 codifica a proteína de transporte nuclear (NSP, *nuclear shuttle protein*), sendo necessária para o tráfego de ssDNA viral entre o núcleo e o citoplasma celular (Noueiry et al., 1994, Pascal et al., 1994). Ela forma um complexo com o DNA viral para a realização do transporte (Rojas et al., 1998). Quando um mutante, defeitivo para a NSP é produzido, a CP pode substituir algumas funções da NSP (Ingham et al., 1995). Como a CP e a NSP compartilham pelo menos uma função, especula-se que essas duas proteínas tenham uma origem evolucionária em comum (Kikuno et al., 1984).

A proteína do movimento (MP, *movement protein*) pode ser codificada pela ORF BC1 em begomovírus bipartidos ou pela ORF V2 em begomovírus monopartidos, porém essas

duas ORFs não possuem identidade na sequência de nucleotídeos (Boulton et al., 1991, Eteessami et al., 1988). A MP é necessária para o movimento tanto a longa distância quanto a curta distância dentro da hospedeira (Frischmuth et al., 1993). Atualmente, acredita-se que junto com a NSP a MP forma um complexo: MP – DNA – NSP e com isso fazer o transporte célula-a-célula (Hehnle et al., 2004).

5.2.2 Diversidade de begomovírus em tomateiro no Brasil

Atualmente, o gênero *Begomovirus*, possui 192 espécies aceitas pelo ICTV (ICTV, 2013). Um fato interessante é que quase todas as espécies de begomovírus descritas nas Américas nunca foram isoladas em outros continentes. Tal evidência sugere que os begomovírus sejam nativos dos continentes das Américas, sendo que provavelmente os ancestrais dos vírus descritos atualmente eram encontrados infectando plantas não cultivadas. Com a introdução do biótipo B da mosca-branca e sua rápida adaptação para infectar plantas cultivadas tornaram-se muito importantes em campos de produção (Rocha et al., 2013).

Um exemplo de exceção é o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) que evidências sugerem que foi introduzido na América Central, mais especificamente na República Dominicana no início da década de 1990, por meio de mudas de tomateiro infectadas com o vírus proveniente de Israel (Nakhla et al., 1994). No Brasil são descritas 11 espécies de *Begomovirus* que infectam tomateiro. São elas:

- *Tomato golden mosaic virus* – TGMV (Flores et al., 1960, Matyis et al., 1975);
- *Tomato rugose mosaic virus* – ToRMV (Fernandes et al., 2006);
- *Tomato chlorotic mottle virus* – ToCMoV (Ribeiro et al., 2007);
- *Tomato yellow spot virus* – ToYSV (Calegario et al., 2007);
- *Tomato severe rugose virus* – ToSRV (Fernandes et al., 2008);
- *Tomato mild mosaic virus* – ToMIMV (Castillo-Urquiza et al., 2008);

- Tomato yellow vein streak virus – ToYVSV (Albuquerque et al., 2012b);
- Tomato mottle leaf curl virus – TMoLCV (Ribeiro et al., 2003);
- Tomato common mosaic virus – ToCmMV (Castillo-Urquiza et al., 2008);
- Tomato interveinal chlorosis virus (ToICV) (Albuquerque et al., 2012b);
- Tomato golden vein virus (TGVV) (Albuquerque et al., 2012b).

Dos begomovírus anteriormente citados seis são aceitas pelo ICTV como definitivos: TGMV, ToRMV, ToCMoV, ToYSV, ToSRV e ToYVSV. As outras permanecem como espécies tentativas. Pelo menos mais sete novas espécies não totalmente caracterizadas são descritas no Brasil (Ribeiro et al., 2003, Ambrozevicius et al., 2002, Inoue-Nagata et al., 2006).

Espécies de begomovírus tipicamente observadas em plantas não cultivadas, como *Sida mottle virus* – SiMoV e *Sida micrantha mosaic virus* – SiMMV, são encontradas também, em tomateiro (Cotrim et al., 2007).

5.2.3 Ciclo de infecção

O ciclo de infecção dos begomovírus se inicia quando uma mosca-branca, carregando as partículas virais, se alimenta em uma folha sadia, da seiva transportada no floema e insere os vírions através do estilete para células adjacentes ao floema (Hanley-Bowdoin et al., 2013).

Dentro da célula hospedeira, o material genético do vírus é desencapsidado com a liberação do material genético que é encaminhado para dentro do núcleo. Dentro do núcleo a replicação ocorre em três fases: iniciação, alongação e terminação (Hanley-Bowdoin et al., 2013).

O intermediário de fita dupla é sintetizado para dar início à replicação (Donson et al., 1984, Saunders et al., 1992). O dsDNA é transcrito e a proteína Rep é sintetizada, essa

proteína inicia a replicação viral por uma combinação de dois mecanismos: replicação por círculo rolante e replicação dependente de recombinação (Jeske et al., 2001).

A Rep catalisa tanto a iniciação quanto a terminação pela clivagem da forma replicativa, em lugares conservados e específicos no genoma do vírus (Laufs et al., 1995). A etapa da alongação é altamente dependente de fatores da hospedeira, pois o vírus para se replicar necessita das enzimas polimerase de DNA do hospedeiro (Hanley-Bowdoin et al., 2004).

O movimento viral, de dentro do núcleo para o citoplasma e do citoplasma para células vizinhas, ocorre por meio de duas principais proteínas, NSP e MP, para begomovírus bipartidos (Krenz et al., 2012).

Existem alguns modelos possíveis que descrevem o movimento viral dentro da célula e célula a célula, um deles afirma que a proteína NSP facilita o transporte do DNA viral de dentro do núcleo para o citoplasma, sendo substituída pela MP que é responsável pelo movimento célula-a-célula pelo aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (Noueiry et al., 1994). Por outro lado, um segundo modelo afirma que as duas proteínas agem conjuntamente nos dois tipos de transporte, nele a NSP forma um complexo com o DNA e a MP media tanto o transporte desse complexo do núcleo para o citoplasma, quanto o transporte para células adjacentes, via túbulos derivados do retículo endoplasmático (Lazarowitz and Beachy, 1999).

Para o ciclo se iniciar novamente, a mosca-branca ao se alimentar de células do floema infectadas, adquire os vírions, estes entram no canal salivar do inseto, passam para o intestino, onde entra na hemolinfa e passa para as glândulas salivares para serem transmitidos novamente às plantas sadias (Ghanim et al., 2001). As interações entre *B. tabaci* – vírus depende da espécie viral, do biótipo do vetor e dos endossimbiontes presentes no corpo do inseto (Gottlieb et al., 2010).

5.2.4 Recombinação, pseudorecombinação e mutação

Acredita-se que os geminivírus evoluíram a partir de replicons de ssDNA extracromossomal de antigos procariotos ou eucariotos primitivos, sendo que tais DNAs se replicavam pelo mecanismo de círculo rolante e para que o ciclo de replicação se concluísse eles sintetizavam um intermediário de dsDNA. Uma evidência que comprova essa teoria é que a Rep dos geminivírus é muito parecida com a Rep de procariotos atuais (Rojas et al., 2005).

Foi proposto que os geminivírus surgiram a partir da recombinação entre um gene da proteína CP de um vírus de ssRNA com arquitetura de partícula icosaédrica e um gene da proteína Rep de um plasmídeo bacteriano de ssDNA (Krupovic et al., 2009). Estudos realizados nos últimos anos demonstram que a alta variabilidade dos geminivírus pode ser explicada pela alta taxa de ocorrência de recombinação, pseudorecombinação e mutação no genoma viral.

Os tipos de recombinação que ocorrem em begomovírus foram revisados por Martin e colaboradores (2011) e foram assim classificados:

- Recombinação homóloga na qual sequências dentro de um genoma são substituídas por sequências homólogas de outro genoma;
- Recombinação não-homóloga na qual regiões do genoma são reordenadas, duplicadas, suprimidas ou são inseridas no genoma da célula hospedeira;
- Rearranjo ou Pseudorecombinação na qual há a troca de um componente genômico inteiro, no caso de begomovírus bipartidos, entre espécies ou isolados.

Existem três principais fatores que contribuem para a ocorrência de recombinação dentro da família *Geminiviridae*: a alta incidência de infecções mistas, altos níveis de replicação viral e o surgimento do biótipo B da *B. tabaci* que permitiu um grande aumento na

gama de hospedeiras do inseto vetor e com isso aumentou a quantidade de hospedeiras que os begomovírus podem infectar (Padidam et al., 1999).

Padidam e colaboradores (1999) avaliaram a importância da recombinação dentro da família *Geminiviridae*, pela avaliação no programa GENECONV de todas as sequências disponíveis no GenBank, na época. Entre suas conclusões, perceberam que se avaliadas posições distintas no genoma a posição relativa das espécies dentro do gênero muda, essa observação sugere que existe uma significativa recombinação entre os geminivírus.

Analisando a árvore filogenética de todos os gêneros aceitos na família até então (*Begomovirus*, *Curtovirus* e *Mastrevirus*), os mesmo autores observaram que os vírus se separavam filogeneticamente e que dentro dos gêneros dos begomovírus havia uma separação geográfica clara entre Ásia, África e América (Padidam et al., 1999). A recombinação ocorre ao longo de todo o genoma e os fragmentos recombinantes variam entre 32 e 2391 nts, os fragmentos recombinantes são menores no gênero *Mastrevirus* e ela é menos significativa, em *Begomovirus* ocorrem mais recombinações do que nos demais gêneros, e dentro deste há maior índice de recombinação na Ásia (Padidam et al., 1999).

A recombinação entre os gêneros *Curtovirus* e *Begomovirus* e entre diferentes posições nos begomovirus ocorre predominantemente na extremidade 5' terminal do gene *Rep*, sugerindo que estes eventos são antigos e aconteceram antes da separação geográfica (Padidam et al., 1999). Foi proposto que os curtovírus surgiram a partir de uma recombinação entre um begomovírus e um mastrevírus (Stanley et al., 1986), mas que essa recombinação foi tão antiga que não aparecera nas análises de Padidam e colaboradores (1999).

A família *Geminiviridae* conta com sete gêneros atualmente e os quatro gêneros que foram aceitos pelo ICTV:

- Topocuvírus: recombinante entre curtovírus e begomovírus (Bridson et al., 1996);

- Becurtovírus: recombinante entre curtovírus e mastrevírus (Yazdi et al., 2008);
- Eragrovírus: um ancestral que deu origem a begomovírus, curtovírus, mastrevírus e topocuvírus;
- Turncurtovírus: vírus bem divergentes dos demais que tem maior similaridade com os curtovírus.

O programa RDP (Recombination Detection Program) foi criado por Martin e Rybicki (2000) para detectar eventos de recombinação presentes em alinhamentos de uma grande quantidade de sequências, através de diversos programas, e para avaliar a confiabilidade do evento de recombinação através do valor de *P*.

Hou e Gilbertson (1996) forneceram as primeiras evidências de que a pseudorecombinação é importante para a variabilidade, evolução e aumento de patogenicidade de begomovírus bipartidos. Mais recentemente, Andrade e colaboradores (2006) mostraram que é possível haver pseudorecombinação entre diferentes espécies de begomovírus infectando tomateiro no Brasil e, como existem diversas espécies no campo é possível que a pseudorecombinação ocorra e que seja importante para evolução e surgimento de espécies mais adaptadas.

Duffy e Holmes (2008) estudaram a velocidade com que o begomovírus monopartido TYLCV evolui e chegaram à conclusão que tal begomovírus evolui por mutação em taxas tão altas quanto a evolução de vírus de RNA. Os autores calcularam a taxa de substituição de nucleotídeos por local por ano e observaram que as maiores taxas de mutação são observadas no gene que codifica a CP e a região intergênica, refletindo a rápida dinâmica mutacional e a frequente evolução adaptativa.

Os dados obtidos por Rocha e colaboradores (2013), analisando begomovírus brasileiros bipartidos, mostraram altas taxas de substituições de nucleotídeos por local por ano e que as regiões do genoma que apresentam maiores taxas são da região intergênica e do gene da CP,

corroboram com os dados obtidos por Duffy e Holmes (2008) para um begomovírus monopartido presente no velho mundo.

5.2.5. Resistência Genética

Dentre os métodos de controle de begomovírus na cultura do tomateiro, um dos mais recomendados é aquele baseado na resistência genética. A busca por genes de resistência é normalmente realizada em espécies selvagens de *Solanum* (Pilowsky and Cohen, 1974, Lapidot et al., 2000). A transferência da resistência por meio de genes de acessos de espécies selvagens para as cultivares é a principal ferramenta dos programas de melhoramento (Lapidot et al., 2000).

A busca por resistência genética a begomovírus data do início dos anos 1970 em Israel, quando Pilowsky e Cohen (1974) procuraram por fontes de resistência a *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) em espécies silvestres do gênero *Solanum*. Os autores citam as seguintes espécies como fontes de resistência, *S. pimpinellifolium*, *S. peruvianum* e *S. chilense*.

Acessos de todas as três espécies possuem níveis de resistência a TYLCV, porém, *S. peruvianum* e *S. chilense* são muito distintos de *S. lycopersicum* (espécie de tomateiro cultivado) o que dificulta sobremaneira o cruzamento entre estas espécies e a geração de sementes viáveis. Dessa forma, Pilowsky & Cohen (1974) escolheram *S. pinpinellifolium* para realizar os cruzamentos em seu programa de melhoramento. Eles demonstraram que a resistência a TYLCV era dominante incompleta e governada por um único gene. Mais tarde outras espécies silvestres de *Solanum* foram relatadas como fontes de resistência como *S. habrochaites* e *S. cheesmaniae* (Ji et al., 2007b).

O primeiro gene de resistência mapeado foi o *Ty-1*, que foi originário de *S. chilense* e foi reportado estar localizado no cromossomo seis de tomate (Zamir et al., 1994). Sua ação está ligada à inibição do movimento célula-a-célula viral (Zamir et al., 1994).

Outro gene encontrado em *S. habrochaites f. glabratum* nos anos 1990 foi mais tarde denominado de *Ty-2*, sendo mapeado e relacionado ao cromossomo 11 de tomate (Kalloo and Banerjee, 1990, Hanson et al., 2000, Ji et al., 2007b, Hanson et al., 2006).

Recentemente, outro gene presente no cromossomo seis, introgridido a partir de *S. chilense*, foi encontrado e chamado de *Ty-3* (Ji et al., 2007a). Ji e colaboradores (2007a) mostraram que os genes do *Ty-1* e *Ty-3* não são alélicos e *Ty-3* pode conferir resistência a begomovírus bipartidos. Porém mais tarde, Verlaan e colaboradores (2011) demonstraram que *Ty-1* e *Ty-3* podiam se sobrepor no cromossomo seis e, serem alélicos. Verlaan e colaboradores (2013) provaram a suspeita de 2011 e concluíram que além de serem alélicos *Ty-1* e *Ty-3* são responsáveis por codificar uma polimerase dependente de RNA-polimerase.

Ji e colaboradores (2009) mapearam outro gene de resistência a TYLCV o *Ty-4*, que foi introgridido em *S. lycopersicum* a partir de *S. chilense*, assim como o *Ty-3*. Diferentemente do *Ty-3*, os autores provaram que o gene *Ty-4* está presente no cromossomo três. Vale ressaltar que o gene *Ty-4* não confere resistência a todos os isolados de TYLCV presentes na Europa, África e Ásia (Ji et al., 2009).

O gene de resistência *Ty-5* foi introgridido em *S. lycopersicum* a partir de *S. peruvianum* e mapeado no cromossomo 4 (Anbinder et al., 2009). Recentemente, Hutton e colaboradores (2012) mapearam um outro gene, de caráter recessivo e no cromossomo 4, foi denominado de *ty-5*; e provaram que o *ty-5* é um alelo de *Ty-5*.

No Brasil um gene recessivo de resistência, chamado de *tcm-1*, foi relatado em 2005, com herança monogênica recessiva e é derivado de *S. lycopersicum* cv. “Tyking” (Giordano et al., 2005). Plantas com esse gene apresentam resistência a isolados de ToCMoV, e também a outras espécies de begomovírus brasileiros bipartidos (Pereira-Carvalho et al., 2010).

Segundo Aguilera e colaboradores (2011) as cultivares comerciais que possuem moderada resistência a begomovírus brasileiros, no Brasil, são portadoras do gene *Ty-1*

(Aguilera et al., 2011). Esses autores encontraram ainda, acessos presentes no banco de germoplasma de hortaliças da Universidade Federal de Viçosa, com os genes *Ty-2* e *Ty-3*, com características de interesse para programas de melhoramento brasileiros. Existem no mercado muitas opções de híbridos com moderada resistência a begomovírus, por exemplo Dominador, Gladiador, Ellen, Carina TY, Colossus, Portinari, etc. Esses híbridos apresentam crescimento indeterminado e são voltados para o mercado fresco. Para tomateiro de crescimento determinado, o híbrido TY2006 apresenta resistência semelhante e é cultivado em algumas regiões para mercado fresco. A partir de 2014, o híbrido BRS Sena, de crescimento determinado e aptidão de processamento, estará disponível no mercado.

6. Tospovirus

Os tospovírus foram primeiramente descritos em 1915 infectando tomates na Austrália causando a doença conhecida como “spotted wilt” ou vira-cabeça do tomateiro (Brittlebank, 1919). Por volta da década de 1930, verificou-se que o vírus era transmitido por tripes, sendo que epidemias dessa doença foram relatadas em várias partes do mundo (Samuel et al., 1930, Pittman, 1972).

O *Tospovirus* é um gênero pertencente à família *Bunyaviridae*, que possui outros quatro gêneros *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus* e *Phlebovirus*. O gênero dos tospovírus é o único gênero dentro da família capaz de infectar plantas, enquanto os vírus de outros gêneros infectam animais (ICTV, 2013).

O gênero possui oito espécies aceitas pelo ICTV, são elas: *Groundnut bud necrosis virus* – PBNV, *Groundnut ringspot virus* – GRSV, *Impatiens necrotic spot virus* – INSV, *Tomato chlorotic spot virus* – TCSV, *Tomato spotted wilt virus* – TSWV (espécie-tipo), *Watermelon silver mottle virus* – WSMoV e *Zucchini lethal chlorosis virus* – ZLCV (ICTV,

2013). Existem ainda onze espécies de tospovírus que são espécies tentativas, ainda não incorporadas pelo ICTV (Pappu et al., 2009).

De acordo com a organização genômica dos tospovírus ele foi inserido dentro da família *Bunyaviridae* no quinto relatório divulgado pelo ICTV (Francki et al., 1991). O vírus possui um envelope de lipídeos contendo dois tipos de glicoproteínas e dentro do envelope há três segmentos de ssRNA chamados de S, M e L protegidos pela proteína do nucleocapsídeo e com algumas cópias da proteína L (Fig. 6) (van Poelwijk et al., 1993).

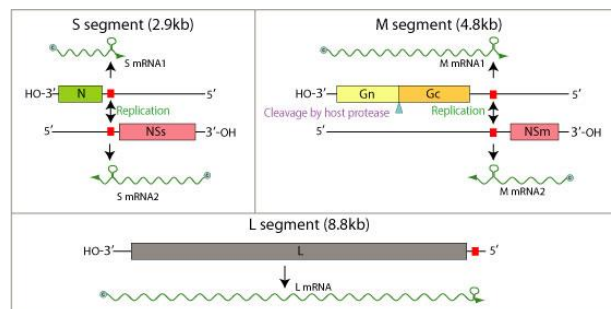


Figura 6. Representação esquemática da organização genômica dos três segmentos dos tospovírus. Fonte: ViralZone (2013b).

O segmento L possui sentido negativo e codifica a proteína L, uma polimerase de RNA dependente de RNA (van Poelwijk et al., 1993).

O segmento M, que codifica proteínas em ambos os sentidos, negativo e positivo, codifica as duas glicoproteínas (proteínas estruturais) no sentido complementar viral e no sentido viral a proteína não estrutural NSm que está relacionada ao movimento célula-a-célula (Storms et al., 1995).

O segmento S no sentido viral codifica a proteína NSs responsável pela supressão do silenciamento gênico e no sentido complementar viral codifica a proteína estrutural N do nucleocapsídeo (de Haan et al., 1990, Kormelink et al., 1991).

Até o início da década de 1990 acreditava-se que em todas as regiões do mundo o gênero fosse monotípico, ou seja, até então só TSWV tinha sido descrito (Pappu et al., 2009).

Porém, Ávila e colaboradores (1990) realizaram experimentos para, através do método de ELISA, conseguir separar vinte isolados diferentes de TSWV em serotipos e serogrupos. Eles testaram anticorpos mono e policlonais produzidos a partir das glicoproteínas e da proteína N e obtiveram um método mais eficiente que era capaz de separar em dois serogrupos e três serotipos os vinte isolados. A partir de então, com o aprimoramento da técnica de ELISA, foi possível a separação de isolados de TSWV em espécies diferentes.

Com isso, Law e Moyer (1990) descreveram o INSV infectando o híbrido New Guinea de *Impatiens* sp., que apresentava diferenças sorológicas na proteína do nucleocapsídeo (N) com o TSWV.

Os tospovírus são transmitidos por várias espécies de tripes, de maneira propagativa-circulativa (Mound, 1996, Ullman et al., 1997). Diferentes espécies de tripes têm diferentes eficiências de transmissão, sendo dependente da espécie de tospovírus que eles transmitem (Wijkamp et al., 1995). Existem mais de cinco mil espécies de tripes e mais ou menos dez espécies foram descritas como capazes de transmitir os tospovírus. As principais espécies que atuam como vetoras de tospovírus pertencem aos gêneros *Thrips* e *Frankliniella*.

Tanto o adulto quanto as larvas de tripes são capazes de se alimentar em plantas infectadas com tospovírus, porém é apenas nos instares iniciais do estágio larval que o inseto é capaz de adquirir o vírus. A transmissão acontece apenas nos estádios finais da fase larval e durante toda a vida adulta, sendo que a transmissão acontece após um período mínimo de latência do vírus no corpo do inseto (Wijkamp et al., 1996, Ullman et al., 1997).

Os sintomas de infecção com os tospovírus variam conforme a hospedeira, porém, os sintomas mais comumente associados à tospovirose são: anéis cloróticos ou necróticos nas folhas e frutos; mosaico, deformação foliar, necrose e nanismo (Sherwood et al., 2009).

Para o controle de infecções virais causadas por tospovírus é essencial realizar um manejo integrado, usando práticas como uso de materiais com resistência aos tospovírus;

controle do inseto-vetor; uso do “mulching” refletivo, para desorientar o trips; plantio em épocas desfavoráveis ao vetor; e realizar o roguing (Kimati et al., 2005).

No Brasil, além do TSWV, descrito nos anos de 1940, existem mais tospovírus presentes: TCSV (*Tomato chlorotic spot virus*) (De Ávila et al., 1990), GRSV (*Groundnut ringspot virus*) (De Ávila et al., 1990), IYSV (*Iris yellow spot virus*) (Pozzer et al., 1999), CSNV (*Chrysanthemum stem necrosis virus*) (Bezerra et al., 1999) e ZLCV (*Zucchini lethal chlorosis virus*) (Bezerra et al., 1999).

Em tomateiro no Brasil, a doença do vira-cabeça está distribuída amplamente em todas as áreas produtoras de tomateiro no território nacional, e ocorrem surtos frequentes que causam grandes perdas (Lopes and Ávila, 2005). Os tospovírus que foram encontradas infectando tomateiro são: TSWV, TCSV, GRSV e CSNV (Lopes and Ávila, 2005).

7. Tobamovirus

O vírus que causa o mosaico do fumo, o *Tobacco mosaic virus* (TMV), é muito importante em campos de produção de fumo, principalmente nos Estados Unidos. O TMV foi o primeiro vírus a ser descoberto, Adolf Mayer chamou a doença de mosaico do fumo no final do século XIX (Mayer, 1886). Foi também o primeiro vírus a ser purificado e suas partículas observadas em microscópio eletrônico (Stanley, 1935).

O TMV é a espécie-tipo do gênero *Tobamovirus*, que está classificado dentro da família *Virgaviridae* (ICTV, 2013). A família *Virgaviridae* possui cinco gêneros: *Furovirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus* e *Tobamovirus*. O gênero *Tobamovirus* é o maior gênero da família e possui 33 espécies (ICTV, 2013).

Os tobamovírus são caracterizados por apresentar partícula alongada e rígida composta por uma fita simples de RNA sentido positivo. O RNA do TMV codifica pelo menos quatro

proteínas: capa proteica (CP), duas proteínas relacionadas à replicação e a proteína do movimento (MP) (Fig. 7) (Zaitlin, 1999).

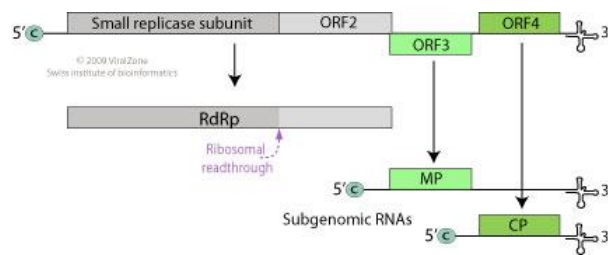


Figura 7. Representação esquemática da organização genômica e dos RNAs subgenômicos dos tobamovírus. Fonte: ViralZone (2013a).

Uma espécie de vírus dentro desse gênero que causa uma doença importante no tomateiro é o *Tomato mosaic virus* (ToMV). Esse vírus causa em tomateiro sintomas que se iniciam com áreas verde-claras entre as nervuras das folhas e evoluem para mosaico nas folhas, com áreas verde-escuras e verde-claras, redução do crescimento, deformação e redução na quantidade de frutos, quando em infecção severa os frutos por dentro ficam com coloração marrom (Kimati et al., 2005).

Essa espécie viral não possui vetor, porém pode ser facilmente transmitida mecanicamente, por sementes e apresenta alta estabilidade, podendo sobreviver por longos períodos em restos de cultura no solo (Scholthof, 2005)

Medidas de controle para a doença se baseiam na prevenção, principalmente medidas sanitárias. Não existe, também, nenhum produto de ação preventiva que proteja a planta da infecção viral. Portanto, medidas como: remover plantas infectadas do campo, inclusive a raiz; lavar bem as mãos antes dos tratos culturais; evitar plantios onde existiam plantas infectadas; evitar fumar durante a manipulação das plantas; lavagem e desinfecção regular das ferramentas; usar sementes saudáveis; pulverização de solução com leite (Kimati et al., 2005).

Uma doença com sintomas similares aos causados por TMV foi descrita em tomateiro no início da década de 1970 no Brasil (Costa et al., 1971). Foi a partir de então que o ToMV foi descrito por vários autores em diversas localidades do Brasil (Fernandes et al., 1983,

Caner et al., 1990). Algumas estirpes diferentes de ToMV já foram relatadas no país (Bastos et al., 1999).

Apesar da maioria das cultivares de tomateiro plantadas no Brasil possuírem resistência a tobamovírus, surtos ocasionais podem ocorrer em decorrência do plantio de sementes infectadas e práticas culturais inadequadas (Lopes and Ávila, 2005).

8. Controle de viroses em tomateiro

O controle de doenças de plantas visa, principalmente, o aumento da qualidade e quantidade dos produtos agrícolas a serem produzidos após a infecção por um determinado patógeno (Agrios, 2005). Os métodos de controle que devem ser empregados dependem substancialmente de uma série de fatores, incluindo tipo de patógeno, a hospedeira, interação patógeno-hospedeira, entre outras variáveis (Agrios, 2005).

Especialmente para doenças causadas por vírus, as plantas são tratadas individualmente, diferentemente do que acontece com outros patógenos, para os quais se tratam as populações de plantas. No caso de vírus, é possível que a eliminação de uma planta possa resultar prevenção de infecções secundárias.

Para a sistematização dos métodos de controle Whetzel e colaboradores (1925), Whetzel (1929) e mais tarde Marchionatto (1949), complementando Whetzel, propuseram os princípios gerais de controle, que se baseiam nas relações entre patógeno-hospedeiro-ambiente, ou seja, no triângulo da doença. São eles: evasão, regulação, exclusão, erradicação, terapia, proteção e imunização.

O princípio da evasão se baseia na prevenção da doença por meio da fuga ao patógeno ou às condições ambientais favoráveis ao patógeno. No caso de viroses pode-se evitar o plantio em épocas que estejam mais favoráveis à disseminação do vetor ou em localizações geográficas que possuam uma alta população do vetor (Kimati et al., 1995).

O princípio da exclusão se baseia na prevenção da entrada de um patógeno em uma determinada área. Para viroses esse método é muito importante, pois, uma vez que um vírus entra em uma área, sua eliminação é muito difícil. Então a promoção de medidas que evitem a entrada do vírus a uma determinada área é extremamente importante (Kimati et al., 1995). Medidas quarentenárias são exemplos de ações que podem ser tomadas em nível nacional, estadual ou municipal, porém a exclusão pode ser aplicada também em nível de propriedade pelo agricultor (Kimati et al., 1995).

O princípio da erradicação objetiva eliminar a doença da área onde ela está presente. A identificação precoce da presença da doença no campo de produção é essencial para o sucesso da medida, sendo que uma vez que uma planta infectada por um determinado vírus é eliminada, a infecção de outras plantas é evitada (Kimati et al., 1995). Outras medidas como eliminação de restos culturais, eliminação de hospedeiros alternativos, tratamento de sementes e rotação de culturas, são altamente eficientes para o controle de viroses ou pelo menos para atrasar o início da infecção, com a diminuição da fonte de inóculo para o plantio seguinte (Kimati et al., 1995).

O princípio da regulação toma medidas que modificam o ambiente para desfavorecer o patógeno (Kimati et al., 1995).

O princípio da proteção visa a prevenção do contato direto do patógeno com a hospedeira, por meio da aplicação de fungicidas, por exemplo, para viroses esse princípio não é aplicado (Kimati et al., 1995).

O princípio da imunização representa as medidas mais eficientes para o controle de viroses, como, o desenvolvimento de plantas tolerantes, resistentes ou imunes, por meio de métodos naturais, como melhoramento genético convencional, ou artificiais, como a transgenia (Kimati et al., 1995). Além disso, pode se citar a imunização química, em que a imunização da planta é garantida pela aplicação de produtos químicos, um exemplo

amplamente utilizado é a substância química Acibenzolar-S-metil, eficiente contra fungos e bactérias. A chamada imunização biológica é caracterizada pela proteção cruzada ou pré-imunização. Um exemplo muito comum no Brasil é a utilização do limão galego previamente inoculado com uma estirpe fraca do vírus da tristeza do citros, que protege a planta contra estirpes mais agressivas do mesmo vírus (Kimati et al., 1995).

Finalmente, o princípio da terapia se baseia na recuperação da planta e eliminação do patógeno após a infecção estar estabelecida, são exemplos da aplicação desse método o uso de fungicidas e bactericidas, além do tratamento térmico (Kimati et al., 1995).

9. Indução de resistência sistêmica adquirida

Como uma forma de sobreviver ao ataque de patógenos, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa para se protegerem da infecção. A resistência sistêmica adquirida (RSA) é uma das formas de impedir o desenvolvimento de uma infecção causada pelo patógeno.

A RSA é desencadeada pela hospedeira após a invasão por um patógeno. Sabe-se que uma planta não desencadeia a RSA após um ferimento ou estresse osmótico, ou seja, só há RSA com a presença de um patógeno (Ryals et al., 1994).

A RSA é um tipo de defesa da planta de amplo espectro e de longa duração, podendo perdurar até 20 dias na planta (Luna et al., 2012). Esta se diferencia de mecanismos de defesas pré-existentes como barreiras físicas, mas também é diferente de mecanismos induzíveis, como a resposta de hipersensibilidade, por exemplo (Ryals et al., 1994).

Hormônios como o ácido salicílico e ácido jasmônico estão envolvidos na via de sinalização e desencadeamento da RSA e atuam de diferentes formas na planta (Spoel et al., 2003, Koornneef and Pieterse, 2008). Para a resposta na indução da RSA há a acumulação do ácido salicílico na planta (Lawton et al., 1996).

Desde meados da década de 1960 é conhecida a indução de RSA por vírus em plantas de fumo (Ross, 1961). Em meados da década de 1990 as vias utilizadas pela planta na indução de resistência começaram a serem estudadas, com isso plantas transgênicas super-expressando ou inibindo certas vias foram produzidas (Lawton et al., 1996). A partir de então, compostos químicos, capazes de induzir a RSA foram sintetizados e aplicados nas plantas com a finalidade de induzir a RSA. Hoje existem no mercado alguns produtos que são comercializados como fertilizantes com ação de indução de resistência. Os principais serão abordados a seguir.

O primeiro grupo de compostos a serem sintetizados foram os Benzothiadiazoles, que mostraram serem indutores de RSA e ativadores de genes que codificam as proteínas relacionadas à patogenicidade (PR) (Lawton et al., 1996, Ruess et al., 1996).

O composto do grupo dos Benzothiadiazoles que é atualmente mais utilizado é o Acibenzolar-S-Metil (ASM), lançado pela Bayer nos EUA em 1999 com o nome de Actigard[®], no Brasil é vendido pela Syngenta, com o nome de Bion[®].

A época em que o ASM começou a ser comercializado, vários estudos foram realizados testando o efeito em diversos patógenos em diversas culturas, como brássicas, milho, trigo, fumo, pêsego e pepino (Ishii et al., 1999, Benhamou and Belanger, 1998, Görlach et al., 1996, Jensen et al., 1998, Morris et al., 1998, Campbell and Wilson, 1999).

Atualmente é conhecida a indução de RSA por patógenos como fungos e bactérias, porém existem dúvidas se esses compostos podem induzir resistência contra infecção por vírus (Ishii et al., 1999).

Existem alguns estudos que testaram o efeito do ASM, por exemplo, à infecção por TSWV em fumo e obtiveram resultados positivos na indução da RSA (Pappu et al., 2000, Csinos et al., 2001, Mandal et al., 2008); à infecção por tobamovírus (TMV e ToMV) em

tomateiro e pimentão (Madhusudhan et al., 2008); à infecção por *Cucumber mosaic virus* (CMV) em tomateiro (Anfoka, 2000).

Um outro grupo de compostos são as estrobirulinas são uma classe de fungicidas de amplo espectro, que contém componentes sintéticos que protegem as plantas, cujo modo de ação é a inibição da respiração mitocondrial (Sauter et al., 1999). Além dos efeitos antifúngicos as estrobirulinas, principalmente a piraclostrobina, mostraram ser indutores de efeitos fisiológicos nas plantas, como aumento da resistência da planta contra o ataque de patógenos, as plantas tratadas com piraclostrobina aparentaram estar mais saudáveis do que plantas não tratadas (Koehle et al., 2002). Adicionalmente, plantas de trigo tratadas com piraclostrobina exibiram um aumento de produtividade em comparação com plantas não tratadas (Koehle et al., 2002).

Herms e colaboradores (2002) também demonstraram um efeito positivo em que plantas de fumo cv. Xanthi pré-tratadas com piraclostrobina aumentaram a resistência contra TMV, pela redução no tamanho das lesões causadas pelo vírus.

Acadian é um fertilizante foliar constituído pelo extrato da alga *Ascophyllum nodosum* e é considerado como um bioestimulante para plantas (Brown, 2004). O extrato de alga pode ser uma fonte natural de citocinina, um hormônio da planta (Reiber and Neuman, 1999, Zhang and Schmidt, 2000). Fernandes (2009) testou a eficiência de Acadian em lavoura de café irrigado e concluiu que o produto promoveu um aumento de produtividade, ajudou a controlar a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) no primeiro ano, por outro lado a redução na quantidade de doença não foi estatisticamente significativa.

Adhevir's é um fertilizante que aplicado na planta preventivamente, pode auxiliar a recuperação do estado de estresse e aumentar sua produtividade (Centro, 2010). Em plantas infectadas por vírus transmitidos pela mosca-branca, verificou-se que mesmo após a infecção

viral esta continue seu desenvolvimento e produtividade com a sua aplicação (Biochem, 2012).

Aminonutri é um fertilizante foliar organomineral, que promove o crescimento vegetativo, melhora o desenvolvimento de raízes, ramos e folhas novas, melhora a absorção e translocação de nutrientes e contribui para a maior tolerância da planta às condições adversas (Rural, 2014).

Megafol, além de ser um fertilizante foliar produzido a base de extratos vegetais, é também um ativador do crescimento das plantas após a planta sofrer algum estresse ambiental (Valagro, 2009).

Orobor N1 é um fertilizante foliar sua base é feita de extratos cítricos e pode ser utilizado juntamente com inseticida, fungicidas ou bactericidas, em todas as culturas (Agrícola, 2008).

Protton é um fertilizante foliar misto, disponibiliza fósforo e potássio rapidamente para as plantas, permitindo com isso uma rápida recuperação das plantas depois de sofrer estresses bióticos e abióticos (Plantytec, 2009).

10. Literatura Citada

- AGRÍCOLA, P. 2008. *Fertilizante Orobor NI* [Online]. Available: <http://www.padoinagricola.com.br/index.php/faq/38-oro-agri/84-fertilizante-orobor-n1> [Accessed 12 jan 2014].
- AGRIOS, G. N. 2005. *Plant Pathology*, Elsevier Science.
- AGUILERA, J. G., HURTADO, F. D., XAVIER, C. A. D., LAURINDO, B. S., NICK, C., GIL, M. Á., SILVA, D. J. H. D. & ZERBINI, F. M. 2011. Identificação dos genes Ty-2 e Ty-3 de resistência a begomovírus em genótipos de tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46, 772-775.
- ALBUQUERQUE, L. C., INOUE-NAGATA, A. K., PINHEIRO, B., RESENDE, R. O., MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2012a. Genetic diversity and recombination analysis of sweepoviruses from Brazil. *Virology Journal*, 9, 241.
- ALBUQUERQUE, L. C., INOUE-NAGATA, A. K., PINHEIRO, B., RIBEIRO SDA, G., RESENDE, R. O., MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2011. A novel monopartite begomovirus infecting sweet potato in Brazil. *Arch Virol*, 156, 1291-4.
- ALBUQUERQUE, L. C., VARSANI, A., FERNANDES, F. R., PINHEIRO, B., MARTIN, D. P., DE TARSO OLIVEIRA FERREIRA, P., LEMOS, T. O. & INOUE-NAGATA, A. K. 2012b. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Arch Virol*, 157, 747-52.
- ALEMANDRI, V., DE BARRO, P., BEJERMAN, N., ARGUELLO CARO, E. B., DUMON, A. D., MATTIO, M. F., RODRIGUEZ, S. M. & TRUOLI, G. 2012. Species within the Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) complex in soybean and bean crops in Argentina. *J Econ Entomol*, 105, 48-53.
- AMBROZEVICIUS, L. P., CALEGARIO, R. F., FONTES, E. P. B., CARVALHO, M. G. & ZERBINI, F. M. 2002. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 27, 372-377.
- ANBINDER, I., REUVENI, M., AZARI, R., PARAN, I., NAHON, S., SHLOMO, H., CHEN, L., LAPIDOT, M. & LEVIN, I. 2009. Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from Solanum peruvianum. *Theor Appl Genet*, 119, 519-30.
- ANDRADE, E. C., MANHANI, G. G., ALFENAS, P. F., CALEGARIO, R. F., FONTES, E. P. & ZERBINI, F. M. 2006. Tomato yellow spot virus, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from Sida sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from Sida. *J Gen Virol*, 87, 3687-96.
- ANFOKA, G. H. 2000. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (Lycopersicon esculentum. Mill cv. Vollendung) to Cucumber mosaic virus. *Crop Protection*, 19, 401-405.
- BARBOSA, J. C., TEIXEIRA, A. P. M., MOREIRA, A. G., CAMARGO, L. E. A., FILHO, A. B., KITAJIMA, E. W. & REZENDE, J. A. M. 2008. First Report of Tomato chlorosis virus Infecting Tomato Crops in Brazil. *Plant Disease*, 92, 1709-1709.
- BASTOS, H. B., PAVAN, M. A. & SILVA, N. 1999. Estirpes do vírus do mosaico do tomateiro presentes em regiões produtoras de tomate do Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, 1, 14 - 16.
- BENHAMOU, N. & BELANGER, R. R. 1998. Induction of systemic resistance to Pythium damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Plant J*, 14, 13-21.

- BERNARDO, P., GOLDEN, M., AKRAM, M., NAIMUDDIN, NADARAJAN, N., FERNANDEZ, E., GRANIER, M., REBELO, A. G., PETERSCHMITT, M., MARTIN, D. P. & ROUMAGNAC, P. 2013. Identification and characterisation of a highly divergent geminivirus: Evolutionary and taxonomic implications. *Virus Research*, 177, 35-45.
- BEZERRA, I. C., DE O. RESENDE, R., POZZER, L., NAGATA, T., KORMELINK, R. & DE ÁVILA, A. C. 1999. Increase of Tospoviral Diversity in Brazil with the Identification of Two New Tospovirus Species, One from Chrysanthemum and One from Zucchini. *Phytopathology*, 89, 823-830.
- BIOCHEM, B. M. E. Q. 2012. *Adhevir's melhora a sanidade vegetal* [Online]. Available: <http://biochem.co.mz/adhevirs-melhora-a-sanidade-vegetal/> [Accessed 12 jan 2014].
- BOCK, K. R., GUTHRIE, E. J. & WOODS, R. D. 1974. Purification of maize streak virus and its relationship to viruses associated with streak diseases of sugar cane and *Panicum maximum*. *Annals of Applied Biology*, 77, 289-296.
- BONDAR, G. 1928. *Aleyrodideos do Brasil: 2. contribuição*, Secretaria da Agricultura.
- BOULTON, M. I., KING, D. I., DONSON, J. & DAVIES, J. W. 1991. Point substitutions in a promoter-like region and the V1 gene affect the host range and symptoms of maize streak virus. *Virology*, 183, 114-121.
- BRIDDON, R. W., BEDFORD, I. D., TSAI, J. H. & MARKHAM, P. G. 1996. Analysis of the Nucleotide Sequence of the Treehopper-Transmitted Geminivirus, Tomato Pseudo-Curly Top Virus, Suggests a Recombinant Origin. *Virology*, 219, 387-394.
- BRIDDON, R. W., HEYDARNEJAD, J., KHOSROWFAR, F., MASSUMI, H., MARTIN, D. P. & VARSANI, A. 2010. Turnip curly top virus, a highly divergent geminivirus infecting turnip in Iran. *Virus Res*, 152, 169-75.
- BRIDDON, R. W., MANSOOR, S., BEDFORD, I. D., PINNER, M. S., SAUNDERS, K., STANLEY, J., ZAFAR, Y., MALIK, K. A. & MARKHAM, P. G. 2001. Identification of dna components required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology*, 285, 234-43.
- BRIDDON, R. W., PINNER, M. S., STANLEY, J. & MARKHAM, P. G. 1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*, 177, 85-94.
- BRIDDON, R. W. & STANLEY, J. 2006. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology*, 344, 198-210.
- BRITTLBANCK, C. C. 1919. Tomato diseases. *Journal of Agriculture of Victoria*, 17, 213 - 235.
- BROWN, J. K. 2000. Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-Begomovirus complexes. *Virus Res*, 71, 233-60.
- BROWN, J. K., IDRIS, A. M., TORRES-JEREZ, I., BANKS, G. K. & WYATT, S. D. 2001. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Archives of Virology*, 146, 1581-1598.
- BROWN, M. A. 2004. *The use of marine derived products and soybean meal in organic vegetable production*. Master in Science, North Carolina State University.
- CALEGARIO, R. F., FERREIRA, S. D. S., ANDRADE, E. C. D. & ZERBINI, F. M. 2007. Characterization of Tomato yellow spot virus, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42, 1335-1343.
- CAMPBELL, H. L. & WILSON, M. 1999. Evaluation of Actigard (CGA-245704) for the control of bacterial spot of peach. *Phytopathology*, 89.

- CANER, J., COLARICCIO, A., CHAGAS, C. M., ALBA, A. P. C. & VICENTE, M. 1990. Identificação de um isolado do vírus do mosaico do tomateiro (ToMV) no Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, 15, 347 - 350.
- CASTILLO-URQUIZA, G. P., BESERRA, J. E., JR., BRUCKNER, F. P., LIMA, A. T., VARSANI, A., ALFENAS-ZERBINI, P. & MURILO ZERBINI, F. 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Arch Virol*, 153, 1985-9.
- CENTRO, R. 2010. *Adhevir's Adheflex* [Online]. Available: <http://mercado.ruralcentro.com.br/produtos/44740/adhevirs-adheflex> [Accessed 12 jan 2014].
- CLEMENTE, M. V. T. T. & BOITEUX, L. S. 2012. *Produção de Tomate para Processamento Industrial*, Brasília, Embrapa.
- COSTA, A. S. 1955. Studies on Abutilon mosaic in Brazil. *Phytopathology*, 24, 97 - 112.
- COSTA, A. S. 1976. Whitefly-transmitted plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 14, 429 - 440.
- COSTA, A. S., NAGAI, H. & COSTA, C. L. 1971. Mancha parda interna do tomate associada à infecção pelo vírus do mosaico do fumo. *Revista de Olericultura*, 11, 77 - 78.
- COTRIM, M. A. D. 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.
- CSINOS, A. S., PAPPU, H. R., MCPHERSON, R. M. & STEPHENSON, M. G. 2001. Management of Tomato spotted wilt virus in Flue-Cured Tobacco with Acibenzolar-S-Methyl and Imidacloprid. *Plant Disease*, 85, 292-296.
- CUI, X., LI, G., WANG, D., HU, D. & ZHOU, X. 2005. A Begomovirus DNAbeta-encoded protein binds DNA, functions as a suppressor of RNA silencing, and targets the cell nucleus. *J Virol*, 79, 10764-75.
- CUNHA, L., NAGATA, T., RESENDE, R. & INOUE-NAGATA, A. 2001. Biological, serological and genomic characteristics of a potyvirus isolated from tomato in Brazil. *Virus Reviews & Research*, 6, 154-155.
- DE ÁVILA, A. C., HUGUENOT, C., RESENDE RDE, O., KITAJIMA, E. W., GOLDBACH, R. W. & PETERS, D. 1990. Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. *J Gen Virol*, 71 (Pt 12), 2801-7.
- DE BARRO, P. J., LIU, S. S., BOYKIN, L. M. & DINSDALE, A. B. 2011. Bemisia tabaci: a statement of species status. *Annu Rev Entomol*, 56, 1-19.
- DE HAAN, P., WAGEMAKERS, L., PETERS, D. & GOLDBACH, R. 1990. The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *J Gen Virol*, 71 (Pt 5), 1001-7.
- DINSDALE, A., COOK, L., RIGINOS, C., BUCKLEY, Y. M. & BARRO, P. D. 2010. Refined Global Analysis of Bemisia tabaci (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) Mitochondrial Cytochrome Oxidase 1 to Identify Species Level Genetic Boundaries. *Annals of the Entomological Society of America*, 103, 196-208.
- DONSON, J., MORRIS-KRSINICH, B. A., MULLINEAUX, P. M., BOULTON, M. I. & DAVIES, J. W. 1984. A putative primer for second-strand DNA synthesis of maize streak virus is virion-associated. *EMBO J*, 3, 3069-73.
- DUFFY, S. & HOLMES, E. C. 2008. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus tomato yellow leaf curl virus. *J Virol*, 82, 957-65.

- ELMER, J. S., BRAND, L., SUNTER, G., GARDINER, W. E., BISARO, D. M. & ROGERS, S. G. 1988a. Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus. II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. *Nucleic Acids Res*, 16, 7043-60.
- ELMER, J. S., SUNTER, G., GARDINER, W., BRAND, L., BROWNING, C., BISARO, D. & ROGERS, S. 1988b. Agrobacterium-mediated inoculation of plants with tomato golden mosaic virus DNAs. *Plant Molecular Biology*, 10, 225-234.
- ETESSAMI, P., CALLIS, R., ELLWOOD, S. & STANLEY, J. 1988. Delimitation of essential genes of cassava latent virus DNA 2. *Nucleic Acids Res*, 16, 4811-29.
- ETESSAMI, P., SAUNDERS, K., WATTS, J. & STANLEY, J. 1991. Mutational analysis of complementary-sense genes of African cassava mosaic virus DNA A. *J Gen Virol*, 72 (Pt 5), 1005-12.
- FAO, F. A. A. O. O. T. U. N. 2013. FAOSTAT.
- FAUQUET, C. M., BRIDDON, R. W., BROWN, J. K., MORIONES, E., STANLEY, J., ZERBINI, M. & ZHOU, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch Virol*, 153, 783-821.
- FAUQUET, C. M., MAYO, A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U. & BALL, L. A. 2005. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Science.
- FAUQUET, C. M. & STANLEY, J. 2003. Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems. *Annals of Applied Biology*, 142, 165-189.
- FERNANDES, A. L. T. 2009. *Avaliação do concentrado de algas Acadian no desenvolvimento vegetativo e produtivo do cafeeiro irrigado por gotejamento e cultivado em condições de cerrado* [Online]. Uberada. Available: http://www.agrolibertas.com/wp-content/uploads/2011/08/Relat%C3%B3rio_ACADIAN_Uniube_segundo_ano_experimento.pdf [Accessed 12 jan 2014].
- FERNANDES, F. R., DE ALBUQUERQUE, L. C., DE BRITTO GIORDANO, L., BOITEUX, L. S., DE AVILA, A. C. & INOUE-NAGATA, A. K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes*, 36, 251-8.
- FERNANDES, J., CARVALHO, M. & ALMEIDA, E. 1983. Distribuição do Mosaico em tomates de duas regiões produtoras de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, 8, 625.
- FERNANDES, J. J., CARVALHO, M. G., ANDRADE, E. C., BROMMONSCHENKEL, S. H., FONTES, E. P. B. & ZERBINI, F. M. 2006. Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology*, 55, 513-522.
- FILGUEIRA, F. A. R. 2008. *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*, Viçosa, Editora Universidade Federal de Viçosa.
- FLORES, E., SILBERSCHMIDT, K. & KRAMER, H. 1960. Observações de "clorose infecciosa" das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico*, 26, 65 - 69.
- FONDONG, V. N. 2013. Geminivirus protein structure and function. *Molecular Plant Pathology*, 14, 635-649.
- FONTES, E. P., LUCKOW, V. A. & HANLEY-BOWDOIN, L. 1992. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *The Plant Cell Online*, 4, 597-608.
- FRANCKI, R. I., HATTA, T., BOCCARDO, G. & RANGLES, J. W. 1980. The composition of Chloris striate mosaic virus, A geminivirus. *Virology*, 101, 233-41.
- FRANCKI, R. I. B., M., F. C., L., K. D. & F., B. 1991. *Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [for the]*

Virology Division of the International Union of Microbiological Societies, Springer-Verlag.

- FRISCHMUTH, T., ROBERTS, S., VON ARNIM, A. & STANLEY, J. 1993. Specificity of bipartite geminivirus movement proteins. *Virology*, 196, 666-73.
- GALVAO, R. M., MARIANO, A. C., LUZ, D. F., ALFENAS, P. F., ANDRADE, E. C., ZERBINI, F. M., ALMEIDA, M. R. & FONTES, E. P. 2003. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *J Gen Virol*, 84, 715-26.
- GHANIM, M., MORIN, S. & CZOSNEK, H. 2001. Rate of Tomato yellow leaf curl virus Translocation in the Circulative Transmission Pathway of its Vector, the Whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology*, 91, 188-96.
- GIBBS, A. & OHSHIMA, K. 2010. Potyviruses and the digital revolution. *Annu Rev Phytopathol*, 48, 205-23.
- GIORDANO, L. B., SILVA-LOBO, V. L., SANTANA, F. M., FONSECA, M. E. N. & BOITEUX, L. S. 2005. Inheritance of resistance to the bipartite Tomato chlorotic mottle begomovirus derived from *Lycopersicon esculentum* cv. 'Tyking'. *Euphytica*, 143, 27-33.
- GOODMAN, R. M., SHOCK, T. L., HABER, S., BROWNING, K. S. & BOWERS, G. R., JR. 1980. The composition of bean golden mosaic virus and its single-stranded DNA genome. *Virology*, 106, 168-72.
- GOPAL, P., PRAVIN KUMAR, P., SINILAL, B., JOSE, J., KASIN YADUNANDAM, A. & USHA, R. 2007. Differential roles of C4 and β C1 in mediating suppression of post-transcriptional gene silencing: Evidence for transactivation by the C2 of Bendi yellow vein mosaic virus, a monopartite begomovirus. *Virus Research*, 123, 9-18.
- GÖRLACH, J., VOLRATH, S., KNAUF-BEITER, G., HENGY, G., BECKHOVE, U., KOGEL, K. H., OOSTENDORP, M., STAUB, T., WARD, E., KESSMANN, H. & RYALS, J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell Online*, 8, 629-43.
- GOTTLIEB, Y., ZCHORI-FEIN, E., MOZES-DAUBE, N., KONTSEDALOV, S., SKALJAC, M., BRUMIN, M., SOBOL, I., CZOSNEK, H., VAVRE, F., FLEURY, F. & GHANIM, M. 2010. The Transmission Efficiency of Tomato Yellow Leaf Curl Virus by the Whitefly *Bemisia tabaci* Is Correlated with the Presence of a Specific Symbiotic Bacterium Species. *Journal of Virology*, 84, 9310-9317.
- GRONING, B. R., HAYES, R. J. & BUCK, K. W. 1994. Simultaneous regulation of tomato golden mosaic virus coat protein and AL1 gene expression: expression of the AL4 gene may contribute to suppression of the AL1 gene. *J Gen Virol*, 75 (Pt 4), 721-6.
- HAMILTON, W. D., STEIN, V. E., COUTTS, R. H. & BUCK, K. W. 1984. Complete nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of tomato golden mosaic virus: potential coding regions and regulatory sequences. *EMBO J*, 3, 2197-205.
- HAMILTON, W. D. O., BISARO, D. M., COUTTS, R. H. A. & BUCK, K. W. 1983. Demonstration of the bipartite nature of the genome of a single-stranded DNA plant virus by infection with the cloned DNA components. *Nucleic Acids Research*, 11, 7387-7396.
- HANLEY-BOWDOIN, L., BEJARANO, E. R., ROBERTSON, D. & MANSOOR, S. 2013. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat Rev Microbiol*, 11, 777-88.

- HANLEY-BOWDOIN, L., ELMER, J. S. & ROGERS, S. G. 1988. Transient expression of heterologous RNAs using tomato golden mosaic virus. *Nucleic Acids Res*, 16, 10511-28.
- HANLEY-BOWDOIN, L., ELMER, J. S. & ROGERS, S. G. 1990. Expression of functional replication protein from tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 1446-50.
- HANLEY-BOWDOIN, L., SETTLAGE, S. B. & ROBERTSON, D. 2004. Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. *Mol Plant Pathol*, 5, 149-56.
- HANSON, P., GREEN, S. K. & KUO, G. 2006. Ty-2, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Tomato Genetics Cooperative*, 56, 17 - 18.
- HANSON, P. M., BERNACCHI, D., GREEN, S., TANKSLEY, S. D., MUNIYAPPA, V., PADMAJA, A. S., CHEN, H.-M., KUO, G., FANG, D. & CHEN, J.-T. 2000. Mapping a Wild Tomato Introgression Associated with Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance in a Cultivated Tomato Line. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125, 15-20.
- HEHNLE, S., WEGE, C. & JESKE, H. 2004. Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. *J Virol*, 78, 7698-706.
- HERMS, S., SEEHAUS, K., KOEHLE, H. & CONRATH, U. 2002. A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against tobacco mosaic virus and *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. *Plant Physiol*, 130, 120-7.
- HEYDARNEJAD, J., KEYVANI, N., RAZAVINEJAD, S., MASSUMI, H. & VARSANI, A. 2013. Fulfilling Koch's postulates for beet curly top Iran virus and proposal for consideration of new genus in the family Geminiviridae. *Arch Virol*, 158, 435-43.
- HEYRAUD, F., MATZEIT, V., SCHAEFER, S., SCHELL, J. & GRONENBORN, B. 1993. The conserved nonanucleotide motif of the geminivirus stem-loop sequence promotes replicational release of virus molecules from redundant copies. *Biochimie*, 75, 605-615.
- HOU, Y. M. & GILBERTSON, R. L. 1996. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *J Virol*, 70, 5430-6.
- HOWARTH, A. J., CATON, J., BOSSERT, M. & GOODMAN, R. M. 1985. Nucleotide sequence of bean golden mosaic virus and a model for gene regulation in geminiviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 3572-6.
- HOWARTH, A. J. & GOODMAN, R. M. 1982. Plant viruses with genomes of single-stranded DNA. *Trends in Biochemical Sciences*, 7, 180 - 182.
- HUNTER, W. B., HIEBERT, E., WEBB, S. E., TSAI, J. H. & POLSTON, J. E. 1998. Location of Geminiviruses in the Whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Plant Disease*, 82, 1147-1151.
- HUTTON, S. F., SCOTT, J. W. & SCHUSTER, D. J. 2012. Recessive Resistance to Tomato yellow leaf curl virus from the Tomato Cultivar Tyking Is Located in the Same Region as Ty-5 on Chromosome 4. *HortScience*, 47, 324-327.
- IBGE 2006. Censo Agropecuário. Rio de Janeiro.
- IBGE 2013. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro.
- ICTV. 2013. *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* [Online]. Available: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> [Accessed 13/11 2013].
- INGHAM, D. J., PASCAL, E. & LAZAROWITZ, S. G. 1995. Both bipartite geminivirus movement proteins define viral host range, but only BL1 determines viral pathogenicity. *Virology*, 207, 191-204.

- INOUE-NAGATA, A. K., ALBUQUERQUE, L. C., ROCHA, W. B. & NAGATA, T. 2004. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. *J Virol Methods*, 116, 209-11.
- INOUE-NAGATA, A. K., MARTIN, D. P., BOITEUX, L. S., GIORDANO, L. D. B., BEZERRA, I. C. & ÁVILA, A. C. D. 2006. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41, 1329-1332.
- ISHII, H., TOMITA, Y., HORIO, T., NARUSAKA, Y., NAKAZAWA, Y., NISHIMURA, K. & IWAMOTO, S. 1999. Induced Resistance of Acibenzolar-S-methyl (CGA 245704) to Cucumber and Japanese Pear Diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 77-85.
- JENSEN, B. D., OLUMIDE LATUNDE-DADA, A., HUDSON, D. & LUCAS, J. A. 1998. Protection of Brassica seedlings against downy mildew and damping-off by seed treatment with CGA 245704, an activator of systemic acquired resistance. *Pesticide Science*, 52, 63-69.
- JESKE, H., LÜTGEMEIER, M. & PREIß, W. 2001. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *EMBO Journal*, 20, 6158-6167.
- JI, Y., SCHUSTER, D. & SCOTT, J. 2007a. Ty-3, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding*, 20, 271-284.
- JI, Y., SCOTT, J., HANSON, P., GRAHAM, E. & MAXWELL, D. 2007b. Sources of Resistance, Inheritance, and Location of Genetic Loci Conferring Resistance to Members of the Tomato-Infecting Begomoviruses. In: CZOSNEK, H. (ed.) *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease*. Springer Netherlands.
- JI, Y., SCOTT, J. W., SCHUSTER, D. J. & MAXWELL, D. P. 2009. Molecular Mapping of Ty-4, a New Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Locus on Chromosome 3 of Tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134, 281-288.
- JUPIN, I., DE KOUCHKOVSKY, F., JOUANNEAU, F. & GRONENBORN, B. 1994. Movement of Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus (TYLCV): Involvement of the Protein Encoded by ORF C4. *Virology*, 204, 82-90.
- KALLOO & BANERJEE, M. K. 1990. Transfer of Tomato Leaf Curl Virus Resistance from *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to *L. esculentum*. *Plant Breeding*, 105, 156-159.
- KIKUNO, R., TOH, H., HAYASHIDA, H. & MIYATA, T. 1984. Sequence similarity between putative gene products of geminiviral DNAs. *Nature*, 308, 562.
- KIMATI, H., FILHO, A. B. & AMORIM, L. 1995. *Manual de fitopatologia: principios e conceitos*, Agronomica Ceres.
- KIMATI, H., FILHO, A. B. & AMORIM, L. 2005. *Manual de fitopatologia*, Agronômica Ceres.
- KING, A. M. Q., LEFKOWITZ, E., ADAMS, M. J. & CARSTENS, E. B. 2011. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Science.
- KOEHLE, H., GROSSMANN, K., JABS, T., STIERL, R., GERHARD, M., KAISER, W., GLAAB, J., CONRATH, U., SEEHAUS, K. & HERMS, S. 2002. Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants. In: RUSSELL, P. E., DEHNE, H. W., S., H. & SISLER, H. D. (eds.) *Modern Fungicides and Antifungal Compounds III*. Andover: Intercept.
- KOORNNEEF, A. & PIETERSE, C. M. J. 2008. Cross Talk in Defense Signaling. *Plant Physiology*, 146, 839-844.

- KORMELINK, R., KITAJIMA, E. W., DE HAAN, P., ZUIDEMA, D., PETERS, D. & GOLDBACH, R. 1991. The nonstructural protein (NSs) encoded by the ambisense S RNA segment of tomato spotted wilt virus is associated with fibrous structures in infected plant cells. *Virology*, 181, 459-68.
- KRENZ, B., JESKE, H. & KLEINOW, T. 2012. The induction of stromule formation by a plant DNA-virus in epidermal leaf tissues suggests a novel intra- and intercellular macromolecular trafficking route. *Front Plant Sci*, 3, 291.
- KRUPOVIC, M., RAVANTTI, J. & BAMFORD, D. 2009. Geminiviruses: a tale of a plasmid becoming a virus. *BMC Evolutionary Biology*, 9, 1-11.
- LAPIDOT, M., GOLDRAY, O., BEN-JOSEPH, R., COHEN, S., FRIEDMANN, M., SHLOMO, A., NAHON, S., CHEN, L. & PILOWSKY, M. 2000. Breeding tomatoes for resistance to tomato yellow leaf curl begomovirus. *EPPO Bulletin*, 30, 317-321.
- LAUFS, J., TRAUT, W., HEYRAUD, F., MATZEIT, V., ROGERS, S. G., SCHELL, J. & GRONENBORN, B. 1995. In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 3879-3883.
- LAW, M. D. & MOYER, J. W. 1990. A tomato spotted wilt-like virus with a serologically distinct N protein. *Journal of General Virology*, 71, 933-938.
- LAWTON, K. A., FRIEDRICH, L., HUNT, M., WEYMANN, K., DELANEY, T., KESSMANN, H., STAUB, T. & RYALS, J. 1996. Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J*, 10, 71-82.
- LAZAROWITZ, S. G. & BEACHY, R. N. 1999. Viral Movement Proteins as Probes for Intracellular and Intercellular Trafficking in Plants. *The Plant Cell Online*, 11, 535-548.
- LAZAROWITZ, S. G. & SHEPHERD, R. J. 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 11, 327-349.
- LOPES, C. A. & ÁVILA, A. C. 2005. *Doenças do tomateiro*, Embrapa Hortaliças.
- LOPES, C. A. & QUEZADO-SOARES, A. M. 1997. *Doenças bacterianas das hortaliças: Diagnose e controle*, Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças.
- LOURENÇÃO, A. L. & NAGAI, H. 1994. Surtos populacionais de Bemisia tabaci no estado de São Paulo. *Bragantia*, 53, 53-59.
- LOZANO, G., TRENADO, H. P., VALVERDE, R. A. & NAVAS-CASTILLO, J. 2009. Novel begomovirus species of recombinant nature in sweet potato (*Ipomoea batatas*) and *Ipomoea indica*: taxonomic and phylogenetic implications. *J Gen Virol*, 90, 2550-62.
- LUNA, E., BRUCE, T. J. A., ROBERTS, M. R., FLORS, V. & TON, J. 2012. Next-Generation Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiology*, 158, 844-853.
- MADHUSUDHAN, K. N., DEEPAK, S. A., PRAKASH, H. S., AGRAWAL, G. K., JWA, N. S. & RAKWAL, R. 2008. Acibenzolar-S-Methyl (ASM)-Induced Resistance against Tobamoviruses Involves Induction of RNADependent RNA Polymerase (RdRp) and Alternative Oxidase (AOX) Genes. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 11, 127 - 134.
- MANDAL, B., MANDAL, S., CSINOS, A. S., MARTINEZ, N., CULBREATH, A. K. & PAPPU, H. R. 2008. Biological and Molecular Analyses of the Acibenzolar-S-Methyl-Induced Systemic Acquired Resistance in Flue-Cured Tobacco Against Tomato spotted wilt virus. *Phytopathology*, 98, 196-204.
- MANSOOR, S., BRIDDON, R. W., BULL, S. E., BEDFORD, I. D., BASHIR, A., HUSSAIN, M., SAEED, M., ZAFAR, Y., MALIK, K. A., FAUQUET, C. &

- MARKHAM, P. G. 2003. Cotton leaf curl disease is associated with multiple monopartite begomoviruses supported by single DNA beta. *Arch Virol*, 148, 1969-86.
- MARCHIONATTO, P. J. B. 1949. Directivas en la lucha contra las enfermedades de las plantas. *Revista Argentina de agronomía*, 16, 29.
- MÁRQUEZ-MARTÍN, B., ARAGÓN-CABALLERO, L., FIALLO-OLIVÉ, E., NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. 2011. Tomato leaf deformation virus, a novel begomovirus associated with a severe disease of tomato in Peru. *European Journal of Plant Pathology*, 129, 1-7.
- MARTIN, D. & RYBICKI, E. 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*, 16, 562-563.
- MARTIN, D. P., BIAGINI, P., LEFEUVRE, P., GOLDEN, M., ROUMAGNAC, P. & VARSANI, A. 2011. Recombination in Eukaryotic Single Stranded DNA Viruses. *Viruses*, 3, 1699-1738.
- MARUBAYASHI, J. M., YUKI, V. A., ROCHA, K. C. G., MITUTI, T., PELEGRINOTTI, F. M., FERREIRA, F. Z., MOURA, M. F., NAVAS-CASTILLO, J., MORIONES, E., PAVAN, M. A. & KRAUSE-SAKATE, R. 2013. At least two indigenous species of the Bemisia tabaci complex are present in Brazil. *Journal of Applied Entomology*, 137, 113-121.
- MATTHEWS, R. E. F. 1979. The Classification and Nomenclature of Viruses. *Intervirology*, 11, 133-135.
- MATYIS, J. C., SILVA, D. M., OLIVEIRA, A. R. & COSTA, A. S. 1975. Purification and morphology of tomato golden mosaic virus. *Summa Phytopathologica*, 1, 267 - 275.
- MAYER, A. 1886. Concerning the mosaic disease of tobacco. In: SOCIETY, A. P. (ed.) *Phytopathological Classics Number 7*. St. Paul: Johnson, J.
- MCDANIEL, L. L. & TSAI, J. H. 1990. Partial characterization and serological analysis of pseudo-curly top virus. *Plant Disease*, 74, 17-21.
- MEIJAARD, D. 1992. Fresh tomato production in North-Western Europe. In: LAURET, F. (ed.) *Les fruits et légumes dans les économies méditerranéennes : actes du colloque de Chania*. Montpellier : CIHEAM.
- MELGAREJO, T. A., KON, T., ROJAS, M. R., PAZ-CARRASCO, L., ZERBINI, F. M. & GILBERTSON, R. L. 2013. Characterization of a New World Monopartite Begomovirus Causing Leaf Curl Disease of Tomato in Ecuador and Peru Reveals a New Direction in Geminivirus Evolution. *Journal of Virology*, 87, 5397-5413.
- MORRIS, S. W., VERNOOIJ, B., TITATARN, S., STARRETT, M., THOMAS, S., WILTSE, C. C., FREDERIKSEN, R. A., BHANDHUFALCK, A., HULBERT, S. & UKNES, S. 1998. Induced resistance responses in maize. *Mol Plant Microbe Interact*, 11, 643-58.
- MOUND, L. A. 1996. The Thysanoptera Vector Species of Tospoviruses. *Acta Horticulturae*, 431, 298 - 309.
- MUMFORD, D. L. 1974. Putification of Curly Top Virus. *Phytopathology*, 64, 136 - 139.
- MURPHY, F. A., M., F. C., L., B. D. H., A., G. S., W., J. A., P., M. G., A., M. M. & D., S. M. 1995. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses : sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Springer-Verlag.
- NAITO, F. Y. B. 2012. *Avaliação da diversidade de begomovírus em tomateiro em três pólos de produção de tomate para processamento do Brasil*. Master, Universidade of Brasília.
- NAKHLA, M. K., MAXWELL, D. P., MARTINEZ, R. T., CARVALHO, M. G. & GILBERTSON, R. L. 1994. Widespread occurrence of the eastern Mediterranean strain of tomato yellow leaf curl geminivirus in tomatoes in the Dominican Republic. *Plant Disease*, 78, 926.

- NORIS, E., JUPIN, I., ACCOTTO, G. P. & GRONENBORN, B. 1996. DNA-binding activity of the C2 protein of tomato yellow leaf curl geminivirus. *Virology*, 217, 607-12.
- NORIS, E., VAIRA, A. M., CACIAGLI, P., MASENGA, V., GRONENBORN, B. & ACCOTTO, G. P. 1998. Amino acids in the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus that are crucial for systemic infection, particle formation, and insect transmission. *J Virol*, 72, 10050-7.
- NOUEIRY, A. O., LUCAS, W. J. & GILBERTSON, R. L. 1994. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, 76, 925-32.
- PADIDAM, M., BEACHY, R. N. & FAUQUET, C. M. 1996. The Role of AV2 ("Precoat") and Coat Protein in Viral Replication and Movement in Tomato Leaf Curl Geminivirus. *Virology*, 224, 390-404.
- PADIDAM, M., SAWYER, S. & FAUQUET, C. M. 1999. Possible Emergence of New Geminiviruses by Frequent Recombination. *Virology*, 265, 218-225.
- PAPPU, H. R., CSINOS, A. S., MCPHERSON, R. M., JONES, D. C. & STEPHENSON, M. G. 2000. Effect of acibenzolar-S-methyl and imidacloprid on suppression of tomato spotted wilt Tospovirus in flue-cured tobacco. *Crop Protection*, 19, 349-354.
- PAPPU, H. R., JONES, R. A. & JAIN, R. K. 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Res*, 141, 219-36.
- PAPROTKA, T., BOITEUX, L. S., FONSECA, M. E., RESENDE, R. O., JESKE, H., FARIA, J. C. & RIBEIRO, S. G. 2010. Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. *Virus Res*, 149, 224-33.
- PASCAL, E., SANDERFOOT, A. A., WARD, B. M., MEDVILLE, R., TURGEON, R. & LAZAROWITZ, S. G. 1994. The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. *Plant Cell*, 6, 995-1006.
- 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.
- PILOWSKY, M. & COHEN, S. 1974. Inheritance of Resistance of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in tomatoes. *Phytopathology*, 64, 632 - 635.
- PIROUX, N., SAUNDERS, K., PAGE, A. & STANLEY, J. 2007. Geminivirus pathogenicity protein C4 interacts with Arabidopsis thaliana shaggy-related protein kinase AtSKeta, a component of the brassinosteroid signalling pathway. *Virology*, 362, 428-40.
- PITTMAN, H. A. 1972. Spotted wilt of tomatoes. *Journal Australia Council Scientific Industrial Research*, 1, 74 - 77.
- PLANTYTEC. 2009. *Protton* [Online]. Available: <http://www.plantytec.com.br/produtos-interna.php?id=4539> [Accessed 12 jan 2014].
- POZZER, L., BEZERRA, I. C., KORMELINK, R., PRINS, M., PETERS, D., RESENDE, R. D. O. & DE ÁVILA, A. C. 1999. Characterization of a Tospovirus Isolate of Iris Yellow Spot Virus Associated with a Disease in Onion Fields in Brazil. *Plant Disease*, 83, 345-350.
- RAZAVINEJAD, S., HEYDARNEJAD, J., KAMALI, M., MASSUMI, H., KRABERGER, S. & VARSANI, A. 2013. Genetic diversity and host range studies of turnip curly top virus. *Virus Genes*, 46, 345-353.
- REIBER, J. M. & NEUMAN, D. S. 1999. Hybrid Weakness in Phaseolus vulgaris L. I. Disruption of Development and Hormonal Allocation. *J Plant Growth Regul*, 18, 101-106.

- REVINGTON, G. N., SUNTER, G. & BISARO, D. M. 1989. DNA sequences essential for replication of the B genome component of tomato golden mosaic virus. *The Plant Cell Online*, 1, 985-92.
- RIBEIRO, S. G., AMBROZEVICIUS, L. P., AVILA, A. C., BEZERRA, I. C., CALEGARIO, R. F., FERNANDES, J. J., LIMA, M. F., DE MELLO, R. N., ROCHA, H. & ZERBINI, F. M. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Arch Virol*, 148, 281-95.
- RIBEIRO, S. G., MARTIN, D. P., LACORTE, C., SIMOES, I. C., ORLANDINI, D. R. & INOUE-NAGATA, A. K. 2007. Molecular and Biological Characterization of Tomato chlorotic mottle virus Suggests that Recombination Underlies the Evolution and Diversity of Brazilian Tomato Begomoviruses. *Phytopathology*, 97, 702-11.
- RIGDEN, J. E., DRY, I. B., MULLINEAUX, P. M. & REZAIAN, M. A. 1993. Mutagenesis of the Virion-Sense Open Reading Frames of Tomato Leaf Curl Geminivirus. *Virology*, 193, 1001-1005.
- ROCHA, C. S., CASTILLO-URQUIZA, G. P., LIMA, A. T., SILVA, F. N., XAVIER, C. A., HORA-JUNIOR, B. T., BESERRA-JUNIOR, J. E., MALTA, A. W., MARTIN, D. P., VARSANI, A., ALFENAS-ZERBINI, P., MIZUBUTI, E. S. & ZERBINI, F. M. 2013. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. *J Virol*, 87, 5784-99.
- ROGERS, S. G., BISARO, D. M., HORSCH, R. B., FRALEY, R. T., HOFFMANN, N. L., BRAND, L., ELMER, J. S. & LLOYD, A. M. 1986. Tomato golden mosaic virus A component DNA replicates autonomously in transgenic plants. *Cell*, 45, 593-600.
- 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.
- ROJAS, M. R., HAGEN, C., LUCAS, W. J. & GILBERTSON, R. L. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu Rev Phytopathol*, 43, 361-94.
- ROJAS, M. R., NOUEIRY, A. O., LUCAS, W. J. & GILBERTSON, R. L. 1998. Bean Dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell*, 95, 105-13.
- ROSS, A. F. 1961. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*, 14, 340-358.
- RUESS, W., MUELLER, K., KNAUF-BEITER, G., KUNZ, W. & STAUB, T. 1996. Plant activator CGA 245704: an innovative approach for disease control in cereals and tobacco. *Brighton Crop Protection Conference: Pests & Diseases*. Brighton, UK.
- RURAL, M. F. 2014. *Aminonutri: Fertilizante Foliar - Orgamineral* [Online]. Available: <http://www.mfrural.com.br/detalhe.asp?cdp=66121&nmoca=nutriplant> [Accessed 12 jan 2014].
- RYALS, J., UKNES, S. & WARD, E. 1994. Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiology*, 104, 1109 - 1112.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory Press.
- SAMUEL, G., BALD, J. G. & PITTMAN, H. A. 1930. Spotted wilt of tomatoes. *Journal Australia Council Scientific Industrial Research*, 44, 64.
- SAUNDERS, K., BEDFORD, I. D., BRIDDON, R. W., MARKHAM, P. G., WONG, S. M. & STANLEY, J. 2000. A unique virus complex causes *Ageratum* yellow vein disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 6890-6895.

- SAUNDERS, K., LUCY, A. & STANLEY, J. 1992. RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus African cassava mosaic virus. *Nucleic Acids Res*, 20, 6311-5.
- SAUTER, H., STEGLICH, W. & ANKE, T. 1999. Strobilurins: evolution of a new class of active substances. *Angewandte Chemie International Edition*, 38, 1328 - 1349.
- SCHOLTHOF, K. B., ADKINS, S., CZOSNEK, H., PALUKAITIS, P., JACQUOT, E., HOHN, T., HOHN, B., SAUNDERS, K., CANDRESSE, T., AHLQUIST, P., HEMENWAY, C. & FOSTER, G. D. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 12, 938-54.
- SCHOLTHOF, K. B. G. 2005. *Tobacco mosaic virus* [Online]. The American Phytopathological Society. Available: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/TobaccoMosaic.aspx> [Accessed 25/11/2013 2013].
- SHANKARA NAIKA, J. L. J. M. G. M. H. B. D. 2006. *AD17P A cultura do tomate*, Agromisa.
- SHERWOOD, J. L., GERMAN, T. L., MOYER, J. W. & ULLMAN, D. E. 2009. *Tomato spotted wilt virus* [Online]. The American Phytopathological Society. Available: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/253.html [Accessed 21/11 2013].
- SILVA, J. B. C., GIORDANO, L. B., FURUMOTO, O., BOITEUX, L. S., FRANÇA, F. H., VILLAS-BÔAS, G. L., CASTELO-BRANCO, M., MEDEIROS, M. A., MAROUELLI, W., SILVA, W. L. C., LOPES, C. A., ÁVILA, A. C., NASCIMENTO, W. M. & PEREIRA, W. 2006. *Cultivo de Tomate para Industrialização* [Online]. Available: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial_2ed/index.htm [Accessed 23/07 2013].
- SPOEL, S. H., KOORNNEEF, A., CLAESSENS, S. M., KORZELIUS, J. P., VAN PELT, J. A., MUELLER, M. J., BUCHALA, A. J., METRAUX, J. P., BROWN, R., KAZAN, K., VAN LOON, L. C., DONG, X. & PIETERSE, C. M. 2003. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*, 15, 760-70.
- STADEN, R., JUDGE, D. & BONFIELD, J. 2003. Analyzing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS. In: KRAWETZ, S. & WOMBLE, D. (eds.) *Introduction to Bioinformatics*. Humana Press.
- STANLEY, J., MARKHAM, P. G., CALLIS, R. J. & PINNER, M. S. 1986. The nucleotide sequence of an infectious clone of the geminivirus beet curly top virus. *EMBO J*, 5, 1761-7.
- STANLEY, W. M. 1935. Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco mosaic virus. *Science*, 81, 644 - 645.
- STORMS, M. M., KORMELINK, R., PETERS, D., VAN LENT, J. W. & GOLDBACH, R. W. 1995. The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology*, 214, 485-93.
- SUNTER, G. & BISARO, D. M. 1991. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology*, 180, 416-9.
- SUNTER, G. & BISARO, D. M. 1992. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell*, 4, 1321-31.
- SUNTER, G. & BISARO, D. M. 1997. Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): evidence for activation and derepression mechanisms. *Virology*, 232, 269-80.

- SUNTER, G., GARDINER, W. E. & BISARO, D. M. 1989. Identification of tomato golden mosaic virus-specific RNAs in infected plants. *Virology*, 170, 243-50.
- SUNTER, G., HARTITZ, M. D., HORMUZDI, S. G., BROUGH, C. L. & BISARO, D. M. 1990. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology*, 179, 69-77.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
- TRINKS, D., RAJESWARAN, R., SHIVAPRASAD, P. V., AKBERGENOV, R., OAKELEY, E. J., VELUTHAMBI, K., HOHN, T. & POOGGIN, M. M. 2005. Suppression of RNA Silencing by a Geminivirus Nuclear Protein, AC2, Correlates with Transactivation of Host Genes. *Journal of Virology*, 79, 2517-2527.
- ULLMAN, D. E., SHERWOOD, J. L. & GERMAN, T. L. 1997. Thrips as vectors of plant pathogens. 539-565.
- UNSELD, S., HOHNLE, M., RINGEL, M. & FRISCHMUTH, T. 2001. Subcellular targeting of the coat protein of African cassava mosaic geminivirus. *Virology*, 286, 373-83.
- VALAGRO. 2009. *Megafol* [Online]. Available: http://www.valagro.com/pt/farm/products/valagro/especialidade/megafol?func=viewThingData;thingId=_uYISXOGSrv3tQuGmJdHSQ;thingDataId=YgY3Ehzp3oI1zMxB7cLOog [Accessed 12 jan 2014].
- VAN POELWIJK, F., BOYE, K., OOSTERLING, R., PETERS, D. & GOLDBACH, R. 1993. Detection of the L protein of tomato spotted wilt virus. *Virology*, 197, 468-70.
- VAN REGENMORTEL, H. V., FAUQUET, C. M. & BISHOP, D. H. L. 2000. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses : Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press.
- VANITHARANI, R., CHELLAPPAN, P., PITA, J. S. & FAUQUET, C. M. 2004. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J Virol*, 78, 9487-98.
- VARMA, A. & MALATHI, V. G. 2003. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology*, 142, 145-164.
- VARSANI, A., SHEPHERD, D., DENT, K., MONJANE, A., RYBICKI, E. & MARTIN, D. 2009. A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. *Virology Journal*, 6, 1-12.
- VERLAAN, M. G., HUTTON, S. F., IBRAHEM, R. M., KORMELINK, R., VISSER, R. G., SCOTT, J. W., EDWARDS, J. D. & BAI, Y. 2013. The Tomato Yellow Leaf Curl Virus resistance genes Ty-1 and Ty-3 are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. *PLoS Genet*, 9, e1003399.
- VERLAAN, M. G., SZINAY, D., HUTTON, S. F., DE JONG, H., KORMELINK, R., VISSER, R. G., 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 J*, 68, 1093-103.
- VIDAL, M. F. 2010. Produção e área colhida de tomate no Nordeste. In: ETENE (ed.).
- VIRALZONE. 2013a. *Tobamovirus* [Online]. Available: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/51.html [Accessed 28/11 2013].
- VIRALZONE. 2013b. *Tospovirus* [Online]. ViralZone. Available: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/253.html [Accessed 21/11 2013].
- WHETZEL, H. H. Year. The terminology of phytopathology. In: The Internacional Congress of Plant Sciences, 1929. 1204 - 1215.

- WHETZEL, H. H., HESLER, L. R., GREGORY, C. T. & RANKIN, W. H. 1925. *Laboratory outlines in plant pathology*, W. B. Saunders Company.
- WIJKAMP, I., ALMARZA, N., GOLDBACH, R. & PETERS, D. 1995. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology*, 85, 1069 - 1074.
- WIJKAMP, I., GOLDBACH, R. & PETERS, D. 1996. Propagation of tomato spotted wilt virus in *Frankliniella occidentalis* does neither result in pathological effects nor in transovarial passage of the virus. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 81, 285-292.
- XIE, Q., SUAREZ-LOPEZ, P. & GUTIERREZ, C. 1995. Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication. *EMBO J*, 14, 4073-82.
- YAZDI, H. R., HEYDARNEJAD, J. & MASSUMI, H. 2008. Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus Genes*, 36, 539-45.
- ZAITLIN, M. 1999. Elucidation of the genome organization of tobacco mosaic virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354, 587-91.
- ZAMIR, D., EKSTEIN-MICHELSON, I., ZAKAY, Y., NAVOT, N., ZEIDAN, M., SARFATTI, M., ESHED, Y., HAREL, E., PLEBAN, T., VAN-OSS, H., KEDAR, N., RABINOWITCH, H. D. & CZOSNEK, H. 1994. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, TY-1. *Theoretical and Applied Genetics*, 88, 141-146.
- ZHANG, X. & SCHMIDT, R. E. 2000. Hormone-Containing Products' Impact on Antioxidant Status of Tall Fescue and Creeping Bentgrass Subjected to Drought. *Crop Sci.*, 40, 1344-1349.
- ZRACHYA, A., GLICK, E., LEVY, Y., ARAZI, T., CITOVSKY, V. & GAFNI, Y. 2007. Suppressor of RNA silencing encoded by Tomato yellow leaf curl virus-Israel. *Virology*, 358, 159-165.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIROS (*Solanum lycopersicum*) DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL

ANÁLISE DE DIVERSIDADE DE BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIROS (*Solanum lycopersicum*) DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL

RESUMO

A begomovirose é uma das principais doenças que limitam a produção de tomate no Brasil. Os principais sintomas são clareamento de nervuras, manchas cloróticas, clorose internerval, mosaico, deformação foliar e nanismo. Os begomovírus são vírus com partículas geminadas e genoma constituído de uma ou duas fitas simples de DNA. Foram relatadas mais de 20 espécies de begomovírus infectando tomateiro no Brasil, porém na região Nordeste há pouca informação sobre as espécies presentes. Para a identificação de um begomovírus, é necessária a determinação da sequência do genoma (ou somente do DNA-A para bipartido). O presente trabalho teve como objetivo analisar a diversidade de begomovírus infectando tomateiro no Nordeste brasileiro. Para tanto, folhas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) com sintomas de infecção por begomovírus foram coletadas entre os anos de 2009 e 2011 nos estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e norte de Minas Gerais (considerado como parte do Nordeste, caracterizado pelo bioma Caatinga). O DNA total foi extraído e o PCR com primers universais foi realizado para a confirmação da infecção. Inicialmente 28 amostras de DNA total foram submetidas à análise de diversidade com a técnica de RCA/RFLP. Um total de 10 perfis de restrição diferentes foi observado, uma a duas amostras foram selecionadas de cada perfil de restrição. O DNA-A de cada amostra foi clonado e analisado. Todas as sequências obtidas foram classificadas como Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV). Na análise filogenética os isolados de TMoLCV agruparam-se em dois grupos principais, conhecidos como estirpe PE e DF. Os isolados analisados no presente trabalho, todos da estirpe PE, formaram três grupos, um composto por isolados coletados na Bahia e Pernambuco, outro composto por isolados coletados no Ceará e o terceiro com um isolado da Bahia e um de Minas Gerais. Conclui-se que isolados de TMoLCV predominam nas regiões amostradas e que há uma alta diversidade intraespecífica com a presença de pelo menos duas estirpes (DF e PE) e três variantes dentro da estirpe PE.

Palavras-chave: caatinga, geminivírus, TMoLCV.

DIVERSITY OF TOMATO BEGOMOVIRUSES IN TOMATO PLANTS CULTIVATED IN THE NORTH-EAST PART OF BRAZIL

ABSTRACT

The begomovirus disease is one of the major limiting factors for the tomato (*Solanum lycopersicum*) production in Brazil. The main symptoms are veinal clearing, chlorotic spot, interveinal chlorosis, mosaic, leaf distortion and stunting. The begomoviruses are viruses with twinned particles and the genome consists of one (monopartite) to two (bipartite) single stranded DNA. More than twenty begomovirus species were reported infecting tomato plants in Brazil, but in the North-East region there is little information about the present species. For a begomovirus identification it is necessary to analyze the complete genome sequence (or only the DNA-A for bipartite ones). This study aimed to analyze the begomovirus diversity in tomato plants present in the north-east part of Brazil. Tomato leaves with symptoms of begomovirus infection were collected from the years 2009 to 2011 in the states of Bahia, Ceará, Pernambuco and Minas Gerais (considered as part of the North-East, characterized by the Caatinga biome). Total DNA was extracted, and PCR was performed with universal primers to confirm the infection. Initially, twenty eight total DNA samples were submitted to diversity analysis with the RCA/RFLP technique. A total of ten different restriction profiles was observed, and one to two samples were selected for each restriction profile. The DNA-A of each sample was cloned and analyzed. All the viruses were classified as isolates of Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV). In a phylogenetic analysis, two groups were observed, known as DF and PE strains. The isolates collected in this study formed three groups within the PE strain grouping, one with isolates collected in Bahia and Pernambuco, the other with isolates from Ceará, and the third with one isolate from Minas Gerais and one from Bahia. It was concluded that TMoLCV isolates is prevalent in the sampled regions and that the intra-specific diversity is high with the presence of at least two strains (DF and PE) and three variants within the PE strain.

Keywords: caatinga, geminiviruses, TMoLCV.

1. INTRODUÇÃO

Os begomovírus são relatados no Brasil desde a década de 1950/1960 (Flores et al., 1960, Costa, 1955), entretanto até a década de 1990 surtos ocasionais ocorriam, porém no início da década de 1990 houve a introdução de um novo biótipo do inseto vetor o aleirodídeo *Bemisia tabaci*, conhecido popularmente como mosca-branca (Lourenção and Nagai, 1994). O biótipo anteriormente presente no Brasil era o “A”, a partir de 1990 o biótipo “B” mais polífago e com uma alta taxa reprodutiva passou a predominar no território brasileiro, com isso as begomoviroses ganharam importância em diversos tipos de cultura, por exemplo, em feijão e em tomate (Lourenção and Nagai, 1994).

Em tomateiro no Brasil, são relatadas apenas espécies bipartidas e somente encontradas em território brasileiro. Especula-se que os begomovírus presentes aqui têm origem em plantas nativas e que com a introdução do biótipo “B” esses vírus foram transferidos e adaptados para plantas cultivadas (Rocha et al., 2013).

Atualmente são descritas onze espécies que infectam tomateiro. *Tomato golden mosaic virus* – TGMV (Flores et al., 1960, Matyis et al., 1975), *Tomato rugose mosaic virus* – ToRMV (Fernandes et al., 2006), *Tomato chlorotic mottle virus* – ToCMoV (Ribeiro et al., 2007), *Tomato yellow spot virus* – ToYSV (Calegario et al., 2007), *Tomato severe rugose virus* – ToSRV (Fernandes et al., 2008), *Tomato mild mosaic virus* – ToMIMV (Castillo-Urquiza et al., 2008), *Tomato yellow vein streak virus* – ToYVSV (Albuquerque et al., 2012b), *Tomato mottle leaf curl virus* – TMoLCV (Ribeiro et al., 2003), *Tomato common mosaic virus* – ToCmMV (Castillo-Urquiza et al., 2008), *Tomato interveinal chlorosis virus* (ToICV) (Albuquerque et al., 2012b) e *Tomato golden vein virus* (TGVV) (Albuquerque et al., 2012b).

Além das espécies citadas anteriormente existem pelo menos mais sete novas espécies não totalmente caracterizadas no Brasil (Ribeiro et al., 2003, Ambrozevicius et al., 2002, Inoue-Nagata et al., 2006).

A distribuição espacial das espécies de begomovírus é parcialmente conhecida (Rocha et al., 2013). O ToSRV predomina na região centro-sul (Naito, 2012, Fernandes et al., 2008, Rocha et al., 2013), enquanto que o TMoLCV foi encontrado em maior predominância na região Nordeste nos anos de 1994 a 1999 e 2002 a 2004 (Ribeiro et al., 2003, Fernandes et al., 2008, Albuquerque et al., 2012b).

Estudar a diversidade genética de begomovírus permite compreender a dinâmica do surgimento, adaptação de novas espécies, estirpes ou isolados. Entender esses temas é fundamental para se elaborar recomendações adequadas e eficientes de manejo da doença e para servir de suporte para os programas de melhoramento com o objetivo de desenvolver materiais com resistência ampla e durável. Por isso, o objetivo do trabalho foi estudar a diversidade de espécies de begomovírus em tomateiros da região Nordeste do Brasil e caracterizar molecularmente as espécies encontradas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras de trabalho

Vinte e oito amostras de DNA total foram selecionadas a partir da coleção de begomovírus da Embrapa Hortaliças, mantidas em forma de DNA total a -20°C. Essas amostras foram coletadas entre os anos de 2009 e 2011 nos estados: Bahia, Ceará, Pernambuco e norte de Minas Gerais (divisa com a Bahia, e, nesse trabalho, considerada como região com característica típica do Nordeste), com respectivamente 20, 4, 2 e 2 amostras de cada estado. As amostras foram coletadas de tomateiro com diferentes idades, apresentando típicos sintomas de begomovírus, como clorose internerval, enrolamento e deformação foliar. A quantidade reduzida de amostras reflete a baixa incidência de plantas com sintomas nas áreas visitadas.

2.2 Amplificação do DNA circular viral por círculo rolante-polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos e restrição do DNA viral (RCA/RFLP)

O DNA total foi submetido à RCA (Inoue-Nagata et al., 2004) para aumentar a quantidade de moléculas de DNA fita circular, com a utilização da enzima *phi-29* DNA polimerase (New England BioLabs – NEB, Ipswich, MA, EUA). A reação foi conduzida como descreve Inoue-Nagata e colaboradores (2004) e foi mantida a 30°C por 20 horas. O produto da reação foi digerido com a enzima de restrição Msp I para analisar o perfil de restrição do DNA viral genômico de begomovírus de cada amostra.

2.3 Escolha das amostras

Os produtos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, preparado em tampão TBE 0,5X (Tris-borato EDTA), corado com brometo de etídeo e visualizado em

transiluminador de luz ultravioleta. A partir da análise do perfil de digestão e migração dos fragmentos de DNA, foram selecionadas uma a duas amostras de cada tipo de perfil de restrição, totalizando dezesseis amostras

2.4 Seleção das enzimas de restrição para clonagem

Para a clonagem do genoma completo das 16 amostras selecionadas, foram avaliadas 17 enzimas de restrição (AccI, ApaI, BamHI, BssHII, ClaI, EcoRI, EcoRV, HincII, HindIII, KpnI, PstI, SacI, SalI, SmaI, SpeI, XbaI e XhoI). Foram escolhidas as enzimas capazes de clivar o DNA-A e DNA-B em um único ponto, gerando um fragmento de tamanho aproximado de 2,6 kb. Após a digestão do DNA foi realizada a eletroforese com gel de agarose 1% para a avaliação da migração dos fragmentos de DNA, preparado em TBE 0,5X.

2.5 Digestão com a enzima selecionada

Após a seleção da enzima específica para clonagem do begomovírus presente em cada amostra, foi feita uma digestão em maior volume para a etapa de clonagem, uma reação de 100 µL no total. Essa reação foi realizada para as 16 amostras selecionadas.

Em seguida, o volume total do DNA digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% e corado com brometo de etídeo. Os fragmentos de DNA de aproximadamente 2,6 kb correspondentes ao DNA viral foram excisados e o DNA separado da agarose com a utilização do kit IllustraTM PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante.

2.6 Preparação do vetor pBlueScript

Paralelamente à escolha das enzimas e digestão das amostras, foi feita a preparação do vetor pBlueScript SK+ (pBS, Stratagene, La Jolla, CA, EUA) para clonagem. Inicialmente foi

realizada RCA com um volume total de 500 μL para o vetor pBS (ca. 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$). O DNA amplificado por RCA foi digerido com as enzimas escolhidas para cada amostra e cada reação conduzida com um total de ca. 10 μg do vetor. Após a digestão do vetor, este foi desfosforilado (CIP, NEB) e precipitado de acordo com os procedimentos descritos por Sambrook e colaboradores (1989).

2.7 Ligação, Transformação e Clonagem

A ligação entre o inserto e o vetor foi realizada utilizando, a proporção de vetor e inserto de 1:3 (vetor:inserto) com a enzima T4 DNA ligase (NEB). A reação foi incubada a 16°C por 12 horas. O volume total da amostra foi submetido à diálise, para a retirada do sal, utilizando a membrana de nitrocelulose para diálise de 0,45 μm . Em seguida, os 10 μL da reação foram adicionados a 50 μL de células competentes de *Escherichia coli* DH5 α , para a transformação por eletroporação. A extração do DNA plasmidial foi realizada de acordo com Sambrook e colaboradores (1989). Para confirmação da presença do inserto foi realizada uma digestão, em todas as amostras, com as respectivas enzimas de restrição utilizadas no processo de clonagem, resultando em dois fragmentos de DNA em gel submetido a eletroforese, um correspondente ao vetor e outro correspondente ao inserto. Esses clones foram então, submetidos a digestão com a enzima de restrição MspI, e aqueles com perfis de restrição distintos foram selecionados. O DNA plasmidial dos clones selecionados foi purificado com kit IllustraTM PlasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante.

2.8 Sequenciamento e análise das sequências

O DNA purificado foi enviado à empresa Macrogen Inc. (Coréia do Sul) para a determinação da sequência de nucleotídeos do inserto utilizando primers do vetor e do inserto,

por *primer walking*. As sequências foram analisadas preliminarmente por BLAST n do National Center of Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para confirmação da clonagem do DNA genômico de begomovirus. Contigs foram produzidos a partir do pacote Staden4 (Staden et al., 2003). O desenho de primers para se obter a sequência completa do DNA-A ou B foi feito no programa Oligo Analyzer (Integrated DNA Technologies) e sintetizado na MacroGen Inc.

Após obtidas as sequências completas de todos os isolados, estas foram alinhadas no programa MEGA5 (Tamura et al., 2011), com o uso do método Muscle. As árvores filogenéticas foram construídas de acordo com o método de Neighbor-Joining, utilizando-se três mil repetições “bootstraps”, das sequências completas obtidas nesse estudo e as sequências de isolados mais próximos às sequências encontradas nesse trabalho.

3. RESULTADOS

3.1. Amostras do trabalho

Um total de 28 amostras de DNA total, da coleção de begomovírus da Embrapa Hortaliças, foi usada no início para avaliação do polimorfismo de restrição. Na Tabela 1 encontram-se a identificação das amostras, data e local de coleta e outras observações relacionadas à amostra.

Tabela 1. Vinte e oito amostras de DNA total, extraído de folhas de tomateiro expressando típicos sintomas de begomovírus da coleção de begomovírus da Embrapa Hortaliças.

Amostra	Data	Local	Observações
8038	25/05/2009	Ceará	
8062	25/05/2009	Ceará	
8093	25/05/2009	Ceará	
8094	25/05/2009	Ceará	
9217	22/10/2009	Jaíba - MG	
9220	22/10/2009	Jaíba - MG	
12098	17/09/2010	Jaboatão dos Guararapes - PE	
12099	17/09/2010	Jaboatão dos Guararapes - PE	
12934	14/02/2011	Bahia	
12935	14/02/2011	Bahia	
12958	14/02/2011	Bahia - Ibicoara	cv. Siloute
12959	14/02/2011	Bahia - Ibicoara	cv. Siloute
12977	14/02/2011	Bahia - Ibicoara	cv. Granadero
12978	14/02/2011	Bahia - Seabra	cv. Ellen
12979	14/02/2011	Bahia - Seabra	cv. Ellen
12988	14/02/2011	Bahia - Canarana	
13011	14/02/2011	Bahia - Lapão	
13012	14/02/2011	Bahia - Lapão	
13033	14/02/2011	Bahia - Irecê	
13034	14/02/2011	Bahia - Irecê	
13176	22/03/2011	Bahia	
13182	22/03/2011	Bahia	
13198	22/03/2011	Bahia	
13226	22/03/2011	Bahia	
13227	22/03/2011	Bahia	
13228	22/03/2011	Bahia	cv. Dominador
13230	22/03/2011	Bahia	
13231	22/03/2011	Bahia	

3.2 Amplificação do DNA circular viral por círculo rolante-polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos e restrição do DNA viral (RCA/RFLP)

A partir do DNA total amplificado por RCA e posterior digestão com a enzima *MspI*, os fragmentos foram visualizados em gel de agarose (Fig. 8).

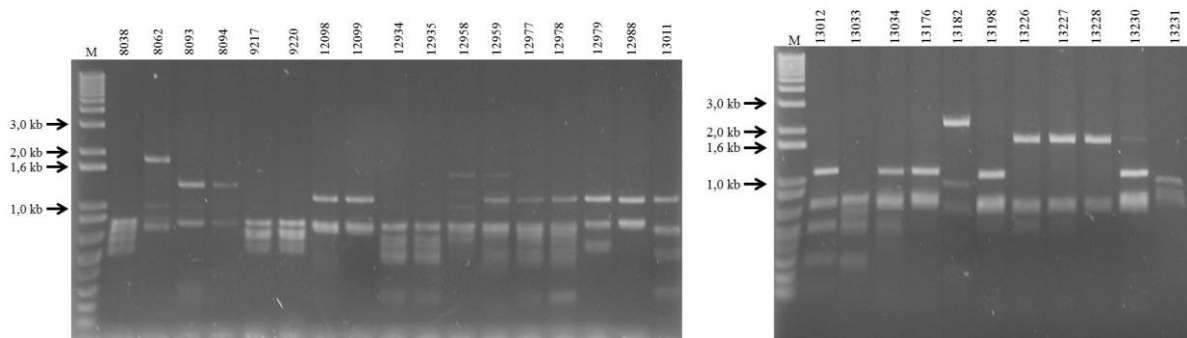


Figura 8. Gel de agarose 1% com o polimorfismo de restrição das vinte e oito amostras iniciais do trabalho com o produto da digestão do RCA a partir de DNA total de folhas de tomateiro expressando típicos sintomas de begomovírus com a enzima de restrição *MspI*. Marcador: 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

3.3. Escolha das amostras

A partir da digestão com *MspI* foram obtidos dez perfis de restrição diferentes (Fig. 9). De cada perfil, quando foi possível, foram escolhidas duas amostras. Cada perfil e suas amostras estão identificados com uma seta na coloração correspondente. Dezesesseis amostras foram selecionadas para clonagem do genoma.

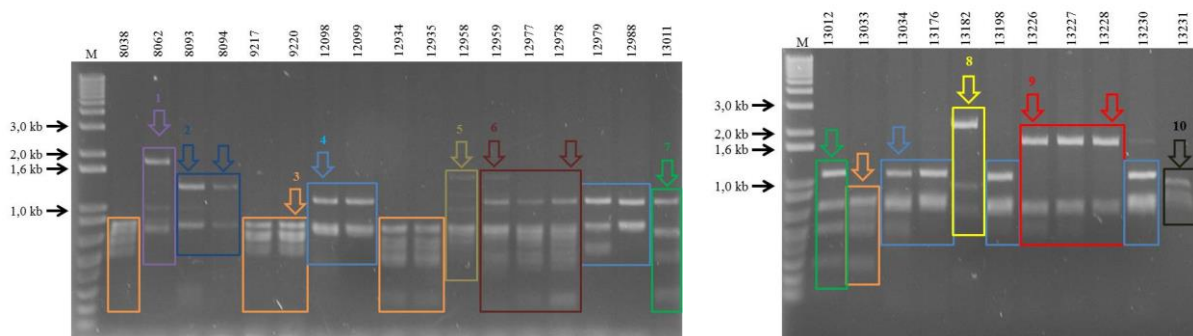


Figura 9. Gel de agarose 1% da digestão com *MspI* de DNA total, extraído de folhas de tomateiro expressando típicos sintomas de begomovírus amplificado por RCA. Os perfis diferentes estão destacados por retângulos e as amostras selecionadas apontadas pelas setas. Marcador: 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

3.4. Seleção das enzimas de restrição para clonagem

Para cada begomovírus a ser clonado, dezessete enzimas foram testadas. Três foram selecionadas como sendo capazes de clivar o DNA-A e o DNA-B em um único ponto gerando um fragmento de 2,6 kb (Tabela 2). Após a seleção das enzimas, cada DNA foi digerido com a enzima selecionada, separada por gel de agarose e os fragmentos correspondentes ao DNA genômico foram eluídos e clonados em vetor pBlueScript.

Tabela 2. Dezesseis amostras selecionadas para clonagem do genoma completo do begomovírus e as enzimas de restrição que foram capazes de clivá-las em um único ponto gerando um fragmento de 2,6 kb.

Amostras	Estado	Enzima	
8062	CE	Kpn I	
8093	CE	Kpn I	
8094	CE	Kpn I	
9220	MG	Kpn I	
12098	PE		ApaI
12958	BA		Cla I
12959	BA	Kpn I	Cla I
12978	BA	Kpn I	
13011	BA		Cla I
13012	BA		Cla I
13033	BA		ApaI
13034	BA		ApaI
13182	BA		ApaI
13226	BA		ApaI
13227	BA		ApaI
13231	BA		ApaI

3.5. Montagem das sequências

Os insertos foram sequenciados por *primer walking* na MacroGen Inc. (Coréia do Sul). Primers universais do vetor foram utilizados para o primeiro sequenciamento. As amostras foram nomeadas de acordo com o número na coleção de begomovírus e o clone escolhido para o sequenciamento, por exemplo, 8093-6 correspondente à amostra 8093 clone 6.

A partir do momento em que as primeiras sequências foram recebidas, montou-se contigs de cada clone no programa Staden4 (Staden et al., 2003) e desenhou-se primers específicos para a continuação das sequências (Tabela 3).

Foram obtidas vinte e duas sequências do DNA-A completo, sendo todas classificadas como Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV).

Tabela 3. Primers internos desenhados a partir das primeiras sequências obtidas no sequenciamento dos clones para o sequenciamento do genoma viral completo.

Nome	Primer
ToMoLCA790FF	AGA GGT TCT GGA AGG TC
ToMoLCA120R	GGC TTT GAG GAC CAC TTC
ToMoLCV701R	CGT TCT TCA CCG TGG CA
ToMoLCV2556F	GGT ACA ATA TAT ACT AGA AGT C
ToMoLCV701R	CGT TCT TCA CCG TGG CA
ToMoLCV2101F	GCT GAC CTC CTC TAG TTG

3.6. Análise das sequências

Como foi observado que todas as amostras continham o DNA-A de vírus classificados como isolados de TMoLCV, o DNA-A do clone 12098-1 foi selecionado para comparação com todas as sequências disponíveis, essa sequência foi selecionada, porque ela possuía uma identidade de nucleotídeos média entre todas as sequências obtidas nesse trabalho. Essa sequência apresentou 94,6 a 99,1% de identidade com as sequências dos isolados de TMoLCV da região Nordeste. Quando comparadas às sequências de TMoLCV de isolados provenientes do Distrito Federal e Goiás a porcentagem de nts foi inferior a 93% (Tabela 4). As espécies de begomovirus mais próximas foram Tomato interveinal chlorosis virus e *Tomato chlorotic mottle virus*, com aproximadamente 82% de identidade de sequência.

Tabela 4. Comparação entre porcentagem de nucleotídeos da sequência 12098-1 com as sequências de vírus presentes no GenBank mais proximamente relacionadas.

TMoLCV_BR:Jai56:08_KC706616.1	99,1%
TMoLCV_BR:Jai13:08_KC706615.1	99,1%
TMoLCV_PEBR:Juaz2586:04_JF803250.1	97,9%
TMoLCV_PEBR:Bez2665:04_JF803251.1	94,6%
TMoLCV_DFBR:Turv2904:04_JF803249.1	92,1%
TMoLCV_DFBR:PA2143:04_JF803247.1	92,0%
TMoLCV_DFBR:PADFM:04_JF803246.1	92,0%
TMoLCV_DFBR:Turv2911:04_JF803248.1	92,0%
ToIVCV_PE[BR:Mdc2681:04]_JF803252.1	82,0%
ToCMoV_BR:Flo210:08_KC706560.1	82,0%
PSLDV_BR:LNS2:Pas:01_FJ972767.1	81,0%
ToGLDV*_HM357456.2	81,0%
CdTAmV_AM10_HM357461.3	81,0%

*Tomato golden leaf distortion virus (ToGLDV).

Na comparação entre as vinte e duas sequências foram obtidas porcentagens de nts que variaram entre 92,14 e 99,9%. As sequências mais divergentes foram aquelas provenientes de clones das amostras (8093 e 8094) coletadas no estado Ceará no ano de 2009, cujas identidades de nts foram iguais ou inferiores a 95,48% (Tabela 5).

Por outro lado as sequências mais próximas foram aquelas coletadas no estado da Bahia no ano de 2011. A identidade de nts foi de 99,6% com isolados da mesma localidade e com isolados provenientes de Minas Gerais TMoLCV_BR:Jai56:08_KC706616.1 e TMoLCV_BR:Jai13:08_KC706615.1 (Tabela 5).

3.7. Análise filogenética

Para a análise filogenética foram escolhidas todas as sequências completas de TMoLCV disponíveis em banco de dados público e uma sequência representativa das espécies mais próximas determinadas pela análise de BLAST: Passionfruit severe leaf distortion virus (PSLDV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), Tomato golden leaf distortion virus (ToGLDV), Tomato interveinal chlorosis virus (ToICV), Chino del tomate Amazonas virus (CdTAmV), Rhynchosia rugose golden mosaic virus (RhRGMV) e Tomato bright yellow mottle virus (TBYMoV) (Tabela 6).

Tabela 6. Sequências de vírus presentes no GenBank que foram escolhidas para o alinhamento e posterior construção da árvore filogenética, com seus acrônimos e números de acesso no GenBank.

Nome	Acrônimo	Número de acesso
Tomato mottle leaf curl virus_BR:Jai56:08	TMoLCV	706616.1
Tomato mottle leaf curl virus_BR:Jai13:08	TMoLCV	706615.1
Tomato mottle leaf curl virus_PEBR:Bez2665:04	TMoLCV	803251.1
Tomato mottle leaf curl virus_PEBR:Juaz2586:04	TMoLCV	803250.1
Tomato mottle leaf curl virus_DFBR:PA2143:04	TMoLCV	803247.1
Tomato mottle leaf curl virus_DFBR:PADFM:04	TMoLCV	803246.1
Tomato mottle leaf curl virus_DFBR:Turv2911:04	TMoLCV	803248.1
Tomato mottle leaf curl virus_DFBR:Turv2904:04	TMoLCV	803249.1
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	ToCMoV	003664.1
Tomato interveinal chlorosis virus	ToICV	803252.1
Tomato golden leaf distortion virus	ToGLCV	357456.2
Tomato bright yellow mottle virus	TBYMoV	791691.1
Passionfruit severe leaf distortion virus	PSLDV	012786.1
Chino del tomate Amazonas virus	CdTAmV	357461.3
Rhynchosia rugose golden mosaic virus	RhRGMV	236370.1

A árvore filogenética foi construída pelo método de Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) (Fig. 10). Dois grupos podem ser claramente reconhecidos na árvore filogenética, o primeiro grupo compreende os isolados coletados no Nordeste e Minas Gerais e o segundo de isolados do Distrito Federal e Goiás. Esses grupos são classificados como estirpe PE e DF, respectivamente (Albuquerque et al., 2012b). Todas as sequências obtidas nesse trabalho foram agrupadas junto com aquelas da estirpe PE. Dentro dessa ramificação, três subgrupos

podem ser reconhecidos, o primeiro, maior, com a maioria dos isolados e incluindo os isolados da Bahia e Pernambuco, juntamente com sequências depositadas anteriormente provenientes de Minas Gerais (KC706616; KC706615; ambos coletados em Jaíba). O segundo grupo é formado por quatro sequências isoladas de duas amostras, coletadas no Ceará. As sequências apresentam pouca variação entre si, mas se mostraram bem distintos dos demais. Finalmente, o terceiro grupo é formado apenas por duas sequências de um isolado coletado em Jaíba (MG) e outro em Seabra (BA). O grupo é fortemente suportado com um valor de bootstrap de 66.

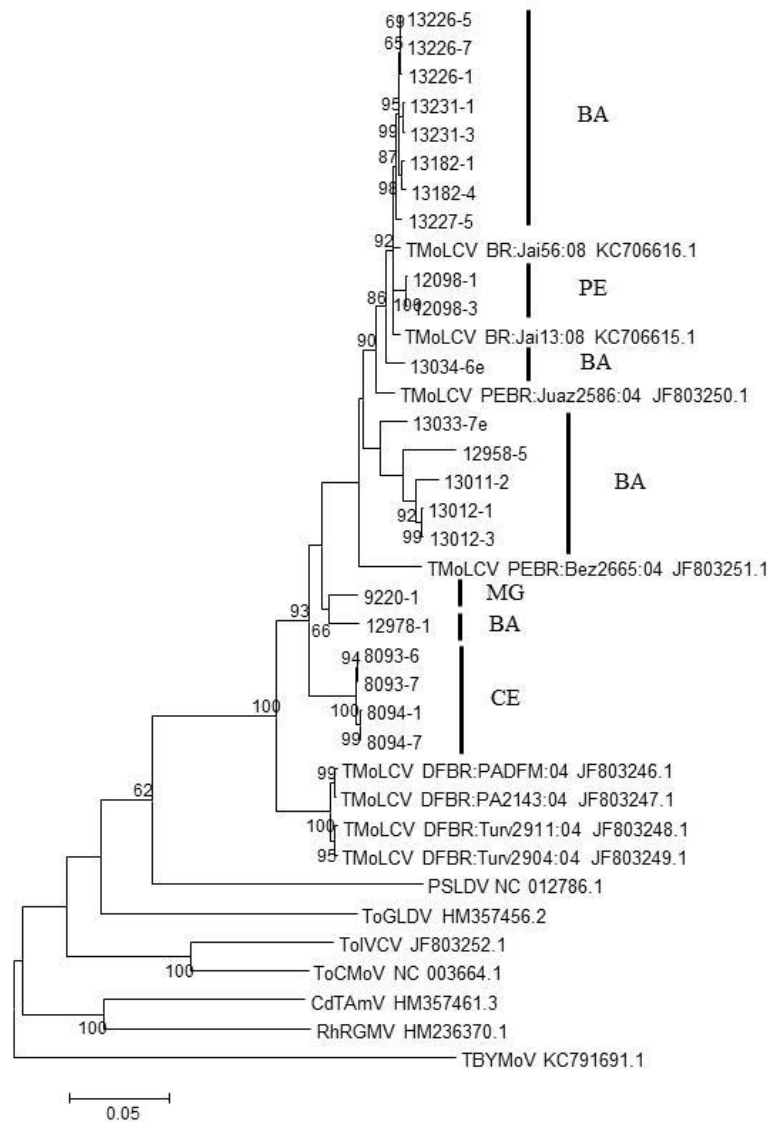


Figura 10. Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-Joining, a partir de um alinhamento feito no MUSCLE. Cada sequência é identificada com o acrônimo e o número de acesso. Consultar a Tabela 6 para a identificação dos acrônimos.

4. DISCUSSÃO

As espécies de begomovírus de tomateiro encontradas no Brasil, não foram encontradas em nenhum outro lugar no mundo. Essa evidência sugere que os begomovírus brasileiros sejam nativos do Brasil e que eles tenham evoluído em plantas silvestres (Rocha et al., 2013). Os begomovírus de tomateiro brasileiros são todos bipartidos, apesar de que houve um relato de um isolado de *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) ser infectivo somente com o DNA-A (Galvao et al., 2003).

Por outro lado, begomovírus monopartidos podem ser encontrados em outras espécies de plantas, como é o caso da batateira doce (*Ipomea batatas*), cujos vírus são conhecidos como “sweepovirus” e estão presentes tanto no velho, quanto no novo mundo (Lozano et al., 2009, Paprotka et al., 2010, Albuquerque et al., 2011, Albuquerque et al., 2012a).

Até o presente momento, apenas o DNA-A de Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV) é relatado (Ribeiro et al., 2003, Fernandes et al., 2008, Albuquerque et al., 2012b). O vírus apresenta características típicas de um begomovírus bipartido. Ribeiro e colaboradores (2003) foram os primeiros a relatar os isolados desse vírus, que foram encontrados em amostras de tomateiro coletadas entre os anos de 1994 e 1999. Além de TMoLCV, os autores encontraram outro begomovirus o ToCMoV em plantios localizados na região Nordeste do Brasil.

Mais recentemente, Fernandes e colaboradores (2008) realizaram um estudo de diversidade e prevalência de begomovírus em tomateiro, com amostragens em diferentes localidades do Brasil, entre os anos de 2002 e 2004. Nos estados da região Nordeste, TMoLCV, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e uma nova espécie de vírus foram encontrados no estado de Pernambuco, enquanto que no estado da Bahia os autores encontraram apenas TMoLCV para tomate de consumo fresco. O TMoLCV não foi exclusivamente isolado do Nordeste, mas também no estado de Goiás nessas amostragens.

Em levantamentos posteriores, Albuquerque e colaboradores (2012b) descreveram a subdivisão de isolados de TMoLCV em duas estirpes: TMoLCV-DF e TMoLCV-PE. Neste trabalho os autores afirmam que o TMoLCV-DF é um recombinante entre isolados de ToCMoV (menor parental) e TMoLCV-PE (maior parental), através da análise da árvore filogenética. Os autores, observaram que TMoLCV, ToICV e ToCMoV são filogeneticamente muito próximos e provavelmente possuem um ancestral comum no Nordeste.

Os isolados encontrados neste trabalho possuem maiores diferenças no percentual de identidade de nts quando se compara isolados de diferentes estados, por exemplo, isolados provenientes do Ceará possuem uma identidade de nucleotídeos máxima de 95,64% quando comparados com isolados da Bahia, por outro lado se comparados entre si, os isolados do Ceará, apresentam uma identidade superior a 99,5%. O mesmo acontece para isolados de outros estados, porém a variabilidade entre os isolados da Bahia é um pouco maior; quando comparados entre si o percentual de identidades de nts varia de 93,6 a 99,96%. Se observarmos o isolado de Minas Gerais ele compartilha uma identidade de nts máxima de 97,06% com isolados da Bahia e se comparados com isolados do Ceará é 95,6%, ou seja, ele está mais proximamente relacionado com isolados da Bahia do que isolados do Ceará. Para isolados de Pernambuco, entre si eles compartilham uma identidade de nts de 99,84%, entre isolados do Ceará 93,62% e entre isolados de Pernambuco e Bahia entre 93,40 e 99,85% de identidade de nts.

No nosso estudo, as sequências de TMoLCV foram mais proximamente relacionadas com a estirpe TMoLCV-PE, do que a estirpe TMoLCV-DF. As duas estirpes de TMoLCV supostamente apresentam um ancestral em comum e é provável que esse ancestral estava presente no Nordeste brasileiro. Com a migração do vírus para a região centro-sul, houve a possibilidade de recombinação com outros vírus que pode ter culminado com o surgimento de

isolados da estirpe TMoLCV-DF, que provavelmente se mostrou mais adaptado que a estirpe TMoLCV-PE nessa região.

Ao contrário de ToSRV que apresenta uma baixa variabilidade genética entre isolados, (Naito, 2012), TMoLCV apresenta uma alta variabilidade genética que variou entre 92,2 e 99,9%. O ToSRV predomina no centro-sul do Brasil (Fernandes et al., 2008, Albuquerque et al., 2012b) e sua baixa variabilidade genética pode significar um maior período de co-evolução do vírus com o tomateiro e uma alta adaptação às condições de cultivo e vetor no centro-sul, enquanto que TMoLCV, que possui alta variabilidade genética, pode estar em fase de adaptação e evolução dentro das condições do Nordeste.

Entre as dezesseis amostras analisadas em quatro estados: Bahia, Ceará, Minas Gerais e Pernambuco, apenas o TMoLCV foi encontrado, enquanto que em trabalhos anteriores foi possível isolar ToCMoV e ToICV (Ribeiro et al., 2003, Albuquerque et al., 2012b). Provavelmente os isolados de TMoLCV encontrados estão muito mais adaptados às condições de cultivo da região Nordeste do que os isolados de ToCMoV e ToICV, pois nas amostras analisadas só se encontrou TMoLCV, apesar do espaço amostral ser pequeno. Não há dúvidas que os isolados de TMoLCV são amplamente distribuídos no Nordeste brasileiro e de ToSRV no centro-sul, sendo as causas para tal fenômeno ainda desconhecidas.

Isolados coletados em Minas Gerais são mais parecidos com isolados do Nordeste do que com isolados coletados em outras regiões de Minas Gerais em que predominam espécies como ToSRV, ToCMoV, Tomato common mosaic virus (ToCmMV), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (Rocha et al., 2013). Portanto, a inclusão de amostras do norte de Minas Gerais nessa análise parece ter sido acertada e demonstra a similaridade de condições de cultivo nessas regiões.

No presente trabalho, não conseguimos isolar o DNA-B de TMoLCV, apesar de sua organização genômica ser de um típico begomovírus bipartido com a ausência da ORF AV2. Entretanto em 2011 foi isolado no Peru o vírus Tomato leaf deformation virus (ToLDeV) que tem organização genômica típica de um begomovírus bipartido e foi demonstrado ser um begomovírus monopartido (Márquez-Martín et al., 2011, Melgarejo et al., 2013).

Testes preliminares por PCR (primers CRC2 e pBL1v 2039 (Rojas et al., 1993)) nas dezesseis amostras demonstrou a presença de DNA correspondente ao DNA-B. Espera-se que TMoLCV seja bipartido, então esforços estão sendo feitos para a clonagem do componente B e para a construção de clones infecciosos para a caracterização biológica desse importante begomovírus.

5. CONCLUSÕES

De acordo com o trabalho realizado, entre os anos de 2009 e 2011, Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV) foi a única espécie de begomovírus detectada região Nordeste do país. Os isolados obtidos nesse trabalho possuem uma alta variabilidade genética, podendo ser divididos em pelo menos duas estirpes e três grupos (variantes) de TMoLCV.

6. LITERATURA CITADA

- ALBUQUERQUE, L. C., INOUE-NAGATA, A. K., PINHEIRO, B., RESENDE, R. O., MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2012a. Genetic diversity and recombination analysis of sweepoviruses from Brazil. *Virology Journal*, 9, 241.
- ALBUQUERQUE, L. C., INOUE-NAGATA, A. K., PINHEIRO, B., RIBEIRO SDA, G., RESENDE, R. O., MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2011. A novel monopartite begomovirus infecting sweet potato in Brazil. *Arch Virol*, 156, 1291-4.
- ALBUQUERQUE, L. C., VARSANI, A., FERNANDES, F. R., PINHEIRO, B., MARTIN, D. P., DE TARSO OLIVEIRA FERREIRA, P., LEMOS, T. O. & INOUE-NAGATA, A. K. 2012b. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Arch Virol*, 157, 747-52.
- 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.
- BERNARDO, P., GOLDEN, M., AKRAM, M., NAIMUDDIN, NADARAJAN, N., FERNANDEZ, E., GRANIER, M., REBELO, A. G., PETERSCHMITT, M., MARTIN, D. P. & ROUMAGNAC, P. 2013. Identification and characterisation of a highly divergent geminivirus: Evolutionary and taxonomic implications. *Virus Research*, 177, 35-45.
- CALEGARIO, R. F., FERREIRA, S. D. S., ANDRADE, E. C. D. & ZERBINI, F. M. 2007. Characterization of Tomato yellow spot virus, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42, 1335-1343.
- CASTILLO-URQUIZA, G. P., BESERRA, J. E., JR., BRUCKNER, F. P., LIMA, A. T., VARSANI, A., ALFENAS-ZERBINI, P. & MURILO ZERBINI, F. 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Arch Virol*, 153, 1985-9.
- COSTA, A. S. 1955. Studies on Abutilon mosaic in Brazil. *Phytopathology*, 24, 97 - 112.
- COSTA, A. S. 1965. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. *Plant Protection F.A.O.*, 13, 2 - 12.
- COSTA, A. S. 1976. Whitefly-transmitted plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 14, 429 - 440.
- COSTA, A. S. & BENNETT, C. W. 1950. White-fly-transmitted mosaic of Euphorbia prunifolia. *Phytopathology*, 40, 266 - 283.
- FERNANDES, F. R., DE ALBUQUERQUE, L. C., DE BRITTO GIORDANO, L., BOITEUX, L. S., DE AVILA, A. C. & INOUE-NAGATA, A. K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes*, 36, 251-8.
- FERNANDES, J. J., CARVALHO, M. G., ANDRADE, E. C., BROMMONSCHENKEL, S. H., FONTES, E. P. B. & ZERBINI, F. M. 2006. Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology*, 55, 513-522.
- FERREIRA PDE, T., LEMOS, T. O., NAGATA, T. & INOUE-NAGATA, A. K. 2008. One-step cloning approach for construction of agroinfectious begomovirus clones. *J Virol Methods*, 147, 351-4.
- FLORES, E., SILBERSCHMIDT, K. & KRAMER, H. 1960. Observações de "clorose infecciosa" das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico*, 26, 65 - 69.
- GALVAO, R. M., MARIANO, A. C., LUZ, D. F., ALFENAS, P. F., ANDRADE, E. C., ZERBINI, F. M., ALMEIDA, M. R. & FONTES, E. P. 2003. A naturally occurring

- recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *J Gen Virol*, 84, 715-26.
- HEYDARNEJAD, J., KEYVANI, N., RAZAVINEJAD, S., MASSUMI, H. & VARSANI, A. 2013. Fulfilling Koch's postulates for beet curly top Iran virus and proposal for consideration of new genus in the family Geminiviridae. *Arch Virol*, 158, 435-43.
- ICTV. 2013. *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* [Online]. Available: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> [Accessed 13/11 2013].
- INOUE-NAGATA, A. K., ALBUQUERQUE, L. C., ROCHA, W. B. & NAGATA, T. 2004. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. *J Virol Methods*, 116, 209-11.
- INOUE-NAGATA, A. K., MARTIN, D. P., BOITEUX, L. S., GIORDANO, L. D. B., BEZERRA, I. C. & ÁVILA, A. C. D. 2006. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41, 1329-1332.
- LOURENÇÃO, A. L. & NAGAI, H. 1994. Surtos populacionais de Bemisia tabaci no estado de São Paulo. *Bragantia*, 53, 53-59.
- LOZANO, G., TRENADO, H. P., VALVERDE, R. A. & NAVAS-CASTILLO, J. 2009. Novel begomovirus species of recombinant nature in sweet potato (*Ipomoea batatas*) and *Ipomoea indica*: taxonomic and phylogenetic implications. *J Gen Virol*, 90, 2550-62.
- MARTIN, D. & RYBICKI, E. 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*, 16, 562-563.
- MATYIS, J. C., SILVA, D. M., OLIVEIRA, A. R. & COSTA, A. S. 1975. Purification and morphology of tomato golden mosaic virus. *Summa Phytopathologica*, 1, 267 - 275.
- NAITO, F. Y. B. 2012. *Avaliação da diversidade de begomovírus em tomateiro em três pólos de produção de tomate para processamento do Brasil*. Master, Universidade of Brasília.
- PAPROTKA, T., BOITEUX, L. S., FONSECA, M. E., RESENDE, R. O., JESKE, H., FARIA, J. C. & RIBEIRO, S. G. 2010. Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. *Virus Res*, 149, 224-33.
- RAZAVINEJAD, S., HEYDARNEJAD, J., KAMALI, M., MASSUMI, H., KRABERGER, S. & VARSANI, A. 2013. Genetic diversity and host range studies of turnip curly top virus. *Virus Genes*, 46, 345-353.
- RIBEIRO, S. G., AMBROZEVICIUS, L. P., AVILA, A. C., BEZERRA, I. C., CALEGARIO, R. F., FERNANDES, J. J., LIMA, M. F., DE MELLO, R. N., ROCHA, H. & ZERBINI, F. M. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Arch Virol*, 148, 281-95.
- RIBEIRO, S. G., MARTIN, D. P., LACORTE, C., SIMOES, I. C., ORLANDINI, D. R. & INOUE-NAGATA, A. K. 2007. Molecular and Biological Characterization of Tomato chlorotic mottle virus Suggests that Recombination Underlies the Evolution and Diversity of Brazilian Tomato Begomoviruses. *Phytopathology*, 97, 702-11.
- ROCHA, C. S., CASTILLO-URQUIZA, G. P., LIMA, A. T., SILVA, F. N., XAVIER, C. A., HORA-JUNIOR, B. T., BESERRA-JUNIOR, J. E., MALTA, A. W., MARTIN, D. P., VARSANI, A., ALFENAS-ZERBINI, P., MIZUBUTI, E. S. & ZERBINI, F. M. 2013. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. *J Virol*, 87, 5784-99.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory Press.

- STADEN, R., JUDGE, D. & BONFIELD, J. 2003. Analyzing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS. *In: KRAWETZ, S. & WOMBLE, D. (eds.) Introduction to Bioinformatics*. Humana Press.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
- VARSANI, A., SHEPHERD, D., DENT, K., MONJANE, A., RYBICKI, E. & MARTIN, D. 2009. A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. *Virology Journal*, 6, 1-12.

CAPÍTULO 3

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA NA
SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO DE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum*) POR
VÍRUS**

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA NA SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO DE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum*) POR VÍRUS

RESUMO

Entre as doenças que ocorrem em tomateiro, as viroses são um dos principais problemas. Doenças, como o do vira-cabeça causado por, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e outros tospovírus e o mosaico do tomateiro *Tomato mosaic virus* (ToMV) destacam-se pela severidade dos sintomas e complexidade de manejo. Devido à grande dificuldade no controle de viroses, o uso da indução de resistência sistêmica adquirida (RSA) seria uma alternativa muito atraente no combate à infecção por vírus. Existem produtos comerciais que promovem a RSA contra vários patógenos. Visando a avaliação da estratégia de combate da infecção por vírus pela RSA, o objetivo do trabalho foi testar produtos comercializados como indutores de resistência contra a infecção por: TSWV e ToMV. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Hortaliças, com duas repetições nos anos de 2012 e 2013. No primeiro ano, a resistência de plantas de tomateiro ao TSWV e ToMV foi avaliada após aplicações foliares de: Adhevir's, Aminonutri, Megafol, Protton, Acibenzolar-S-metil, Piraclostrobina ou água. No segundo ano, somente ToMV foi inoculado, plantas de tomateiro, foram avaliadas com aplicações dos mesmos produtos, sendo que foram acrescidos Acadian e Orobor N1. Para cada produto foram feitos três tratamentos: ToMV, TSWV e sem inoculação, em quatro repetições. O aparecimento de sintomas foi avaliado a partir do primeiro dia após a inoculação e se deu a cada dois dias. Verificou-se que nenhum tratamento reduziu o número de plantas infectadas ou a intensidade de sintomas observados. Concluiu-se que o uso de indutores de resistência não resultou em redução de susceptibilidade das plantas em ensaios controlados com inoculação artificial.

Palavras-chave: indução de resistência, TSWV, ToMV.

EVALUATION OF THE EFFECT OF RESISTANCE INDUCING PRODUCTS ON THE TOMATO SUSCEPTIBILITY TO VIRAL INFECTION

ABSTRACT

Among the tomato diseases, those caused by viruses are one of the major problems. Diseases such as the spotted wilt caused by *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) and other tospoviruses, and the tomato mosaic caused by *Tomato mosaic virus* (ToMV) are well-known because of the strong symptom severity and the complexity of their management. Due to the great difficulty in controlling viruses, the use of the systemic acquired resistance (SAR) property would be a very attractive alternative to fight against a viral infection. There are some commercial products that promote the SAR against various pathogens. Aiming at the evaluation of the use of SAR against viruses, the objective of this study was to test products reported to induce resistance to infection against TSWV and ToMV. The test was performed in the greenhouse at Embrapa Vegetables, with two repetitions in the years 2012 and 2013. In the first year, the resistance of tomato plants against TSWV and ToMV was evaluated after the leaf application with: Adhevir's, Aminonutri, Megafol, Protton, Acibenzolar-S-methyl, Pyraclostrobin and water. In the second year, tomato plants were evaluated after applications of the same products, and additionally with Acadian and Orobor N1. For each product three treatments were done: ToMV, TSWV and mock inoculation, in four replications. The onset of symptoms was evaluated from the first day after inoculation and after that each two days. It was found that any treatment neither reduced the number of infected plants nor the symptom severity. It was concluded that the use of resistance inducers did not result in susceptibility decrease in plants in the controlled assays with artificial inoculation.

Keywords: inducing resistance, ToMV, TSWV.

1. INTRODUÇÃO

As viroses são importantes patógenos na agricultura, além de sua alta incidência e severidade o controle de viroses de plantas é uma questão que há muito vem preocupando os agricultores. Métodos de controle baseados na evasão, exclusão, erradicação e imunização são os mais eficientes no controle das viroses, principalmente métodos que evitem a entrada do patógeno ou sua eliminação completa no campo. Além disso, o uso da imunização é a tática mais importante como a produção de plantas resistentes (Kimati et al., 1995).

A indução de resistência sistêmica adquirida (RSA) é um mecanismo que as plantas desenvolveram para se protegerem da infecção por patógenos. A RSA é apenas desencadeada após a invasão do patógeno, ou seja, após um estresse biótico, sendo que estresses abióticos não estimulam a RSA (Ryals et al., 1994). A RSA é um tipo de defesa da planta que é de amplo espectro e de longa duração, podendo durar até 20 dias na planta (Luna et al., 2012).

Os vírus podem induzir a RSA, sendo que essa atividade desencadeada por infecção viral é conhecida desde meados da década de 1960, quando se verificou que *Tobacco mosaic virus* (TMV) desencadeava RSA em folhas de fumo (Ross, 1961).

O grupo de compostos dos Benzothiadiazoles foram os primeiros produtos químicos a serem produzidos que eram capazes de desencadear a RSA, sendo demonstrado que além de induzirem a RSA são ativadores de genes que codificam as proteínas relacionadas à patogenicidade (PR) (Lawton et al., 1996, Ruess et al., 1996).

Atualmente o principal produto do grupo dos Benzothiadiazoles é Acibenzolar-S-Metil (ASM), lançado pela Bayer nos EUA em 1999 com o nome de Actigard[®] e no Brasil é vendido pela Syngenta, com o nome de Bion[®].

A época em que o ASM começou a ser comercializado, vários estudos foram realizados testando diversos patógenos e diversas culturas, como brássicas, milho, trigo, fumo, pêssigo e

pepino (Ishii et al., 1999, Benhamou and Belanger, 1998, Görlach et al., 1996, Jensen et al., 1998, Morris et al., 1998, Campbell and Wilson, 1999).

Atualmente é conhecida a indução de RSA pelo ASM a patógenos como fungos e bactérias, porém existem dúvidas se esses compostos podem induzir resistência contra infecção por vírus (Ishii et al., 1999).

Existem alguns estudos que testaram o efeito do ASM, por exemplo, à infecção por TSWV em fumo e obtiveram resultados positivos na indução da RSA (Pappu et al., 2000, Csinos et al., 2001, Mandal et al., 2008); à infecção por tobamovírus (TMV e ToMV) em tomateiro e pimentão (Madhusudhan et al., 2008); à infecção por *Cucumber mosaic virus* (CMV) em tomateiro (Anfoka, 2000).

Além do ASM as estrobirulinas são relatadas como indutores de RSA. Elas representam uma classe de fungicidas de amplo espectro, que contém componentes sintéticos que protegem as plantas e cujo modo de ação é a inibição da respiração mitocondrial (Sauter et al., 1999). Uma estrobirulina, a piraclostrobina, mostrou induzir efeitos fisiológicos nas plantas, como aumento da resistência da planta contra o ataque de patógenos (Koehle et al., 2002).

Herms e colaboradores (2002) afirmaram também que plantas de fumo cv. Xanthi pré-tratadas com piraclostrobina aumentaram a resistência contra TMV, pela redução no tamanho das lesões causadas pelo vírus.

O estudo da RSA induzida por produtos químicos e que conferem resistência a viroses é uma alternativa promissora para o controle de doenças causadas por vírus. Assim, o objetivo desse trabalho foi determinar os possíveis efeitos na aplicação de produtos comerciais com possível efeito de indução de resistência e teste para avaliação da infecção viral.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estudo em casa de vegetação, primeiro ano

O ensaio de casa de vegetação, do primeiro ano, foi conduzido no Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças (CNPH) – Embrapa Hortaliças, Brasília/DF, durante o ano de 2012. Inicialmente foram utilizados vinte e um vasos de cinco litros contendo solo esterilizado. A semeadura foi realizada no dia 25 de julho com sementes de tomate cv. Viradoro e o transplante realizado após oito dias, quando as mudas possuíam duas folhas cotiledonares, com três replicatas em cada vaso. Para cada tratamento (produto/vírus) foram feitas três repetições, ou seja, nove plantas por tratamento.

2.2 Estudo em casa de vegetação segundo ano

O segundo ensaio em casa de vegetação foi conduzido na Embrapa Hortaliças, Brasília/DF, durante o ano de 2013. Neste ano, duzentas e dezesseis mudas da cultivar AP533 foram adquiridas de viveiro especializado e o transplante foi realizado no dia 26 de março. As mudas, na época do transplante, possuíam vinte e cinco dias de plantio e foram transplantadas em cento e oito vasos de cinco litros contendo solo esterilizado. Neste ano, foram feitas quatro repetições por tratamento em um vaso de cinco litros.

2.3 Fonte de inóculo

As fontes de inóculo foram obtidas a partir de plantas infectadas com TSWV ou ToMV, positivas para esses dois vírus separadamente, pelo método de ELISA, e foram mantidas em *Nicotiana rustica* e *N. tabacum* var. TNN, respectivamente.

2.4 Produtos e doses

No ano de 2012 foram aplicados seis produtos comercializados no mercado como indutores de resistência (Fig. 11): Aminonutri®, Adhevir's®, Megafol®, Protton®, o fungicida Comet® e o ativador de plantas Bion® (Acibenzolar-S-metílico - ASM) (Tabela 7; Tabela 8). No ensaio de 2013 além dos produtos aplicados no ano anterior foram acrescentados mais dois produtos: Orobor N1® e Acadian® (Tabela 8, Tabela 9, Fig. 11). As doses recomendadas pelos fabricantes foram utilizadas. Aos tratamentos, foi adicionada uma testemunha com aplicação somente de água.

Tabela 7. Dose em mililitros de produto em um litro de água, ou em gramas de produtos em um litro de água, dos produtos pulverizados no ensaio em casa de vegetação ano de 2012.

Produtos	Dose
Adhevir's	2 mL de produto / 1 L de água
Aminonutri	2 mL de produto / 1 L de água
Bion	0,05 g de produto / 1 L de água
Comet	0,4 mL de produto / 1 L de água
Megafol BR	2 mL de produto / 1 L de água
Protton	1 mL de produto / 1 L de água

Tabela 8. Quantidade de cada componente presente em cada um dos produtos utilizados no trabalho tanto para o ano de 2012, quanto para o ano de 2013.

Produtos	N (g/L)	P₂O₅ (g/L)	K₂O (g/L)	B (g/L)	Ca (g/L)	S (g/L)	Mg (g/L)	C orgânico (g/L)	Piraclostrobina	ASM
Acadian	***	***	61,48	***	***	***	***	69,6	***	***
Adhvir's	***	***	***	12	60	12	12	60	***	***
Aminonutri	112,5	25	12,5	***	***	***	***	106,3	***	***
Bion	***	***	***	***	***	***	***	***	***	500 g/Kg
Comet	***	***	***	***	***	***	***	***	250 g/L	***
Megafol	36,6	***	97,6	***	***	***	***	109,8	***	***
Orobor	1%	***	***	0,2%	***	***	***	***	***	***
Protton	***	1141	163	***	***	***	***	***	***	***

Tabela 9. Doses em mililitros de produto em um litro de água, ou em gramas de produtos em um litro de água, dos produtos pulverizados no ensaio em casa de vegetação ano de 2013.

Produtos	Dose
Acadian	2,5 mL de produto / 1 L de água
Adhevir's	2 mL de produto / 1 L de água
Aminonutri	2 mL de produto / 1 L de água
Bion	0,05 g de produto / 1 L de água
Comet	0,2 mL de produto / 1 L de água
Megafof BR	2 mL de produto / 1 L de água
Orobor N1	2 mL de produto / 1 L de água
Protton	0,5 mL de produto / 1 L de água

2.5 Aplicações

A primeira aplicação dos produtos foi realizada uma semana após o transplante e a segunda aplicação uma semana após a primeira, a partir de então as aplicações foram quinzenais. As pulverizações foram feitas por meio de pulverizadores de mão com capacidade de um litro de calda. No ano de 2012 foram realizadas três aplicações de produtos, enquanto no ano de 2013 foram realizadas quatro aplicações.

2.6 Inoculação

A inoculação mecânica dos isolados virais foi realizada cinco dias após a segunda pulverização de produtos com a aplicação de extrato foliar em tampão fosfato 0,02M pH7, acrescido de sulfato de sódio 0,02M em plantas previamente polvilhadas com carborundum. A maceração de extrato foliar se deu na seguinte proporção: um grama de extrato foliar por dez mililitros de tampão fosfato. No ano de 2012 os vírus ToMV e TSWV foram inoculados, já no ano de 2013 somente o vírus ToMV foi inoculado.

2.7 Avaliação dos sintomas

A avaliação de sintomas foi realizada a cada dois dias a partir da inoculação.



Figura 11. Foto com a imagem da embalagem de todos os produtos comerciais utilizados em nos anos de 2012 e 2013 no trabalho.

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação dos sintomas

No ano de 2012 os primeiros sintomas de ToMV em todos os tratamentos começaram a aparecer seis dias após a inoculação, sintomas como mosaico, com alternância de coloração verde clara com verde escura. Para os tratamentos com TSWV, os sintomas se iniciaram também com seis dias após a inoculação, porém menos severos do que com ToMV e com o aparecimento de grande quantidade de lesão necrótica local, sem distinção de tratamentos, inclusive o controle com água (Tabela 10).

No ensaio do ano 2013 com inoculação de ToMV, os sintomas começaram a aparecer como um mosaico leve nas folhas e um leve enrolamento foliar nas folhas jovens, dez dias após a inoculação. Com doze dias após a inoculação os sintomas estavam espalhados sistemicamente em todas as folhas de todas as plantas em todos os tratamentos (Tabela 11).

Em ambos os anos, a partir do dia da inoculação nenhum dos produtos aplicados resultou na redução do número de plantas infectadas. Todas as plantas inoculadas foram infectadas pelos dois vírus em todos os tratamentos (Tabela 10 e 11). Não houve tampouco variação na época de aparecimento e intensidade dos sintomas, quando comparado com o controle de aplicação com água, sugerindo que nas condições de inoculação do trabalho os produtos não exerceram efeito na suscetibilidade das plantas à infecção por TSWV e ToMV nas condições avaliadas.

Tabela 10. Resultado da infecção viral em cada uma das plantas avaliadas no trabalho, treze dias após a inoculação no ensaio em casa de vegetação ano 2012.

13 dias após a inoculação						
	TSWV			ToMV		
	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 1	Planta 2	Planta 3
Adhvir's	+	+	+	+	+	+
Aminonutri	+	+	+	+	+	+
Bion	+	+	+	+	+	+
Comet	+	+	+	+	+	+
Megafol	+	+	+	+	+	+
Protton	+	+	+	+	+	+
Água	+	+	+	+	+	+

Tabela 11. Resultado da infecção viral, em cada uma das plantas avaliadas no trabalho, doze dias após a inoculação no ensaio em casa de vegetação ano 2013.

12 dias após a inoculação				
	ToMV			
	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4
Acadian	+	+	+	+
Adhvir's	+	+	+	+
Aminonutri	+	+	+	+
Bion	+	+	+	+
Comet	+	+	+	+
Megafol	+	+	+	+
Orobor	+	+	+	+
Protton	+	+	+	+
Água	+	+	+	+

4. DISCUSSÃO

Estudos de campo com plantas de fumo e o uso de ASM combinado com imidacloprid realizados no estado da Georgia nos Estados Unidos nos anos de 1997 e 1999 mostraram a redução da incidência de TSWV nessas plantas (Pappu et al., 2000, Csinos et al., 2001). Porém, o uso do ASM resultou em efeito fitotóxico que culminou em uma redução no tamanho das plantas. Alguns anos depois, Madal e colaboradores (2008) em estudo em casa de vegetação com inoculação de TSWV em fumo avaliou o efeito de ASM, imidacloprid e ácido giberélico (para aumento do tamanho das plantas). Neste ensaio os autores observaram que houve redução no número de lesões locais, na porcentagem de plantas com infecção sistêmica e redução nos valores de absorbância no teste de ELISA.

Ao contrário dos autores citados anteriormente, no presente trabalho não foi possível verificar a indução de RSA por nenhum dos produtos utilizados. O método de inoculação mecânica é muito drástico, uma vez que o título viral na inoculação mecânica é muito alto, trabalhos que testam a eficiência de alguns dos mesmos produtos, usam inoculação natural ou por vetor. É possível que em condições de inoculação natural em campo os resultados sejam diferentes. Após o uso de ASM não houve sintoma de fitotoxidez, porém a aplicação de Comet e Protton produziu uma resposta de fitotoxidez severa no ano de 2012. Devido a isso a dose desses produtos foi reduzida pela metade no segundo ano. Mesmo com a redução, o produto Comet continuou induzindo fitotoxidez às plântulas.

Devido a exemplos de sucesso no uso de indutores de resistência para evitar doenças virais, pensou-se em avaliar produtos disponíveis no mercado brasileiro. Oito produtos foram avaliados, mas nenhum mostrou resultados satisfatórios, portanto com o método de avaliação utilizado neste ensaio não foi possível comprovar a eficiência desses produtos como indutores de resistência a vírus.

5. CONCLUSÃO

Nas condições do trabalho, em casa de vegetação e com inoculação mecânica, nos anos 2012 e 2013, os produtos não se mostraram eficientes para a indução de RSA contra a infecção por TSWV e ToMV em plantas de tomateiro.

6. LITERAURA CITADA

- ANFOKA, G. H. 2000. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill cv. Vollendung) to Cucumber mosaic virus. *Crop Protection*, 19, 401-405.
- BENHAMOU, N. & BELANGER, R. R. 1998. Induction of systemic resistance to *Pythium damping-off* in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Plant J*, 14, 13-21.
- CAMPBELL, H. L. & WILSON, M. 1999. Evaluation of Actigard (CGA-245704) for the control of bacterial spot of peach. *Phytopathology*, 89.
- CSINOS, A. S., PAPPU, H. R., MCPHERSON, R. M. & STEPHENSON, M. G. 2001. Management of Tomato spotted wilt virus in Flue-Cured Tobacco with Acibenzolar-S-Methyl and Imidacloprid. *Plant Disease*, 85, 292-296.
- GÖRLACH, J., VOLRATH, S., KNAUF-BEITER, G., HENGY, G., BECKHOVE, U., KOGEL, K. H., OOSTENDORP, M., STAUB, T., WARD, E., KESSMANN, H. & RYALS, J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell Online*, 8, 629-43.
- HERMS, S., SEEHAUS, K., KOEHLE, H. & CONRATH, U. 2002. A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against tobacco mosaic virus and *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. *Plant Physiol*, 130, 120-7.
- ISHII, H., TOMITA, Y., HORIO, T., NARUSAKA, Y., NAKAZAWA, Y., NISHIMURA, K. & IWAMOTO, S. 1999. Induced Resistance of Acibenzolar-S-methyl (CGA 245704) to Cucumber and Japanese Pear Diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 77-85.
- JENSEN, B. D., OLUMIDE LATUNDE-DADA, A., HUDSON, D. & LUCAS, J. A. 1998. Protection of Brassica seedlings against downy mildew and damping-off by seed treatment with CGA 245704, an activator of systemic acquired resistance. *Pesticide Science*, 52, 63-69.
- KIMATI, H., FILHO, A. B. & AMORIM, L. 2005. *Manual de fitopatologia*, Agronômica Ceres.
- KOEHLE, H., GROSSMANN, K., JABS, T., STIERL, R., GERHARD, M., KAISER, W., GLAAB, J., CONRATH, U., SEEHAUS, K. & HERMS, S. 2002. Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants. In: RUSSELL, P. E., DEHNE, H. W., S., H. & SISLER, H. D. (eds.) *Modern Fungicides and Antifungal Compounds III*. Andover: Intercept.
- LAWTON, K. A., FRIEDRICH, L., HUNT, M., WEYMANN, K., DELANEY, T., KESSMANN, H., STAUB, T. & RYALS, J. 1996. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J*, 10, 71-82.
- LUNA, E., BRUCE, T. J. A., ROBERTS, M. R., FLORS, V. & TON, J. 2012. Next-Generation Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiology*, 158, 844-853.
- MADHUSUDHAN, K. N., DEEPAK, S. A., PRAKASH, H. S., AGRAWAL, G. K., JWA, N. S. & RAKWAL, R. 2008. Acibenzolar-S-Methyl (ASM)-Induced Resistance against Tobamoviruses Involves Induction of RNADependent RNA Polymerase (RdRp) and Alternative Oxidase (AOX) Genes. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 11, 127 - 134.

- MANDAL, B., MANDAL, S., CSINOS, A. S., MARTINEZ, N., CULBREATH, A. K. & PAPPU, H. R. 2008. Biological and Molecular Analyses of the Acibenzolar-S-Methyl-Induced Systemic Acquired Resistance in Flue-Cured Tobacco Against Tomato spotted wilt virus. *Phytopathology*, 98, 196-204.
- MORRIS, S. W., VERNOOIJ, B., TITATARN, S., STARRETT, M., THOMAS, S., WILTSE, C. C., FREDERIKSEN, R. A., BHANDHUFALCK, A., HULBERT, S. & UKNES, S. 1998. Induced resistance responses in maize. *Mol Plant Microbe Interact*, 11, 643-58.
- PAPPU, H. R., CSINOS, A. S., MCPHERSON, R. M., JONES, D. C. & STEPHENSON, M. G. 2000. Effect of acibenzolar-S-methyl and imidacloprid on suppression of tomato spotted wilt Tospovirus in flue-cured tobacco. *Crop Protection*, 19, 349-354.
- ROSS, A. F. 1961. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*, 14, 340-358.
- RUESS, W., MUELLER, K., KNAUF-BEITER, G., KUNZ, W. & STAUB, T. 1996. Plant activator CGA 245704: an innovative approach for disease control in cereals and tobacco. *Brighton Crop Protection Conference: Pests & Diseases*. Brighton, UK.
- RYALS, J., UKNES, S. & WARD, E. 1994. Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiology*, 104, 1109 - 1112.
- SAUTER, H., STEGLICH, W. & ANKE, T. 1999. Strobilurins: evolution of a new class of active substances. *Angewandte Chemie International Edition*, 38, 1328 - 1349.

CONCLUSÕES GERAIS

No Brasil, os begomovírus são importantes patógenos para o tomateiro, sendo uma das principais causas de perdas nas lavouras. Até o início da década de 1990, epidemias de begomovirose eram esporádicas e pouco importantes. Todavia, com a introdução de um novo biótipo do inseto vetor, a mosca-branca *B. tabaci* biótipo B, as begomovirose tornaram-se muito mais importantes e significativas, inúmeras espécies foram relatadas – provavelmente resultado de transferência de plantas silvestres e daninhas e adaptação em plantas cultivadas sob condições climáticas e de cultivo favoráveis.

Na região Nordeste, na década de 80, as áreas de produção de tomate foram abandonadas, desencadeadas pelo incontrolável ataque de pragas, como moscas-brancas, traças, tospovírus e begomovírus. As áreas de produção de tomate para processamento industrial foram, então, transferidas para a região centro-sul. Decorridos mais de vinte anos da introdução do biótipo B no Brasil, o principal estado produtor de tomate é o Goiás, cujos produtores mesmo possuindo um alto nível tecnológico, sofrem com a begomovirose. No Nordeste, as áreas de cultivo foram reduzidas, mas a begomovirose ainda causa problemas.

O estudo de diversidade de begomovírus ajuda-nos a entender a dinâmica da sua adaptação e evolução. Essas informações contribuem para o desenvolvimento de técnicas, mais eficientes de prevenção da infecção por begomovírus, baseadas na eliminação de hospedeiros alternativos, por exemplo. A grande contribuição é vista no suporte a programas de melhoramento de tomateiro, para a geração de materiais com uma resistência ampla e durável.

Os resultados conduzem à conclusão de que o TMoLCV, predomina na região Nordeste e existe uma alta variabilidade entre os isolados coletados. Esse panorama é distinto do observado na região centro-sul em que o ToSRV predomina, mas com uma baixa

variabilidade entre isolados. As perguntas que pairam no ar e permanecem sem resposta são por que existe essa diferença no vírus predominante e por que da variabilidade alta em TMoLCV?

Apesar do genoma de TMoLCV ser tipicamente de um begomovírus bipartido, não foi possível clonar o DNA-B. esforços foram realizados sem sucesso (dados não mostrados), mas esforços mais intensos serão enviados, juntamente com construção de clones infecciosos para viabilizar a caracterização biológica.

O controle de viroses é sabidamente complexa e a busca por alternativas eficientes de controle é uma prioridade. O uso de indutores de resistência foi vislumbrado como uma alternativa que necessitava ser avaliada.

Infelizmente, não foi obtido nenhum indicativo de que os produtos, ora comercializados como potenciais indutores de resistência, apresentem algum efeito positivo nessas avaliações em plantas de tomateiro contra a infecção por TSWV e ToMV. É possível que novas tentativas, com inoculações naturais, sejam realizadas.