

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CECA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL E
PROTEÇÃO DE PLANTAS

MARÍLIA GRACELÍDIA DOS SANTOS BARROS

CARACTERIZAÇÃO DE BEGOMOVÍRUS NA CULTURA DO TOMATEIRO
(*Solanum Lycopersicon* L.) NO ESTADO DE ALAGOAS

RIO LARGO – AL

2012

MARÍLIA GRACELÍDIA DOS SANTOS BARROS

CARACTERIZAÇÃO DE BEGOMOVÍRUS NA CULTURA DO TOMATEIRO
(*Solanum Lycopersicon* L.) NO ESTADO DE ALAGOAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Proteção de Plantas.

Orientadora: Iraildes Pereira Assunção

RIO LARGO - AL

2012

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- B277c Barros, Marília Gracelídia dos Santos.
 Caracterização de begomovírus na cultura do tomateiro (*Solanum Lycopersicon* L.) no estado de Alagoas / Marília Gracelídia dos Santos Barros.
 – 2012.
 54 f. : il. tabs., grafs.
- Orientadora: Iraildes Pereira Assunção.
 Dissertação (mestrado em Agronomia : Produção Vegetal e Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2012.
- Bibliografia: f. 43 - 53.
1. Tomate – Melhoramento genético. 2. Geminivírus. 3. *Solanum Lycopersicon*.
 4. Diversidade genética. I. Título.

CDU: 635.64

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo e de todos, pelas graças concedidas nesses dois anos, pela coragem de enfrentar todos os desafios e por nunca me deixar desanimar. Sem Seu cuidado eu nada seria.

À Universidade Federal de Alagoas, pela oferta dos cursos de mestrado;

À toda a equipe que faz a pós-graduação do Centro de Ciências Agrárias;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Aos meus pais e aos meus irmãos, pelo exemplo e incentivo aos estudos;

Ao Allan, pela torcida, presença constante, incentivo e por estar sempre ao meu lado, apoiando qualquer decisão minha e entendendo as renúncias necessárias para a conclusão de cada etapa;

À todos os meus familiares e amigos, pelas orações e torcida a todo momento;

Aos Professores Iraldes Pereira Assunção e Gaus Silvestre Andrade de Lima pela orientação e apoio durante todo esse período;

À todos os professores do curso de pós-graduação em Agronomia, pelos conhecimentos compartilhados, em especial à professora Fátima Muniz pela dedicação e disponibilidade em ajudar a todos;

À todos do Laboratório de Fitopatologia Molecular, Aline, Arthur, Edlene, Helloá, Jaqueline, Liliane, Mariote e Nayana pelos ensinamentos, pelos momentos de ajuda mútua e alegria;

Às companheiras Erika e Mayra, por estarem comigo desde o início dos trabalhos, minha gratidão pelo companheirismo e amizade;

Às amigas Joyce e Sheila pelo grato reencontro e pelo incentivo e apoio incondicional em todos os momentos;

À Sarah, pelo apoio durante as análises e procedimentos e pela disponibilidade em ajudar a todos;

Aos colegas de mestrado Andrea, Danilo, Franklin, Fred, Juliana, Leonardo, Rosângela, Sandra, Sérgio e a todos os outros pelo apoio e amizade durante as disciplinas;

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram e torceram pelo sucesso deste trabalho.

RESUMO

Os begomovírus são geminivírus transmitidos por moscas-brancas que apresentam o genoma composto por DNA de fita simples circular. Os begomovírus relatados no Brasil são bipartidos (DNA-A e DNA-B). A explosão de ocorrência de begomovírus provavelmente foi desencadeada pela introdução e dispersão do vetor, o biótipo B de *Bemisia tabaci*. Este biótipo é polífago e com maior capacidade de multiplicação do que o biótipo A, antes predominante no país. Os begomovírus são considerados os vírus mais importantes para a cultura do tomateiro na atualidade no Brasil, apresentando alta diversidade, contam com 17 espécies relatadas somente em tomateiro. A identificação precisa da espécie é complexa e somente pode ser realizada a partir da determinação da sequência completa do DNA-A do genoma dos begomovírus. Este trabalho teve como objetivos realizar a caracterização molecular e a análise da diversidade genética de begomovírus que infectam tomateiro em áreas produtoras do município de Arapiraca no estado de Alagoas. A detecção de *Begomovirus* em plantas de tomate apresentando sintomas típicos foi realizada pela técnica de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos degenerados visando a amplificação de regiões específicas dos componentes A ou B do genoma viral. Foi detectada a presença de begomovírus nas 23 amostras coletadas. A identificação precisa das espécies ocorreu mediante a amplificação do genoma completo (DNA-A) dos begomovírus, utilizando-se a técnica de amplificação por círculo rolante (RCA), clonagem e sequenciamento do genoma. Duas espécies de begomovírus foram caracterizadas neste trabalho, sendo o Tomato mottle leaf curl virus a espécie predominante dentre os clones obtidos. A outra espécie encontrada foi a *Bean Golden mosaic virus*, com apenas um isolado. Este trabalho constitui o primeiro relato de infecção de solanáceas pelo BGMV no Brasil. Entretanto, a alta identidade das sequências (99%) deste clone, não elimina a hipótese de contaminação. A ausência de relatos envolvendo infecção de tomateiro por BGMV reforça a importância da realização de novos testes para confirmação destes resultados.

Palavras-chave: Geminivírus, *Solanum Lycopersicon*, Diversidade genética

ABSTRACT

The begomoviruses are geminiviruses transmitted by whiteflies that present single-stranded circular DNA genome. The begomoviruses reported in Brazil are bipartite, with two genomic components (DNA-A and DNA-B). The explosion of occurrence of begomoviruses was probably triggered by the introduction and spread of vector, the B biotype of *Bemisia tabaci*. This biotype is polyphagous and greater capacity of multiplication than biotype A (before prevalent in the country). Nowadays, the begomoviruses are considered the most important for tomato crop in Brazil. Presenting high diversity, just for tomato plants 17 species of begomoviruses have been reported, despite the complexity of accurate identification (performed by determining the complete sequence of DNA-A component). The present work aimed the molecular characterization and analysis of genetic diversity of begomoviruses infecting tomato producing areas from Arapiraca, Alagoas. Begomoviruses detection in sintomatic tomato plants was performed by PCR using primers to amplify specific regions of DNA A or DNA B viral genomic components. 23 samples were positive for begomovirus. Accurate identification of species was performed by amplification of the complete genome (DNA-A) using the technique of Rolling circle amplification (RCA), cloning and sequencing of the genome. Two different species of begomoviruses were characterized in this survey and Tomato mottle leaf curl virus was the predominant species among the clones obtained. The other species found was the *Bean golden mosaic virus*, with only one isolate. This work constitutes the first report of infection of solanaceous by BGMV in Brazil. However, the high sequence identity (99%) of the clone does not eliminate the possibility of contamination. The absence of reports involving infection of tomato plants by BGMV reinforces the importance of conducting further tests to confirm these results.

Keywords: Geminivirus, *Solanum Lycopersicon*, Genetic diversity

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Organização genômica dos quatro gêneros pertencentes à família <i>Geminiviridae</i> . Para o gênero <i>Begomovirus</i> Os círculos representam o genoma viral, com dois componentes (DNA-A e DNA-B) de aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada. Uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (CR), contém a origem de replicação viral, com uma estrutura em forma de grampo e uma sequência invariável de nove nucleotídeos (TAATATT↓AC) conservada em todos os membros da família <i>Geminiviridae</i> . A seta (↓) indica o sítio de início da replicação do DNA viral por círculo rolante. As setas azuis e vermelhas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição (viral e complementar, respectivamente).....	15
Figura 2 – <i>Bemisia tabaci</i> , fase adulta.	20
Figura 3 – Plantas de tomate apresentando sintomas típicos de infecção por begomovírus.	25
Figura 4 – Produtos de PCR amplificados a partir do DNA-A de begomovirus de plantas de tomate. M = Marcador de peso molecular (1 kb DNA Plus Ladder); 1-23 = Produtos de PCR amplificados a partir da DNA-A de plantas de tomate. Controle positivo (+) e controle negativo (-).....	31
Figura 5 – Árvore Neighbor-joining baseada na sequência parcial e nucleotídeos do DNA-A de begomovírus que infectam tomateiro (Arapiraca – AL) e outros begomovírus brasileiros.....	33
Figura 6 – A - Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) de amplicons obtidos a partir de amostras de DNA total amplificado via RCA. B - Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) de amplicons obtidos a partir de amostras de DNA total submetidos à clivagem com enzima de restrição. M = Marcador de peso molecular (1 kb DNA Plus Ladder); Enzima <i>ApaI</i>	34
Figura 7 – Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) da clivagem de DNA plasmidial proveniente da clonagem de componentes genômicos, com as enzimas <i>ApaI</i> e <i>HindIII</i> . M = Marcador de peso molecular (1 kb DNA Plus Ladder).....	35
Figura 8 – Porcentagem de identidade entre os cinco clones isolados de plantas de tomate e entre as espécies mais relacionadas (DNAMAN 6).....	38
Figura 9 – Árvore filogenética Maximum-likelihood baseada na sequência completa do DNA-A de begomovírus que infectam tomateiro (Arapiraca-AL) e outros begomovírus brasileiros.....	40

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de fragmentos do componente A do genoma viral.....	26
Tabela 2 – Begomovírus utilizados nas análises filogenéticas.....	28
Tabela 3 – Oligonucleotídeos internos utilizados para sequenciamento dos componentes genômicos de begomovírus.....	36
Tabela 4 – Comparação preliminar das sequências obtidas através do sequenciamento a partir dos clones dos isolados EC01, EC02, EC04, EC08 e EC21, utilizando a ferramenta BLAST.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1X – 1 vez
μL – Microlitro
μg/ml – Micrograma por mililitro
A – Adenina
ACMV – *African cassava mosaic virus*
BCTV – *Beet curly top virus*
BGMV – *Bean golden mosaic virus*
BGYMV – *Bean golden yellow mosaic virus*
BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
°C – Graus Celsius
C – Citosina
CaLCuV – *Cabbage leaf curl virus*
cm² – Centímetro quadrado
CP – proteína capsidial
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
dNTP's - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dsDNA – DNA de fita dupla
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
G - Guanina
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada
Kb – Kilobase
KCl – Cloreto de Potássio
LB – Meio Luria-Bertani
M – Molar
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
mM – Milimol
MP – Proteína de movimento
MSV – *Maize streak virus*
NaCl – Cloreto de Sódio
n.d – Não disponível
ng – Nanograma
ng/μl – Micrograma por microlitro
NIG – NSP-interacting GTPase
nm – nanômetro
NSP – nuclear shuttle protein
nt – Nucleotídeo
ori – origem de replicação
PAM – Produção Agrícola Municipal
PCR – Reação da Polimerase em Cadeia

pH – Potencial Hidrogeniônico
PSLDV – Passionfruit severe leaf distortion virus
RC – região comum
RCA – rolling circle amplification
REn – Replication-Enhancer Protein
Rep – replication-associated protein
RF – forma replicativa
RNA – Ácido Ribonucleico
rpm – rotações por minuto
SCE – structurally-conserved element
SDS – sodium dodecil sulfate
SEAGRI – Secretaria de Agricultura
ssDNA – DNA de fita simples
T – Timina
TAE – tampão Tris-Acetato-EDTA
TE – Tris EDTA
TGMV – *Tomato golden mosaic virus*
TGVV – *Tomato golden vein virus*
TLCV – *Tomato leaf curl virus*
TMoLCV – *Tomato mottle leaf curl virus*
ToCMoV – *Tomato chlorotic mottle virus*
Ton/ha – Tonelada por hectare
ToSRV – *Tomato severe rugose virus*
ToYSV – *Tomato yellow spot virus*
ToYVSV – *Tomato yellow vein streak virus*
TPCTV – *Tomato pseudo-curly top virus*
TrAP – Transactivation Protein
Tris-HCl – Tris hidrocloreto
TYLCV – *Tomato yellow leaf curl virus*
UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Família <i>Geminiviridae</i>.....	13
2.2 O gênero <i>Begomovirus</i>.....	14
2.2.1 Organização genômica.....	14
2.2.2 Replicação e Movimento viral.....	16
2.2.3 Identificação e caracterização de <i>Begomovirus</i>	18
2.2.4 Transmissão natural dos <i>Begomovirus</i>	19
2.3 A cultura do tomate.....	21
2.4 <i>Begomovirus</i> relatados em tomateiro.....	23
3 METODOLOGIA.....	25
3.1 Coleta de material vegetal e obtenção de isolados virais.....	25
3.2 Teste de detecção por PCR.....	26
3.3 Sequenciamento parcial e análise filogenética dos isolados virais.....	27
3.4 Amplificação por RCA e clivagens com enzimas de restrição.....	27
3.5 Clonagem e sequenciamento dos genomas virais.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Detecção de geminivírus por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR).....	31
4.2 Sequenciamento parcial e análise filogenética dos isolados virais.....	32
4.3 Sequenciamento do genoma completo e análises filogenéticas.....	34
5 CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* é constituída por quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* (VAN REGENMORTEL et al., 2000). Os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* são considerados os mais importantes pelo número de espécies que infectam plantas cultivadas e invasoras (CASTILLO-URQUIZA et al., 2008; FARIA et al., 2000). Caracterizam-se por apresentar “partículas geminadas” com morfologia icosaédrica e genoma composto, na maioria das vezes, por duas moléculas de DNA circular de fitas simples, denominadas DNA-A e DNA-B, cada uma com aproximadamente 2.500 nucleotídeos.

Espécies de begomovírus que ocorrem no “Velho Mundo” possuem apenas um componente genômico e frequentemente estão associados a um DNA satélite denominado DNA β (MANSOOR et al., 2003). Por outro lado, begomovírus encontrados no “Novo Mundo” possuem dois componentes denominados DNA-A e DNA-B. No DNA-A encontram-se os genes envolvidos na replicação e encapsidação da progênie viral, enquanto no DNA-B encontram-se os genes responsáveis pelos movimentos intra- e intercelular (LAZAROWITZ, 1992). Ambos os componentes são requeridos para a infecção sistêmica do hospedeiro. Dentre os begomovírus de maior importância econômica estão *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV – espécie tipo do gênero), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e *African cassava mosaic virus* (ACMV).

As espécies de vírus deste gênero são transmitidas de forma circulativa não-propagativa por insetos da ordem hemíptera pertencentes à espécie *Bemisia tabaci*, nesse tipo de transmissão, não ocorre replicação das partículas virais no interior do corpo do vetor. No Brasil, após a introdução do novo biótipo de mosca branca, *Bemisia tabaci* biótipo B, surtos epidêmicos de geminivírus passaram a ocorrer em todas as regiões produtoras. Sendo a mosca branca um vetor muito móvel e com amplo círculo de hospedeiros, uma grande diversidade de espécies de geminivírus que estavam restritas às ervas daninhas migraram para o tomateiro (FARIA et al., 2000; FRANÇA et al., 1996).

Desde então, já foram relatadas no Brasil 17 espécies de begomovírus em tomateiro, três dessas espécies são consideradas como predominantes: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato golden vein virus* (TGVV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV) (FERNANDES et al., 2008). Fatores ainda desconhecidos podem estar relacionados com a predominância dessas espécies na cultura do tomate.

O cultivo ininterrupto do tomateiro favorece o aparecimento de diversas doenças que diminuem a produção e afetam a qualidade do fruto. Essas doenças são causadas por diversos patógenos e aquelas de origem viral são as que apresentam maior dificuldade de controle. No Brasil, as principais doenças de origem viral são causadas por espécies de vírus dos generos *Begomovirus*, *Tospovirus*, *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus* e mais recentemente por espécies de *Crinivirus* (BARBOSA et al., 2010).

A distinção das diferentes espécies de geminivírus no campo por meio de sintomatologia é impossível, sendo necessário o uso de técnicas moleculares. Em geral, os sintomas manifestam-se com clorose das nervuras, a partir da base da folha, seguido de mosaico amarelo, rugosidade e até mesmo enrolamento foliar. Quando a infecção é precoce, as perdas são totais e o controle é muito difícil, em razão da alta população de mosca branca presente no campo (GIORDANO et al, 2005).

Diante do alto grau de diversidade genética e importância econômica dos begomovírus encontrados no Brasil, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização molecular e analisar a diversidade genética de begomovírus que infectam tomateiro no município de Arapiraca, estado de Alagoas. A geração de informações sobre a diversidade de espécies de begomovírus e sua distribuição na cultura do tomateiro auxiliará programas de melhoramento e permitirá o desenvolvimento de medidas de controle mais duráveis, como o desenvolvimento de variedades resistentes para Estado de Alagoas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* compreende um grande grupo de fitovírus de grande importância econômica em todos os continentes, desde culturas de cereais até leguminosas (FARIA; ZERBINI, 2000). Estas geminiviroses causam significantes perdas na produção em muitas plantas no mundo. Os vírus pertencentes à família *Geminiviridae* possuem genoma composto por DNA de fita simples circular, e suas partículas são geminadas com morfologia icosaédrica. As partículas geminadas têm tamanho aproximado de 22 x 38 nm, consistindo em uma morfologia de dois icosaédros incompletos com 110 unidades da proteína capsidial, organizados em 22 capsômeros pentaédricos. É dividida nos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, com base no número de componentes do genoma, tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros e relacionamento filogenético (STANLEY et al., 2005).

O gênero *Mastrevirus* (espécie tipo *Maize streak virus* - MSV) é constituído por genoma monopartido (2,6 – 2,8 Kb) (STANLEY et al., 2005). São transmitidos por cigarrinhas (Hemiptera: *Cicadellidae*), sendo a maioria encontrada em plantas monocotiledôneas, especialmente em milho. O MSV é endêmico na África e seus hospedeiros naturais são as gramíneas infestantes. Outra espécie importante deste gênero é *Wheat dwarf virus*, que infecta a cultura do trigo (VARMA; MALATHI, 2003).

O gênero *Curtovirus* (espécie tipo *Beet curly top virus* - BCTV) apresenta genoma monopartido (2,9 – 3kb) e as espécies deste gênero estão limitadas ao floema. A transmissão é feita por cigarrinhas (Hemiptera: *Cicadellidae*) (STANLEY et al., 2005). Essas viroses infectam apenas dicotiledôneas, especialmente beterraba, tomate e melão, e são encontradas na Índia, no continente Americano e países do Mediterrâneo (ASCENIO-IBÁÑEZ et al., 2000).

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

Os *Begomovirus* podem ser divididos em dois grandes grupos, os originados do Novo Mundo (Américas - Hemisfério Ocidental) e os do Velho Mundo (Europa, Ásia e África – Hemisfério Oriental). Neste gênero, encontram-se os vírus transmitidos por mosca-branca para

dicotiledôneas e que possuem um ou dois componentes genômicos, sendo o membro tipo o *Bean golden yellow mosaic virus* – BGYMV (STANLEY et al., 2005). Atualmente, mais de 180 espécies de begomovirus já foram descritas, incluindo mais de 50 espécies que podem infectar o tomateiro (FAUQUET et al., 2008).

2.2 O gênero Begomovírus

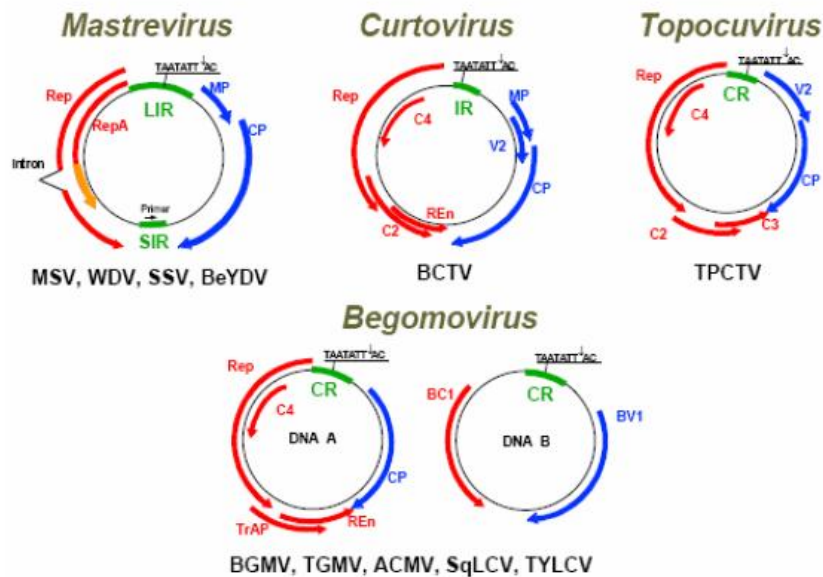
2.2.1 Organização genômica

Os begomovírus são constituídos de DNA de fita simples circular. Alguns begomovírus do Velho Mundo (Europa, Ásia e África), como o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e *Tomato leaf curl virus* (TLCV) têm apenas um componente genômico, o DNA A (FAUQUET et al., 2003; STANLEY et al., 2005), que está frequentemente associado a moléculas de ssDNA circular conhecidas como DNA β (betassatélites) e DNA-1 (alfassatélites) (BRIDDON, 2003; BRIDDON; STANLEY, 2006).

Os begomovírus relatados no Brasil são bipartidos, ou seja, o genoma é composto por dois componentes de DNA, o DNA-A e o DNA-B. Ambos apresentam um tamanho aproximado de 2.600 bases com baixa identidade entre eles, exceto por uma região de cerca de 200 bases idêntica denominada região comum (RC), que inclui a origem de replicação (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999) (Figura 1). Essa região é altamente conservada para cada espécie viral e com identidade normalmente acima de 90% entre os componentes A e B da mesma espécie (FONTES et al., 1994; LAZAROWITZ, 1992; PILARTZ; JESKE, 2003).

Dentro da região comum, localiza-se uma sequência de nove nucleotídeos (5'-TAATATTAC-3') conservada entre todos os geminivírus, onde se encontra o domínio funcional da origem de replicação. Essa sequência de nucleotídeos é clivada durante o início da replicação viral e se localiza num contexto de 29 a 32 nucleotídeos capazes de formar uma estrutura em forma de grampo. Embora a sequência de 30 nucleotídeos varie entre espécies de geminivírus, a estrutura em forma de grampo está sempre presente, sendo assim considerada um elemento conservado estruturalmente e essencial para replicação denominado SCE (*structurally-conserved element*) (FARIA; ZERBINI, 2000; LAZAROWITZ et al., 1992; STANLEY et al., 2005).

Figura 1 – Organização genômica dos quatro gêneros pertencentes à família *Geminiviridae*. Para o gênero *Begomovirus* Os círculos representam o genoma viral, com dois componentes (DNA-A e DNA-B) de aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada. Uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (CR), contém a origem de replicação viral, com uma estrutura em forma de grampo e uma sequência invariável de nove nucleotídeos (TAATATT↓AC) conservada em todos os membros da família *Geminiviridae*. A seta (↓) indica o sítio de início da replicação do DNA viral por círculo rolante. As setas azuis e vermelhas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição (viral e complementar, respectivamente).



Fonte: Reproduzido de Gutierrez et al. (2004).

Cada um dos componentes (DNA-A e DNA-B) é responsável por etapas distintas no processo de infecção, sendo o DNA-A envolvido na replicação viral, transcrição e formação da capa protéica e o DNA-B responsável pelo movimento (célula-a-célula e longa distância) do vírus na planta (ROJAS et al., 2005b; STANLEY et al., 2005). Ambos os componentes são essenciais para a infecção sistêmica eficiente do vírus na planta.

O DNA-A dos begomovírus bissegmentados pode codificar de quatro a seis proteínas, destacando-se a proteína associada à replicação, Rep (“replication-associated protein”), iniciadora do mecanismo de replicação por círculo rolante, com propriedade de ligação a ácidos nucleicos, endonuclease e ATPase (FONTES et al., 1992; OROZCO et al., 1997) e a proteína capsidial (“coat protein”, CP), que além de formar o capsídeo viral é essencial para a transmissão do vírus pelo inseto vetor (BRIDDON et al., 1990; HÖFER et al., 1997a). O DNA-A é utilizado para a identificação das espécies.

O DNA B codifica a proteína MP (“movement protein”), envolvida no movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas

(NOUEIRY et al., 1994), e a proteína NSP (“nuclear shuttle protein”), responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear (NOUEIRY et al., 1994; SANDERFOOT et al., 1996).

A transcrição dos genes virais ocorre tanto no sentido viral ($5' \rightarrow 3'$) como no sentido complementar ($3' \rightarrow 5'$) (HOWARTH et al., 1985; ROJAS et al., 2005b). A transcrição é bidirecional tanto no componente A, quanto no componente B (FARIA et al., 2000).

Populações de geminivírus, incluindo os begomovírus, possuem um elevado grau de diversidade genética. A ocorrência de eventos frequentes de recombinação (PADIDAM et al., 1999b), a ocorrência de pseudo-recombinação entre vírus com genoma bissegmentado (ANDRADE et al., 2006a), e a alta taxa de mutação (DUFFY; HOLMES, 2008, 2009) contribuem para esse elevado grau de diversidade.

A existência de dois componentes genômicos na maioria dos begomovírus promove um mecanismo alternativo, conhecido como pseudo-recombinação, pelo qual a troca de material genético pode ocorrer sem necessidade de recombinação intermolecular, ocorrendo apenas a troca de componentes genômicos entre dois vírus distintos (GILBERTSON et al., 1993b; SUNG; COUTTS, 1995; ANDRADE et al., 2006a); revisado por ROJAS et al., (2005b). A ocorrência natural de pseudo-recombinantes no campo foi verificada no México, em tomateiros infectados pelo *Chino del tomate virus* (CdTV) (PAPLOMATAS et al., 1994). Experimentos com pseudo-recombinação são ferramentas úteis no estudo de funções de genes e podem revelar relações filogenéticas.

O alto índice de recombinação entre espécies de begomovírus invalida a utilização de pequenos fragmentos de DNA-A para comparação, sendo recomendado para tal a informação obtida a partir do genoma completo deste segmento (FAUQUET et al., 2008).

2.2.2 Replicação e Movimento viral

No processo de infecção dos geminivírus, as partículas virais são inoculadas na planta pelo inseto vetor e o genoma viral (ssDNA) se desassocia de forma espontânea do capsídeo (LAZAROWITZ, 1992; PALMER; RYBICKI, 1998). No interior da célula o ssDNA viral é transportado para o núcleo, onde é convertido em um intermediário de fita dupla (dsDNA) denominado forma replicativa (RF). A maneira como esta conversão ocorre não é conhecida, no entanto evidências indiretas, como a necessidade de desestabilização local do dsDNA para o iniciação da replicação por círculo rolante em procariotos por “strand-nicking enzymes”, indicam que é realizada por fatores do hospedeiro. A RF serve como molde para síntese dos

novos componentes genômicos e também para a transcrição dos genes virais. O genoma viral é replicado via mecanismo de círculo rolante utilizando a RF como molde (STANLEY, 1995; STENGER et al., 1991).

A origem de replicação (*ori*) está localizada na região intergênica comum entre os dois componentes genômicos. A sequência da *ori* é conservada entre componentes de um mesmo vírus, porém variável entre espécies (DAVIES et al., 1987; LAZAROWITZ, 1992). Nesta região se localiza uma sequência repetida e invertida composta predominantemente por guanina e citosina, formando uma estrutura conservada em forma de grampo (“structurally-conserved element”, SCE), com uma sequência invariável (5'-TAATATTAC-3') encontrada em todos geminivírus, que constitui o domínio funcional da origem de replicação (HEYRAUD-NITSCHKE et al., 1995; OROZCO; HANLEY-BOWDOIN, 1998). É nesse nonanucleotídeo que ocorre a clivagem (TAATATT↓AC) que inicia o processo de replicação por círculo rolante (FONTES et al., 1994; LAUFS et al., 1995). A clivagem é realizada pela proteína Rep, que atua como endonuclease sítioespecífica com requerimento de estrutura e sequência (LAUFS et al., 1995; OROZCO; HANLEY-BOWDOIN, 1998). Na região comum encontram-se as sequências específicas para ligação da proteína Rep (FONTES et al., 1994; FONTES et al., 1992) e regiões promotoras da RNA polimerase tipo II de plantas, responsável pela transcrição dos genes virais (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999). O reconhecimento pela proteína Rep é considerado vírus-específico (ARGÜELLO-ASTORGA et al., 1994; HARRISON; ROBINSON, 1999; RAMOS et al., 2003), de modo que Rep só inicia a replicação de DNAs cognatos. A replicação é idêntica para o DNA B. Mutações nos genes Rep, TrAP, NSP e MP podem bloquear a infectividade viral (HANLEY-BOWDOIN, 1999).

Para o estabelecimento de uma infecção sistêmica na planta, é necessário que, após a replicação na célula inicial, o vírus infecte outras células. O movimento no interior do hospedeiro pode ser dividido em dois processos, sendo o primeiro o movimento célula a célula via plasmodesmas e o segundo a longa distância, através do floema. Como os begomovírus replicam no núcleo da célula hospedeira, necessitam de uma etapa adicional de transporte do núcleo para o citoplasma, a qual é realizada pela proteína NSP (PALMER; RYBICKI, 1998). Já a proteína MP associa-se à membrana celular e altera o limite de exclusão dos plasmodesmas, viabilizando o transporte do genoma viral (NOUEIRY et al., 1994).

Estas duas proteínas atuam de forma cooperativa para mediar o tráfego intra e intercelular do DNA viral (SANDERFOOT; LAZAROWITZ, 1995), permitindo ao vírus

infectar sistemicamente o hospedeiro. A interação direta das proteínas MP e NSP *in vitro* foi demonstrada para o TGMV, utilizando-se o sistema duplo-híbrido de levedura (MARIANO et al., 2004). A interação *in vivo* entre NSP e MP do *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) foi recentemente demonstrada, também utilizando-se o sistema duplo-híbrido levedura. Nestes estudos foi identificada uma GTPase citoplasmática designada NIG (NSP-interacting GTPase), que interage com NSP de begomovírus *in vitro* e *in vivo* e promove o transporte da proteína viral do núcleo para o citoplasma, onde ela é redirecionada para a superfície da célula para interagir com MP (CARVALHO et al., 2008).

Para mastrevírus, curtovírus e begomovírus monossegmentados, a proteína CP é necessária para os movimentos célula-a-célula e a longa distância (ROJAS et al., 2001; GAFNI; EPEL, 2002). No caso de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), a CP é responsável pelo transporte do DNA do núcleo para o citoplasma, funcionando como uma proteína análoga a NSP dos begomovírus bissegmentados (ROJAS et al., 2001; ROJAS et al., 2005b).

Tanto MP quanto NSP reconhecem o DNA viral de maneira específica com relação à forma e comprimento (GILBERTSON et al., 2003; ROJAS et al., 1998), o que elimina a necessidade da proteína capsidial para o movimento a longa distância. Raras exceções, como o begomovírus bissegmentado *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), são capazes de infectar sistemicamente alguns hospedeiros na ausência do DNA-B cognato (FONTENELLE et al., 2007; GALVÃO et al., 2003;).

2.2.3 Identificação e caracterização de *Begomovirus*

A identificação e caracterização de begomovírus baseada apenas na sintomatologia não é possível, uma vez que os sintomas variam de acordo com as condições ambientais, idade da planta hospedeira e ocorrência de infecções mistas envolvendo duas ou mais espécies virais (PAPLOMATAS et al., 1994). O método mais seguro para a identificação de uma espécie tem sido a determinação da sequência completa do DNA-A do *Begomovirus*. O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) estabeleceu que 90% de identidade de nucleotídeos do DNA-A seria a porcentagem de identidade limite para dois vírus serem considerados da mesma espécie (STANLEY et al., 2005) e isolados com identidade de nucleotídeos inferior a 90% são considerados espécies distintas. Contudo, a clonagem e sequenciamento do genoma completo é complexa devido às dificuldades no isolamento da forma replicativa dos *Begomovirus* bipartidos, pois estes encontram-se em baixas

concentrações nos tecidos infectados. Inoue-Nagata et al. (2004) desenvolveram um método simples de clonagem utilizando a amplificação por círculo rolante (RCA = “rolling circle amplification”) seguido de digestão com enzima de restrição e ligação em vetor. Este método tem facilitado os procedimentos de clonagem e proporcionado a realização rápida de clonagens de DNA de um grande número de isolados. A utilização dessas técnicas tem permitido a realização de estudos de variabilidade genética, epidemiologia, além de fornecer suporte a programas de melhoramento genético de espécies cultivadas.

As vantagens do uso de RCA estão relacionadas à simplicidade de uso da técnica, detecção de todos os componentes infecciosos de DNA circular e possibilidade de sequenciamento direto do produto amplificado (HAIBLE et al., 2006).

2.2.4 Transmissão natural dos Begomovírus

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

Trata-se de um inseto cosmopolita, cujo centro de origem supõe-se ser o Oriente ou o Paquistão, tendo sido introduzida na Europa, África e Américas, pelo homem, através de material vegetal (BROWN; BIRD 1992). Atualmente, é encontrada geralmente nos trópicos e subtropicais e em todos os continentes (FRANÇA et al. 2000), e sua distribuição está estreitamente relacionada a fatores como: expansão da monocultura da maioria das espécies cultivadas; condições dos sistemas agrícolas modernos; aumento da utilização de agrotóxicos; e, principalmente, grande facilidade em se adaptar aos diversos hospedeiros.

Figura 2 – *Bemisia tabaci*, fase adulta.



Fonte: <http://agroecologiamt.blogspot.com>

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

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

O biótipo Q é encontrado na Europa e Ásia (BOSCO et al., 2006). Esse biótipo é exótico no Brasil e representa uma ameaça devido à alta resistência aos inseticidas pyriproxyfen (HOROWITZ et al. 2003) e buprofezin, e reduzida suscetibilidade aos neonicotinóides, como imidacloprid, acetamiprid e thiumethoxam (HODGES, 2009), utilizados comumente no controle da *B. tabaci*. Na Bacia do Mediterrâneo, além dos biótipos B e Q, também foram observados os biótipos M, S e T (BOSCO et al., 2006). O biótipo S é restrito a plantas de *Ipomoea indica* e encontrado em Málaga na Espanha, enquanto que o

biótipo T foi encontrado em *Euphorbia characias*, na Sicília e outras regiões do sul da Itália. O biótipo M foi verificado em algodão, na Turquia (BOSCO et al., 2006).

No Brasil, o biótipo A de *B. tabaci* era predominante até 1990/1991, quando foi relatada a introdução do biótipo B, provavelmente via plantas ornamentais importadas dos Estados Unidos da América (FRANÇA et al., 1996; LOURENÇÃO; NAGAI, 1994). As fêmeas do biótipo B de *B. tabaci* possuem taxas maiores de oviposição, alta capacidade reprodutiva, baixa mortalidade em novos hospedeiros e uma gama de hospedeiros muito mais ampla em comparação com o biótipo A, incluindo o tomateiro e outras solanáceas. Essas características indicam uma grande capacidade de adaptação e elevada taxa de dispersão deste biótipo, que geralmente desloca populações do biótipo A tornando-se predominante nas áreas onde é introduzido (BEDFORD et al., 1994).

2.3 A cultura do tomate

O tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) é uma hortaliça originária da parte ocidental da América do Sul, que foi levada para a América Central por índios pré-históricos e para outras partes do mundo por viajantes europeus, no século XV. Sendo levado até o México, foi cultivado e melhorado (COLARICCIO, 2004).

O tomateiro pertence ao gênero *Solanum* (antigo gênero *Lycopersicon*), e é membro da família Solanaceae. As solanáceas apresentam distribuição mundial, exceto na Antártida, sendo que a maior diversidade de espécies ocorre nas Américas do Sul e Central (NATURAL HISTORY MUSEUM, 2009). O tomate (*Lycopersicon esculentum*) é uma hortaliça de elevada importância socioeconômica. Além de possuir propriedades alimentícias benéficas para a saúde humana, a cultura é reconhecida como poderosa fonte geradora de emprego e renda em todos os segmentos de sua cadeia produtiva (SILVA; GIORDANO, 2000).

Os maiores produtores de tomate são China, Estados Unidos da América, Turquia e Índia (AGRIANUAL, 2008) e o Brasil ocupa a 8ª posição no ranking de maiores produtores no mundo (FAO, 2010) com 65,7 mil hectares destinados a tomaticultura, sendo produzidas anualmente nessa área 4,2 milhões de toneladas de frutos. Aproximadamente 65% são destinados ao consumo in natura e 35% destinados a indústria. As regiões Centro-Oeste e Sudeste concentram os principais estados produtores (IBGE, 2011). Em 2006 foram produzidas 2.400 toneladas de tomate no estado Alagoas (PAM, 2006). O município de

Arapiraca apresenta atualmente uma área plantada de 20 hectares com as variedades IPA-6, Supera, CM-16 e TY, com uma produção de aproximadamente 37,12 ton/ha (SEAGRI, 2011).

Dada a importância da cultura tanto sob o ponto de vista econômico quanto social, pelo volume da produção e geração de empregos, diversas estratégias são aplicadas para que os problemas fitossanitários e fisiológicos sejam minimizados. No entanto, nenhuma estratégia de controle, quando usada isoladamente, tem demonstrado ser efetiva para doenças causadas por geminivírus. Assim, para o controle das doenças causadas por estes vírus geralmente recomenda-se o manejo integrado, que envolve o uso de plantas resistentes, eliminação de plantas hospedeiras do vírus e do vetor e o controle químico de *B. tabaci* (FARIA et al., 2000).

Inúmeras cultivares são encontradas no mercado e anualmente são lançados novos materiais com características diferenciadas nas plantas, tais como resistência a doenças e frutos com maior capacidade de conservação pós-colheita, chamados longa vida, ou considerados nutracêuticos (MAKISHIMA, 2005).

O cenário atual de variedades disponíveis no mercado mostra que em sua maioria estas variedades são principalmente portadores do gene *Ty-1*, que confere resistência ao *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), um begomovírus com genoma monossegmentado que não ocorre no Brasil. O TYLCV é o begomovírus mais agressivo em tomateiro em todas as regiões onde ocorre, daí a importância de se incorporar fontes de resistência a este vírus nas variedades e híbridos disponíveis no mercado brasileiro. Além disso, o gene *Ty-1* oferece tolerância aos vírus com genoma bissegmentado que são predominantes no Brasil. (SANTANA et al., 2001).

Zamir et al. (1994) descreveram o gene *Ty-1* a partir da espécie *S. chilense* localizado no cromossomo 6. A busca de novas fontes ou genes de resistência levou à descoberta e introgressão dos genes *Ty-2* e *Ty-3*, localizados nos cromossomos 11 e 6 das espécies silvestres *S. habrochaites* e *S. chilense*, respectivamente, e que, como o *Ty-1*, conferem resistência a diferentes isolados de TYLCV (HANSON et al., 2006; JI et al., 2007). Mais recentemente já foram descritos os genes de resistência *Ty-4* e *Ty-5* identificados no cromossomo 3 e 4 das espécies *S. chilense* e *S. peruvianum*, pelos autores Ji et al. (2009) e Anbinder et al (2009), respectivamente.

A procura e caracterização de genes de resistência descritos em outras partes do mundo, principalmente ao TYLCV, podem contribuir para um melhor controle de begomovirose no campo nas condições atuais do Brasil. A introdução de novos materiais ou a procura dentre os materiais conservados nos bancos de germoplasma brasileiros, podem

também ajudar nos programas de melhoramento visando obter novos genótipos resistentes a begomovírus (AGUILERA, 2011).

Em Alagoas, o cultivo de hortaliças tem se concentrado na cidade de Arapiraca e municípios circunvizinhos e se mostrou uma opção para substituir a cultura do fumo, se consolidando como ótima oportunidade para geração de renda, principalmente para pequenos agricultores. Apesar de ser considerada ainda uma área recente, em 2006 foram produzidas 2.400 toneladas de tomate no estado (PAM, 2006). O município de Arapiraca apresenta atualmente uma área plantada de 20 hectares, com uma produção de aproximadamente 37,12 ton/ha (SEAGRI, 2011).

Os problemas fitossanitários interferem muito na produção de tomate, pois as doenças são as principais responsáveis pela perda da qualidade do produto final. As viroses são relatadas como um dos problemas que atinge diretamente a qualidade dos frutos na cultura causando perdas severas na produção, sendo por isso caracterizadas como uma das adversidades mais difíceis de ser afrontada pelos produtores devido à dificuldade de controle e às práticas agrícolas empregadas na cultura (COLARICCIO, 2004).

2.4 Begomovírus relatados em tomateiro

Dentre as viroses que podem ser consideradas como limitantes à produção de tomate destacam-se as causadas por espécies dos gêneros *Begomovirus* e *Tospovirus* (KUROSZAWA; PAVAN, 2005). Muitas vezes a begomovirose foi apontada como limitante para a produção de tomate em várias áreas de cultivo (BEZERRA et al., 1996; FARIA et al., 2000).

O primeiro relato de begomovírus em tomateiro no Brasil foi feito na década de 1970 (COSTA et al., 1975). O vírus foi caracterizado e denominado *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). Além do *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), cinco outros vírus transmitidos por mosca-branca foram identificados, porém sem causar danos de importância econômica (MATYIS et al., 1975). Isso provavelmente ocorria porque o biótipo A de *B. tabaci*, o único presente no país naquela época, colonizava o tomateiro com baixa eficiência (BEDFORD et al., 1994).

Nas últimas duas décadas o número de espécies relatadas vem aumentando significativamente em diversas regiões do país. Em 1998, Ribeiro et al. relataram a ocorrência de pelo menos seis espécies novas em plantas exibindo sintomas de mosaico amarelo, severa

deformação foliar e epinastia. A análise de sequência de nucleotídeos de um segmento do genoma de isolados coletados entre 1994 e 1999 demonstrou a existência de possíveis sete novas espécies no Brasil (RIBEIRO et al., 2003).

O surgimento deste complexo de espécies de begomovírus em tomateiro no Brasil coincidiu com a introdução e disseminação do biótipo B de *B. tabaci* (AMBROZEVICIUS et al., 2002; RIBEIRO et al., 2003).

Dados mais recentes apontam que no Brasil já foram identificadas 17 espécies de begomovírus em tomateiro, seis dessas já foram aceitas como espécies definitivas de acordo com o ICTV e as outras onze esperam por definição taxonômica. Cinco espécies já foram estudadas e caracterizadas: *Tomato rugose mosaic virus* (FERNANDES et al. 2006), *Tomato chlorotic mottle virus* (RIBEIRO et al. 2007), *Tomato yellow spot virus* (CALEGARIO et al. 2007), *Tomato yellow vein streak virus* (ALBUQUERQUE et al. 2010) e *Tomato severe rugose virus* (BARBOSA et al. 2011, aceito para publicação). Três espécies são consideradas como predominantes no país: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato Golden vein virus* (TGVV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV) (FERNANDES et al. 2008).

Outras espécies prováveis, com base em sequências de genomas parciais, são o *Tomato chlorotic vein virus*, *Tomato crinkle yellow leaf virus*, *Tomato crinkle virus*, *Tomato dwarf leaf curl virus*, *Tomato infectious yellows virus* e *Tomato severe mosaic virus* (FAUQUET et al., 2008). Algumas dessas espécies encontram-se amplamente distribuídas pelo país, enquanto outras estão restritas a certas regiões.

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

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta de material vegetal e obtenção de isolados virais

Os isolados de begomovírus utilizados neste estudo foram obtidos de 23 amostras de tecido foliar de tomateiro coletadas em 2010, em quatro áreas diferentes do município de Arapiraca, principal região produtora do estado de Alagoas. Foram coletadas amostras apresentando sintomas típicos de infecção por begomovírus, com redução de crescimento, distorção foliar, mosaico e amarelecimento de nervura (Figura 3).

Figura 3 – Plantas de tomate apresentando sintomas típicos de infecção por begomovírus.



Fonte: Autora, 2012.

As amostras foram submetidas à extração de DNA total de acordo com o protocolo de Dellaporta et al. (1983). Discos foliares das amostras coletadas (1 cm^2) foram colocados, individualmente, em tubos de microcentrifuga com capacidade de $1500\text{ }\mu\text{L}$ e macerados com $500\text{ }\mu\text{L}$ de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 500 mM NaCl; 10 mM β -mercaptoetanol). Adicionou-se $33\text{ }\mu\text{L}$ de SDS 20% em seguida as amostras foram incubadas em banho-maria a $65\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos. Após o banho-maria foi adicionado $160\text{ }\mu\text{L}$ de acetato de potássio 5 M às amostras e agitou-se por 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação, transferiu-se $550\text{ }\mu\text{L}$ do sobrenadante para tubos novos, o qual foi adicionado 1 volume de isopropanol gelado, para precipitação do DNA. Logo após, retirou-se cuidadosamente o sobrenadante sem remover o “pellet” lavando-se com $500\text{ }\mu\text{L}$ de etanol 70%, centrifugado a 7.500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, todo o sobrenadante foi descartado e as amostras foram secas em estufa por 15 minutos a 37°C . Após a secagem, o “pellet” foi ressuspensionado em $100\text{ }\mu\text{L}$ de tampão TE. O DNA foi armazenado em freezer ($-20\text{ }^\circ\text{C}$). Para quantificação do DNA, foram

utilizados 2 µL do DNA total em gel de agarose 0,8% em TAE 1X, submetido a eletroforese a 70 Volts por 30 minutos. Posteriormente o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e as bandas visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta. A concentração de DNA das amostras foi estimada mediante comparações com soluções de DNA do fago lâmbda com concentrações conhecidas (2,5ng/µl, 5,0 ng/µl, 10 ng/µl e 50 ng/µl).

3.2 Teste de detecção por PCR

Para confirmação da presença de begomovírus nas amostras coletadas, o DNA obtido foi usado como molde em reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores “universais” PAL1v1978 e PAR1c496, que amplificam fragmentos com aproximadamente 1,2 Kb do DNA-A dos begomovírus, descritos na tabela 1 (ROJAS et al., 1993).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de fragmentos do componente A do genoma viral.

Oligonucleotídeo	Sequência (5'→3')	Tamanho do fragmento
PAL1v1978	GCATCTGCAGGCCCACTYGTCTTYCCNGT	1,2 Kb
PAR1c496	AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG	

Nota: Os oligonucleotídeos nas posições degeneradas são representados por uma única letra do código da ambiguidade da IUPAC: R = A, G; W = A, T; K = G, T; Y = C, T; e N = A, C, G, T.

Fonte: Adaptado de Luz (2003).

Os oligonucleotídeos PAL1v1978/PAR1c496 direcionam a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1,2 kb do DNA-A, compreendendo a região comum e as extremidades amino-terminal dos genes *Rep* e *Cp*.

A PCR foi realizada em um volume de 15 µL, contendo tampão 10X (10 mM Tris-HCl pH 8,3 e 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, mistura de dNTP's a 0,2 mM (cada), 10 ng de cada oligonucleotídeo, 30 ng de DNA, 1 unidade de *Taq* polimerase e água ultrapura estéril em volume suficiente para atingir volume final de 30 µL. O controle positivo consistiu em

plasmídeo contendo fragmentos do DNA-A do genoma do TGMV, caracterizado por Mello (2002). No controle negativo, adicionou-se água ultrapura ao invés do DNA molde. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf® modelo Mastercycler personal com incubação inicial de 95°C por dois minutos, seguido por 30 ciclos consecutivos de 95°C por um minuto para desnaturação, 52°C por um minuto para anelamento e extensão a 72°C por um minuto e meio, seguido de uma extensão final a 72° por cinco minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2% em TAE 1X, corado com brometo de etídeo e as bandas visualizadas em luz ultravioleta (UV).

3.3 Sequenciamento parcial e análise filogenética dos isolados virais

Os produtos de PCR correspondentes aos 23 isolados de begomovírus obtidos de tomateiro foram purificados com o kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), visualizados em gel de agarose 1,2% e sequenciados pela empresa Macrogen Inc., localizada em Seoul, Coréia do Sul.

Para obtenção do relacionamento filogenético entre os isolados virais provenientes de Arapiraca e outros begomovírus brasileiros (Tabela 2), sequências nucleotídicas foram inicialmente alinhadas com a ferramenta MUSCLE no programa MEGA versão 5.0. Com esse mesmo programa foi construída uma árvore filogenética utilizando o método Neighbor Joining, com bootstrap de 2000 repetições.

3.4 Amplificação por RCA e clivagens com enzimas de restrição

Amostras representativas dos diferentes grupos formados após a construção da árvore filogenética obtida com o sequenciamento parcial dos isolados foram selecionadas e submetidas à amplificação do DNA viral utilizando-se a enzima DNA polimerase do bacteriófago phi29 de acordo com o método descrito por Inoue-Nagata et al. (2004). Para cada alíquota das amplificações foram realizadas clivagens com enzimas de restrição, individualmente. As enzimas utilizadas foram *Bam*HI, *Cla*I, *Eco*RV, *Hin*fI, *Apa*I e *Hind*III.

Tabela 2. Begomovírus utilizados nas análises filogenéticas.

(continua)

Vírus	Acrônimo	Nº de Acesso GenBank
Begomovirus brasileiros		
<i>Abutilon Brazil vírus</i>	AbBV	NC014138
<i>Bean golden mosaic vírus</i>	BGMV	NC004042/ M88686
<i>Blainvillea yellow spot vírus</i>	BIYSV	EU710756
<i>Cleome leaf crumple vírus</i>	CLCrV	FN435999
<i>Centrosema yellow spot vírus</i>	CenYSV	JN419002
<i>Euphorbia yellow mosaic vírus</i>	EuYMV	NC012553/ FJ619507
<i>Macrotidium yellow net vírus</i>	MaYNV	JN418998
<i>Macrotidium yellow spot vírus</i>	MaYSV	JN419005
<i>Macrotidium yellow vein vírus</i>	MaYVV	JN419021
<i>Nicandra deforming necrosis vírus</i>	NDNV	n.d
<i>Okra mottle vírus</i>	OMoV	NC011181
<i>Passionfruit severe leaf distortion virus</i>	PSLDV	NC012786
<i>Sida common mosaic vírus</i>	SiCmMV	EU710751
<i>Sida mosaic Brazil vírus</i>	SiMBV	FN436001
<i>Sida micrantha mosaic vírus</i>	SiMMV	NC005330
<i>Sida mottle vírus</i>	SiMoV	NC004637/ AY090555
<i>Sida mottle Alagoas virus</i>	SiMoAV	n.d
<i>Sida yellow blotch virus</i>	SiYBV	n.d
<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	SiYLCV	EU710750
<i>Sida yellow mosaic vírus</i>	SiYMV	NC004639/ AY090558
<i>Sida yellow mosaic Alagoas virus</i>	SiYMAV	n.d.
<i>Sida yellow net virus</i>	SiYNV	n.d.
<i>Soybean blistering mosaic vírus</i>	SoBIMV	EF016486
<i>Tomato chlorotic mottle vírus</i>	ToCMoV	NC003664/ AF490004
<i>Tomato common mosaic vírus</i>	ToCmMV	NC010835/ EU710754
<i>Tomato golden mosaic vírus</i>	TGMV	NC001507/ K02029
<i>Tomato golden vein vírus</i>	TGVV	JF803254

Tabela 2. Begomovírus usados nas análises filogenéticas.

(conclusão)

Vírus	Acrônimo	Nº de Acesso GenBank
<i>Tomato mild mosaic vírus</i>	ToMlMV	EU710752
<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	TMoLCV	JF803250
<i>Tomato leaf curl vírus</i>	ToLCV	JF803252
<i>Tomato leaf distortion vírus</i>	ToLDV	EU710749
<i>Tomato rugose mosaic vírus</i>	ToRMV	NC002555/ AF291705
<i>Tomato severe rugose vírus</i>	ToSRV	NC009607/ DQ207749
<i>Tomato yellow spot vírus</i>	ToYSV	N007726/ DQ336350
<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	ToYVSV	NC010949/ EF417915
Outgroup		
<i>Maize streak virus</i>	MSV	NC001346
<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i>	TLCNDV	U15015

Nota: n.d – Não disponível.**Fonte:** Autora, 2012.

3.5 Clonagem e sequenciamento dos genomas virais

Os produtos das reações de clivagem com enzimas de restrição foram analisados em gel de agarose a 0,7% corado com brometo de etídeo (5 µg/mL) e visualizado sob luz UV. Alíquotas das reações de clivagem contendo fragmentos de aproximadamente 2600 nucleotídeos, correspondente a uma cópia de cada componente genômico, foram utilizadas para ligação ao vetor pBluescript KS+ (Stratagene) previamente linearizado com a mesma enzima e defosforilado. O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação de células ultracompetentes de *Escherichia coli* estirpe DH5α pelo método de choque térmico. Colônias contendo os possíveis plasmídeos recombinantes foram repicadas para meio LB líquido contendo ampicilina e incubadas a 37° C sob agitação orbital de 250 rpm durante 12h. Após incubação, as culturas foram submetidas à extração de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina (SAMBROOK et al., 2001). O DNA obtido foi submetido à clivagem com a mesma enzima utilizada para a clonagem, e o padrão eletroforético observado em gel de agarose a 0,7% utilizado para confirmação da clonagem.

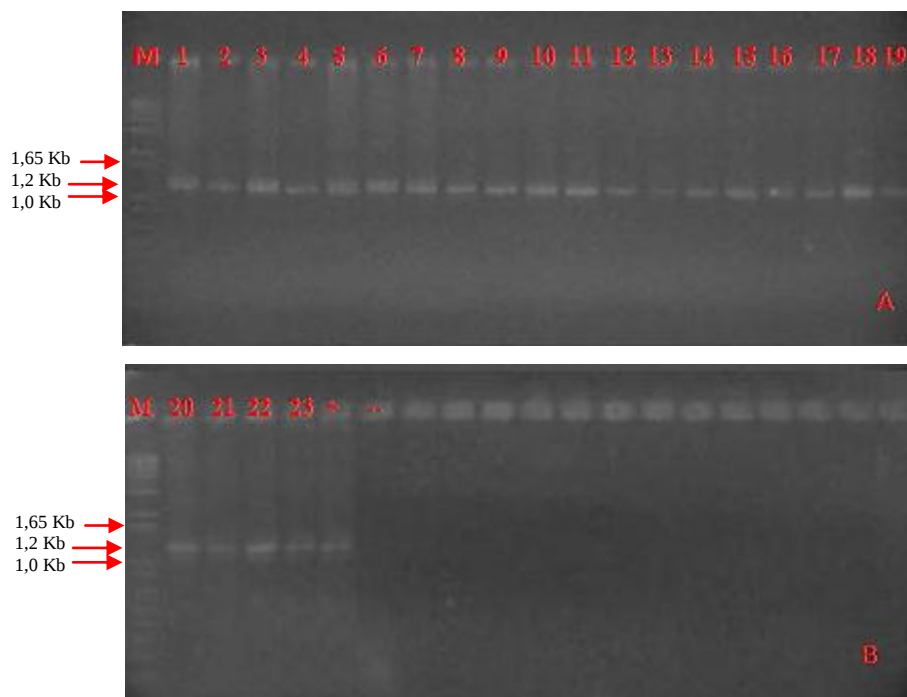
Amostras onde a clonagem foi confirmada foram submetidas a uma digestão com a enzima *Hae*III (enzima de corte frequente), e o padrão eletroforético utilizado para seleção dos clones a serem completamente sequenciadas pela empresa Macrogen, Inc. A primeira rodada de sequenciamento foi realizada com os oligonucleotídeos M13 *Forward* e *Reverse*. Os clones foram classificados como DNA-A e DNA-B por meio do sequenciamento parcial da Macrogen, mas apenas os clones referentes ao DNA-A foram usados para o sequenciamento do genoma completo a partir da confecção de oligonucleotídeos internos. As sequências foram montadas utilizando-se o programa DNAMAN versão 6 (Lynnon Biosoft Corporation) e analisadas com o algoritmo BLASTn para identificação das espécies virais com maior porcentagem de identidade

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Detecção de geminivírus por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR)

Foi detectada a presença de begomovírus nas 23 amostras de DNA, provenientes de plantas de tomate do município de Arapiraca no estado de Alagoas (Figura 4).

Figura 4 – Produtos de PCR amplificados a partir do DNA-A de begomovírus de plantas de tomate. M = Marcador de peso molecular (1 kb DNA Plus Ladder); 1-23 = Produtos de PCR amplificados a partir da DNA-A de plantas de tomate. Controle positivo (+) e controle negativo (–).



Fonte: Autora, 2012.

O par de oligonucleotídeos PAL1v1978/PAR1c496 direcionou a amplificação de um fragmento com aproximadamente 1,2 kb, a partir do DNA-A (Figura 4). Esse resultado confirma que geminivírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* (STANLEY et al., 2005; FAUQUET et al., 2008) estavam infectando as plantas de tomateiro.

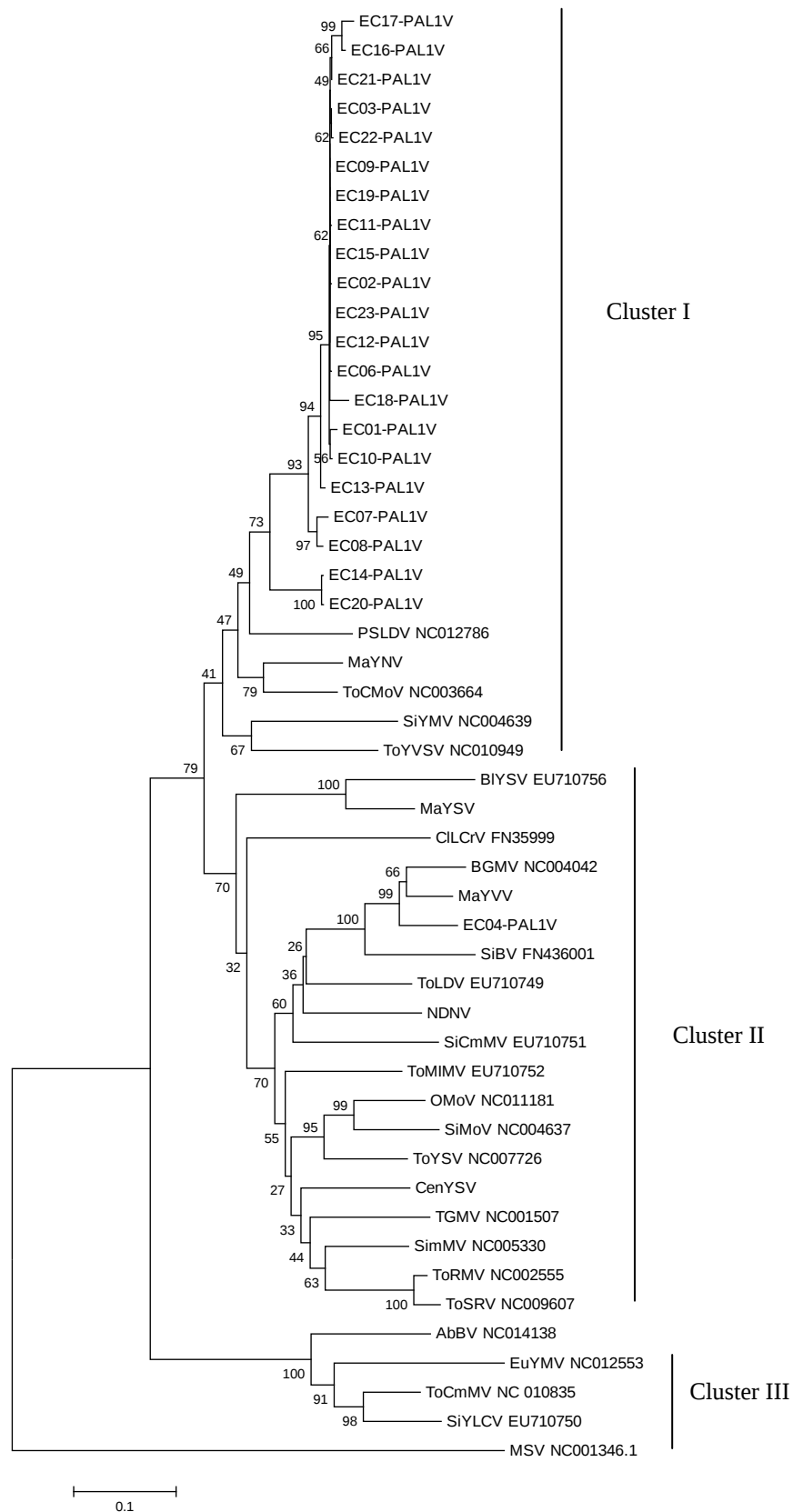
4.2 Sequenciamento parcial e análise filogenética dos isolados virais

Os produtos de PCR correspondentes as 23 amostras de begomovírus isolados de tomateiro no município de Arapiraca, foram sequenciados no sentido viral e complementar. As sequências escolhidas para caracterização molecular dos vírus foram aquelas obtidas com o primer PAL1v1978.

Com exceção EC05, as amostras apresentaram sequenciamento de boa qualidade, e as sequências abrangeram o tamanho entre 1102 a 1187 nucleotídeos. A comparação inicial das sequências com a ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) indicou que 21 amostras (EC01, EC02, EC03, EC06 – EC23) estavam mais relacionadas com o begomovírus *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV) [AY049212], proveniente do município de Juazeiro, na Bahia. A amostra EC04, apresentou maior identidade com o begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) [M88686.1], obtido de feijoeiro (FARIA; MAXWELL, 1999). No entanto a porcentagem de cobertura (menor de 100%) e identidade entre as sequências foram baixas (84-91%) na maioria dos casos. Esse resultado sugere que ao menos duas espécies distintas de begomovírus estão infectando tomateiro no município de Arapiraca.

Uma árvore filogenética baseada na sequência parcial de nucleotídeos do DNA-A dos begomovírus provenientes do tomateiro e outros begomovírus brasileiros confirmaram os resultados observados nas análises preliminares utilizando a ferramenta BLAST. Os vinte e dois begomovírus que infectam tomate agruparam em dois diferentes grupos. (Figura 5). Os isolados EC01, EC02, EC03, EC06 ao EC23, representam uma nova espécie que está mais proximamente relacionada com *Passionfruit severe leaf distortion virus* (PSLDV) [NC012786], um begomovírus que infecta maracujazeiro no Brasil. Outra nova espécie, representada pela amostra EC04, se encontra no Cluster II, agrupando com begomovírus que infectam plantas principalmente da família Fabaceae, os quais foram obtidos de feijoeiro (BGMV), ou de plantas invasoras (*Macroptilium* sp.).

Figura 5 - Árvore Neighbor-joining baseada na sequência parcial e nucleotídeos do DNA-A de begomovírus que infectam tomateiro (Arapiraca – AL) e outros begomovírus brasileiros.



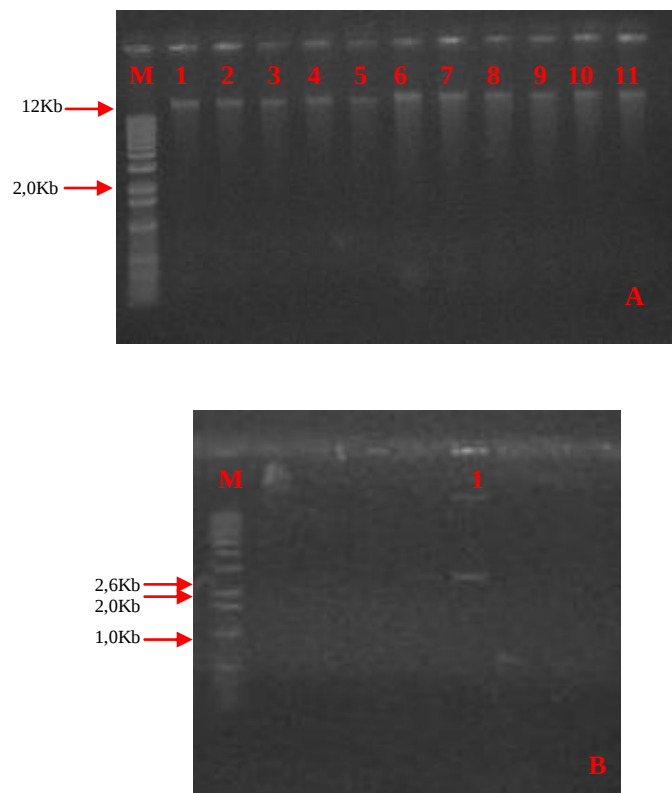
Fonte: Autora, 2012.

4.3 Sequenciamento do genoma completo e análises filogenéticas

A partir dos resultados obtidos com o sequenciamento parcial do genoma dos begomovírus provenientes das amostras de tomateiro, foram selecionados cinco isolados para sequenciamento do genoma completo. EC01, EC02, EC08 e E21 representam a provável nova espécie que agrupou com PSLDV e EC04 mais relacionado com begomovírus que infectam Fabaceae.

O DNA viral foi amplificado via RCA resultando em fragmento de tamanho superior a 12.000 nucleotídeos, correspondente a um multímero linear contendo várias cópias do genoma viral (concatâmero) (Figura 6A). Os produtos do RCA foram clivados e apenas as enzimas de restrição *ApaI* e *HindIII*, produziram fragmentos de aproximadamente 2.600 nt, correspondentes a uma cópia dos componentes genômicos virais, DNA-A ou DNA-B (Figura 6B).

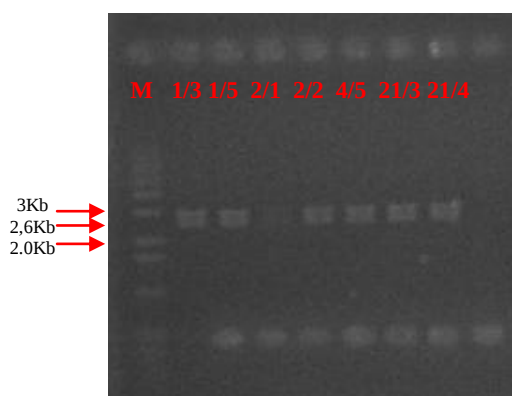
Figura 6 – **A** - Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) de amplicons obtidos a partir de amostras de DNA total amplificado via RCA. **B** - Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) de amplicons obtidos a partir de amostras de DNA total submetidos à clivagem com enzima de restrição. M = Marcador de peso molecular (1 kb DNA Plus Ladder); Enzima *ApaI*.



Fonte: Autora, 2012.

Os fragmentos de aproximadamente 2600 nt foram clonados no vetor pKS+ (Figura 7). Nove clones (EC01-3, EC01-5, EC02-1, EC02-2, EC04-5, EC08-1, EC08-2, EC21-3 e EC21-4) foram selecionados para o sequenciamento inicial com os oligonucleotídeos M13 Forward e Reverse. No entanto, os isolados EC01-3, EC02-2, EC08-2 e EC21-3 apresentaram sequências de baixa qualidade, sendo excluídos das análises. As sequências nucleotídicas dos demais isolados foram submetidas ao algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificação preliminar das espécies. A análise inicial das sequências revelou a presença de duas possíveis espécies de begomovírus (Tabela 4).

Figura 7. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) da clivagem de DNA plasmidial proveniente da clonagem de componentes genômicos, com as enzimas *ApaI* e *HindIII*. M = Marcador de peso molecular (1 kb DNA Plus Ladder).



Fonte: Autora, 2012.

O genoma completo de todos os isolados virais foi completamente sequenciado, apresentando 100% de cobertura (Tabela 4). Os clones BR:Ara1:10A (EC01-5), BR:Ara4:10A (EC04-5), BR:Ara8:10A (EC08-1) e BR:Ara21:10A (EC21-4), corresponderam a espécie Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV) (Albuquerque et al., 2012) e o clone BR:Ara2:10A (EC02-1) correspondeu a espécie *Bean golden mosaic virus* (BGMV) (WYANT et al., 2012). Esses dados diferem dos resultados do sequenciamento parcial via PCR obtidos por Correia (2011) para esse mesmo conjunto de isolados. Esta divergência reafirma a necessidade e importância do sequenciamento completo dos isolados para a correta identificação das espécies.

Os oligonucleotídeos internos utilizados no sequenciamento completo desses isolados estão indicados na Tabela 3. Sequências obtidas a partir desses oligonucleotídeos, foram montadas utilizando o programa DNAMAN versão 6 e posteriormente submetidas ao algoritmo BLAST para determinação das espécies.

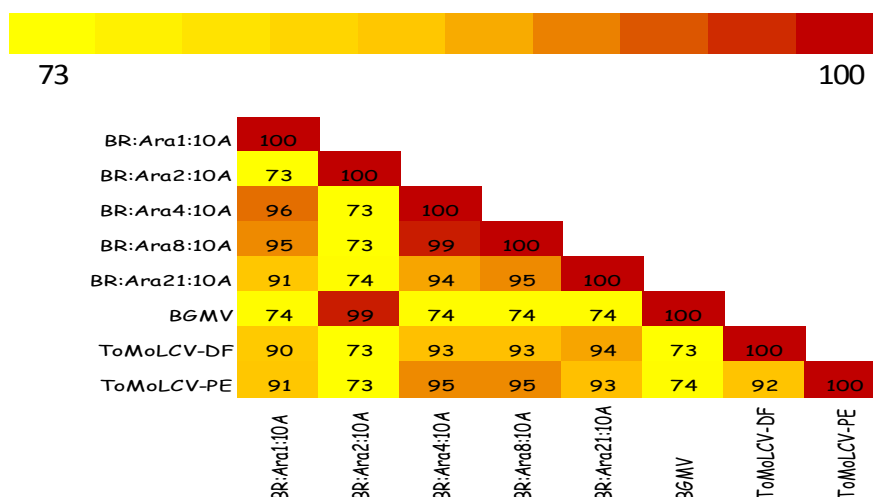
Tabela 3 – Oligonucleotídeos internos utilizados para sequenciamento dos componentes genômicos de begomovírus.

Oligonucleotídeo	Clones
PM01 – 5' GACGGCAGATCAGCTAGAGG 3'	EC01
PM02 – 5' GGCCTTCACAACCTCTAGGA 3'	EC02
PM03 – 5' CGTTCCTCCGTATGGTTCTCG 3'	EC04
PM04 – 5' GAGCACGTGGAGATGAGGTT 3'	EC04
PM05 – 5' CTCAGGAGAGCGTTGGATCT 3'	EC21
PM06 – 5' GAGCACGTGGAGATGAGGTT 3'	EC08
PM07 – 5' ACAACCTGAGGAGAGCGTTG 3'	EC08

Fonte: Autora, 2012.

Também foram realizadas comparações das sequências nucleotídicas dos isolados entre si e com as espécies de begomovírus mais relacionadas (Figura 8).

Figura 8. Porcentagem de identidade entre os cinco clones isolados de plantas de tomate e entre as espécies mais relacionadas (DNAMAN 6).



Fonte: Autora, 2012.

O sequenciamento do clone BR:Ara1:10A gerou uma sequência de 2631 nucleotídeos a qual correspondeu a 100% do genoma viral. A comparação inicial das sequências com outros begomovírus depositados no GenBank utilizando o BLAST revelou que este isolado

compartilhou maior identidade nucleotídica (91%) com o DNA-A do isolado de TMoLCV de Bezerros-PE [JF803251] (Tabela 4).

As sequências completas do DNA-A dos clones BR:Ara4:10A e BR:Ara8:10A (2631 nt) apresentaram 94% de identidade nucleotídica com o isolado de Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV) [JF803251] obtido de tomateiro proveniente de Bezerros no estado de Pernambuco (Tabela 4), correspondendo ao mesmo isolado.

A partir do isolado EC21 (BR:Ara21:10A) foram sequenciados 2631 nt que correspondem a 100% do genoma viral. Este isolado apresentou 93% de identidade com o TMoLCV (Turvânia-DF) [JF803249] (Tabela 4).

O clone BR:Ara2:10A teve 100% do seu genoma sequenciado (2616 nucleotídeos). Este isolado foi mais relacionado (99% de identidade) com o *Bean golden mosaic virus* (Rio Largo-AL) [JF694450] isolado de *Phaseolus lunatus*.

Tabela 4. Comparação preliminar das sequências obtidas através do sequenciamento a partir dos clones dos isolados EC01, EC02, EC04, EC08 e EC21, utilizando a ferramenta BLAST.

ISOLADO	TAMANHO	IDENTIDADE	ORGANISMO	HOSPEDEIRO	LOCAL	NÚMERO DE ACESSO	REFERÊNCIAS
BR:Ara1:10A	2631 nt	100% de cobertura 91% de identidade	TMoLCV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bezerros - PE	JF803251	Albuquerque et al, 2012
BR:Ara2:10A	2616 nt	100% de cobertura 99% de identidade	BGMV	<i>Phaseolus lunatus</i>	Rio Largo - AL	JF694450	Wyant et al, 2012
BR:Ara4:10A	2631 nt	100% de cobertura 94% de identidade	TMoLCV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bezerros - PE	JF803251	Albuquerque et al, 2012
BR:Ara8:10A	2631 nt	100% de cobertura 94% de identidade	TMoLCV	<i>Solanum Lycopersicum</i>	Bezerros - PE	JF803251	Albuquerque et al, 2012
BR:Ara21:10A	2631 nt	100% de cobertura 93% de identidade	TMoLCV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Turvânia - DF	JF803249	Albuquerque et al, 2012

Fonte: Autora, 2012.

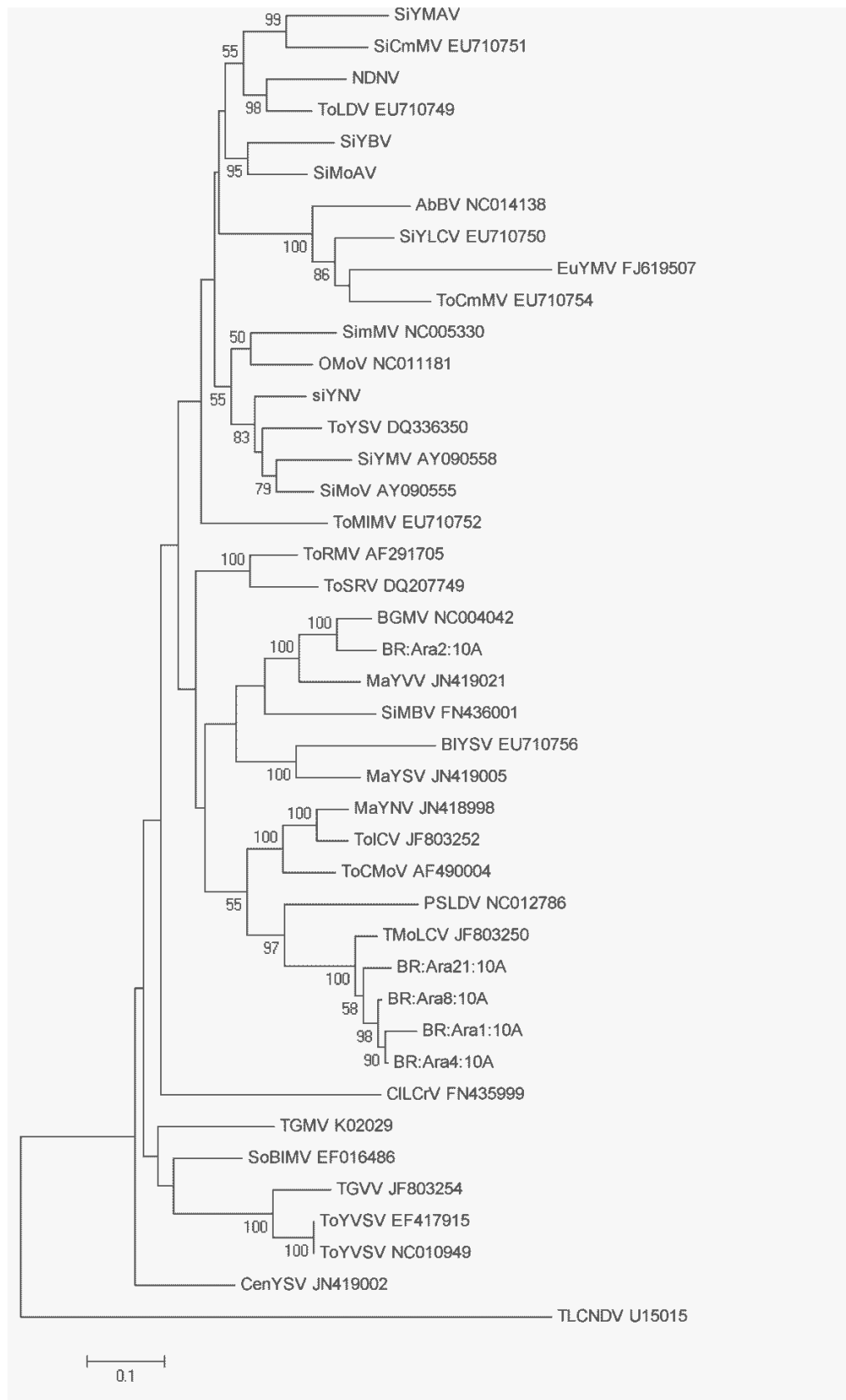
Uma árvore filogenética baseada na sequência completa do DNA-A de todas as espécies de begomovírus brasileiros foi construída usando o método Maximum-likelihood, com o modelo de substituição GTR+G4. Todos os clones foram agrupados em um ramo que inclui vírus que infectam feijão, tomate e plantas invasoras. Os clones BR:Ara1:10A, BR:Ara4:10A, BR:Ara8:10A e BR:Ara21:10A e o TMoLCV, formaram um ramo monofilético com 100% de confiabilidade e um outro ramo monofilético, com 100% de confiabilidade, agrupou o clone BR:Ara2:10A com o BGMV. Esses resultados confirmam aqueles obtidos através das análises par-a-par. (Figura 9).

A sequência completa do genoma do TMoLCV foi recentemente determinada (ALBUQUERQUE et al., 2012) e análises filogenéticas revelaram que os isolados pertencentes a esta espécie estão mais relacionados com o Passionfruit severe leaf distortion virus (PSLDV) [NC012786], um novo begomovírus que infecta maracujazeiro (FERREIRA et al., 2010).

Assim como no trabalho realizado por Albuquerque et al. (2012), o TMoLCV foi a espécie predominante neste estudo, sendo portanto a espécie que parece se apresentar como a mais comum em plantas de tomate nessa região. Entretanto, novas análises são necessárias para confirmar essa afirmação. De acordo com Albuquerque et al. (2012), existem dois diferentes grupos TMoLCV ocorrendo no Brasil, o grupo “TMoLCV-DF” (Distrito Federal) que engloba isolados pertencentes ao estado de Goiás e o grupo “TMoLCV-PE” inclui isolados oriundos dos estados da Bahia e Pernambuco. Análises de recombinação revelaram que os isolados do grupo “TMoLCV-DF” surgiram a partir de recombinação entre o “TMoLCV-PE” e o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV). (ALBUQUERQUE et al., 2012). Entretanto, BR:Ara:21:10A apresenta-se mais relacionado com TMoLCV-DF, não confirmando a hipótese de separação geográficas dos isolados.

O clone BR:Ara2:10A, apresentou-se agrupado com o BGMV. Este resultado foi inesperado devido ao fato do BGMV ser um begomovírus que possui uma restrita gama de hospedeiros, confinada quase que, exclusivamente, a espécies da família das leguminosas (MOREIRA; GASPAR, 2002). Ainda não há relatos desse vírus infectando tomateiro. Entretanto, a alta identidade das sequências (99%) deste clone, não elimina a hipótese de contaminação. Estudos adicionais, como a construção de um clone infeccioso, são necessários para demonstrar a infectividade do BGMV em plantas de tomate.

Figura 9. Árvore filogenética Maximum-likelihood baseada na sequência completa do DNA-A de begomovírus que infectam tomateiro (Arapiraca-AL) e outros begomovírus brasileiros.



Fonte: Autora, 2012.

Embora os primeiros relatos de doenças em tomateiro causadas presumivelmente por begomovírus ocorreram por volta de 1960 (FLORES, 1960), durante as duas últimas décadas, um diverso complexo de begomovírus emergiu como o principal problema na produção de tomate no Brasil (MORALES, 2006).

Acredita-se que a emergência dos begomovírus que infectam tomateiro no Brasil seja resultado da transferência horizontal de vírus nativos que infectam plantas silvestres ou invasoras pelo biótipo B da mosca-branca. Uma vez presentes no novo hospedeiro, esses vírus evoluem rapidamente via recombinação ou pseudo-recombinação, dando origem às espécies atualmente detectadas no campo. (CASTILLO-URQUIZA et al., 2008).

A presença de diversas espécies no campo, todas transmitidas pelo mesmo inseto vetor, torna comum a ocorrência de infecções mistas, com dois ou mais vírus presentes simultaneamente na mesma planta, aumentando a probabilidade da ocorrência de eventos de recombinação ou pseudo-recombinação, o que pode levar ao surgimento de espécies melhor adaptadas ao hospedeiro (PITA et al., 2001; MONCI et al., 2002; ANDRADE et al., 2006a; INOUE-NAGATA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2007).

Apesar do grande número de begomovírus descritos causar doenças em tomateiro no Brasil, pouco se conhece sobre as espécies que ocorrem no estado de Alagoas. Nesse estudo, foi revelado que TMoLCV é a espécie que prevalece no município de Arapiraca. Levantamentos realizados para acessar a diversidade de begomovírus em tomateiro indicam que determinadas espécies tornaram-se prevalentes em diferentes regiões do país (CASTILLO-URQUIZA et al., 2007; COTRIM et al., 2007; CASTILLO-URQUIZA, 2008; FERNANDES et al., 2008). De acordo com Fernandes et al. (2008), as três espécies mais prevalentes e economicamente importantes de begomovírus de tomateiro no Brasil são ToSRV, TGVV e TMoLCV.

Este trabalho constitui o primeiro relato de infecção de solanáceas pelo BGMV no Brasil. Apesar da restrita gama de hospedeiros, o BGMV causa graves perdas a estas culturas de interesse econômico como o feijoeiro comum e a soja (MOREIRA; GASPAR, 2002), podendo atingir também espécies como chicharro, trevo, ervilha, acácia preta, gladiolo e abóbora amarela (AGRIOS, 2005). A ausência de relatos envolvendo infecção de tomateiro por BGMV reforça a importância da realização de novos testes para confirmação destes resultados.

5 CONCLUSÕES

- A presença de begomovírus em 100% das amostras de tomateiro demonstra que esses vírus estão amplamente distribuídos no município de Arapiraca-AL;
- Duas espécies foram encontradas infectando *Solanum lycopersicon*: o Tomato mottle leaf curl virus e *Bean golden mosaic virus*;
- Dentre as amostras coletadas, o Tomato mottle leaf curl virus é espécie predominante de begomovírus no município de Arapiraca – AL;
- Este é o primeiro relato de *Bean golden mosaic virus* infectando plantas de tomate no estado de Alagoas;
- Estudos adicionais são necessários para demonstrar a infectividade do BGMV em tomateiro.
- O cultivo de tomate em Arapiraca tem se baseado amplamente na utilização de cultivares tolerantes a begomovírus. Portanto é importante realizar estudos adicionais sobre os begomovírus que ocorrem nessa cultura como forma de determinar o potencial do surgimento de espécies que irão levar a quebra dessa resistência.

REFERÊNCIAS

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

AGRIOS, G. N. **Fitopatologia**. 2^a. Edição. Ed. Limusa. México, 2005

AGUILERA, Jorge González, D.Sc., **Caracterização de subamostras de tomateiro do BGH-UFV, quanto à resistência a begomovírus e análise da população viral em condições de campo**. Orientador: Derly José Henriques da Silva. Co-orientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Francisco Murilo Zerbini Júnior. Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2011. (Tese de Doutorado).

ALBUQUERQUE, L.C. et al. Characterization of tomato yellow vein streak virus, a begomovirus from Brazil. **Virus genes**. 40: 140-147, 2010.

ALBUQUERQUE, L.C. et al. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v. 157, 2012. p. 747-752.

AMBROZEVICIUS, L.P. et al. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, v. 27, n. 4, 2002. p. 372-377.

ANBINDER, I. et al. Molecular dissection of *Tomato leaf curl virus* resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. **TAG Theoretical and Applied Genetics** 119:519-530. 2009.

ANDRADE, E.C. et al. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. **Journal of General Virology**, London, v. 87, 2006a. p. 3687-3696.

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

ASCENCIO-IBÁÑEZ, J.T. et al. Los Geminivirus. **Revista Mexicana de Fitopatologia**, v. 17, n. 2, 2000. p. 113-125.

BARBOSA, J.C.; TEIXEIRA, L.D.D.; REZENDE, J.A.M. First report on the susceptibility of sweet pepper crops to tomato chlorosis virus in Brazil. **Plant Disease** 94: 374. 2010.

BARBOSA, J.C. et al. Characterization and experimental host range of a Brazilian tomato isolate of *Tomato severe rugose virus*. **Journal Phytopathol** 159: 644-646, 2011.

BEDFORD, I.D. et al. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 125, 1994. p. 311-325.

BEZERRA, I.C. et al. **Survey of geminivirus in tomato producing areas in Federal District**. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA. Resumo. São Lourenço: Sociedade Brasileira de Virologia, 1996. p. 286.

BOSCO, D. et al. PCR-RFLP identification of *Bemisia tabaci* biotypes in the Mediterranean Basin. **Phytoparasitica**, v. 34, n. 3, 2006. p. 243-251.

BRIDDON, R.W. et al. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, New York, v. 177, 1990. p. 85-94.

BRIDDON, R.W. et al. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. **Virology**, v. 219, 1996. p. 387-394.

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

BRIDDON, R.W.; STANLEY, J. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. **Virology**, New York, v. 344, 2006. p. 198-210.

BROWN, J.K.; BIRD, J. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. **Plant Disease** 76, 220-5, 1992.

BROWN, J.K.; FROHLICH, D.R.; ROSELL, R.C. The sweet potato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? **Ann. Rev. Entomol.** 40: 511-534. 1995.

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

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

CALEGARIO, R.F. et al. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 42, 2007. p. 1335-1343.

CARVALHO, C.M. et al. A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. **Plant Journal**, Oxford, v. 55, 2008. p. 869-880.

CASTILLO-URQUIZA, G.P. et al. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato in Paty do Alferes, Rio de Janeiro state, Brazil. **Virus Reviews and Research**, Belo Horizonte, v. 12, 2007. p. 233.

CASTILLO-URQUIZA, G.P. et al. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 153, 2008. p. 1985-1989.

COLARICCIO, A. **O impacto das viroses na cultura do tomateiro**. Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia – CPDSV – Instituto Biológico. Seminário de Atualização Cadeia Produtiva do Tomate. Mogi-Guaçu, São Paulo. 2004. Disponível em <http://www.feagri.unicamp.br/tomates/pdfs/impacviro.pdf>. Acesso em Maio de 2012.

CORREIA, E. C. S. S. **Caracterização molecular de begomovírus na cultura do tomateiro no município de Arapiraca-AL**. Universidade Federal de Alagoas, 2011. 48p. (Trabalho de Conclusão de Curso).

COSTA, A.S.; OLIVEIRA, A.R.; SILVA, D.M. Transmissão mecânica do mosaico dourado do tomateiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, v. 6, 1975. p. 147.

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

COTRIM, M.A. et al. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 33, 2007. p. 300-303.

DAVIES, J.W. et al. Structure and replication of geminivirus genomes. **Journal of Cell Science**, London, v. 7, 1987. p. 95-107.

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

DUFFY, S.; HOLMES, E.C. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus*. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, 2008. p. 957-965.

DUFFY, S.; HOLMES, E.C. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: Phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 90, 2009. p. 1539-1547.

EDGAR, R.C. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics** 5: 1-19. 2004.

FAO, 2010. [www.fao.org/waicent/portal/statistics_en.asp].

FARIA, J.C.; MAXWELL, D.P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, 1999. p. 262-268.

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

FARIA, J.C. et al. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, 2000. p. 125-137.

FAUQUET, C.M. et al. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. **Archives of Virology**, v. 148, 2003. p. 405-421.

FAUQUET, C.M. et al. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. **Archives of Virology**, New York, v. 153, 2008. p. 783-821.

FERNANDES, J.J. et al. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato infecting begomovirus from Brazil. **Plant Pathology**, v. 55, 2006. p. 513-522.

FERNANDES, F.R. et al. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, v. 36, 2008. p.251-258.

FERREIRA, S.S. et al. Characterization of passionfruit severe leaf distortion virus, a novel begomovirus infection passionfruit in Brazil, reveals a close relationship with tomato-infecting begomoviruses. **Plant Pathol** 59:221-230. 2010.

FLORES, E.; SILBERSCHIMDT, K. KRANER, M., Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. **Biológico**, 26:65-69. 1960.

FONTENELLE, M.R. et al. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus *Tomato chlorotic mottle virus*. **Virus Research**, Amsterdam, v. 126, 2007. p. 262-267.

FONTES, E.P.B.; LUCKOW, V.A.; HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, 1992. p. 597-608.

FONTES, E.P.B. et al. Geminivirus replication origins have a modular organization. **Plant Cell**, v. 6, 1994. p.405-416.

FONTES, E.P.B. et al. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, 1994. p. 8459-8465.

FRANÇA, F.H.; VILLAS BÔAS, G.L.; CASTELO-BRANCO, M. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera:Aleyrodidae) no Distrito Federal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, 1996. p. 369-372.

FRANÇA, F.H. et al. Manejo integrado de pragas. p. 112-127. In: SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B.; eds. Tomate para processamento industrial. EMBRAPA. **Comunicação para Transferência de Tecnologia/ EMBRAPA-CNPq**. 2000.

FROHLICH, D.R. et al. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. **Molecular Ecology**, v. 8, 1999. p.1683–1691.

GAFNI, Y.; EPEL, B.L. The role of host and viral proteins in intra and inter-cellular trafficking of geminiviruses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, 2002. p. 231-241.

GALVÃO, R.M. et al. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. **Journal of General Virology**, London, v. 84, 2003. p. 715-726.

GHANIM, M. et al.. Evidence for transovarial transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. **Virology**, v. 240, 1998. p. 295- 303.

GILBERTSON, R.L. et al. Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. **Journal of General Virology**, London, v. 74, 1993b. p. 23-31.

GILBERTSON, R.L. et al. Limitations on geminivirus genome size imposed by plasmodesmata and virus-encoded movement protein: Insights into DNA trafficking. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, 2003. p. 2578-2591.

GIORDANO L.B. et al. Efeito da infecção precoce por *Begomovirus* com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. **Horticultura Brasileira** 23, 815-818. 2005

GUTIERREZ, C. et al. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. **Veterinarian Microbiology**. 98: 111-119. 2004.

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

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

HANSON, P.M.; GREEN, S.K.; KUO, G. Ty-2, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. **Tomato Genetics Cooperative Report** 56: 17-18. 2006

HARRISON, B.D.; ROBINSON, D.J. Natural genomic and antigenic variation in white-fly transmitted geminiviruses (begomoviruses). **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, 1999. p. 369-398.

HEYRAUD-NITSCHKE, F. et al. Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, 1995. p. 910-916.

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

HÖFER, P. et al. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. **Virology**, New York, v. 236, 1997a. p. 288-295.

HOROWITZ, A. et al. Inheritance of pyriproxyfen in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Q biotype). **Archives Insect Biochemistry and Physiology**, v. 54, 2003. p. 177-186.

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

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

IBGE, 2011. **Levantamento Sistemático da Produção**. Disponível em: www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/Ispa/Ispa_201104.pdf. Acessado em 3 de Julho de 2011.

INOUE-NAGATA, A.K. et al. A simple method for cloning of the complete begomovirus using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, v.11, 2004. p.209-211.

INOUE-NAGATA, A.K. et al. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. **Brazilian Journal of Agricultural Research** 41, 2006. p. 1329-32.

JI, Y.; SCHUSTER, D.; SCOTT, T. *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. 2007.

JI, Y.; SCOTT, J.W.; SCHUSTER, D.J.; MAXWELL, D.P. 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. 2009.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, cap. 67, p.607-626.

LAUFS, J. et al. *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 of the United States of America**, Washington, v. 92, 1995. p. 3879-3883.

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

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

LUZ, D.F. **Natureza recombinante e propriedades patogênicas do DNA-A do begomovírus ToCMV-[MG-Bt1]**. Tese de Mestrado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2003. p.23.

MAKISHIMA, N.; DE MELO, W. F. O Rei das Hortaliças. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**. Especial Como cultivar. Embrapa hortaliças, Distrito Federal, p. 28-32. 29ª Ed. Dez/2004-Jan/2005. Disponível em http://www.grupocultivar.com.br/arquivos/hf29_rei.pdf. Acesso em Maio de 2012.

MANSOOR, S. et al. Geminivirus disease complexes: An emerging threat. **Trends in Plant Science** 8: 128-134. 2003.

MARIANO, A.C. et al. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. **Virology**, New York, v. 318, 2004. p. 24-31.

MATYIS, J.C. et al. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 1, 1975. p. 267-275.

MELLO, R.N. et al. Survey of begomoviruses associated with soybean and identification of *Sida mottle virus* (SiMoV) infecting this crop in Brazil. **Virus Reviews and Research**, Belo Horizonte, v. 7(Supplement), 2002. p. 157.

MONCI, F. et al. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. **Virology** 303, 317-26, 2002.

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

MORALES, F.J., History and current distribution of begomoviruses in Latin America. **Adv Virus Res**, 67:127-162, 2006.

MOREIRA, A. E.; GASPAR, J. O. Propriedades moleculares de um isolado brasileiro do southern bean mosaic virus. **Fitopatologia Brasileira** 27:292-297. 2002.

MORIN, S. et al. A Groel homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl. **Virology** 256:75-84. 1999.

NATURAL HISTORY MUSEUM, **Solanaceae Source**, disponível em: <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/solanaceaesource>. Acessado em 06/04/2009.

NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, Cambridge, v. 76, 1994. p. 925-932.

OROZCO, B.M. et al. Functional domains of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, 1997. p. 9840-9846.

OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN, L. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, 1998. p. 24448-24456.

PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, New York, v. 265, 1999b. p. 218-224.

PALMER, K.E.; RYBICKI, E.P. The molecular biology of mastreviruses. **Advances in Virus Research**, San Diego, v. 50, 1998. p. 183-234.

PAM - **Produção Agrícola Municipal: culturas temporárias e permanentes**, Rio de Janeiro, v. 31, 2006. p. 1-133. Disponível em (<http://www.ibge.gov.br>, acesso em janeiro de 2006).

PAPLOMATAS, E.J. et al. Molecular characterization of a new sap-transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. **Phytopathology**, v.84, 1994. p.1215-1224.

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

PITA, J.S. et al. Synergism of geminiviruses are determined Keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. **Jornal of General Virology**, 82, 2001. p. 655-65.

RAMOS, P.L. et al. Tomato mottle Taino virus pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the delimitation of cis- and trans-acting replication specificity determinants. **Archives of Virology**, New York, v. 148, 2003. p. 1697-1712.

RIBEIRO, S.G. et al. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease**, v.82, 1998. p.830.

RIBEIRO, S.G. et al. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 148, 2003. p. 281-295.

RIBEIRO, S.G. et al. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. **Phytopathology** 97: 702-711. 2007.

ROJAS, M.R. et al. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v.77, n. 4, 1993. p.340-347.

ROJAS, M.R. et al. Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. **Cell**, Cambridge, v. 95, 1998. p. 105-113.

ROJAS, M.R. et al. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, tomato yellow leaf curl virus. **Virology**, New York, v. 291, 2001. p. 110-125.

ROJAS, M.R. et al. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v.43, 2005b. p. 361-394.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning – A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 2001.

SANDERFOOT, A.A.; LAZAROWITZ, S.G. Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, 1995. p. 1185-1194.

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

SANTANA, F.M. et al. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. **Euphytica** 122: 45-51. 2001.

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

SEAGRI – SECRETARIA DE AGRICULTURA DE ARAPIRACA. **Levantamento agrícola da cultura do tomate**. Arapiraca, 2011.

SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B. **Tomate para o processamento industrial**. Brasília: EMBRAPA-HORTALIÇAS, 2000. 168p.

STANLEY, J. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggest strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. **Virology**, New York, v. 206, 1995. p. 707-712.

STANLEY, J. et al. *Geminiviridae*. In FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MMANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL L.A. (eds), **Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier/Academic Press, London, 2005. pp. 301-326.

STENGER, D.C. et al. Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: Evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, 1991. p. 8029-8033.

SUNG, Y.K.; COUTTS, R.H. Pseudorecombination and complementation between potato yellow mosaic geminivirus and tomato golden mosaic geminivirus. **Journal of General Virology**, London, v. 76, 1995. p. 2809-2815.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. et al. **Virus taxonomy**. Classification and nomenclature of viruses. In: REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES, v. 7, 2000, New York Report. New York: academic Press, 2000. 985 p.

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

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

WYANT, P. S. et al. Circular DNA genomics (circomics) exemplified for geminiviruses in bean crops and weeds of northeastern Brazil. **Virology** 427 (2), 2012. p. 151-157.

ZAMIR, D. et al. Mapping and introgression of a *Tomato yellow leaf curl virus* tolerance gene, *Ty-1*. TAG **Theoretical and Applied Genetics**, 88:141-146. 1994.