



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE BEGOMOVÍRUS EM
TOMATEIRO NO DISTRITO FEDERAL E GOIÁS

BRUNA PINHEIRO

ORIENTADOR: LUIZ EDUARDO BASSAY BLUM

CO-ORIENTADORA: ALICE KAZUKO INOUE NAGATA

Brasília, 08 de outubro de 2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE BEGOMOVÍRUS
EM TOMATEIRO NO DISTRITO FEDERAL
E GOIÁS

BRUNA PINHEIRO

Brasília, 08 de outubro de 2012

TERMO DE APROVAÇÃO

Análise da diversidade de begomovírus em tomateiro no Distrito Federal e no estado de Goiás

Aprovado por:

Monografia apresentada à disciplina de Estágio Supervisionado como requisito parcial para conclusão do curso de Engenharia Agrônômica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Professor Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum (Orientador)

Universidade de Brasília

Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata (Co-Orientadora)

Universidade de Brasília

Embrapa Hortaliças

Professor Dr. Jean Kleber de Abreu Mattos (Examinador interno)

Universidade de Brasília

Brasília, 08 de outubro de 2012.

Ao meu Senhor e meu Deus,
aos meus amigos e familiares,
dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela fé, força e coragem que me fizeram acreditar que, mesmo diante das dificuldades, eu poderia alcançar meus objetivos e enxergar alguns dos mistérios da sua criação e as belezas desta tão desconhecida vida.

À minha família que me apoiou e ajudou nesses anos de luta e perseverança. Sempre acreditando e encorajando os meus projetos.

Ao meu noivo Gabriel Castro, que sempre incentivou os meus sonhos e me ajudou a realizá-los.

Aos meus amigos da igreja que em especial dedicaram suas orações as minhas necessidades e aflições.

Ao meu orientador Luiz Eduardo Bassay Blum, por sua paciência e prontidão em me ajudar.

À minha co-orientadora Alice Kazuko Inoue Nagata, por ter me ensinado, com carinho de mãe e por sua amizade que será por toda a vida.

Aos meus prezados amigos da faculdade, Jorge Augusto, Fábio Caribé, Mariana Barreto, Diego de Paula, Moíra Paranaguá, Roberta Ferreira, Fernando Arthur, Guilherme Firmino pelo companherismo, alegria e amizade. Em especial, a Estela Andrade por ser a melhor amiga que eu poderia ter durante esses anos.

Aos meus amigos da Embrapa Hortaliças; Sarah Barreto, Mariana Martins, Maciel Capistrano, Oneilson Medeiros, Lúcio Flávio, Mariana Hallwass, Leonardo Albuquerque, e Fernanda Naito pelos dias de alegria e felicidade compartilhados entre nossas bancadas e por todo apoio durante os meus projetos.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Agronomia e Veterinária por sua dedicação e conselhos durante todo o curso.

Análise da diversidade de begomovírus em tomateiro no Distrito Federal e no estado de Goiás

Resumo

Um dos principais problemas da produção de tomate no Brasil é a ocorrência de viroses, principalmente as causadas por begomovírus. Diferentes espécies de begomovírus foram encontradas infectando plantas de tomate e os prejuízos econômicos causados por esses vírus são grandes. Neste trabalho, a diversidade de begomovírus infectando o tomateiro foi analisada, em amostras coletadas em núcleos rurais no Distrito Federal e em diferentes municípios produtores no estado de Goiás, que apresentam relevante produção de tomate no Brasil. Para analisar a população viral, a prevalência de determinadas espécies e a diversidade intra e inter-específica, foram selecionadas 46 amostras (coletadas entre 2003 e 2007) em um raio de 500 Km², de modo que representasse a abrangência geográfica da região produtora de tomate no Goiás de Distrito Federal. O DNA-A de cada um dessas amostras foi clonado, sequenciado e os vírus identificados como pertencentes a três espécies: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato golden vein virus* (TGVV) e *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV). A maioria dos isolados clonados: quarenta e três clones de trinta e oito amostras foram de ToSRV, oito clones de sete amostras foram identificados como isolados de TGVV, e um clone de uma amostra como um isolado de ToCMoV. No Distrito Federal foram encontrados uma amostra de ToCMoV (no ano de 2005), cinco amostras de TGVV (em 2003 e 2005) e oito de ToSRV (em 2003, 2005 e 2007). No estado de Goiás haviam duas amostras de TGVV (no ano de 2003) e trinta amostras de ToSRV (em 2003, 2005 e 2007). Os dados gerados neste trabalho irão contribuir para a compreensão da distribuição dos begomovírus nas regiões produtoras, informação essa que irá auxiliar na elaboração de estratégias futuras de controle da doença.

Palavras-chave: Begomovírus, *Bemisia tabaci*, Mosca-branca.

Analysis of diversity in begomovirus on tomato plants in the Federal District and Goiás State

Abstract

One of the main constraints of the tomato production in Brazil is the virus disease caused by begomoviruses. Different begomovirus species have been found infecting tomato plants and causing severe losses to the tomato production. In this study the diversity of tomato begomoviruses was analyzed in samples collected in rural areas in the Federal District and in different counties in the state of Goiás, which represent important tomato crop production regions in Brazil. For the analysis of the relative viral population prevalence of different species and to assess intra and inter-specific genetic variability, 46 samples (collected between 2003 to 2007) were selected within a 500 Km² area encompassing counties of Goiás State and rural areas of the Federal District. The DNA-A of each sample was cloned, sequenced and classified in three species: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato golden vein virus* (TGVV) e *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV). While most of the clones (forty three clones from thirty eight samples) were of ToSRV isolates, eight clones (from seven samples) were identified as TGVV isolates, and another one (from one sample) as a ToCMoV isolate. In the Federal District were found one sample of ToCMoV (from 2005), five samples of TGVV (from 2003 and 2005), and eight samples os ToSRV (from 2003, 2005 and 2007). In Goiás state were found two samples of TGVV (from 2003 and 2005) and thirty samples of ToSRV (from 2003, 2005 and 2007). These data will in the future enable the understanding of the distribution of begomoviruses in the growing areas, information that will contribute to develop future control strategies of the disease.

Keyword: Begomovirus, *Bemisia tabaci*, whitefly.

SUMÁRIO

1.Introdução.....	09
2.Objetivo Geral.....	12
2.1 Objetivo Específico.....	12
3.Revisão Bibliográfica.....	12
3.1Tomate.....	12
3.2 Begomoviroses.....	14
3.3 Critérios de classificação taxonomica dos geminivírus.....	15
3.4 Mecanismos de variabilidade genética dos begomovírus.....	16
3.5 Histórico das begomoviroses no Brasil.....	17
3.6 Métodos de transmissão dos begomovírus.....	17
3.7 Controle de doenças causadas por begomovírus.....	18
4. Material e Métodos.....	19
5. Resultados e Discussão.....	20
6. Conclusão.....	26
7. Referências Bibliograficas.....	26

1. Introdução

O tomate é a segunda hortaliça mais consumida e produzida em todo o mundo, com produção mundial de aproximadamente 140.278,5 milhões de toneladas (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, FAOStat, dados de junho 2011). O maior produtor é a China, com 45,3 milhões de toneladas. O Brasil ocupa o 9º lugar, produzindo cerca de 4,3 milhões de toneladas ao ano (Figuras 1 e 2) (FAOStat, janeiro de 2012). Considerando a importância da cultura no Brasil, os setores de pesquisa agropecuária passaram a trabalhar na geração de variedades melhoradas geneticamente por meio de cruzamentos específicos que fornecessem fatores agrônômicos desejáveis, como: alto conteúdo de sólidos solúveis e a resistência a pragas e doenças, a fim de tornar a tomaticultura nacional mais competitiva e desenvolvida. Por se tratar de uma planta sensível, pouco resistente ou tolerante a pragas, o tomateiro necessita de constantes aplicações de agrotóxicos que auxiliam no combate às pragas e doenças.

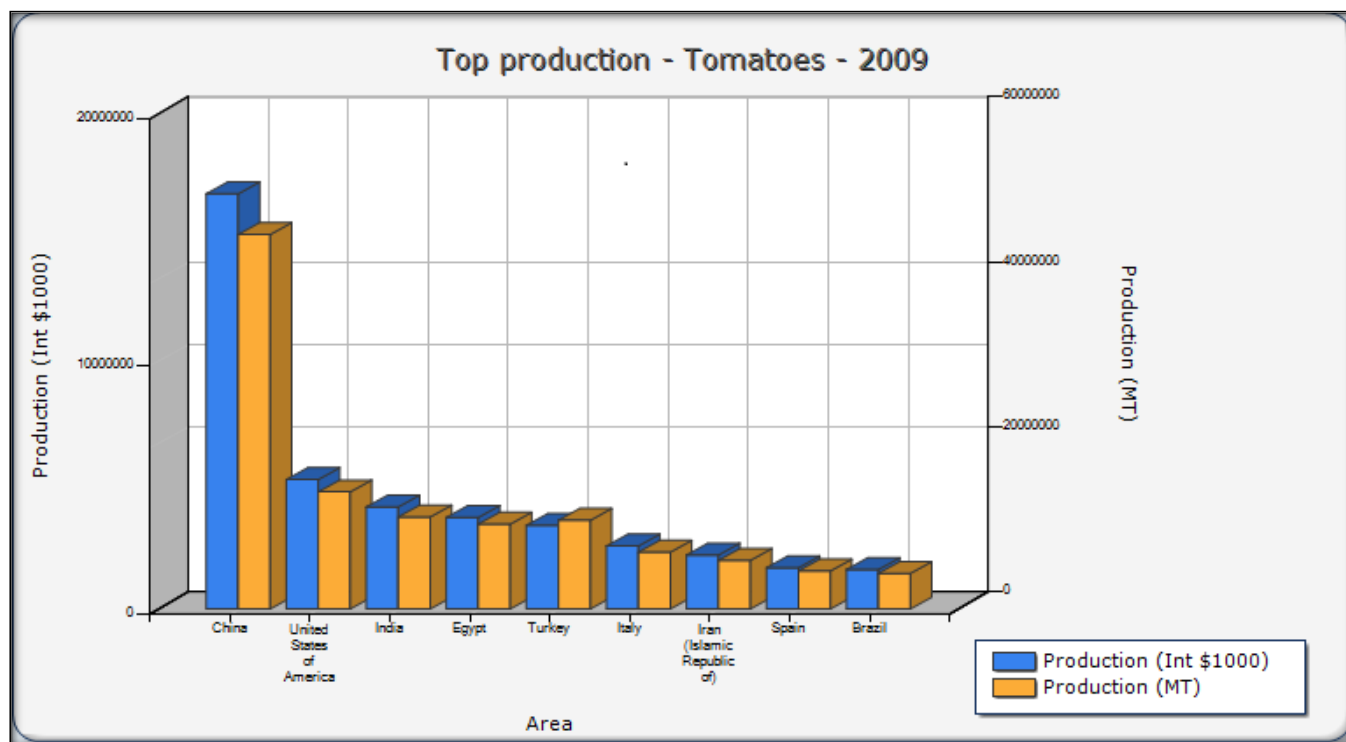


Figura 1: Produtores mundias de tomate, Balanço FAO 2009 (FAOSTAT, Janeiro de 2012).

Rank	Area	Production (Int \$1000)	Flag	Production (MT)	Flag
1	China	16765471	*	45365543	
2	United States of America	5226337	*	14181300	
3	India	4120195	*	11148800	
4	Egypt	3695640	*	10278500	
5	Turkey	3375505	*	10745600	
6	Italy	2541639	*	6878160	
7	Iran (Islamic Republic of)	2175885	*	5887710	
8	Spain	1664368	*	4603600	
9	Brazil	1592998	*	4310480	
10	Mexico	957688	*	2591400	
11	Russian Federation	802098	*	2170390	
12	Uzbekistan	779780	*	2110000	*
13	Ukraine	754206	*	2040800	
14	Greece	498911	*	1561000	
15	Portugal	497691	*	1346700	
16	Nigeria	492839	*	1333570	Im
17	Morocco	480433	*	1230470	
18	Syrian Arab Republic	430767	*	1165610	
19	Tunisia	369564	*	1135000	
20	Iraq	337594	*	913493	

* : Unofficial figure
[]: Official data
Im: FAO data based on imputation methodology

Figura 2: Produção mundial por países (FAOStat, janeiro 2012).

As begomoviroses são doenças causadas por vírus pertencentes à família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*, responsáveis por consideráveis perdas na produção desta cultura. Essa família é composta por quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus*. Os vírus do gênero *Begomovirus* são transmitidos pela *Bemisia tabaci*, que é um inseto homóptero da família Aleyrodidae, conhecida popularmente como mosca-branca e é classificada em biótipos. O biótipo A raramente coloniza o tomateiro, já o biótipo B apresenta maior eficiência de colonização (LOURENÇÃO & NAGAI, 1994; FRANÇA et al., 1996).

No Brasil ocorreu um aumento significativo da população de moscas-brancas biótipo B em meados de 1990, provavelmente ocasionado pela importação de materiais ornamentais (MELO, 1992), sendo que esse fato foi determinante para o aumento na ocorrência de begomoviroses (RIBEIRO et al., 2003). Outros fatores que aumentaram a incidência desses vírus foram a produção contínua de plantas susceptíveis e a presença de espécies hospedeiras da mosca-branca, como as plantas de soja e o feijão, impedindo assim a quebra do ciclo de reprodução do vetor.

Os begomovírus podem causar em tomateiro sintomas de deformação foliar, amarelecimento, mosaico, clorose internerval e nanismo da planta (Figura 3 A e B). Podem ocorrer também descoloração e encurtamento dos entrenós. Existem 17 espécies de begomovírus isolados de tomateiro do Brasil (Albuquerque et al., 2010), sendo que três dessas espécies são consideradas predominantes no país: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), encontrado praticamente em todo o país; *Tomato golden vein virus* (TGVV), encontrado predominantemente na região Sudeste e Centro-Oeste; e o *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMLCV), encontrado na região Nordeste (Fernandes et al., 2008). Em virtude da alta variabilidade desses vírus os critérios taxonômicos para classificação de novas espécies são mais rígidos, sendo necessário o sequenciamento completo do DNA. Sequências com identidade inferior a 89% são consideradas espécies distintas, abaixo de 93% são consideradas novas estirpes e acima de 94% novas variantes (FAUQUET et al., 2008).

Este trabalho propôs analisar a diversidade de algumas espécies virais de begomovírus que ocorrem em regiões de importância econômica para a tomaticultura brasileira. Este levantamento contribuirá para fornecer dados de diversidade e evolução viral no campo, orientando os trabalhos em programas de melhoramento genético e avaliação de materiais comerciais.

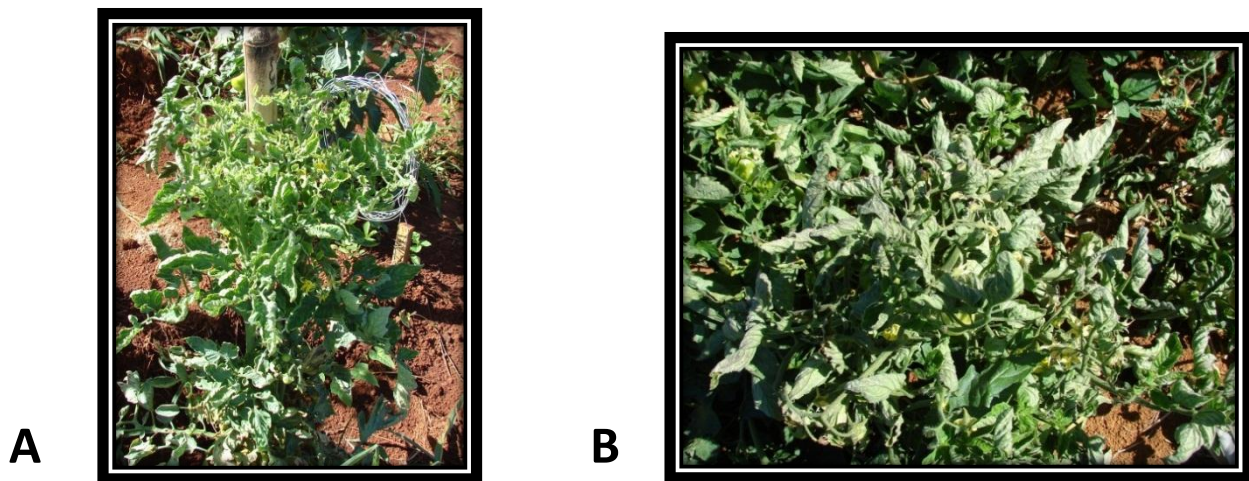


Figura 3: Deformação foliar, amarelecimento, mosaico, clorose e nanismo (A) e enrolamento foliar e clorose internerval (B) Fonte: Cedida por Alice Nagata.

2. Objetivo Geral:

Determinar os principais begomovírus que ocorrem em tomateiros cultivados na região de Goiás e do Distrito Federal.

2.1 Objetivo Específico:

- ✓ Clonar e sequenciar o DNA-A dos begomovirus presentes em 46 amostras.
- ✓ Montar a sequência do DNA-A completo de cada clone.
- ✓ Realizar análise filogenética dos begomovírus.

3. Revisão Bibliográfica:

3.1 Tomate

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma planta de crescimento determinado ou indeterminado pertencente à família Solanaceae, gênero *Solanum*, originário da região ocidental da América do Sul, distribuído do Equador ao norte do Chile e também pode-se desenvolver em diferentes habitats, topografias e climas como em costas litorâneas, altos Andes e desertos como o do Atacama, no norte do Chile (PERALTA & SPOONER, 2005). O tomateiro foi levado para a Europa aproximadamente em meados do século XVI, quando foi adaptado ao cultivo e houve a sua distribuição e popularização nos diversos continentes. Atualmente, há dois sistemas de condução principais em tomateiro: o estaqueado e o rasteiro. O estaqueado é próprio para consumo *in natura*, e é produzido em casas de vegetação ou em campos abertos com varas ou fitilhos que conduzem o crescimento da planta, hábito de crescimento indeterminado (Figura 4A). Outro tipo é o tomate rasteiro em geral produzido para uso industrial, seu crescimento é determinado, sendo o seu plantio e a colheita em geral são mecanizados, diferentemente do tomate “mesa” (Figura 4B e 5).

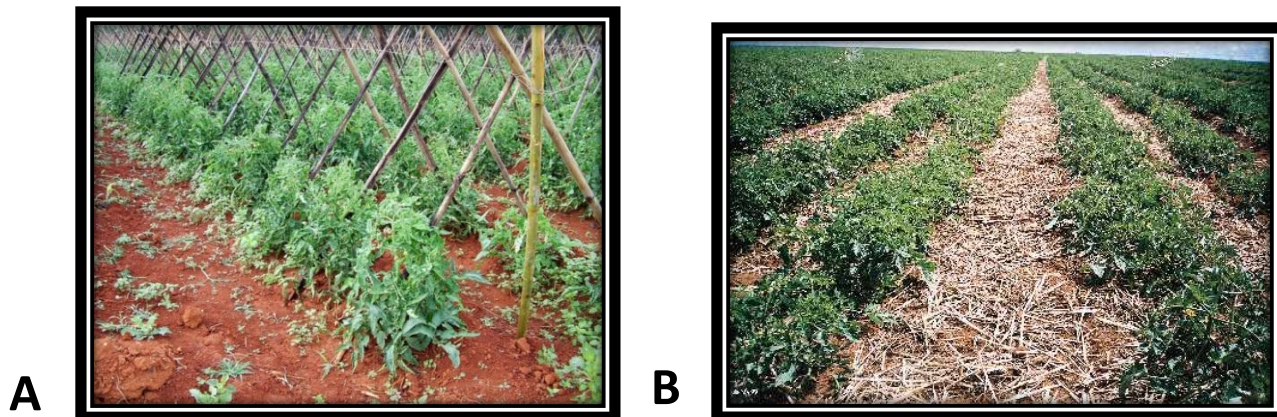


Figura 4: Tomate estaqueado “mesa” (A) e Tomate indústria (B). (Fonte A: Cedida por Alice Nagata. Fonte B: Vanderlei Barbosa).



Figura 5: Campo de tomate indústria (Fonte: foto cedida por Alice Nagata).

3.2 Begomoviroses

A família *Geminiviridae* possui quatro gêneros de vírus, os gêneros monopartidos: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocovirus*, e o bipartido *Begomovirus*. Esses vírus infectam plantas de culturas com grande importância comercial como o algodão, a mandioca, o tomate, pimentão e batata doce, reduzindo a produção. O nome *Geminiviridae* provém da própria partícula, que consiste em dois icosaedros incompletos geminados (figura 6), (HARRISON et al., 1977). Os geminivírus possuem uma região intergênica conservada que contém a origem de replicação e uma estrutura em forma de grampo de nove nucleotídeos (TAATATT/AC) na maioria dos vírus desta família (figura 7) (ROJAS et al., 2005). O gênero *Begomovirus* pode possuir genoma mono ou bipartido (DNA-A e DNA-B), o DNA-A dos begomovírus que ocorrem no Brasil, que apresenta tamanho de 2,5 – 2,7kb. possui uma ORF no sentido viral que codifica a capa proteica (CP ou AV1) e quatro no sentido complementar: a Rep (“replication-associated protein” ou AC1) essencial para a replicação viral, a TrAP (ativador de transcrição ou AC2), a Ren (AC3), a proteína AC4, relacionadas à replicação e tradução viral (FAQUET et al., 2005 & ROJAS et al., 2005). O DNA-B, de tamanho semelhante, possui duas ORFs (BC1 e BV1) que codificam proteínas que estão envolvidas no movimento dos vírus, na infecção sistêmica, na relação com a gama de hospedeiras e com o desenvolvimento de sintomas (figura 7) (FAQUET et al., 2005). A espécie-tipo é o *Bean golden yellow mosaic virus* (FAUQUET et al., 2008). Os begomovírus infectam plantas dicotiledôneas e são transmitidos pela mosca branca, *Bemisia tabaci*.

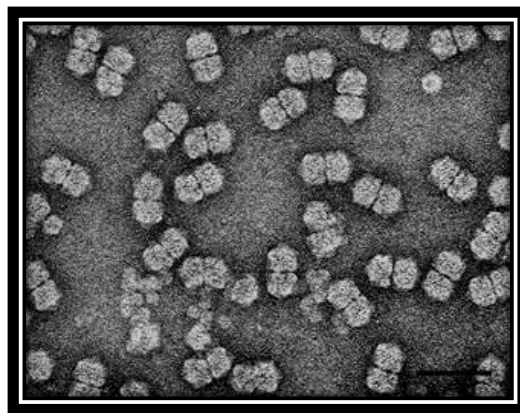


Figura 6: Partículas virais geminadas. (Fonte: <http://www.ufv.br/dfp/virologia/gemini.htm>).

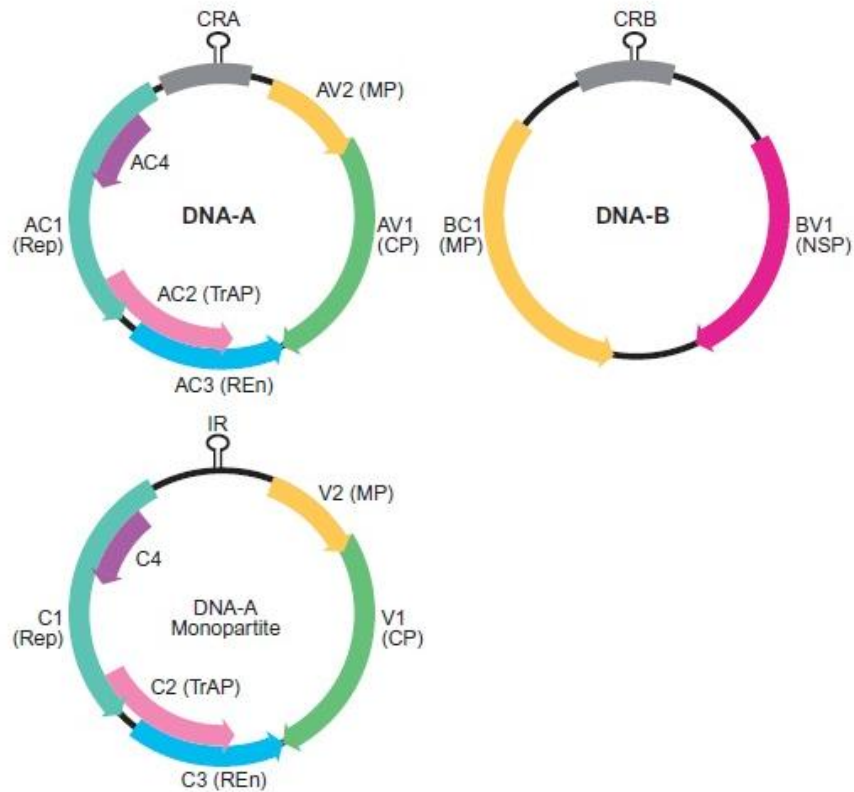


Figura 7: Organização genômica dos begomovírus. ORFs são codificadas no sentido viral (V) ou complementar (C) de acordo com o componente A ou B. A região comum CRA e CRB no topo, representam regiões compartilhadas entre os componentes bipartidos. A posição do stem-loop na região intergênica (CRA, CRB e IR) contém uma sequência de nove nucleotídeos conservados (TAATATTAC). CP, capa proteica; Rep Proteína associada a replicação; TrAP, Ativador de transcrição de proteína; Ren, promotor de replicação; MP, Proteína de movimento; NSP, Proteína de transporte intracelular. AV1 e V1 estão relacionadas na encapsidação do vírus e AV2 também está relacionada com a movimentação. A Av2 não está presente nos begomovirus bipartidos brasileiros (Fonte: FAUQUET et al., 2011, Virus Taxonomy cap.9 pg 360).

3.3 Critérios de classificação taxonômica dos begomovírus

Os critérios taxonômicos utilizados para classificar um vírus como begomovírus segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (Fonte: FAUQUET et al., 2011, Virus Taxonomy cap.9 pg 360) são:

- ✓ Número de componentes genômicos: Presença ou ausência de componente B.
- ✓ Organização do genoma: presença ou ausência de ORF AV2.
- ✓ Sequência de identidade de nucleotídeos do DNA-A. Por causa do crescente número de espécies reconhecidas, derivações nas sequências completas de nucleotídeos são necessárias para distinguir uma espécie de outra. Sequências de identidade de nucleotídeos <89% são indicadas como espécies distintas.
- ✓ Sequências com identidade do DNA-A entre 89% e 94% são indicadas como estirpes e >94% como variantes.
- ✓ Trans-replicação dos componentes genômicos: a incapacidade da proteína Rep para trans-replicar um componente genômico sugere uma espécie distinta. Contudo, quando se considera este critério, deve ser mantido em mente que pequenas mudanças no sítio de ligação da Rep podem prevenir interações funcionais e recombinações envolvendo pequenas partes do genoma que podem conferir replicações em uma nova espécie.
- ✓ Produção de pseudo-recombinantes viáveis: Deve ser levada em consideração a capacidade do pseudo-recombinante nas hospedeiras naturais das viroses parentais. Deve ser assegurado que a viabilidade do pseudo-recombinante não é resultado da combinação entre componentes.
- ✓ Características da capa proteica: uma sequência de identidade de aminoácidos <90% e uma diferença sorológica considerável podem ser indicativos de espécies distintas em primeira instância.
- ✓ Gama de hospedeiras e sintomas fenotípicos: essas características podem estar relacionadas a uma espécie em particular, mas seu uso comum será para distinguir estirpes, quando a informação está disponível.

3.4 Mecanismos de variabilidade genética dos begomovírus

O principais mecanismos de se obter variabilidade genética nos vírus são através de mutações, recombinações e pseudo-recombinações (PADIDAM et al., 1998; MONCI ET AL., 2002). As mutações ocorrem mais em vírus de RNA porque a DNA polimerase possui um mecanismo de correção de erros (“proof reading”) durante a leitura da replicação, o que diminui as chances de mutações (ROSSINCK, 1997). A recombinação consiste na troca de material

genético entre dois ou mais vírus, ou mesmo entre os componentes virais de um mesmo vírus (SEAL et al., 2006). Esse processo confere grandes vantagens aos begomovírus como maior diversidade genética das populações o que auxilia na capacidade de adaptação e na evolução dessas espécies (UMAHARAM et al., 1998; PADIDAM et al., 1999; MONCI et al., 2002). Fatores como infecção mista, altos níveis de replicação e o aumento da gama de hospedeiros com a emergência do biótipo B da mosca branca são essenciais e contribuem positivamente para a recombinação neste gênero de vírus (PADIDAM et al., 1999). A pseudo-recombinação consiste na troca de componentes inteiros de DNAs de vírus bipartidos (DNA-A ou DNA-B) gerando novos vírus. E em geral ocorre entre DNAs de espécies intimamente relacionadas, ou seja do mesmo grupo filogenético (STANLEY, 1991; HARRISON & ROBINSON, 1999).

3.5 Histórico de begomovirose no Brasil

Os primeiros relatos da ocorrência de begomovírus infectando plantas de tomateiro no Brasil que foi observado em meados de 1960 (FLORES et al., 1960). Já na década de 90 diversos vírus deste gênero emergiram no país e foram sequenciados (RIBEIRO et al., 2003). Esse aumento ocorreu devido à dispersão do biótipo B de mosca-branca. As espécies já relatadas no Brasil infectando tomate são: *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV), *Tomato golden vein virus* (TGVV) e outras espécies propostas que ainda não foram completamente caracterizadas (FERNANDES et al., 2008).

3.6 Métodos de transmissão dos begomovírus

Os begomovírus são transmitidos naturalmente pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (COSTA, 1976) (Figura 8), sendo que a eficiência de transmissão pode variar de acordo com o local e o biótipo da mosca, espécie de begomovírus, cultivar de tomateiro, etc. Considerando que a *Bemisia tabaci* é um inseto sugador, o vírus inicialmente é adquirido quando as ninfas ou adultos inserem a probóscide no sistema vascular da planta durante a alimentação, e sugam a seiva adquirindo partículas virais. Os vírus possuem uma relação circulativa persistente com o vetor, ou seja, o vírus circula pelo corpo do inseto até chegar nas glândulas salivares (COHEN & NITZANI, 1996; DUFFUS, 1987; RUBINSTEIN & CZOSNEK, 1997). Ao se alimentar

novamente em uma planta sadia a mosca deposita um pouco de saliva, podendo inserir partículas virais no sistema vascular de acordo com a sua dispersão o que pode levar ao desenvolvimento da virose em plantas sadias (JONES, 2003).

Alguns begomovírus podem ser transmitidos por inoculação mecânica, e com o avanço da tecnologia do DNA recombinante, a inoculação por biobalística e agrobactéria tornou-se uma eficiente ferramenta de inoculação dos begomovírus, para fins de pesquisa, porém sua dispersão na natureza ocorre através da ação da mosca branca a partir de fontes de vírus que podem ser hospedeiras alternativas como daninhas, outras culturas hospedeiras ou restos de lavouras abandonadas (COSTA, 1976).



Figura 8: *Bemisia tabaci*, biótipo B (Fonte: Geni Litvin Vilas Boas, 2009).

3.7 Controle de doenças causadas por begomovírus

A aplicação constante, massiva e generalizada de inseticidas para o controle dos vetores causa o aumento do custo de produção, danos ao meio ambiente e favorece o aparecimento de pragas resistentes. Portanto, para controlar a crescente ocorrência de doenças virais, principalmente em campos de tomate, recomenda-se a utilização de medidas preventivas combinadas ao controle químico, como: eliminação de hospedeiras alternativas, rotação de

culturas não hospedeiras do vetor, vazio sanitário, destruição de restos culturais e uso de materiais resistentes (LOPES & DE ÁVILA, 2005).

4. Material e Métodos

Para a realização deste estudo foram selecionadas quarenta e seis amostras de DNA total de plantas infectadas com begomovírus (preservados a -20°C em $300\mu\text{l}$ de 10mM Tris, $\text{pH}8$), representativas das diversas áreas de produção e coletadas entre os anos de 2003 e 2007, extraídas de amostras foliares sintomáticas de tomateiro provenientes do Distrito Federal e do estado de Goiás. O DNA viral foi extraído de cada amostra foliar com a utilização do detergente brometo de cetiltrimetilamônio - CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987). O processo consiste na quebra das paredes celulares e exposição do conteúdo celular. Após sucessivas lavagens e precipitações obtém-se apenas o DNA viral purificado. O DNA foi identificado como positivo para begomovírus por meio da reação de polimerase em cadeia (PCR - *polymerase chain reaction*) (MULLIS, 1990), com oligonucleotídeos específicos, A496 (5'AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG3') e 1978 (5'GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT3') que amplificaram um fragmento de DNA de aproximadamente 1,1kb (Rojas et al., 1993). A PCR é um tipo de reação que amplifica diversas vezes pequenos fragmentos de DNA com o auxílio de primers, gerando sucessivas cópias do mesmo fragmento de DNA. As amostras foram posteriormente amplificadas via círculo rolante (RCA - *rolling circle amplification*), com a enzima $\phi 29$ DNA polymerase, que amplifica DNAs circulares para a clonagem genômica (Inoue- Nagata et al., 2004). Em seguida foram selecionadas algumas enzimas de restrição (BamHI e ClaI) para digerir o DNA amplificado. Essas enzimas reconhecem o DNA em pontos específicos e atuam como tesouras, cortando o DNA. As bandas obtidas da digestão foram separadas em gel de agarose a 0,8% e os tamanhos eram de $\approx 2.6\text{kb}$. Após a separação em gel os fragmentos foram cortados do gel com uma lâmina e purificados com o kit da GE Healthcare (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit). Os insertos obtidos da purificação de 2,6kb foram ligados ao vetor desfosforilado pBluescript (pBS 3,0kb, Stratagene), com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e transformados em células competentes de *Escherichia coli*, via eletroporação. O pBS é um vetor bacteriano que replica diversas vezes os insertos ligados a ele quando é inserido dentro de uma

bactéria. Em seguida, as colônias obtidas do processo de transformação que tinham uma coloração branca foram selecionadas e o DNA plasmidial foi purificado e digerido com as enzimas de restrição (BamHI e ClaI) adequadas (SAMBROOK, et al., 1989). O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático pela empresa Macrogen na Coreia do Sul. Neste tipo de sequenciamento existem dois tipos de oligonucleotídeos, alguns normais e outro marcados com fluorescência que são aleatoriamente inserido pela DNA polimerase interrompendo a polimerização e gerando fragmentos de tamanhos diferentes que podem ser identificados em gel. O material foi sequenciado inicialmente com os primers T3 e T7 e depois foram desenhados primers para finalizar toda a sequência. Essas sequências foram compiladas utilizando o programa de análise de sequências Staden Package (STADEN et al., 2003), previamente conferidas pelo BLASTn (Altschul et al., 1997) e comparadas com outras sequências de begomovírus pelo ClustalV (Thompson et al., 1994) no programa MegAlign, para a construção da árvore filogenética com os seguintes parâmetros: Analysis = Phylogeny Reconstruction, Scope = All Selected Taxa, Statistical Method = Neighbor-joining. Phylogeny Test: Test of Phylogeny = Bootstrap method, No. of Bootstrap Replications = 3000. Substitution Model: Substitutions Type = Nucleotide, Model/Method = Maximum Composite Likelihood, Substitutions to Include = d: Transitions + Transversions. Rates and Patterns: Rates among Sites = Uniform rates, Pattern among Lineages = Same (Homogeneous). Data Subset to Use: Gaps/Missing Data Treatment = Complete deletion, Codons Included = 1st+2nd+3rd+Non-Coding.

5. Resultados e Discussão

Foram selecionadas trinta e duas amostras do estado de Goiás e quatorze do Distrito Federal com o cultivo de tomate. As duas regiões tiveram amostras coletadas nos anos de 2003, 2005 e 2007, para que o comparativo fosse representativo, totalizando quarenta e seis amostras. Todas as amostras coletadas apresentavam em geral sintomas característicos de infecção por begomovírus, como clorose internerval e deformação foliar. Para o processo de clonagem, foram obtidos fragmentos de DNA viral por meio da digestão do produto da RCA com as enzimas

BamHI e ClaI, que cortam o genoma circular do vírus em apenas um ponto, gerando um fragmento linear de aproximadamente 2,6 kb (figura 9 e 10).

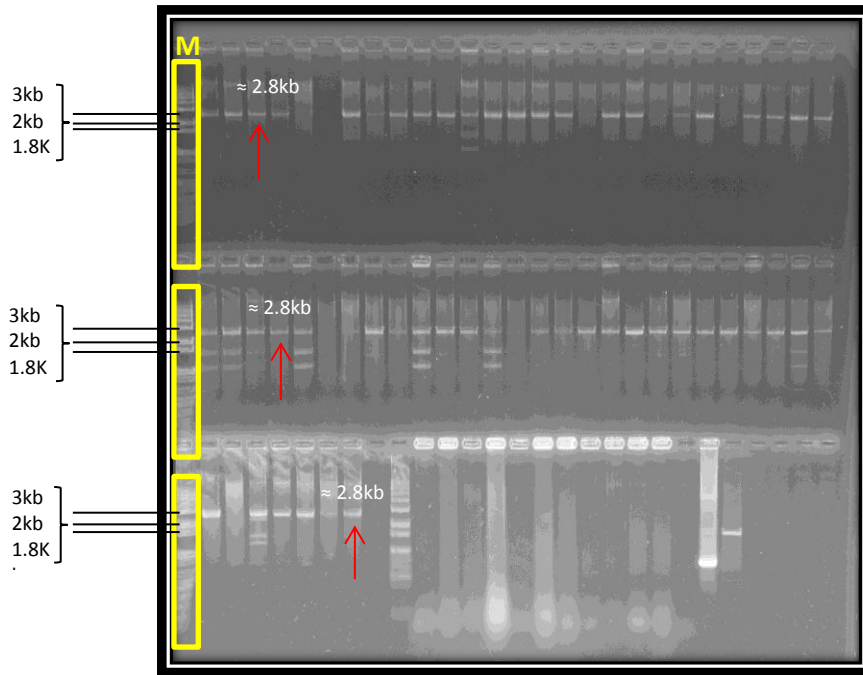


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 0.8% da digestão do RCA com as enzimas de restrição BamHI e ClaI. M= indica o marcador de peso molecular, 1kb ladder (invitrogen). A seta indica os fragmentos de DNA com ≈ 2.8 kb.

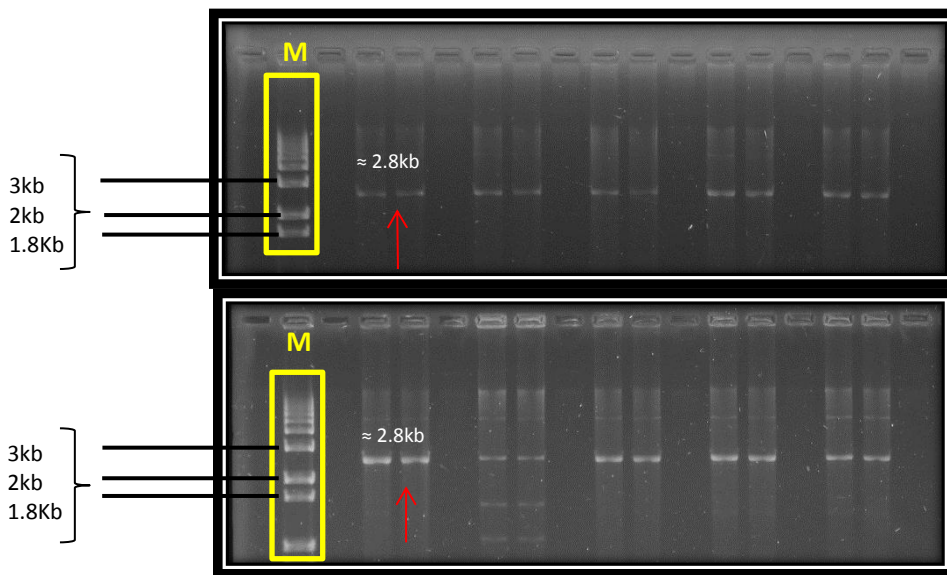


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Digestão amostras com BamHI. M= marcador de peso molecular, 1 kb ladder (Invitrogen). A seta indica os fragmentos de DNA com $\approx 2.8\text{kb}$, digeridos com apenas uma enzima que foram purificados.

Para cada uma das 46 amostras selecionadas para clonagem, foi obtido pelo menos um clone, totalizando 52. Quarenta e seis são do componente A e 6 do componente B. Não foi possível a clonagem dos dois componentes genômicos de todas as amostras (Figura 11).

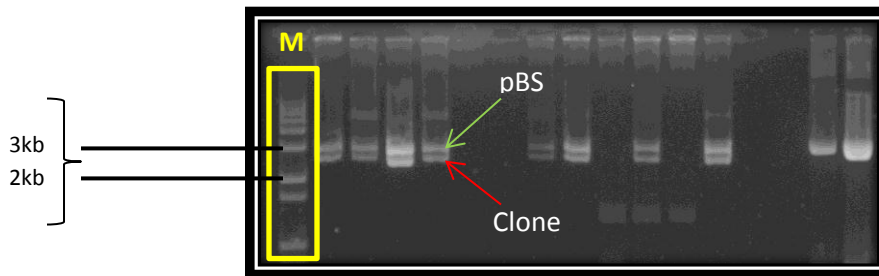


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%. M= Marcador de peso molecular 1kb ladder (Invitrogen). Digestão dos clones 46 amostras. A seta indica um exemplo de clone digerido com sua respectiva enzima de clonagem, o fragmento do pBS e o inserto clonado.

Quarenta e três clones de trinta e oito amostras foram identificados como *Tomato severe rugose* (ToSRV), oito clones de sete amostras foram identificados como *Tomato golden vein virus* (TGVV), e um clone de uma amostra como *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Tabela 1).

As seqüências de nucleotídeos do DNA-A de cada clone foram comparadas com seqüências disponíveis nos bancos de dados. Para isso foram utilizados os seguintes acessos: ToSRV DNA-A (NC_009607.1) e DNA-B (NC_009612.1), TGVVdi (JF803255.1), TGVV8 DNA-A (JF803258.1) e DNA-B (JF803265.1), ToCMoV (NC_003664.1), TMMV (EU710752), TCoMV (EU710754), BYSV (EU710756), OmoV (EU914817.1), ToMLCV9 (JF803246.1), SimMAV1 (AY090555.1), SimMAV2 (AJ557451.1), SiMoV (AY090555.1), SiYMV (AY090558.1), ToCMoVBA (AF490004.1), ToCMVCrumple (AY090557.1), TCMVIg1 (DQ336353.1), ToRMV (AF291705.1), ToSRVGO (DQ207749.1), ToSRVMG (JF803261.1),

TGMV (JF694490.1), ToYSV (DQ336350.1), ToYVSVG22 (JF803259.1), ToYVSVBa3 (EF417915.1).

As sequências foram alinhadas com as sequências de begomovírus disponíveis em bancos de dados públicos para que uma árvore filogenética fosse construída (figura 12). Das quatorze amostras do Distrito Federal, cinco foram identificadas como TGVV, uma como ToCMoV e oito como ToSRV, o que revela uma alta variabilidade de espécies em áreas relativamente próximas. No estado de Goiás, apenas duas amostras eram de isolados de TGVV e trinta de ToSRV. Isso mostra que este vírus é predominante entre as amostras coletadas.

As sequências de DNA apresentaram alta porcentagem de identidade com as sequências de referência. O ToSRV apresentou identidade mínima de 98,3% e máxima de 99,4%. O TGVV apresentou identidade mínima de 96,8% e máxima de 99,8%. O isolado de ToCMoV apresentou identidade de 95,7% com a sequência referência.

O vírus ToSRV ocorreu em todos os anos de coleta e nas duas regiões selecionadas. O TGVV ocorreu nas duas regiões no ano de 2003 e apenas uma amostra no ano de 2005 porém apenas no Distrito Federal, e o ToCMoV ocorreu apenas em uma amostra do DF no ano de 2005. Não foi possível relacionar a ocorrência de todos vírus com sua região de coleta, porque eles ocorreram nas duas regiões, exceto o ToCMoV. Possivelmente seria necessária uma nova amostragem para um estudo comparativo de ocorrência dessas espécies virais. Porém, assim como este trabalho, outros estudos mostram a predominância de ToSRV em diferentes regiões do Brasil (FERNANDES et al., 2008).

A árvore foi construída apenas com as sequências do componente de DNA-A (Figura 12). Todas as sequências que apresentaram alta identidade com o ToSRV e agruparam próximo a ele. Os isolados de TGVV agruparam com a sequência de TGVVdi e TGVV8 e mais distante dos ToYVSV (*Tomato yellow vein streak virus*) e o isolado de ToCMoV se agrupou com as sequências de ToCMoV.

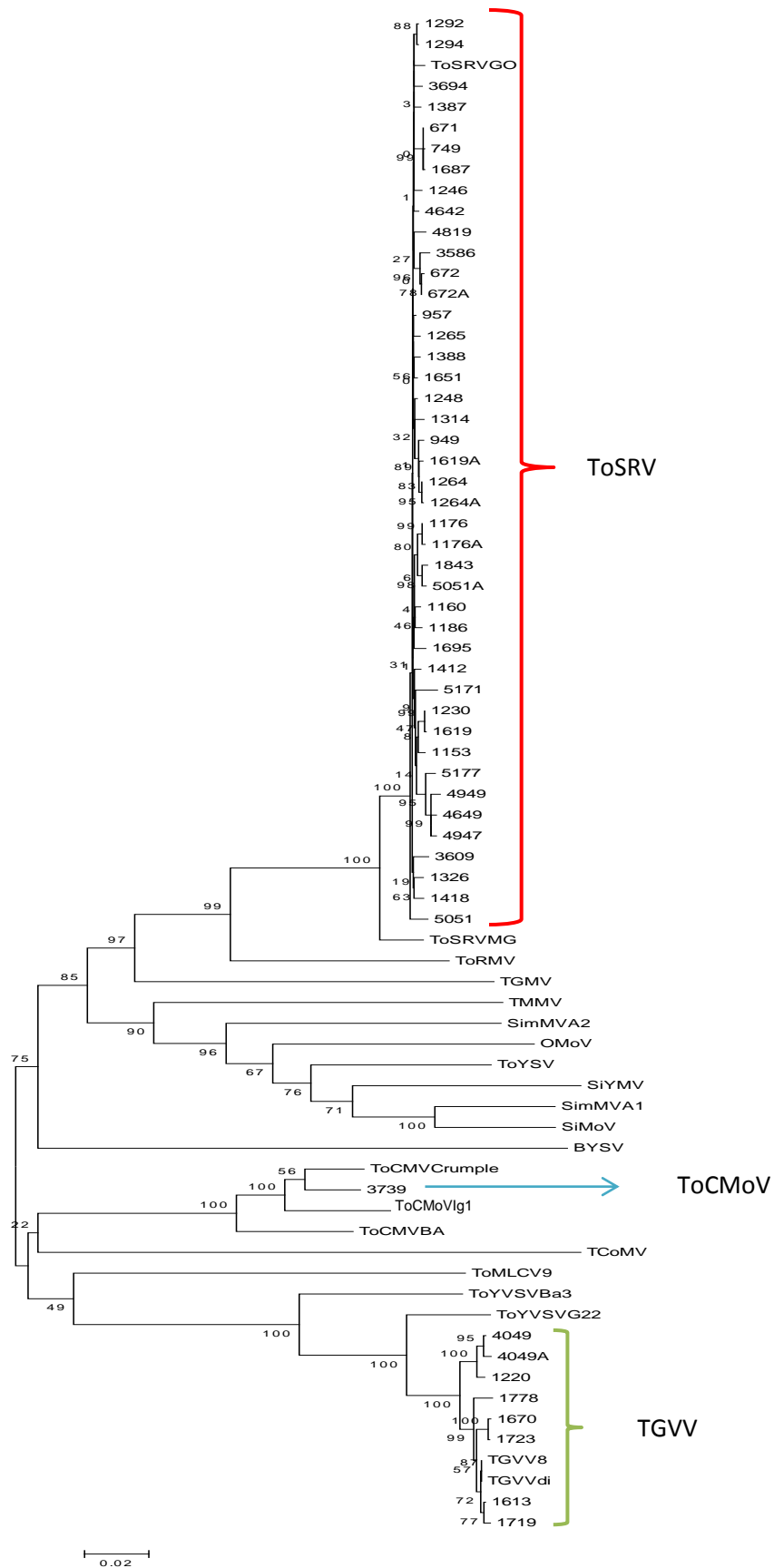


Figura 12. Árvore de análise filogenética. A letra (A) ao lado do número das amostras indica que este clone é de DNA-A.

Tabela 1. Porcentagem de identidade das sequências do DNA-A e B.

Clone ^A	Vírus	Enzima ^C	% ^B	Clone ^A	Vírus	Enzima ^C	% ^B
671	ToSRV	BamHI	99,0	1388	ToSRV	BamHI	99,4
672	ToSRV	BamHI	99,0	1412	ToSRV	BamHI	99,3
672 B	ToSRV	BamHI	99,0	1418	ToSRV	BamHI	98,9
749	ToSRV	BamHI	99,0	1613	TGVV	BamHI	99,8
949	ToSRV	BamHI	99,9	3694	ToSRV	BamHI	99,0
957	ToSRV	BamHI	99,2	1651	ToSRV	BamHI	99,3
1153	ToSRV	BamHI	99,0	4642	ToSRV	BamHI	99,0
1160	ToSRV	BamHI	99,0	1670	TGVV	BamHI	99,3
1176	ToSRV	BamHI	98,6	1687	ToSRV	BamHI	98,9
1176B	ToSRV	BamHI	98,9	1695	ToSRV	BamHI	99,2
1186	ToSRV	BamHI	99,0	1719	TGVV	BamHI	99,5
1220	TGVV	BamHI	97,7	1723	TGVV	BamHI	99,2
1619	ToSRV	BamHI	98,8	1778	TGVV	BamHI	99,0
1619B	ToSRV	BamHI	98,8	4649	ToSRV	BamHI	98,5
1292	ToSRV	BamHI	99,2	1843	ToSRV	BamHI	98,8
1230	ToSRV	BamHI	99,0	3739	ToCMV	Cla I	95,7
1246	ToSRV	BamHI	98,9	3586	ToSRV	BamHI	98,3
1248	ToSRV	BamHI	97,9	4049	TGVV	BamHI	96,8
1294	ToSRV	BamHI	99,2	4049B	TGVV	BamHI	98,1
1314	ToSRV	BamHI	98,8	4819	ToSRV	BamHI	98,7
1264	ToSRV	BamHI	98,9	4947	ToSRV	BamHI	98,5
1264B	ToSRV	BamHI	98,0	4949	ToSRV	BamHI	97,8
1265	ToSRV	BamHI	99,4	5051	ToSRV	BamHI	98,6
3609	ToSRV	BamHI	98,8	5051B	ToSRV	BamHI	98,7
1326	ToSRV	BamHI	98,9	5171	ToSRV	BamHI	98,6
1387	ToSRV	BamHI	99,0	5177	ToRSV	BamHI	98,5

A- Clones: Número de cada clone sendo A para DNA A e B para DNAB.

B- Porcentagem de identidade entre o clone e a sequência referência usada dos bancos de dados.

C- Enzima usada para clonar os fragmentos de DNA.

6. Conclusão

Como resultados deste trabalho, é possível concluir que o ToSRV também é o vírus predominante nas regiões produtoras de tomate do estado de Goiás e do Distrito Federal, sendo que outros trabalhos também indicam sua predominância em outras regiões do Brasil (FERNANDES et al., 2008). Porém também ocorrem nessa região outras espécies virais como o TGVV e o ToCMoV, em menor porcentagem. Foi possível clonar o DNA A de todas as amostras e o DNA-B de algumas. Ao se analisar essas sequências e montar os clones completos de DNA-A, foi possível verificar a baixa variabilidade genética entre as espécies e a alta porcentagem de identidade com as sequências de referência. Foi possível analisar filogeneticamente as sequências e criar uma árvore, que auxilia na interpretação dos dados e a relacionar o parentesco das amostras com os vírus que ocorrem no Brasil, que foram colocados na análise para servir de referência. Esses dados levantados servirão de auxílio para futuros estudos de levantamento de ocorrência de begomovírus e para o estudo evolutivo dos begomovírus, principalmente do ToSRV. Para dar continuidade a este levantamento novas amostras dos anos 2009 e 2010 estão sendo processadas para que haja um comparativo nos anos subsequentes, e no futuro poderá ser possível avaliar a ocorrência e evolução dessas espécies virais. Também está sendo feito um levantamento direcionado para isolados de ToSRV em diferentes estados do Brasil para se verificar a variabilidade genética entre as sequências desses isolados e sua evolução.

7. Bibliografia

ALBUQUERQUE, L. C., D. P. MARTIN, A. C. AVILA and A. K. INOUE-NAGATA, 2010 Characterization of tomato yellow vein streak virus, a begomovirus from Brazil. *Virus Genes* 40: 140-147.

ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, *et al.*, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-402.

LOPES, ÁVILA; organizadores/ autores, Lopes, Alberto... [et al.]. Doenças do tomateiro, – Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005.

COHEN S, NITZANY FE (1966) Transmission and host range of tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology* 56: 1127-1131.

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

C. GUTIERREZ, E.R. PARRA, M.M CASTELLANO, A.P. SANZ-BURGOS, A. LUQUE, R. MISSICH. Geminivirus DNA replication and cell interactions. *Veterinary microbiology* 98, p.111-119, 2004.

DOMINGO, D., and HOLLAND, J.J., Eds (1994). Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. *In* “The Evolutionary Biology of Viruses” (S. S. MORSE, Ed). Raven Press, New York.

DOYLE J.J.; & DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, p.11-15, 1987.

DRAKE, J. W. (1993). Rates of spontaneous mutations among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4171-4175.

DUFFUS JE (1987) Whitefly transmission of plant viruses. *Vector Research* 4:73-91.

E. FLORES, K. SILBERSHMIDT, M. KRAMER, *Biológico* 26, 65-69 (1960).

FAUQUET CM, STANLEY J (2005) Revising the way we conceive and name viruses below the species level: A review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Arch Virol* 150: 2151-2179.

FAUQUET CM, BRIDDON RW, BROWN JK, MORIONES E, STANLEY J, ZERBINI M, ZHOU X (2008) Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch Virol* 153: 783-821.

FERNANDES FR, ALBUQUERQUE LC, GIORDANO LB, BOITEUX LS, ÁVILA AC, INOUE-NAGATA AK (2008) Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36: 251-258.

FRANÇA FH, VILLAS BOAS GL, CASTELO-BRANCO M, 1996. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 25, 369-72.

HARRISON, B.D.; BARKER, H.; BOCK, K.R.; GUTHRIE, E.J.; MEREDITH, G.; ATKINSON, M. Plant viruses with circular single-stranded DNA. *Nature*, London, v. 270, p. 760-762, 1977.

HIGGINS DG, BLEASBY AJ AND FUCHS R, 1992. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Computer applications in the biosciences : CABIOS*, 8, 189-91.

INOUE-NAGATA, A. K., ALBUQUERQUE, L. C., ROCHA, W. B. & NAGATA, T. (2004) A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods* 116, 209–211.

J.C. MATYIS, D.M. SILVA, A.R. OLIVEIRA, A.S. COSTA, *Summa Phytopathol.* 1, 267-275 (1975).

JONES DR (2003) Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* 109: 195-219.

KEESE, P., AND GIBBS, A. (1993). Plant viruses: Master explorers of evolutionary space. *Curr. Opin. Gent. Dev.* 3, 873-877.

LOURENÇÃO AL, NAGAI H, 1994. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo, *Bragantia* 53, 53-9.

MELO, P.C.T. Whitefly threatens vegetable crops. [s.l.]: Asgrow do Brasil sementes Ltda, 1992.

MONCI F, SÁNCHEZ-CAMPOS S, NAVAS-CASTILLO J, MORIONES E (2002) A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology* 303: 317-326.

MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, p.56-65, Apr.1990.

RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVICIUS, L.P; ÁVILA, A. C.; BEZERRA, I.C; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, MF.; MELLO, R.N.; ROCHA, H.G.C.; ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting geminiviruses in Brazil. *Archives of virology*, New York, v. 8, p. 281-295, Nov. 2003.

ROJAS MR, GILBERTSON RL, RUSSEL DR, MAXWELL DP (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis* 77: 340-347.

ROJAS MR, HAGEN C, LUCAS WJ, GILBERTSON RL (2005) Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu Rev Phytopathol* 43: 361-394.

ROOSSINK MJ (1997) Mechanisms of plant virus evolution. *Annu rev Phytopathol* 35; 191-209.

RUBINSTEINS G, CZOSNEK H (1997) Long-term association of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: Effect on the insect transmission capacity, longevity, and fecundity. J Gen Viol 78: 2683-2689.

STADEN R, JUDGE DP, BONFIELD JK (2003) Managing sequencing projects in the GAP4 environment. In: KRAWETZ SA, WOMBLE DD (ed) Introduction to Bioinformatics. A Theoretical and practical approach. Human Press Inc, Totawa.

STANLEY J (1991) The molecular determinants of geminivirus pathogenicity. Semin Virol 2; 139-149.

SAMBROOK, J. et al. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2 ed. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

UMAHARAM P, PADIDAM M, PHELPS RH, BEACHY RN, FAUQUET CM (1998) Distribution and diversity of geminivirus in Trinidad and Tobago, Phytopathology 88; 1262-1268.

FAO, United Nations, Food and Agriculture Organization, FAOStat database (june 2011). Disponível em : <<http://www.ers.usda.gov/publications/vgs/tables/world.pdf>> Acesso em: 14 de março de 2012.