

**IDENTIFICAÇÃO DE BEGOMOVIRUS EM TOMATEIRO NA
SERRA DA IBIAPABA, CE E CARACTERIZAÇÃO DE UM
ISOLADO OBTIDO DE *Macrottilium lathyroides***

JOAQUIM TORRES FILHO

**TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA, COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZ

2002

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos à obtenção do Grau de Doutor em Agronomia com área de concentração em Fitotecnia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

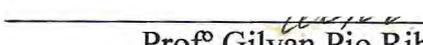
A citação de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.


Joaquim Torres Filho

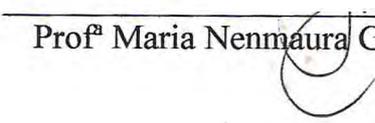
TESE APROVADA EM 25 /01/2002


Prof^o José Albérico de Araújo Lima, Ph.D.
Orientador da tese

Prof^o Abdelatif Kemalledine Benbadis, Ph.D.


Prof^o Gilvan Pio Ribeiro, Ph.D.

Francisco das Chagas Oliveira Freire, Ph.D.


Prof^a Maria Nenmaura Gomes Pessoa, Doutor.

“Não há problema algum em não saber quando não se tem conhecimento.

O problema está em não estar disposto a aprender.”

Benedetto Varchi

Joaquim Ferreira Torres (pai – in memoriam)

Francisca Angelim Oliveira Torres (mãe)

Enai de Sousa Torres (esposa)

Eduardo, Juliana, Ana Paula e Valeska (filhos)

Nicolas, Lucas, Leticia e Lillian (netos)

*Pelo carinho, apoio e compreensão de todos, essencial
para atingir os objetivos propostos.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

- A **DEUS**, por ter me proporcionado esta oportunidade;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pela concessão da bolsa de estudos;
- À **UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**;
- A minha **FAMÍLIA** pelo apoio e incentivo durante a realização do curso;
- Ao Prof^o **JOSÉ ALBÉRSIO A. LIMA**, pela amizade e por sua dedicação no ato de orientar, transformando o saber em conhecimento aplicável;
- À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Fitotecnia nas pessoas dos professores Francisco Ivaldo O. Melo (1998/1999) e Francisco José Alves Fernandes Távora (2000...), pelo apoio recebido;
- À Dra. Andréa M. Harness, da AGDIA, pelo fornecimento do kit de begomovírus e pelas análises das amostras de ácido nucléico;
- Aos professores A. BENBADIS, NENMAURA PESSOA e GILVAN PIO RIBEIRO e ao Dr. FREIRE pelas sugestões, correções do trabalho e participação na banca examinadora;
- Agradecimento especial ao Prof^o VÁLTER VIEIRA, pelo apoio recebido e sugestões apresentadas ao trabalho realizado;
- À equipe do Laboratório de Virologia Vegetal da UFC: Fátima, Shirley, Ana Cláudia, Cláudia Regina, Rosa, Najara e Marco pelo apoio e colaboração;
- Aos colegas de curso de um modo geral e em particular a Ana Ledo, Roselita, Luís Antônio, Roberto Cezar, Roberto Azevedo e Eduardo Nagao (fotos);
- Às Estufas Macapá na pessoa de Aliomar pela colaboração no experimento de campo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
NOMES DE VÍRUS E SIGLAS SEGUNDO O ICTV	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 – Aspectos da cultura do tomateiro e suas principais doenças	4
2.2 – Aspectos gerais da família <i>Geminiviridae</i>	6
2.3 – Avaliação de incidência e controle das begomoviroses	16
3 – MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 – Begomovírus em tomateiro	27
3.1.1 – Identificação por sorologia.	27
3.1.2 – Identificação por PCR.	28
3.1.3 – Avaliação da presença de begomovírus em tomateiro na Serra da Ibiapaba.	29
3.1.4 – Avaliação de begomovírus em tomateiro cultivado em estufa.	29
3.2 – Begomovírus em <i>Macroptilium lathyroides</i>	31
3.2.1 – Identificação por sorologia.	31
3.2.2 – Identificação por PCR.	32
3.2.3 – Transmissão por mosca-branca em casa de vegetação.	32
3.2.4 – Transmissão do begomovírus por enxertia	32
3.2.5 – Estudo de gama de hospedeiros.	33
3.3 – Hibridização do ácido nucléico.	33

4 – RESULTADOS	36
4.1 – Begomovírus em tomateiro	36
4.1.1 – Avaliação da presença de begomovírus na Serra da Ibiapaba	36
4.1.2 – Avaliação de begomovírus em tomateiro cultivado em estufa	38
4.2 – Begomovírus em <i>Macroptilium lathyroides</i>	45
4.2.1 – Identificação sorológica	45
4.2.2 – Identificação por PCR	45
4.2.3 – Transmissão por mosca-branca em casa de vegetação	45
4.2.4 – Transmissão de begomovírus por enxertia.....	48
4.2.5 – Estudo de gama de hospedeiros	48
4.3 – Hibridização de ácido nucléico	48
5 – DISCUSSÃO	54
5.1 – Begomovírus em tomateiro	54
5.2 – Begomovírus em <i>Macroptilium lathyroides</i>	57
6 – CONCLUSÕES	59
7 – BIBLIOGRAFIA	61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1– Áreas dos municípios da Serra da Ibiapaba no Estado do Ceará onde foi realizado o levantamento da incidência de begomovírus em tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	30
2– Planta de tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i>) apresentando sintomas de distorção foliar, encarquilhamento e enrolamento foliar ocasionados por begomovirus	36
3– Produtos da amplificação da reação de polimerase em cadeia de plantas de tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i>) cultivadas e de <i>Macroptilium lathyroides</i> com mosaico dourado	43
4– Vista de tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i>) cultivado em estufa, Guaraciaba do Norte, Ceará, 1999	44
5– Vista parcial de um campo com feijão-de-rola (<i>Macroptilium lathyroides</i>), no Sertão Central do Ceará, apresentando sintomas de mosaico dourado	46
6– Produtos da amplificação da reação de polimerase em cadeia	47
7– Planta de feijão-de-rola (<i>Macroptilium lathyroides</i>), mantida em casa de vegetação, inoculada por enxertia com begomovírus obtido de <i>M. lathyroides</i> , exibindo sintomas de mosaico dourado	51
8– Planta de matapasto (<i>Cassia tora</i>) cultivada em casa de vegetação, inoculada pela mosca-branca (<i>Bemisia argentifolii</i>) com begomovírus obtido de <i>Macroptilium lathyroides</i> , exibindo manchas cloróticas	52
9– Resultados de hibridização com sondas moleculares específicas para begomovírus	53

LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
1– Leituras de absorvância de ELISA indireto com anti-soro específico para <i>Macroptilium golden mosaic virus</i> (MaGMV), de amostras foliares de tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i>), coletadas de plantios comerciais de diferentes municípios da Serra da Ibiapaba, Ceará, 1999	37
2– Leituras de absorvância em ELISA indireto com anti-soro específico para <i>Macroptilium golden mosaic virus</i> (MaGMV), de amostras de plantas de tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i>) coletadas em plantios comerciais em diferentes distritos do município de Guaraciaba do Norte, Ceará, 1999	39
3– Leituras de absorvância em ELISA indireto com anti-soro específico para <i>Macroptilium golden mosaic virus</i> (MaGMV), de amostras de plantas de tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i>) coletadas em plantios comerciais em diferentes municípios da Serra da Ibiapaba, Ceará, 2000	40
4– Leituras de absorvância em ELISA indireto com anti-soro específico para <i>Macroptilium golden mosaic virus</i> (MaGMV), de amostras de plantas de tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i>) coletadas em plantios comerciais em diferentes municípios da Serra da Ibiapaba, Ceará, 2001	41
5– Leituras de absorvância em ELISA indireto com anti-soro específico para <i>Macroptilium golden mosaic virus</i> (MaGMV), de amostras de plantas de tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i>) da avaliação de begomovírus em estufa na Serra da Ibiapaba, Ceará, 1999	42
6– Reações sintomatológicas e resultados sorológicos com anti-soro específico para <i>Macroptilium golden mosaic virus</i> (MaGMV), de espécies vegetais submetidas a inoculação do begomovírus em casa de vegetação, Fortaleza, Ceará, 2000	50

NOMES DE VÍRUS E SIGLAS SEGUNDO O ICTV

SIGLA	NOME DO VÍRUS/FAMÍLIA/GÊNERO
ACMV	Vírus do mosaico africano da mandioca (<i>African cassava mosaic virus</i>) família <i>Geminiviridae</i> , gênero <i>Begomovirus</i> ;
BDMV	Vírus do mosaico do nanismo do feijão (<i>Bean dwarf mosaic virus</i>) família <i>Geminiviridae</i> , gênero <i>Begomovirus</i> ;
BGMV	Vírus do mosaico dourado do feijoeiro (<i>Bean golden mosaic virus</i>) família <i>Geminiviridae</i> , gênero <i>Begomovirus</i> ;
CdTV	Vírus do mosaico del Chino (<i>Chino del tomate virus</i>) família <i>Geminiviridae</i> , gênero <i>Begomovirus</i> ;
GRSV	Vírus da mancha anelar do amendoim (<i>Groundnut ringspot virus</i>) família <i>Bunyaviridae</i> , gênero <i>Tospovirus</i> ;
MaGMV	Vírus do mosaico dourado do <i>Macroptilium</i> (<i>Macroptilium golden mosaic virus</i>) família <i>Geminiviridae</i> , gênero <i>Begomovirus</i> ;
PVY	Vírus Y da batata (<i>Potato virus Y</i>) família <i>Potiviridae</i> , gênero <i>Potyvirus</i> ;
SLCV	Vírus do enrolamento foliar da abóbora (<i>Squash leaf curl virus</i>) família <i>Geminiviridae</i> , gênero <i>Begomovirus</i> ;
TBLYV	Vírus do amarelo baixeiro do tomateiro (<i>Tomato bottom leaf yellow virus</i>) família <i>Luteoviridae</i> ; gênero <i>Luteovirus</i> ;
TGMV	Vírus do mosaico dourado do tomateiro (<i>Tomato golden mosaic virus</i>) família <i>Geminiviridae</i> , gênero <i>Begomovirus</i> ;
ToLCV	Vírus do enrolamento foliar do tomateiro (<i>Tomato leaf curl virus</i>) família <i>Geminiviridae</i> , gênero <i>Begomovirus</i> ;
TMV	Vírus do mosaico do fumo (<i>Tobacco mosaic virus</i>) gênero <i>Tobamovirus</i> ;

- ToMoV** Vírus do mosqueado do tomateiro (*Tomato mottle virus*) família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*;
- ToMV** Vírus do mosaico do tomateiro (*Tomato mosaic virus*) gênero *Tobamovirus*;
- ToYTV** Vírus do topo amarelo do tomateiro (*Tomato yellow top virus*) família *Luteoviridae*, gênero *Luteovirus*;
- TSWV** Vírus do vira-cabeça do tomateiro (*Tomato spotted wilt virus*) família *Bunyaviridae*, gênero *Tospovirus*;
- TYLCV** Vírus do enrolamento amarelo do tomateiro (*Tomato yellow leaf curl virus*) família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*;
- TYMV** Vírus do mosaico amarelo do tomateiro (*Tomato yellow mosaic virus*) gênero *Tymovirus*.

RESUMO

O tomate (*Lycopersicon esculentum*) é uma hortaliça de grande importância no Brasil. No Estado do Ceará, a Serra da Ibiapaba é a principal região produtora de frutos frescos. Desde 1999 os geminivírus transmitidos pela mosca-branca vêm ocasionado severos prejuízos à cultura do tomateiro. O objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar este geminivírus, avaliando sua distribuição e incidência em estufa.

Visitas de inspeção efetuadas no período de 1999 a 2001, em campos de produção de tomate em municípios da Serra da Ibiapaba revelaram a presença de plantas com sintomas de enrolamento e distorção foliar, encarquilhamento e redução no crescimento das folhas e das plantas. Amostras foliares coletadas de plantas de tomateiro com sintomas foram testadas por ELISA indireto contra anti-soro para o vírus do mosaico dourado do *Macroptilium* (*Macroptilium golden mosaic virus*, MaGMV), indicando a presença de um vírus da família *Geminiviridae* do gênero *Begomovirus*. Produtos de PCR com “primers” PAL1v 1978 e PAR 1c496 para componente de DNA A e “primers” PBL1v2040 e PCRC1 para componente de DNA B corresponderam respectivamente a fragmentos de 1,2 Kb e 0,50 Kb, confirmando ser o vírus do gênero *Begomovirus* da família *Geminiviridae*.

No estudo da incidência de begomovírus em tomateiro em estufa, o percentual de plantas infetadas com begomovírus no campo foi de 53,65% contra 7,31% em estufa, constituindo o cultivo em estufa uma ação para evitar prejuízos devido à infecção pelo begomovírus.

Paralelamente foram realizados estudos de um vírus da mesma família, que infeta feijão-de-rola (*Macroptilium lathyroides*), visando identificar, caracterizar e avaliar sua gama de hospedeiros através de inoculações por mosca-branca e por enxertia em casa de vegetação.

Estudos de sorologia, PCR e hibridização de ácido nucléico indicaram que o vírus encontrado infetando *M. lathyroides* no Ceará também pertence ao gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*, podendo tratar-se de uma estirpe da espécie MaGMV. Este begomovírus

foi transmitido naturalmente por mosca-branca em casa de vegetação, bem como por enxertia para plantas de *M. lathyroides*. Em estudo de gama de hospedeiro, a possível estirpe de MaGMV infetou as espécies *Canavalia ensiformis*, *Cassia tora*, *Macroptilium atropurpureum*, *M. lathyroides*, *Phaseolus lunatus* e *P. vulgaris*.

ABSTRACT

Tomato (*Lycopersicon esculentum*) is an important vegetable crop in Brazil and the Ibiapaba Mountain is the main producing area of fresh-market fruits in the State of Ceará, Brazil. The geminivirus transmitted by whitefly has been known as a pathogen that causes severe damage on tomato fields in Ceará since 1999. The objective of this work was to identify the virus and to evaluate its presence and distribution in tomato fields in the Region and in tomatoes cultivated inside greenhouse. Inspections conducted from 1999 to 2001 in tomato fields in Ibiapaba counties, revealed the presence of plants showing leaf curling, leaf rolling, reduction in leaf size and stunting. Leaf samples collected from tomato plants expressing these virus symptoms were tested by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against an antiserum prepared to *Macropodium golden mosaic virus* (MaGMV), indicating the presence of a virus species of the genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*. The PCR products with primers PAL1v 1978 and PARc 496, for DNA A component, corresponded to a fragment of approximately 1,2 Kb, and with primers PBL1v 2040 and PCR c1, for DNA B component, corresponded to a fragment of approximately 0,5 Kb, confirmed the presence of a virus species of the *Begomovirus* genus, family *Geminiviridae*. In the greenhouse, the percentage of tomato plants infected with begomovirus was 7,3% against 53,65% in the field, showing that growing tomatoes in greenhouse could be a good way to reduce begomovirus infection.

Studies were also carried out with a virus of the same family found in *Macropodium lathyroides* plants, with the objective to identify, characterize and evaluate its host range through whitefly and grafting inoculations in greenhouse. Serological, PCR and nucleic acid hybridization studies indicated that the virus infecting *M. lathyroides* found in Ceará also belongs to *Begomovirus* genus, family *Geminiviridae*. This begomovirus was naturally transmitted by whitefly and grafting in greenhouse to *M. lathyroides* plants. The host range studies revealed

that the begomovirus infected *Canavalia ensiformis*, *Cassia tora*, *Macropitilium atropurpureum*, *M. lathyroides*, *Phaseolus lunatus*, and *P. vulgaris*.

1 - INTRODUÇÃO

A agricultura sempre desempenhou um papel importante no desenvolvimento dos povos, sendo mais avançada nos países desenvolvidos, em decorrência das tecnologias aplicadas e das altas taxas de retorno econômico.

A contribuição da agricultura foi decisiva para o desenvolvimento econômico do Brasil na medida em que a produção de alimentos baratos para as populações urbanas, o suprimento de mão-de-obra para a indústria emergente e a geração de divisas por meio de exportações criaram capital para a industrialização, constituindo-se em plataforma de desenvolvimento (CONTINI, 1996).

No Estado do Ceará, a agricultura corresponde a menos de 6% do PIB, apesar de empregar quase 40% da força de trabalho, fato que revela seu baixo nível de produtividade (FUNCAP, 1999).

A cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) apresenta grande importância econômica para o Brasil, tendo sido introduzida por imigrantes europeus no final do século XIX (FILGUEIRA, 2000). O processamento industrial do tomate se constitui num dos segmentos mais importantes da agroindústria brasileira com negócios em torno de US\$682 milhões em 1997 (MELO, 1999).

No Ceará o cultivo de hortaliças merece destaque especial, sobretudo na microrregião da Ibiapaba, constituindo-se fonte geradora de emprego e renda, com destaque especial para a cultura do tomateiro. Apesar do crescimento da área cultivada com essa solanácea no Estado, a mesma não se fez acompanhar de uma base tecnológica que proporcionasse bons resultados de produção e produtividade.

Dentre os problemas identificados no **Plano de fomento à pesquisa e ao desenvolvimento tecnológico em agricultura irrigada no Ceará** (FUNCAP, 1999) estão a falta de estudos concernentes à previsão das potencialidades de surgimento de pragas e

doenças para as culturas instaladas e o monitoramento fitossanitário, enfatizando medidas de controle integrado.

No tocante ao aspecto fitossanitário, as doenças aparecem muitas vezes como fator limitante à produção de tomate, cabendo destaque especial às viroses. Com o surgimento da mosca-branca (*Bemisia argentifolii* Bellows & Perring), os vírus da família *Geminiviridae* gênero *Begomovirus* passaram a ocupar lugar de destaque, afetando culturas como feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), tomateiro, caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. sbsp. *unguiculata*], pimentão (*Capsicum annuum* L.) e soja [*Glycine max* (L.) Merrill] (FARIA *et al.*, 2000).

A princípio os begomovírus não pareciam causar maiores problemas mas, com o advento do processo de globalização, a troca de materiais tornou-se mais intensa, disseminando não só os vírus mas também os seus vetores de maneira que novas estirpes de begomovírus fossem aparecendo. Campos inteiros cultivados com tomateiro, algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) e mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) foram infetados com vírus deste grupo taxonômico, causando problemas sérios de doenças em pelo menos 39 nações (MOFFAT, 1999).

Na América tropical os begomovírus constituem o mais importante fator limitante para a produção de tomates na atualidade (POLSTON & ANDERSON, 1997). Amarelecimento, distorção foliar, enrugamento e redução de crescimento são os sintomas mais observados em plantas infetadas por begomovírus, em condições de campo. No Brasil os prejuízos ocasionados pelos begomovírus foram relatados por vários pesquisadores (RIBEIRO *et al.*, 1994; REZENDE *et al.*, 1996; ZERBINI *et al.*, 1996; BEZERRA *et al.*, 1997; LIMA *et al.*, 2000; FARIA *et al.*, 2000) e, nos últimos seis anos, muitas pesquisas têm sido conduzidas para identificar, caracterizar e recomendar medidas de controle. Vários isolados de begomovírus têm sido identificados, e toda atenção deve ser dada a possíveis hospedeiros selvagens dos mesmos, os quais na medida que infetam plantas de tomateiro possam dar origem a novas espécies com base em recombinação e/ou reagrupamentos de componentes genômicos (FARIA *et al.*, 2000).

Medidas de controle de begomovirose devem ser aplicadas dentro de uma visão sistêmica do ambiente, envolvendo não só a área alvo do plantio bem como as áreas

circunvizinhas. A identificação e caracterização de begomovírus, o estudo da gama de hospedeiros, de seus vetores e de outros métodos de transmissão, relacionamento sorológico, patogenicidade e a distribuição geográfica, constituem elementos importantes não só para definir espécies (BOS, 1999; BOS, 2000; GIBBS, 2000; VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000) como também para melhor conhecimento da epidemiologia dos mesmos.

No manejo das begomoviroses a prática mais utilizada tem sido o controle químico do inseto vetor, mas outras medidas devem ser aplicadas como: uso de mudas saudáveis, eliminação de hospedeiros alternativos da mosca-branca, eliminação de restos culturais, uso de cobertura morta com plástico, uso de cultivo protegido em estufa, uso de resistência genética, produção de mudas distante do local de plantio, evitar plantio seqüenciado, etc.

Com base na importância da cultura do tomateiro para o Estado do Ceará e nos prejuízos ocasionados por viroses, conduziu-se o presente trabalho com o objetivo de identificar o geminivírus encontrado infetando esta solanácea na Serra da Ibiapaba e avaliar seus graus de incidência em condições de campo e estufa. Paralelamente, foram realizados testes biológicos, sorológicos e moleculares visando caracterizar um isolado de begomovírus obtido de feijão-de-rola [*Macroptilium lathyroides* (L.) Urb.], coletado no Sertão Central.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Aspectos gerais da cultura do tomateiro e suas principais doenças

O tomateiro é uma dicotiledônea pertencente à família Solanaceae, originário da espécie andina silvestre – *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* Dun., que produz frutos tipo “cereja. É uma planta herbácea de caule flexível ramificado com flores amareladas em cachos, frutos vermelhos, podendo ser de crescimento determinado (industrial) e indeterminado (tomate de mesa), com 2,5 m de altura. A polpa do fruto é consumida *in natura*, na culinária doméstica, como componente de diversos temperos e saladas. Constitui matéria-prima para a indústria de sucos, para molhos, para massas em culinária e outros. Admite-se, também, seu uso medicinal (FILGUEIRA, 2000).

O centro de origem do tomateiro é um território estreito limitado ao norte pelo Equador, ao sul pelo norte do Chile, a oeste pelo oceano Pacífico e a leste pela Cordilheira dos Andes.”, sendo levado para o México, onde passou a ser cultivado e melhorado. Foi introduzido na Europa, através da Espanha entre 1523 e 1554 (FILGUEIRA, 2000).

O tomateiro industrial é uma das hortaliças de maior importância no Brasil. A área total cultivada com tomateiro industrial em 1997 foi de aproximadamente 20.000 ha, sendo cerca de 50% localizada na região de cerrados do Brasil Central: Goiás e Minas Gerais (BARBOSA, 1997).

As maiores produções concentram-se nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (ARGERICH *et al.*, 1996). A produção brasileira de tomate em 1988 foi de 2.754.670 t e na metade do ano de 1999 foi de 3.142.855 t, evidenciando seu crescimento em mais de 100% em uma década. O rendimento médio no Sudeste foi de 53,06 t/ha contra 30,28 no Nordeste, no ano de 1999. Em termos de área plantada, o Sudeste apresentou maior área com 31.193 ha, seguido do Nordeste e Centro-Oeste, com 14.804 e 11.126 ha

respectivamente (IBGE, 2000).

Segundo FARIA *et al.* (2000), o Brasil utiliza atualmente 60 mil hectares para o cultivo do tomateiro; desse total, 24 mil são cultivados com tomate industrial e o restante com tomate de mesa, atingindo a produção final o valor de 2,6 milhões de toneladas.

O tomate é rico em vitaminas e contém somente 30 calorias. Possui o licopeno, um beta-caroteno que pode proteger contra ataque cardíaco, câncer estomacal, do colo retal e da próstata no caso de homens (LINTON, 1998).

O tomateiro é uma cultura que está sujeita a ocorrência de doenças que podem, de uma hora para outra, se tornar fator limitante, destacando-se entre elas a requeima, causada por *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary, pinta-de-alternaria causada por *Alternaria solani* (Ell. & Martin) Jones & Grout, Murcha Fusariana [*Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* (Sacc) Snyder & Hansen], cancro bacteriano [*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.*], murcha bacteriana [*Ralstonia solanacearum* (Smith) Smith] e talo-ôco [*Erwinia carotovora* subsp. *Michiganensis* (Jones) Bergey *et al.*], que constituem doenças fúngicas e bacterianas de grande expressão econômica para a cultura, além da ocorrência da meloidoginose (*Meloidogyne* spp), que muitas vezes passa despercebida pelos agricultores.

As viroses representam um grupo de doenças de grande importância. O vírus do vira-cabeça do tomateiro (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) família *Bunyaviridae*, gênero *Tospovirus*, e os vírus pertencentes à família *Geminiviridae* são responsáveis por grandes prejuízos para produtores de tomate de mesa, como também para processamento industrial (EMBRAPA: URL: <http://cnph.embrapa.com.br>)

Em algumas regiões as viroses chegam a constituir fator limitante à produção de tomate. O TSWV é responsável por uma das viroses mais importantes da cultura, acarretando grandes prejuízos econômicos (KUROZAWA & PAVAN, 1997). Os tospovírus encontram-se largamente distribuídos no mundo, ocasionando perdas severas em muitas culturas. São transmitidos por cerca de oito espécies de tripses de maneira circulativa, propagativa, e pouco se sabe sobre a relação inseto vetor x vírus no Brasil (ALMEIDA *et al.*, 1999).

CHAVES *et al.* (2000) identificaram, em São Paulo, plantas de tomateiro com

sintomas semelhantes aos causados por tospovirus, e os resultados, através de DAS-ELISA revelaram a etiologia ser devido a *Groundnut ringspot virus* (GRSV), família *Bunyaviridae*, gênero *Tospovirus*, constituindo esse o primeiro registro de ocorrência desse vírus em tomateiro no Estado de São Paulo.

LIMA (2001) cita que, embora a ocorrência de tospovírus no tomateiro na região do Vale do São Francisco tenha sido registrada em 1989, o surto da doença veio ocorrer em 1995, com perdas estimadas em 30% na cultura do tomateiro.

O mosaico ocasionado pelo vírus do mosaico do tomateiro (*Tomato mosaic virus*, ToMV), pertencente ao gênero *Tobamovirus*, ocorre mais no final do ciclo da cultura e sua transmissão ocorre através do contato da planta com mãos contaminadas, implementos agrícolas e sementes (KUROZAWA & PAVAN, 1997; FILGUEIRA, 2000).

Outro problema que afeta os plantios do tomateiro é o “mosaico Y”, também conhecido por risca, ocasionado pelo vírus Y da batata (*Potato virus Y*, PVY), pertencente à família *Potyviriidae*, gênero *Potyvirus*. Esse vírus apresenta gama de hospedeiros restrita aparentemente não sendo transmitido por semente e tendo os afídeos como principais vetores (KUROZAWA & PAVAN, 1997).

Duas viroses distintas no tomateiro são chamadas de amarelos: o topo amarelo e amarelo baixo, sendo a primeira ocasionada pelo vírus do topo amarelo do tomateiro (*Tomato yellow top virus*, ToYTV) família *Luteoviridae*, gênero *Luteovirus*, e a segunda pelo vírus do amarelo baixo do tomateiro (*Tomato bottom leaf yellow virus*, TBLYV), família *Luteoviridae*, gênero *Luteovirus*. O ToYTV causa mais prejuízo à produção, embora o TBLYV, quando atinge incidência elevada, afete o número e tamanho dos frutos (KUROZAWA & PAVAN, 1997).

2.2 – Aspectos gerais da família *Geminiviridae*

Os vírus que constituem a família *Geminiviridae* são considerados vírus emergentes, juntamente com os tospovírus, principalmente devido à explosão populacional de seus insetos vetores. No caso particular dos geminivírus, dois aspectos relevantes dão aos mesmos um

destaque especial, pois, além da importância econômica das geminiviroses nas várias regiões do planeta, alguns geminivírus têm servido de base para a realização de estudos da biologia molecular de plantas (FARIA & ZERBINI, 2000).

Segundo KOONIN & ILYINA (1992), existem inúmeras especulações sobre a origem dos geminivírus; a de maior aceitação aponta similaridades entre o mecanismo de círculo rolante utilizado na replicação de geminivírus, bacteriófagos e certos plasmídeos bacterianos. Um ponto que fortalece essa observação é que o promotor da proteína capsidial dos geminivírus é funcional em *Escherichia coli* (PETTY *et al.*, 1986).

A origem do nome geminivírus deve-se ao fato de os mesmos apresentarem capsídeo viral composto de dois icosaedros incompletos geminados, tendo sido a denominação proposta por HARRINSON *et al.* (1977). O genoma dos geminivírus é composto de DNA circular de hélice simples (ssDNA), cuja replicação ocorre no núcleo das células infetadas. A família *Geminiviridae* é a segunda mais numerosa entre os vírus de plantas, superada apenas pela família *Potyviridae* (FARIA & ZERBINI, 2000).

Os resultados de comparação da capa protéica de 22 geminivírus transmitidos pela mosca-branca revelaram a existência de três diferentes ramificações que não se relacionam pela espécie da planta hospedeira e se dividem em: (1) das Américas; (2) África e Oriente Médio e (3) Ásia e Austrália (RAMIREZ, 1997). Esses resultados sugerem que a capa protéica dos geminivírus transmitidos pela mosca-branca evoluiu por caminhos diferentes nessas três regiões e que estes se adaptaram livremente a novos hospedeiros em cada região. Para HONG & HARRISON (1995), os isolados de vírus que causam enfermidades similares nos diferentes continentes não estão relacionados, podendo ser reconhecidos como espécies diferentes.

Com os avanços na área da biologia molecular e da bioinformática, a taxonomia de vírus de plantas passou por uma completa revisão nos últimos dez anos. Essa reorganização no posicionamento taxonômico de diversos vírus levou ao reconhecimento de novas categorias taxonômicas, e à criação de famílias e ordens (RYBICKI, 2001).

O grupo Geminivirus foi estabelecido pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus - ICTV - em 1979 (MATTHEWS, 1979) e a ocorrência de vírus com genoma composto de dois componentes de DNA foi relatada por GOODMAN *et al.* (1977) para o vírus do

mosaico dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus*, BGMV) e confirmada por GOODMAN *et al.* (1980) e HABER *et al.* (1981).

A família *Geminiviridae* possui aproximadamente 67 espécies reconhecidas (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000) e cerca de 17 delas já foram relatadas afetando a cultura do tomateiro nas Américas (POLSTON & ANDERSON, 1997). De acordo com o VII relatório do ICTV (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000), a família *Geminiviridae* está dividida nos seguintes gêneros: *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus* e *Topocuvirus*. O gênero *Begomovirus* possui dois componentes e alguns isolados possuem apenas um, como é o caso do vírus do enrolamento amarelo do tomateiro (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV), enquanto os outros três gêneros possuem um componente genômico. Um debate sobre possíveis novas mudanças vem ocorrendo através da GeminiNet, devendo levar a novas modificações a curto e médio prazo (FAUQUET *et al.*, 2000).

Os vírus dos gêneros *Curtovirus*, *Mastrevirus* e *Topocuvirus* possuem como vetor as cigarrinhas (*Homoptera: Cicadellidae*) e *Auchenorrhyncha* (*Topocuvirus*), enquanto as moscas-brancas (*Bemisia tabaci* Genn. e *B. argentifolli*) constituem os vetores dos vírus do gênero *Begomovirus*.

Vírus pertencentes ao gênero *Mastrevirus* infetam espécies monocotiledôneas e os pertencentes aos demais gêneros infetam dicotiledôneas. O gênero *Begomovirus* inclui os vírus mais importantes em regiões tropicais e subtropicais como BGMV e TYLCV.

Por ser um grupo emergente de vírus, maior atenção deve ser dada à identificação correta das espécies de vírus nesta família (MORALES & ANDERSON, 2001). Segundo RYBICKI (2001), um bom exemplo é o caso do TYLCV e do TLCV que no VII Relatório do ICTV lista oito espécies de cada um desses vírus e, segundo o autor, todos deveriam ser classificados como membros da mesma espécie, pois atendem aos principais critérios que definem espécies de *Begomovirus*.

A evolução dos vírus da família *Geminiviridae* pode ocorrer por recombinação / rearranjo de componentes genômicos entre espécies (FARIA *et al.*, 2000). Segundo PADIDAM *et al.* (1999), a recombinação freqüente que gera diversidade entre begomovírus complica mais ainda a classificação dos mesmos. HOU & GILBERTSON (1996) demonstraram

experimentalmente in vivo eventos de recombinação em geminivírus, sugerindo um possível mecanismo adicional para a sua rápida evolução.

Na década de 90, o setor agrícola ficou marcado pela incidência da mosca-branca. Segundo POLSTON & ANDERSON (1997), desde o final dos anos 80, muitas áreas produtoras de tomate na Flórida, Caribe, México, América Central, Venezuela e Brasil sentiram os reflexos negativos das altas incidências do complexo mosca-branca-begomovírus, com graves conseqüências econômicas para as indústrias de tomate.

Registros da ocorrência dos begomovírus TYLCV e TLCV ocasionando prejuízos na produção de tomate foram feitos em países do mediterrâneo, África, Oriente Médio, Ásia e Austrália (KHEYR-POUR *et al.*, 1991; NAVOT *et al.*, 1992; DRY *et al.*, 1993; BEDFORD *et al.*, 1994; ROCHESTER *et al.*, 1994).

Os prejuízos causados pelos begomovírus em tomateiro são bastante elevados. Na República Dominicana estima-se que de 1989 a 1995 as perdas foram de U\$50 milhões (ALVAREZ & ABUD-ANTUN, 1995). Na Venezuela a área de produção de tomate foi reduzida em 50% devido às perdas causadas pelo vírus do mosaico amarelo do tomateiro (*Tomato yellow mosaic virus*, TYMV) (SALAS & MENDOZA, 1995). Na Flórida foram registradas incidências de 95% do vírus do mosqueado do tomateiro (*Tomato mottle virus*, ToMoV) em área produtoras de tomate (POLSTON *et al.*, 1993; POLSTON *et al.*, 1996). Foram registrados também na Flórida prejuízos devido à incidência de begomovírus em torno de U\$140 milhões (SHUSTER, 1992) e em Porto Rico de U\$40 milhões (BIRD *et al.*, 1995).

No Brasil os primeiros relatos da incidência de begomovirose no tomateiro datam do início da década de sessenta. FLORES *et al.* (1960) fizeram o primeiro relato de uma doença ocasionada por begomovírus em tomateiro, sendo o agente causal identificado como vírus do mosaico dourado do tomateiro (*Tomato golden mosaic virus*, TGMV) (MAYTIS *et al.*, 1975; COSTA, 1975). Dentre os registros posteriores realizados no Brasil, relatando a presença de begomovírus causando danos significativos ao tomateiro, destacam-se: Distrito Federal (RIBEIRO *et al.*, 1994), Minas Gerais (REZENDE *et al.*, 1996; ZERBINI *et al.*, 1996), São Paulo (SOUSA DIAS *et al.*, 1996), Bahia (RIBEIRO *et al.*, 1996), Pernambuco (BEZERRA *et al.*, 1997), Rio de Janeiro (GALVÃO *et al.*, 1998) e Ceará (LIMA *et al.*,

1999; LIMA *et al.*, 2000).

Estudos comparativos das seqüências genômicas de isolados de begomovírus do Distrito Federal, Minas Gerais e do Submédio do Vale do São Francisco revelaram a existência de grande variabilidade genética desses vírus associados à cultura do tomateiro no Brasil (RIBEIRO *et al.*, 1998), detectando-se seis diferentes espécies ainda não descritas. Os begomovírus identificados no Distrito Federal têm características similares aos que infetam dicotiledôneas, transmitidos por mosca-branca, descritos anteriormente nas Américas sendo, entretanto, diferentes do TYLCV e TLCV que ocorrem em outras regiões do mundo (EMBRAPA: URL: <http://www.cnph.embrapa.com.br>).

A emergência das begomoviroses nos anos 90 está intimamente associada ao aparecimento da nova espécie (biótipo B) de mosca-branca, *B. argentifolii* (BELLOWS JR. *et al.*, 1994). O biótipo B de *B. tabaci* foi observado primeiramente entre os anos de 1990 e 1991 em São Paulo, possivelmente introduzido da Europa pela importação de plantas ornamentais (MELO, 1992).

A mosca-branca está entre os principais grupos de insetos que transmitem vírus de plantas. Pode alcançar grandes densidades populacionais, especialmente quando o clima está quente e seco, o que favorece a disseminação de begomovírus. No Brasil, estudos realizados recentemente, evidenciaram a presença dos dois biótipos da mosca-branca, além de mais dois ecótipos, nos Estados do Ceará e Roraima, em plantas de couve (*Brassica oleracea* L.) e meloeiro (*Cucumis melo* L.) (A GRANJA URL: <http://www.agranja.com/edicoes/0007/rep.1.htm>). Adultos e ninfas de mosca-branca se alimentam da planta retirando a seiva elaborada a qual é rica em açúcares e também aminoácidos, contribuindo assim para a redução dos produtos da fotossíntese do vegetal. Afora os problemas de fitotoxicidade por ela induzido na planta, a transmissão de begomovírus é um problema de grandes proporções (STANSKY, 2000).

Quanto mais cedo o begomovírus infetar o tomateiro maiores serão os prejuízos. Existe uma relação matemática entre o tempo de aparecimento dos primeiros sintomas e a redução do número de frutos e da produção de plantas infetadas comparadas com plantas saudáveis. Plantas exibindo sintomas de TYLCV 33 dias após o transplante produziram 10% de

frutos a menos do que as plantas sadias. Aos 70 dias as perdas giraram em torno de 60% (STANSLY, 2000).

De acordo com LOURENÇO (1997), um bom exemplo de como o biótipo B da mosca-branca espalhou-se no Brasil é o caso de Pernambuco, onde dentro de pouco tempo após ser observada a mesma já atacava o meloeiro, a melancia [*Citrillus lanatus* (Thumb.) Matsum & Nakai] e o tomateiro.

Os begomovírus têm causado sérios prejuízos em culturas como o tomateiro, feijoeiro, cucurbitáceas, pimentão, algodão e mandioca em regiões tropicais e sub-tropicais de todo o mundo, constituindo-se em fator limitante à produção (POLSTON & ANDERSON, 1997). *Bemisia argentifolli* possui grande quantidade de plantas hospedeiras e elevada capacidade de dispersão quando comparada a populações de *B. tabaci* (BETHKE *et al.*, 1991; BEDFORD *et al.*, 1994). A grande habilidade para colonizar o tomateiro, muito embora nem sempre consiga se reproduzir bem no mesmo, contribui para o aumento da capacidade de *B. argentifolli* como vetor de begomovírus.

A sintomatologia ocasionada pelos begomovírus pode variar em função da espécie de vírus, suas estirpes, do hospedeiro, idade da planta e das condições ambientais. Os sintomas podem ser, mosaico amarelo brilhante, margem foliar clorótica, enrugamento, enrolamento foliar, distorção foliar, redução do tamanho da folha, abscisão das flores e nanismo (RIBEIRO *et al.*, 1994; REZENDE *et al.*, 1996; ZERBINI *et al.*, 1996; BEZERRA *et al.*, 1997).

O TYLCV quando incide precocemente em plantas de tomateiro, ocasiona prejuízos severos na produtividade e na qualidade dos frutos para o mercado. A queda de flores e presença de poucos frutos conduzem a baixos rendimentos da cultura. Plantas infetadas produzem frutos de pequeno tamanho que, às vezes, desprendem-se da planta (NITZANY, 1975; IOANNOU, 1985).

As alterações morfológicas que ocorrem na planta em decorrência da infecção de begomovírus, provocam mudanças em processos vitais da mesma, como redução da taxa fotossintética, redução da floração, paralisação do crescimento e conseqüentemente perdas na produção, principalmente se a infecção ocorrer nos estádios de desenvolvimento iniciais da cultura (LIMA, 2001).

O genoma dos vírus da família *Geminiviridae* é constituído por uma ou duas moléculas de DNA circular de hélice simples, dependendo do gênero envolvido. Os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* possuem, normalmente, genoma composto de dois componentes de DNA: DNA A e DNA B. O DNA A contém genes necessários para os processos de replicação e encapsidação viral, sendo que os dois componentes de DNA A e B são fundamentais para o desenvolvimento de infecções sistêmicas das plantas (TIMMERMANS *et al.*, 1994). Estes componentes apresentam similaridade apenas na região comum (RC) constituída por uma seqüência de aproximadamente 200 nucleotídeos. A homologia dessa região chega a 90% na seqüência de nucleotídeos e nela estão localizadas a origem de replicação e os promotores da síntese dos mRNAs virais (OROZCO & HANLEY-BOWDOIN *et al.*, 1996; LAZAROWITZ, 1992; LAZAROWITZ *et al.*, 1992; FONTES *et al.*, 1994b).

Os componentes genômicos A e B dos begomovírus somente são infecciosos em plantas quando ambos são derivados da mesma espécie. Resultados de estudos com TGMV e com o BGMV mostraram uma especificidade estrita entre seus componentes A e B (FONTES *et al.*, 1994a).

A proteína associada à replicação (REP) é a única proteína essencial ao processo de replicação do genoma dos begomovírus (ELMER *et al.*, 1988; HANLEY-BOWDOIN *et al.*, 1990). A proteína da capa protéica (CP) é de fundamental importância para a transmissão do vírus pelo inseto vetor (GARDINER *et al.*, 1988; AZZAM *et al.*, 1994). Resultados de pesquisa sugerem que a CP pode ser necessária para a movimentação sistêmica de begomovírus, desempenhando um papel auxiliar, estando a mesma associada ao acúmulo de ssDNA nas células infetadas (FARIA & ZERBINI, 2000).

Mutações na CP de begomovírus com dois componentes de DNA reduzem o acúmulo de ssDNA, embora os níveis ainda possam ser detectáveis (JEFREY *et al.*, 1996).

O produto do gene **trap** (“trans-activating protein”) codifica a proteína de transativação (TRAP) enquanto a proteína ativadora da transcrição (“Replication enhancer protein”, REN) que é codificada pelo gene **ren** (“replication enhancer gene”) constitui-se num fator de amplificação da replicação viral. Segundo SUNTER *et al.* (1990), quando a mesma encontra-se presente, o acúmulo de DNA viral é muito maior. O gene **mp** (“movement protein”)

codifica a proteína de movimento, a qual é responsável pelo movimento célula-a-célula.

Um ponto de grande importância é que o DNA B dos begomovírus contém os genes requeridos para movimento célula-a-célula e à longa distância, gama de hospedeiros e desenvolvimento de sintomas (TIMMERMANS *et al.* 1994; PALMER & RYBICKI, 1998). Por sua vez, a proteína codificada pelo gene C₄ nos vírus dos gêneros *Curtovirus* e *Begomovirus* com um componente, possui papel importante no desenvolvimento de sintomas (STANLEY & LATHAM, 1992; JUPIN *et al.* 1994).

Proteínas relacionadas à patogênese de plantas (PRs), aquelas induzidas durante o processo de patogênese, como chitinases, peroxidases e β - 1,3 - glucanases podem aumentar a resistência das plantas a algumas doenças. O complexo mosca-branca-begomovírus induz a produção dessas proteínas. MCKENZIE *et al.* (2000) compararam o efeito da indução de PR-proteínas pelo complexo do ToMoV com a mosca-branca no tomateiro. Os resultados obtidos mostraram que o complexo mosca-branca - ToMoV é um forte indutor na resposta de PR-proteínas do que o vetor por si só. Esse resultado é devido ao aumento na pressão de alimentação do inseto vetor virulífero e da interação do vírus com o hospedeiro.

Os begomovírus necessitam do sistema enzimático da planta hospedeira para seu processo replicativo, o qual ocorre no núcleo das células com a conversão do ssDNA em dsDNA (hélice dupla). O processo dessa conversão é, segundo NAGAR *et al.* (1995), dependente de fatores do hospedeiro. As partículas virais ficam agregadas ao núcleo (DAVIS & STANLEY, 1989) e algumas alterações ultraestruturais ocorrem tais como: hipertrofia e segregação do nucléolo em regiões granulares e reposicionamento da cromatina no caso de infetarem dicotiledôneas (KIM *et al.* 1978).

A forma replicativa (RF) constituída de um dsDNA intermediário serve como molde para síntese de novos ssDNA e para mRNAs virais (PALMER & RYBICKI, 1998). A localização dos begomovírus nas células do floema da planta pode estar relacionada à dificuldade de transmissão mecânica dos mesmos (WEGE *et al.*, 1994). A transmissão experimental com extrato de planta infetada por geminivírus é muito baixa. No entanto, o vírus pode ser transmitido por enxertia, não havendo transmissão pelo contato entre plantas, por semente e pelo pólen (BRUNT *et al.*, 1997).

A diagnose e a caracterização das espécies de begomovírus desempenham importante papel no desenvolvimento de estratégias de controle para as mesmas. A microscopia ótica permite a observação da presença de inclusões nucleares específicas (CHRISTIE *et al.*, 1986), enquanto que e a microscopia eletrônica possibilita a identificação de infecções por begomovírus, sem, contudo, ser possível distinguir espécies (FARIA *et al.*, 2000).

A sorologia pode ser utilizada na diagnose de begomovírus, muito embora a mesma não sirva para diferenciar espécies ou estirpes (ROBERTS *et al.*, 1984; CANCINO *et al.*, 1995). O teste “Enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) é o método mais recomendado para diagnose em larga escala devido à sensibilidade, simplicidade, rapidez e possibilidade de testar grande número de amostras. O sucesso do teste de ELISA – indireto dependerá, além de outros fatores, da qualidade do anti-soro produzido, do suporte físico utilizado, da preparação do conjugado, das padronizações quanto às concentrações adequadas dos reagentes e do extrato vegetal que contém o vírus (ZERBINI *et al.*, 2001).

Grande quantidade de amostras de tomateiro com sintomas de begomovírus no Estado do Ceará foram testadas por ELISA – indireto, com resultados bastante confiáveis (LIMA *et al.*, 2000). A grande limitação do uso de ELISA na diagnose de begomovírus é a dificuldade de obtenção de anti-soros policlonais ou monoclonais. (POLSTON & ANDERSON, 1997).

Com os avanços na área da biologia molecular, vários métodos têm contribuído para a detecção rápida e precisa de begomovírus. Uma das técnicas mais utilizadas é a reação de polimerase em cadeia (PCR), técnica extremamente sensível e adequada para detecção de geminivírus (RYBICKI & HUGHES, 1990; GILBERTSON *et al.*, 1991; POLSTON & ANDERSON, 1997; FARIA & MAXWELL, 1999). A técnica de PCR pode gerar grande quantidade de cópias de fragmentos de DNA, a partir do DNA genômico de um geminivírus (AUSUBEL *et al.*, 1992). Essa técnica consiste num processo cíclico, no qual a enzima DNA polimerase faz cópias de um DNA para o qual (“primers”) são delineados, sendo o número de cópias de DNA duplicado a cada ciclo (SAIKI *et al.*, 1985). O desenvolvimento de oligonucleotídeos universais (“primers”) para begomovírus, em muito contribuiu para o sucesso da técnica de PCR, estando os mesmos disponíveis comercialmente. Vários são os trabalhos

em que a reação da PCR foi utilizada com sucesso para detecção e diferenciação de geminivírus nas Américas, Caribe, África e Brasil (NAKHLA *et al.* 1994; PAPLOMATAS *et al.*, 1994; HARRINSON *et al.*, 1997; RIBEIRO *et al.*, 1998; IDRIS & BROWN, 1998), inclusive parte desta pesquisa já publicada (LIMA *et al.*, 2000). Outra técnica também utilizada para detecção de begomovírus é a hibridização com o uso de sondas moleculares (ROBINSON *et al.*, 1984; HARBER *et al.*, 1987; CZOSNEK *et al.*, 1988; NAVOT *et al.*, 1989; POLSTON *et al.*, 1989).

Na identificação e caracterização de espécies e estirpes de begomovírus, quando a seqüência genômica de dois isolados apresentar homologia maior que 90% da seqüência de aminoácidos da capa proteica, os mesmos podem ser considerados da mesma espécie (PADIDAM *et al.*, 1995).

De acordo com MAYO & PRINGLE (1998), os principais critérios taxonômicos para caracterizar uma nova espécie do gênero *Begomovirus* são: número de componentes e organização de genes no genoma, porcentagem de homologia da seqüência de nucleotídeos do DNA A (menor do que 90%), porcentagem de homologia da seqüência de aminoácidos do N – Terminal da proteína capsidial (menor do que 90%), formação de pseudorecombinantes, ausência de transcomplementação dos produtos gênicos, tecidos infetados pelos vírus, gama de hospedeiros e reação com certos anticorpos monoclonais.

Os begomovírus constituem hoje os agentes causais da virose de maior importância na cultura do tomateiro no Brasil. Em avaliações realizadas nos municípios de Guaraciaba do Norte, Ibiapina, São Benedito, Tianguá e Ubajara, no Estado do Ceará, (LIMA *et al.*, 2000) detectaram sintomas de distorção foliar, redução no tamanho da folha e nanismo causados por begomovírus, com diagnóstico sorológico confirmado em amostras foliares de 198 plantas. Em razão da alta incidência de plantas de tomateiro infetadas por begomovírus muitos horticultores da Região passaram a cultivar outras culturas, enquanto outros optaram pelo cultivo do tomateiro em estufa.

No Vale do São Francisco os prejuízos também têm sido grandes e levantamentos da incidência de begomovírus revelaram a presença de 60,2% de amostras infetadas de um total de 908 examinadas (LIMA *et al.*, 2001). Segundo ainda os mesmos autores, informações

das indústrias processadoras de tomate do Submédio do São Francisco, a área cultivada com tomateiro sofreu uma redução de 50% e a produtividade média ficou em torno de 30 t/ha.

Muitos begomovírus que infetam plantas daninhas têm sido parcialmente caracterizados incluindo o vírus do mosaico dourado do *Macroptilium* (*Macroptilium golden mosaic virus*, MaGMV) (RAMIREZ, 1997) e dois vírus isolados em relógio (*Sida rhombifolia* L.) (ABOUZID *et al.*, 1992; ABOUZID & HIEBERT, 1993, 1994).

LIMA *et al.* (1999) detectaram elevada população de plantas de *M. lathyroides* com mosaico dourado no Sertão Central do Estado do Ceará. Os resultados da PCR revelaram presença de fragmentos de DNA de 1,2 Kb com os “primers” PAL1v1978 e PAR1c496 para o componente A e fragmentos de 0,5 Kb por amplificação do DNA viral com os “primers” PBL1v2040 e PCR cl para o componente B, indicando existência de possível isolado do BGMV em *M. lathyroides* no Ceará.

2.3 – Avaliação de incidência e controle de begomoviroses

O controle de fitoviroses, por ser muito difícil e na maioria dos casos quase impossível, torna-se sempre um fator limitante a todo e qualquer cultivo agrícola, de maneira que o mesmo deve contemplar medidas integradas, pois o controle realizado de forma isolada não pode ser efetivo. Desse modo, a prevenção torna-se o meio mais adequado e eficaz, especialmente para as begomoviroses, desde que sejam observados o complexo begomovírus-mosca-branca e o hospedeiro juntamente com a interação entre eles existente.

As medidas de controle dos begomovírus devem obedecer a três estágios: (a) decréscimo da quantidade de inóculo pela eliminação de culturas velhas; (b) controle do inseto vetor utilizando métodos físicos, químicos ou biológicos aliados a algumas práticas culturais e (c) desenvolvimento de variedades resistentes ou tolerantes (PICÓ *et al.*, 1996).

No caso particular de begomovírus, o controle dos insetos vetores, além de representar um custo muito alto, visa apenas diminuir a população da mosca-branca com pouca redução da incidência dos vírus. Ações preventivas podem ser bem sucedidas com o emprego de medidas que visam o controle dos vetores. As alternativas de controle destes são

distintas daquelas que visam o controle de insetos na sua condição de pragas de plantas cultivadas. Segundo ainda o mesmo autor, a manutenção da população do inseto abaixo do nível de dano econômico, para o controle de pragas, será insuficiente para impedir a transmissão de vírus (COSTA 2001).

O tomateiro é a espécie cultivada mais sujeita à ocorrência de problemas sanitários. O controle de doenças e pragas nesta cultura é uma tarefa de grande complexidade que não comporta soluções ingênuas, nem deve ser tentado sem orientação agrônômica (FILGUEIRA, 2000).

No caso da República Dominicana, o governo impôs períodos em que o plantio do tomateiro era proibido, diminuindo assim a incidência de mosca-branca e do TYLCV (POLSTON & ANDERSON, 1997). O monitoramento do TYLCV em mosca-branca, através da PCR com “primers” específicos, demonstrou que a incidência desse begomovírus decresceu sensivelmente durante o período de ausência do hospedeiro, aumentando com o retorno do plantio do tomateiro. Pesquisas para identificar possíveis hospedeiros de TYLCV durante a ausência do plantio de tomateiro revelaram que muitas espécies selvagens infetadas não exibiam sintomas (SALATI *et al.*, 2001).

Um dos maiores problemas diz respeito ao uso de mudas contaminadas por vírus, as quais seguramente causarão prejuízos à cultura do tomateiro, além de servirem de fonte de inóculo. O controle do inseto vetor nos canteiros, aliado ao controle físico e químico, por certo diminuirá esses danos (IOANNOU, 1985; 1987). A sementeira deve localizar-se distante do local de plantio e ser protegida com telado ou tecido à prova de insetos (FARIA *et al.*, 2000).

Eliminação de fontes adjacentes de vírus como restos de culturas anteriores, hospedeiros silvestres ou cultivados, alternativos do vírus, constituem boa estratégia para diminuir o potencial de inóculo (PICÓ *et al.*, 1996). Períodos livres de plantio do tomateiro contribuem para o decréscimo da infecção viral (POLSTON & ANDERSON, 1997). O período livre de plantio cede espaço para o controle biológico natural devido a ausência do uso de inseticidas e a ausência de hospedeiros do inseto vetor e do vírus. Na República Dominicana suspendeu-se por 90 dias o plantio de tomateiro no verão, substituindo essa cultura pelo sorgo (*Sorghum vulgare* Pers) (STANSLEY, 2000).

O cultivo seqüenciado de uma cultura é um dos maiores desafios no tocante ao controle dos begomovírus. Se a cultura que serve como hospedeiro é plantada continuamente, isso faz com que não ocorra redução na população do inseto vetor nem do inóculo viral. Um período de descanso livre do plantio com a cultura torna-se necessário (STANSKY, 2000). Recomenda-se evitar o plantio de novos campos de tomateiro perto de campos velhos.

O uso de plantio intercalado com plantas armadilhas ou plantas repelentes, o uso de cobertura morta com plástico refletivo e colorido contribuem para diminuir prejuízos ocasionados pelo complexo mosca-branca-begomovírus (STANSKY, 2000). Cobertura morta utilizando plásticos que refletem luz ultravioleta tem proporcionado decréscimos na incidência da infecção viral no tomateiro por begomovírus (CSIZIWSZKY *et al.*, 1995). Segundo STANSKY (2000), o uso de plásticos refletivos constitui uma opção no controle da mosca-branca, principalmente durante os estágios iniciais de crescimento do tomateiro, muito embora essa prática ainda não tenha aceitação geral por parte dos agricultores.

Filmes plásticos de absorção de luz ultravioleta têm sido utilizados em sistema de plantio em túnel alto para retardar a infecção e diminuir a severidade dos sintomas (ANTIGNUS *et al.*, 1995). A cor amarela resultante do espectro e a luz ultravioleta, que repelem a mosca-branca, são utilizadas para o controle dos begomovírus.

O plástico prateado reflete a radiação ultravioleta de modo a impedir a visão que os insetos possam ter das plantas. Desta maneira, como o inseto vetor não entrará em contato com o hospedeiro, este ficará livre de possível infecção viral principalmente nos períodos iniciais após o transplante (STANSKY, 2000).

Em experimento realizado na Flórida, com a utilização de cobertura plástica, poucas moscas-brancas foram observadas em tratamento com o uso do plástico de cor prateada do que em coberturas com plásticos escuros, especialmente verde. Uma maior quantidade de adultos de mosca-branca foi encontrada em cobertura com plástico escuro. O peso médio dos frutos foi bem maior nas plantas que estavam com coberturas de cor prateada do que as que estavam com plástico verde e preto (STANSKY, 2000)

Outra medida que pode ser adotada é a utilização de culturas mais atrativas para mosca-branca, como cucurbitáceas e pimentão, as quais plantadas mais cedo do que o tomateiro,

podem atrair maior número de vetores do begomovírus, reduzindo assim a incidência no tomateiro (AL-MUSA, 1986; EL-SERWIY *et al.*, 1987).

O cultivo protegido de tomateiro em estufas é uma medida efetiva para o controle do complexo mosca-branca-begomovírus bastante utilizado em Israel com bons resultados (STANSLY, 2000). O cultivo protegido, com uso de malhas finas que impedem a passagem da mosca-branca em estufas, túneis baixos e casa de vegetação, constitui-se numa boa medida desde que contemple uma boa luminosidade e ventilação. O uso de telas normais combinado com o uso de inseticidas proporciona um bom controle (IOANNOU, 1987).

NUCIFORA (1994) utilizou dois tipos de anteparos biológicos, anti-vírus e anti-afídeo na proteção de portas e janelas da estufa, obtendo uma redução acima de 90% na incidência de infecção. Cultivo protegido sob plástico permitindo ventilação tem proporcionado efetivo controle para TYLCV (AL-MUSA, 1986; IOANNOU, 1987).

Segundo HARRISON (1985), o controle químico da mosca-branca é de difícil consecução, devido à migração da população de insetos de lavouras mais velhas para as mais novas, e devido à possibilidade de tornarem-se resistentes aos inseticidas. Um dos problemas verificados é que o produtor passa a utilizar sempre um produto até que a praga adquira resistência e, em consequência, ocorre um aumento na dosagem e na frequência de aplicação além da mistura de produtos. Como consequência, aumenta-se o custo de produção, a deterioração e a contaminação do ambiente (VILLAS BOAS *et al.*, 1997). Normalmente as ninfas e adultos da mosca-branca se localizam na face inferior das folhas do tomateiro, fato este que dificulta seu controle. A tendência dos agricultores é aumentar o número e frequência de aplicações, assim como utilizar diferentes tipos de inseticidas. Essas ações aumentam a pressão de seleção, favorecendo o surgimento de estirpes resistentes (HAJI *et al.*, 1996). Nos países de terceiro mundo a utilização dos inseticidas tem gerado o aparecimento de resistência nos insetos vetores, bem como o surgimento de grandes desequilíbrios ambientais (MEDEIROS, 2001).

Segundo GUERRA (1985), o aumento do número e da frequência de aplicações de produtos químicos vêm causando intoxicações nos aplicadores e a contaminação ambiental, pondo em risco a saúde dos consumidores pelos resíduos deixados nos alimentos.

O controle químico do inseto vetor é, em muitos casos, a medida mais utilizada, muito embora como registram CAHILL *et al.* (1996), resistência ao inseticida imidacloprid tenha sido observada. A eficiência dos inseticidas pode ser aumentada com o uso alternado de diferentes tipos em conjunto com reguladores de crescimento (SCHUSTER *et al.*, 1993).

Um ponto crítico diz respeito à baixa sensibilidade da mosca-branca aos inseticidas e a facilidade com que desenvolve resistência aos mesmos, além da presença de diferentes estágios do inseto na planta e de seu processo de migração para plantas vizinhas (AL-MUSA, 1986). Por ser a mosca-branca uma espécie que adquire resistência aos inseticidas com grande facilidade, BLEICHER & MELO (1998) sugerem que o controle seja feito com o uso alternado de inseticidas de grupos químicos diferentes, usando um mesmo produto no máximo duas vezes durante o ciclo da cultura, ao passo que os inseticidas reguladores de crescimento só deverão ser aplicados uma única vez.

Um bom programa de controle do complexo mosca-branca-begomovírus consiste na aplicação de inseticida sistêmico no solo para proteger o plantio mais cedo e utilizar reguladores de crescimento do inseto mais tarde para reduzir a reprodução da mosca-branca dentro do plantio (STANSKY, 2000). Uma das saídas para aumentar a eficiência do controle químico é a alternância de produtos e o uso adequado dos mesmos para controle do vetor nos estágios iniciais. Some-se a isto que o controle químico por si só não é efetivo, devendo o mesmo ser parte integrante de um conjunto de medidas de manejo integrado (SHARAF, 1986). Na fase vegetativa da cultura deve-se utilizar produtos de alta seletividade, seguidos daqueles de seletividade média, procurando-se sempre que possível, deixar os não seletivos para o final do ciclo da cultura (BLEICHER & JESUS, 1983).

No caso de aplicações por pulverizações visando adultos, os melhores produtos vêm sendo o thiamethoxan (250 WG, a 100 gpc/ha), o imidacloprid (200 SC, a 800 ml de p.c/ha) e o acetamiprid (20PS utilizado a 250 g de p.c/ha). Quando o controle é direcionado a ovos e ninfas do inseto recomenda-se o inseticida regulador de crescimento pyriproxyfen (100 CE), usado a 1.000 ml do p.c/ha (FARIA *et al.*, 2000).

A baixa dispersão do vírus em Dade e Palm Beach, nos Estados Unidos, em outono de 1997, foi devido possivelmente a aplicações de imidacloprid para o controle da

mosca-branca durante o transplante e a eliminação de plantas que exibiam sintomas da virose (POLSTON & McGOVERN, 1999). Segundo POLSTON & McGOVERN (1999), um ponto muito comum nas diversas regiões de ocorrência do complexo mosca-branca-begomovírus foi o aumento no uso de inseticidas, muitas vezes de forma dramática. Como consequência, a diminuição de áreas plantadas com tomateiro foi muito alta, levando a um aumento no preço do produto. Devido a esse fato, muitos produtores de tomate voltaram a plantar utilizando freqüentes aplicações de inseticidas. Na Flórida, alta incidência de geminivírus foi detectada em anos anteriores apesar do uso freqüente de inseticidas, chegando até sete aplicações por semana (POLSTON *et al.*, 1994).

Alguns produtos não convencionais, como é o caso do detergente neutro e os óleos minerais e vegetais, são empregados no controle da mosca-branca. A concentração utilizada para os óleos varia de 0,5 a 0,8% e o detergente neutro normalmente é de 0,8%. O detergente deve ser intercalado ao inseticida, enquanto os óleos são aplicados preferencialmente junto com os inseticidas (BLEICHER & MELO, 1998).

Segundo FARIA *et al.* (2000), as medidas de controle deverão visar a eliminação ou a redução das fontes do vírus e da população de inseto vetor existente. Alguns fatores devem ser levados em consideração antes do plantio tais como: época da semeadura, população do vetor no local e nas cercanias, área do plantio, restos de culturas, hospedeiros alternativos, etc.

A incidência de begomoviroses bem como a severidade e dispersão dos vírus variam sazonalmente com a flutuação da população do vetor (COHEN *et al.*, 1988). A maior incidência verifica-se, principalmente, em períodos de alta temperatura e baixa umidade relativa, fatores que favorecem o desenvolvimento de populações da mosca-branca. Observa-se que na época das chuvas, a população de mosca-branca é bem menor, apresentando aumento nas épocas mais secas. Quando a temperatura aumenta, o incremento da população de mosca-branca e, conseqüentemente, de begomovírus, inviabiliza o cultivo comercial de muitos plantios de tomateiro. Além disso, é muito comum o abandono de plantios após o período da colheita, contribuindo deste modo para a formação de uma grande fonte de inóculo.

Segundo POLSTON *et al.* (1999), nos Estados Unidos, em um plantio de

tomateiro, os primeiros sintomas de begomovírus ocorreram quatro semanas após o transplântio. Nessa região a incidência da doença é baixa de setembro até janeiro, mas neste último mês ela começa a aumentar com o incremento da população de mosca-branca.

A incidência da mosca-branca como vetor de begomovírus pode ser reduzida pelo manejo de ambos nas áreas produtoras de mudas e nos plantios de tomateiro. A ocorrência desse inseto não é uniforme, variando durante épocas do ano, de maneira que, em determinados períodos, os problemas são menores.

O conhecimento de plantas que possam atuar como fonte de inóculo ou mesmo como reserva de vetor do vírus é de grande importância epidemiológica e serve para o manejo populacional do inseto vetor, principalmente em regiões produtoras de tomate.

Begomovírus não possuem gama de hospedeiros muito extensa em dicotiledôneas (HARRINSON, 1985; FRANCKI *et al.*, 1991). Algumas determinações das gamas de hospedeiros são realizadas através de inoculações do vírus em casa de vegetação. SANTOS *et al.* (1998) testaram 38 espécies vegetais com o objetivo de identificar hospedeiros de begomovírus isolado no DF. Os resultados da pesquisa indicaram que pimentão “Ikeda”, *Datura stramonium* L., *Nicandra physaloides* L., *Nicotiana benthamiana* Domin, *N. rustica* L., *Physalis floridana* L. e *Solanum tuberosum* L. batata ‘Monalisa’ compuseram a gama parcial de hospedeiros do isolado.

São encontrados registros de infecção do TYLCV em plantas das famílias Compositae, Leguminosae, Malvaceae, Solanaceae e Umbiliferae (COHEN & ANTIGNUS, 1994). Segundo COHEN *et al.* (1988), o TYLCV já foi encontrado em plantios de tomateiro, com pelo menos, duas espécies de plantas daninhas atuando como fonte biológica entre ciclos de produção do tomateiro em Israel. A infecção dessas plantas daninhas foi observada antes dos anos 80 e, inicialmente, acreditava-se que as mesmas serviam como fontes de infecção viral para plantas cultivadas nos anos 90.

Vários begomovírus que infetam o tomateiro podem também infetar o feijoeiro comum, pimentão, pimenta (*Capsicum frutescens* L.), batata e fumo (BROWN & NELSON, 1988; BROWN & PAULOS, 1990; McGOVERN *et al.*, 1994; FARIA *et al.*, 1997).

Um dos pontos de maior importância no estudo de begomovirose diz respeito à

correta identificação do vírus, a qual é fundamental para traçar medidas de controle e buscar fontes de resistência varietal. O controle das begomoviroses por meio da eliminação do inseto vetor, quando em condições de elevada população de mosca-branca é pouco eficiente, tornando-se o uso de cultivares resistentes uma boa alternativa (FERREIRA *et al.*, 1999).

Sendo a transmissão mecânica em geminivírus muito difícil e tendo em vista as dificuldades ou incompatibilidades encontradas no citado método para seleção de plantas resistentes a begomovírus, tem sido usado um sistema de gaiolas de tela fina, com adultos de mosca-branca e plantas de tomateiro infetada com begomovírus durante 48 h para aquisição do vírus. Em seguida, as moscas brancas virulíferas são transferidas para outras gaiolas com plantas das cultivares de tomateiro a serem avaliadas. Após 48 h de inoculação as plantas são incubadas por 28 dias em casa de vegetação. Nos testes de avaliação, três moscas-brancas virulíferas por planta foram o bastante para infetar plantas da cultivar “Viradoro”, confirmando a resistência de tomateiro linha ‘486-1’ em comparação com Viradoro (NAGATA *et al.*, 2001).

PICÓ *et al.* (1998) citam que a utilização de moscas-brancas infetadas em gaiolas à prova de insetos constitui uma boa metodologia para seleção de fontes de resistência ao TYLCV. Essa metodologia torna-se ainda mais eficiente quando acompanhada por técnicas biomoleculares como, por exemplo, a técnica da PCR (RYBICKI & HUGHES, 1990; GILBERTSON *et al.*, 1991).

O uso de fontes de resistência torna-se uma alternativa viável e níveis variados de resistência ao TYLCV têm sido encontrados em *Lycopersicon chezmanii* Riley, *L. chilense* Dunal, *L. hirsutum* Humb & Bonpl., *L. peruvianum* (L.) Mill e *L. pimpinellifolium* (L) Mill. (KASRAWI *et al.*, 1988; PILLOWSKY & COHEN, 1990; ZAKAY *et al.*, 1991; ZAMIR *et al.* 1994). Segundo PILLOWSKY & COHEN (1990) a maioria das cultivares com resistência ao TYLCV foi desenvolvida por meio de introgressão de genes de resistência oriundos de *L. peruvianum*.

Os programas de resistência varietal para viroses são baseados na introgressão de genes para resistência ou tolerância, os quais são encontrados em tomateiro selvagem, constituindo-se em verdadeiras fontes de reserva de resistência para muitos patógenos que

afetam esta solanácea (ESQUINAS-ALCAZAR & NUEZ, 1995).

Estudos de tolerância em *L. pimpinellifolium* “LA 121” ao TYLCV mostraram que se trata de uma herança com caráter monogênico com dominância parcial (PILLOWSKY & COHEN, 1974). *Lycopersicon pimpinellifolium* é o tipo selvagem mais utilizado em programas de melhoramento do tomateiro. Desde que não ocorra nenhuma barreira na hibridização entre espécies, o tamanho do fruto pode ser recuperado em poucos retrocruzamentos (ESQUINAS-ALCAZAR & NOEZ, 1995).

A tolerância ao TYLCV em acessos de *L. hirsutum* e *L. peruvianum* é realizada com presença de pêlos foliares ou por secreção e presença de substâncias químicas inibidoras da alimentação do vetor que reduzem o tempo de alimentação (MUNIYAPPA *et al.*, 1991; CHANNARAYAPPA *et al.*, 1992).

Resistência a TYLCV foi encontrada em *L. chilense* (ZAKAY *et al.*, 1991), com dominância parcial condicionada pelo gene **Ty-1** (ZAMIR *et al.*, 1994). Esses autores, por meio de seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), desenvolveram as linhagens quase isogênicas TY-52, homocigota para o alelo TY-1 e TY-50, suscetível ao begomovírus. A comparação das duas linhagens por meio de marcadores RFLP revelou que TY-52 possui aproximadamente 15.3 cM derivado de *L. chilense* (CHEAVEGATTI *et al.*, 2001).

Fontes de resistência a begomovírus com genoma bipartido foram identificadas em *L. peruvianum* ‘CNPH – 782’ ‘CNPH – 786’ e ‘CNPH – 787’ e em *L. chilense* ‘LA 1342’ (GIORDANO *et al.*, 1999). Alguns genótipos de tomateiro, tolerantes e/ou resistentes a begomovírus em outros países, estão sendo avaliados no Brasil. Dentre eles, “Gem Pride” e “Tyking” apresentaram bom nível de tolerância (FARIA *et al.*, 2000). O híbrido “Gem Pride”, de procedência americana, tem apresentado bom nível de tolerância ao begomovírus que ocorre em tomateiro no Submédio do Vale do São Francisco (LIMA, 2001).

Trabalhos conduzidos na avaliação de genótipos visando resistência a begomovírus por FERREIRA *et al.* (1999) revelaram que o mecanismo de tolerância observado nos genótipos mostra que não ocorre o desenvolvimento de sintomas mesmo que o DNA viral esteja presente. Essa resistência é devida ao gene **Ty-1** e não ocorre desenvolvimento de sintomas quando a inoculação tem a mosca-branca como vetor (MITCHELSON *et al.*, 1994).

O comportamento de algumas variedades foi estudado na Flórida durante os anos de 1999-2000 em experimentos conduzidos em condições de alta população da mosca-branca virulífera. Todos os materiais suscetíveis, “Leila”, “Sanibel” e “F1-47”, foram infetados precocemente e mostraram sintomas severos. Apenas uma variedade resistente mostrou sintomas e assim mesmo muito leve. A produção das variedades resistentes foi seis vezes superior a das suscetíveis (STANSLY, 2000).

As plantas transgênicas constituem um meio particularmente eficiente de proporcionar resistência a um ou mais patógenos. Recentemente, várias estratégias foram sendo utilizadas no sentido de produzir, via engenharia genética, resistência a vírus fitopatogênicos (LOMONOSSOFF, 1995). A possibilidade de se obter resistência a patógenos em plantas transgênicas que contêm seqüências genômicas derivadas do próprio patógeno foi inicialmente proposta por SANFORD & JOHNSON (1985). Essas estratégias são baseadas no conceito de que a introdução e expressão em plantas de seqüências virais pode interferir no ciclo de vida do vírus.

Uma estratégia bastante promissora encontra-se fundamentada na expressão do gene do capsídeo, a qual já foi aplicada com sucesso com mais de 40 vírus de RNA, pertencentes a, no mínimo, dez grupos taxonômicos distintos, infetantes de plantas dicotiledôneas e mais recentemente monocotiledôneas (FITCHEN & BEACHY, 1993; WILSON, 1993).

Segundo POWELL-ABEL *et al.* (1986), o primeiro caso de sucesso foi a expressão da CP do TMV em plantas de fumo, gerando linhagens resistentes ao TMV. Segundo estes mesmos autores, em geminivírus a expressão da capa protéica não tem apresentado resultados satisfatórios. Provavelmente isso se deve ao fato da CP não ser essencial à infecção e ao desenvolvimento de sintomas em plantas infetadas por geminivírus.

Outra estratégia baseia-se na expressão de um transcrito viral (RNA-mediated resistance), seja um transcrito senso traducionalmente inativo, seja um transcrito antisense (FITCHEN & BEACHY, 1993).

Plantas de fumo transformadas com DNA subgenômico do DNA B do begomovírus do mosaico da mandioca (*African cassava mosaic virus*, ACMV) desenvolveram sintomas menos severos do que as plantas não transformadas quando inoculadas com

ACMV (STANLEY *et al.*, 1990). Por sua vez, FREITAS-ASTUA *et al.* (2001) obtiveram plantas de fumo transformadas com resistência ao begomovírus TYLCV, com uma versão truncada do gene **rep**, responsável pela replicação deste vírus, as quais se apresentaram imunes ao mesmo. Essa imunidade foi observada nas sete linhagens testadas e foi independente do número de cópias do transgene. O mecanismo de resistência envolvido nas plantas transformadas com o gene **rep** de TYLCV é claramente do silenciamento gênico.

Partindo-se do princípio que os mecanismos de obtenção de plantas transgênicas resistentes a vírus baseados na introdução de uma informação genética derivada do vírus dentro do genoma do hospedeiro são bastante específicos, embora possam ser muito sólidos, novas alternativas estão surgindo nesse campo. Uma delas seria o uso de genes não virais para obtenção de plantas transgênicas resistentes. Uma das possíveis fontes desses genes seriam os próprios insetos vetores através de proteínas tipo receptoras, estabilizadoras ou componentes do sistema imune que apresentam afinidade por partículas virais (MEDEIROS, 2001).

Outra alternativa repousa no fato de que o reconhecimento de um patógeno por uma planta é determinado por alguns genes do hospedeiro, os genes PR (pathogenesis-related), os quais coordenam o desenvolvimento de uma resposta ativa no hospedeiro infetado (WHITHAM *et al.*, 1994).

O benefício agrônômico com o uso de plantas transgênicas resistentes a vírus, por certo, em muito contribuirá para a redução no uso de inseticidas destinados ao controle de insetos vetores, proporcionando assim a oportunidade de, a um só tempo, controlar a virose, que se constitui em fator limitante à produção, e otimizar a receita prevista em função do uso dessa tecnologia (LAUDE, 1996).

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Begomovírus em tomateiro

3.1.1 – Identificação por sorologia

Amostras foliares de tomateiro das variedades Santa Clara e Altair, tipo longa vida, coletadas em condições de campo e de estufa, foram testadas sorologicamente contra anti-soro específico para MaGMV, através da técnica de ELISA indireto (MOWAT & DAWSON, 1987).

Poços de placas de ELISA foram cobertos com 100 µl de extratos obtidos de folhas de plantas com sintomas e de folhas sadias usadas como testemunhas, preparados em uma solução tampão de carbonato pH 9,6, na proporção 1:10 (p/v) e incubados a 37 °C durante 1 h. Em seguida, foram realizadas três lavagens dos poços das placas, com PBS-Tween (0,8% de NaCl, 0,02% de KH_2PO_4 , 0,11% de Na_2HPO_4 , 0,02% de KCl e 0,05% de Tween-20), seguidos da adição de 100 µl do anti-soro correspondente, diluído na proporção de 1:2.000, previamente absorvido com extrato de tecido sadio. As placas foram incubadas novamente em estufa a 37 °C por 1 h e, na sequência, submetidas a outra série de três lavagens com PBS-Tween. Foram adicionados 100 µl de imunoglobulina (IgG) de cabra anti-IgG de coelho, conjugada à fosfatase alcalina, diluída na proporção 1:2.000 em tampão contendo 2% de polivinil pirrolidona, 0,2% de ovalbumina e 0,02% de azida de sódio. As placas foram novamente incubadas a 37 °C durante 1 h e, em seguida, lavadas três vezes com PBS-Tween. Finalmente, foram depositados nos poços das placas, 100 µl do substrato p-nitrofenil fosfato (Sigma N-9389), na concentração de 0,5 mg/ml dissolvido em tampão contendo 12% de dietanolamina e 0,25% de azida de sódio, pH 9,8. Decorridos 60 min, foi efetuada a leitura das placas no aparelho Labsystems Multiskam MS, utilizando-se o comprimento de onda de 405 nm. De acordo com os procedimentos adotados no Laboratório

de Virologia Vegetal da Universidade Federal do Ceará (UFC), foram consideradas positivas as reações cujos valores correspondiam ao dobro das médias das absorvâncias registradas para os extratos de plantas sadias, utilizadas como testemunhas (ALMEIDA, 2001).

A realização da absorção do anti-soro foi efetuada misturando-se 1,0 ml de anti-soro bruto com 20 ml do extrato obtido de planta sadia de *M. lathyroides* em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0. A preparação foi incubada a 37 °C por 2 h, seguido de centrifugação a 3.000 g por 10 min, na centrífuga 5415C “ependorf”. O precipitado foi descartado e o anti-soro foi utilizado no ELISA indireto.

3.1.2 – Identificação por PCR

Amostras de tecidos foliares de tomateiro, que reagiram com anti-soro para MaGMV, foram utilizadas para amplificação de DNA virais pela técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) através do uso de “primers” específicos para o begomovírus MaGMV. Pedacos de tecidos de 40 mg de folíolos jovens foram utilizados para extração do DNA total pelo método desenvolvido por DELLAPORTA *et al.* (1983), de acordo com a metodologia descrita por GILBERTSON *et al.* (1991). O DNA precipitado foi seco sob vácuo e ressuspenso em 100 µl de água Milli-Q estéril. Um microlitro do DNA extraído foi misturado com 45 µl do PCR SuperMix (Life Technologies), 2,0 µl de água Milli-Q estéril e 1,0 µl de cada um dos seguintes “primers” degenerados PAL1v1978 - 5’GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTLYCCNGT 3’ e PAR1c496 - 5’ AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG 3’ (ROJAS *et al.*, 1993) para amplificação do fragmento de DNA A do vírus do gênero *Begomovirus*. Para a amplificação do fragmento de DNA B foi utilizado o par de “primers” degenerados específicos para vírus do gênero *Begomovirus*: PBL1v2040 - 5’GCTCTGCAGCARTGRTCKATCTTCCATACA 3’ e PCRc1 - CTAGCTG CAGCATATTTACRARWA TGCCA 3’ (ROJAS *et al.*, 1993). A mistura de cada DNA extraído foi coberta com 50 µl de óleo mineral para evitar evaporação e os DNAs virais foram então amplificados no aparelho Mini Ciclo MJ Research, mediante o seguinte ciclo para o DNA A: 3 min a 94 °C para desnaturação do DNA, seguido de 35 ciclos de dissociação, anelamento e extensão do DNA de 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C e 3 min a 72 °C, com os “primers” PAL 1v1978 e PAR 1c496. Para a amplificação do fragmento

do DNA B, as amostras extraídas foram submetidas a desnaturação do DNA por 3 min a 94 °C e 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C e 3 min a 72 °C com os “primers” PBL 1v 2040 e PCRc1. Em ambos os casos, o tempo de extensão do DNA para o último ciclo foi aumentado para 5 min, após o qual a temperatura foi reduzida para 4 °C até a retirada das amostras. Os fragmentos de DNA amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de 1,0% de agarose, a 96 volts em um sistema horizontal GIBCO BRL durante 55 min. Em cada cavidade do gel foram aplicados 12 µl de uma mistura contendo 2 µl de DNA amplificado e 10 µl de “loading buffer” (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e glicerol 30%) utilizando-se TBE (Tris-borato – 45 µM EDTA 1 mM, pH 8,0) como tampão de corrida. Foram aplicados 6 µl de marcadores 1 Kb DNA ladder (BRL Life Technologies). O gel foi corado em brometo de etídio, visualizado e fotografado no aparelho BIO-RAD mini-transilluminator.

3.1.3 – Avaliação da presença de begomovírus em tomateiro na Serra da Ibiapaba

Áreas produtoras de tomateiro na Serra da Ibiapaba (FIGURA 1) foram visitadas a fim de se avaliar a presença e distribuição de begomovírus no período de 1999 a 2001. Foram visitados os municípios de Guaraciaba do Norte (maior produtor de tomate da região), São Benedito, Ubajara, Ibiapina e Tianguá, sendo escolhidas duas propriedades por município, onde se efetuou a coleta de amostras foliares de tomateiros que exibiam sintomas típicos de begomovirose em plantios conduzidos em sistema estaqueado, irrigação por mangueira e adubação convencional e em estufa.

No município de Guaraciaba do Norte foram coletadas amostras foliares de tomateiro em propriedades na sede do município e nos distritos de Sussuanha I e Suasunha II e na localidade de Macapá.

3.1.4 – Avaliação de begomovírus em tomateiro cultivado em estufa

Tendo em vista a incidência de begomovírus, comumente chamado de “frisa” pelos agricultores, alguns produtores de tomate iniciaram o cultivo em estufa para tentar escapar dos problemas ocasionados pelo complexo mosca-branca-begomovírus. A avaliação foi realizada no Distrito de Sussuanha, município de Guaraciaba do Norte, no

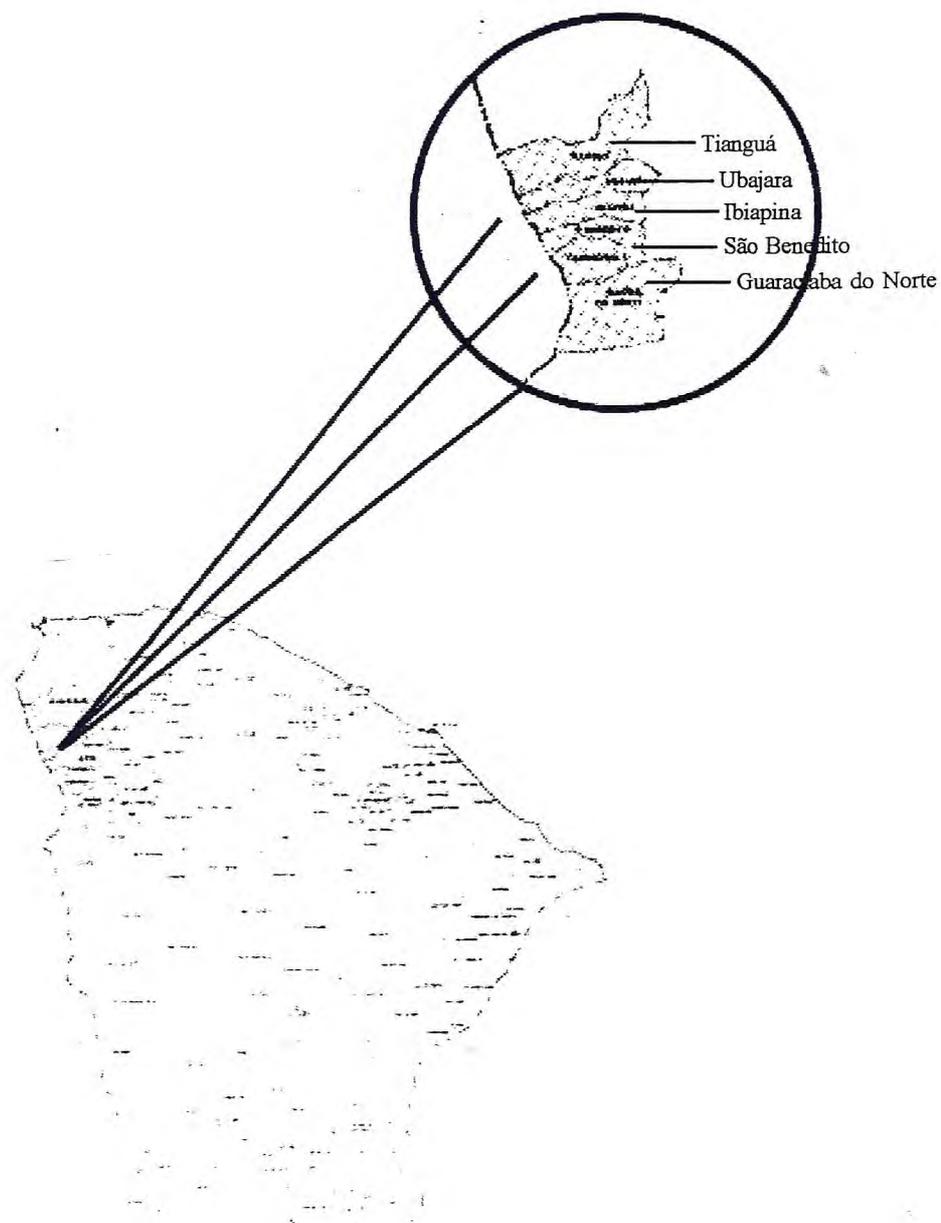


FIGURA 1 - Áreas dos municípios da Serra da Ibiapaba no Estado do Ceará onde foi realizado o levantamento da incidência de begomovírus em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*).

Estado do Ceará, de setembro a dezembro de 1999, na empresa “Estufas Macapá”, onde se comparou a incidência de begomovírus em tomateiros plantados no sistema convencional e em estufa. Durante o ciclo da cultura foram efetuadas três avaliações da incidência de vírus, mediante coleta de material aos 30, 60 e 90 dias após o transplante para exame laboratorial por ELISA e PCR. As amostras, em número de 20 por sistema (campo e estufa) e época de cultivo, foram coletadas aleatoriamente seguindo-se um sistema de coletas em zigue-zague, com intervalos de cinco passadas. Em seguida as amostras foram embaladas em sacos plásticos, devidamente identificadas, colocadas em caixa de isopor com gelo e conduzidas ao laboratório, para posterior indexação viral. Como testemunha utilizaram-se amostras foliares de plantas sadias mantidas em casa de vegetação. O híbrido de tomateiro cultivado foi “Altair” tipo longa vida, com mudas foram produzidas em estufa no sistema de bandeja. O plantio na estufa foi realizado em sacos de polietileno de 40 x 60 cm cada um com 10 l de areia grossa e 15 l de composto orgânico, para evitar ataques de *E. carotovora*, no espaçamento de 1,15 m entre linhas e 0,30 m entre plantas, com densidade de 1.120 plantas em 380 m² de estufa, sendo a planta conduzida apenas com uma haste e a fertirrigação foi realizada utilizando-se um gotejador (hidro-drip) por saco. O controle da mosca-branca foi realizado semanalmente com a utilização alternada de thiametoxam, thiobel e imidacloprid. Como adubo foliar foi aplicado a manipueira, subproduto da fabricação da farinha de mandioca, na proporção de 1:6 (uma parte de manipueira para seis partes d’água), semanalmente.

3.2 – Begomovírus em *Macrotium lathyroides*

3.2.1 – Identificação por sorologia

Amostras de *M. lathyroides* coletadas no Sertão Central do Ceará e cultivadas em casa de vegetação foram testadas sorologicamente contra anti-soro específico para MaGMV, através da técnica de ELISA indireto (MOWAT & DAWSON, 1987), conforme procedimento descrito.

3.2.2 – Identificação por PCR

Amostras de tecidos foliares de *M. lathyroides*, que reagiram com anti-soro para MaGMV foram utilizadas para amplificação de DNA virais pela técnica da PCR através do uso de “primers” específicos para MaGMV. Pedacos de tecidos de 40 mg de folíolos jovens foram utilizados para extração do DNA total pelo método desenvolvido por DELLAPORTA *et al.* (1983), com a amplificação por PCR desenvolvida de acordo com a metodologia descrita por GILBERTSON *et al.* (1991).

3. 2.3 – Transmissão por mosca-branca em casa de vegetação

A transmissão do begomovírus pela mosca-branca em casa de vegetação foi realizada com insetos adultos de *B. argentifolii*, os quais foram submetidos a um sistema de aquisição e de inoculação simultâneo do vírus, em plantas de *M. lathyroides* infetadas por begomovírus e plantas sadias, acondicionadas numa mesma gaiola. As plantas testadas foram cultivadas em vasos de plástico com capacidade para 2 Kg, contendo como substrato uma mistura de solo mais esterco bovino, esterilizada em autoclave à temperatura de 120 °C, durante 60 min. Foram utilizados três vasos contendo cada um quatro plantas de *M. lathyroides* sadias e um vaso com duas plantas infetadas, com um total de seis moscas/vaso.

Após as inoculações com mosca-branca, as plantas foram observadas diariamente, por um período de 25 a 30 dias, com relação ao aparecimento de sintomas típicos do vírus. Após esse período, amostras foliares devidamente identificadas foram testadas sorologicamente contra anti-soro específico para MaGMV, através da técnica de ELISA indireto. Em seguida, amostras foliares que reagiram no teste de ELISA foram utilizadas para detectar e identificar o vírus através da amplificação dos DNA virais pela técnica da PCR.

3. 2.4 – Transmissão do begomovírus por enxertia

A transmissão do begomovírus por enxertia foi avaliada a partir de plantas infetadas de *M. lathyroides* para *M. lathyroides* sadias em casa de vegetação. O método utilizado foi o da “encostia” em que os tecidos da região do caulículo, desprovidos da epiderme, tanto em plantas sadias como nas infetadas, foram unidos e envoltos por fitas plásticas. Foram utilizadas

quatro plantas infetadas e quatro sadias. Decorridos 30 dias, apareceram os primeiros sintomas e as amostras de tecidos foliares foram retiradas de cada planta e submetidas ao teste de ELISA indireto contra anti-soro específico para MaGMV. Em seguida, amostras de tecidos foliares que reagiram em ELISA indireto foram avaliadas por PCR.

3. 2.5 – Estudos de gama de hospedeiros

Os estudos de gama de hospedeiros para o begomovírus isolado de *M. lathyroides* foram conduzidos em regime de casa de vegetação, envolvendo as seguintes espécies vegetais: feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* DC.), matapasto (*Cassia tora* L.), siratro (*Macroptilium atropurpureum* DC.), fava (*Phaseolus lunatus* L) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), com um total de 16 plantas de cada espécie, sendo quatro plantas por vaso. As plantas foram submetidas ao processo de transmissão natural com moscas-brancas associadas a plantas infetadas de *M. lathyroides* seguida da inoculação simultânea do vírus nas espécies testadas na mesma gaiola.

As plantas foram mantidas sob observação por 30 dias, ao final dos quais foram submetidas ao teste de ELISA indireto contra anti-soro para MaGMV. Sub-amostras, cujos resultados foram positivos para ELISA indireto, foram submetidas à amplificação dos cDNA virais, pela técnica da PCR.

3.3 – Hibridização de ácido nucléico

Amostras de tecidos de plantas de tomateiro e de *M. lathyroides* infetadas por begomovírus e amostras de plantas sadias foram utilizadas para teste de hibridização de ácido nucléico com sondas moleculares específicas para begomovírus produzidas pela AGDIA. Foram utilizadas três amostras de cada espécie infetada e sadia, totalizando 12 amostras.

A remoção do filme protetor da membrana foi realizada de modo asséptico. Em seguida, pequenos pedaços de tecido foliar de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro de cada amostra foram depositados sobre a membrana e com o auxílio de eppendorfs esterilizados os pedaços de tecido foliar de cada amostra foram pressionados e macerados cuidadosamente.

A membrana contendo os extratos das amostras foi posta para secar e, depois de seca, acondicionada em caixa protetora e enviada para análise pela AGDIA em Indiana, EUA.

4 - RESULTADOS

4.1 – Begomovírus em tomateiro

4.1.1 – Avaliação da presença de begomovírus na Serra da Ibiapaba

As propriedades visitadas situavam-se na Zona Úmida, com precipitações pluviométricas com média de 1.200 mm/ano, temperatura média de 22 °C, mínima de 14 °C e máxima de 32 °C, com umidade relativa do ar de 80%, em média. O período chuvoso nessa região vai de dezembro até final de maio. Em Tianguá a produção de tomate concentra-se na Zona do “Carrasco”, em solos arenosos tipo AQd (Areia Quartzosa distrófica), com precipitações pluviométricas de 500 mm/ano e temperatura média de 28 °C. Os produtores visitados utilizavam o sistema tradicional de plantio de tomateiro estaqueado, com mudas produzidas em estufas, sendo a maioria irrigada com uso de mangueiras.

As plantas das hortas avaliadas apresentavam sintomas de mosaico, redução foliar, encarquilhamento, nanismo e enrolamento foliar (FIGURA 2), verificando-se em quase todos os locais visitados infestações de mosca-branca.

Os resultados da análise de amostras foliares de 298 plantas de tomateiro cv. Santa Clara tipo longa vida coletadas ao acaso em campo e estufa em 1999 (TABELA 1), revelaram resultados positivos em ELISA indireto para anti-soro específico para MaGMV, indicando, desta maneira, a presença de vírus do gênero *Begomovirus* em 234 plantas cultivadas em condições de campo, correspondendo a um percentual de 81,25% das amostras coletadas em condição de campo infetadas pelo vírus (TABELA 1). O índice de amostras coletadas no campo, com vírus variou de 46,6% (Ibiapina) a 96,5% (Ubajara), sendo que nenhuma das amostras de dez plantas coletadas em estufa no município de Guaraciaba do Norte, apresentou resultado positivo em ELISA (TABELA 1).

Resultados da avaliação de amostras foliares de hortas de tomateiro cv. Santa



FIGURA 2 - Planta de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) apresentando sintomas de distorção foliar, encarquilhamento e enrolamento foliar ocasionados por begomovirus. Guaraciaba do Norte, Ceará, 1999.

TABELA 1 – Leituras de absorvância de ELISA indireto com anti-soro específico para *Macroptilium golden mosaic virus* (MaGMV), de amostras foliares de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) coletadas de plantios comerciais de diferentes municípios da Serra da Ibiapaba, Ceará, 1999

Espécie – Município	Pl. test/Pl. vírus/% Pl. vírus*	ELISA – Absorvância**	
		Média	Amplitude
Tomateiro – Guaraciaba do Norte	145/115/(79,3%)	1,971	1,037 – 2,774
Tomateiro – Guaraciaba do Norte / Estufa	10/-(0%)	0,412	0,391 – 0,521
Tomateiro – Ibiapina	30/14/(46,6%).	1,732	1,497 – 2,149
Tomateiro – São Benedito	23/19/(82,6%)	1,695	0,967 – 2,240
Tomateiro – Tianguá	32/30/(93,7%)	1,570	1,204 – 2,129
Tomateiro – Ubajara	58/56/(96,5%)	2,098	0,947 – 3,418
Testemunhas			
<i>Macroptilium lathyroides</i> (Infetada)	10/10/(100%)	0,923	0,670 – 1,540
<i>Macroptilium lathyroides</i> (sadio)	10/-(0%)	0,316	0,283 – 0,478
Tomateiro sadio	10/-(0%)	0,453	0,315 – 0,518

* Numerador- número de plantas testadas; Denominador - número de plantas infetadas; % de plantas infetadas

** Leitura de absorvância realizada 60 min após a adição do substrato

Clara na sede, nos distritos de Sussuanha I, Sussuanha II e na localidade de Macapá no município de Guaraciaba do Norte, revelaram que de um total de 115 amostras testadas, 61 encontravam-se infetadas pelo begomovírus, correspondendo a 53,04% de amostras infetadas (TABELA 2). Neste município, o qual é responsável por 80% da produção de tomate da Ibiapaba, o índice de amostras coletadas no campo com vírus variou de 11,11% (sede do município) a 100% (Macapá).

Resultados de testes sorológicos com amostras foliares de 40 plantas, coletadas em 2000 revelaram a presença de begomovírus em 36 amostras, correspondendo a 90% de amostras com vírus, tendo o índice de amostras coletadas com vírus por município variado de 80% (Guaraciaba do Norte e Tianguá) a 100% (Ubajara e Ibiapina) (TABELA 3).

Em 2001, o índice de amostras com vírus por município, variou de 40% (Ibiapina) a 100% (Tianguá). Do total de 35 amostras coletadas, 74,2% (26 amostras) apresentaram resultados positivos nos testes de ELISA indireto para o anti-soro específico para o begomovírus MaGMV (TABELA 4).

A utilização dos primers PAL1v1978 e PAR1c496 desenvolvidos para o componente A do DNA de MaGMV, possibilitou a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 1,2 Kb (FIGURA 3A) para as amostras de tomateiro selecionadas dentre aquelas que reagiram com o anti-soro específico para MaGMV. Por outro lado, o uso dos primers PBL1v2040 e PCRC1 para MaGMV permitiu a amplificação de fragmentos de aproximadamente 0,50 Kb a partir das mesmas amostras foliares de tomateiro (FIGURA 3B).

4.1.2 – Avaliação de begomovírus em tomateiro cultivado em estufa

Por ocasião da primeira coleta, aos 30 dias após o transplântio, todas as amostras oriundas do cultivo convencional apresentavam os sintomas típicos de begomovírus, tendo os testes sorológicos confirmado as observações de campo, enquanto nenhuma das amostras coletadas em estufa (FIGURA 4) mostrou-se infetada (TABELA 5). Na avaliação aos 60 dias após o transplântio, de 20 amostras coletadas no campo, apenas duas reagiram positivamente contra anti-soro específico para MaGMV, e nenhuma das amostras coletadas na estufa apresentou infecção viral.

TABELA 2 – Leituras de absorvância em ELISA indireto com anti-soro específico para *Macrotidium golden mosaic virus* (MaGMV), de amostras de plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) coletadas em plantios comerciais em diferentes distritos do município de Guaraciaba do Norte, Ceará, 1999

Planta /Localidade	Pl. test/Pl. vírus/% Pl. vírus*	ELISA – Absorvância**	
		Média	Amplitude
Tomateiro / Sede	45/05/(11,11%)	2,022	0,747 – 3,383
Tomateiro / Sussuanha I	30/27/(90%)	1,438	0,835 – 2,970
Tomateiro / Macapá	10/10/(100%)	0,579	0,456 – 0,733
Tomateiro / Sussuanha II	30/19/(63,3%)	1,517	1,499 – 2,427
Tomateiro sem sintomas (testemunha)	06/-/(0%)	0,370	0,222 – 0,507

*Numerador- número de plantas testadas; Denominador - número de plantas infetadas; % de plantas infetadas

** Leitura de absorvância realizada 60 min após a adição do substrato

TABELA 3 – Leituras de absorvância em ELISA indireto com anti-soro específico para *Macropitilium golden mosaic virus* (MaGMV), de amostras de plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) coletadas em plantios comerciais em diferentes municípios da Serra da Ibiapaba, Ceará, 2000

Planta /Localidade	Pl. test/Pl. vírus/% Pl. vírus*	ELISA–Absorbância**	
		Média	Amplitude
Tomateiro / Guaraciaba	10/08/(80%)	0,659	0,520 – 0,861
Tomateiro / Ubajara	10/10/(100%)	0,905	0,490 – 1,377
Tomateiro / Tianguá	10/08/(80%)	0,738	0,533 – 1,174
Tomateiro / Ibiapina	10/10/(100%)	0,579	0,456 – 0,733
Tomateiro sem sintomas (testemunha)	05/-/(0%)	0,207	0,179 – 0,256

*Numerador- número de plantas testadas; Denominador - número de plantas infetadas; % de plantas infetadas

** Leitura de absorvância realizada 60 min após a adição do substrato

TABELA 4 – Leituras de absorvância em ELISA indireto com anti-soro específico para *Macrotidium golden mosaic virus* (MaGMV), de amostras de plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) coletadas em plantios comerciais em diferentes municípios da Serra da Ibiapaba, Ceará, 2001

Planta /Localidade	Pl. test/Pl. vírus/% Pl. vírus*	ELISA – Absorbância**	
		Média	Amplitude
Tomateiro / Guaraciaba	10/09/(90%)	1,451	1,119 - 1,787
Tomateiro / Ubajara	10/05/(50%)	1,255	1,045 - 1,493
Tomateiro / Tianguá	10/10/(100%)	1,691	1,004 - 1,563
Tomateiro / Ibiapina	05/02/(40%)	0,960	0,954 - 0,966
Tomateiro sem sintomas (testemunha)	05/-/(0%)	0,392	0,386 - 0,399

*Numerador- número de plantas testadas; Denominador - número de plantas infetadas; % de plantas infetadas

** Leitura de absorvância realizada 60 min após a adição do substrato

TABELA 5 – Leituras de absorbância em ELISA indireto com anti-soro específico para *Macrotidium golden mosaic virus* (MaGMV), de amostras de plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) da avaliação de begomovírus em estufa na Serra da Ibiapaba, Ceará, 1999

Dia de coleta / Sistema de cultivo de tomateiro	Pl. test/Pl. vírus/% Pl. vírus*	ELISA–Absorbância**	
		Média	Amplitude
30 dias após transplantio			
Campo	11/11/(100%)	1,398	0,747 –2,563
Estufa	11/-(0%)	0,761	0,524 –1,114
Sadio	05/-(0%)	0,428	0,293 –0,783
60 dias após transplantio			
Campo	20/2/(10%)	0,699	0,584 –1,112
Estufa	20/-(0%)	0,434	0,318 –0,567
Sadio	05/-(0%)	0,443	0,395 –0,523
90 dias após transplantio			
Campo	10/9/(90%)	2,528	0,502 –3,442
Estufa	10/3/(30%)	0,984	0,489 –1,480
Sadio	05/-(0%)	0,471	0,222 –0,676
Total	Total	Média	
Campo	41/22/(53,65%)	1,541	0,611 –2,372
Estufa	41/3/(7,31%)	0,726	0,433 –1,053
Sadio	15/-(0%)	0,445	0,270 –0,660

*Numerador- número de plantas testadas; Denominador - número de plantas infetadas; % de plantas infetadas

** Leitura de absorbância realizada 60 min após a adição do substrato

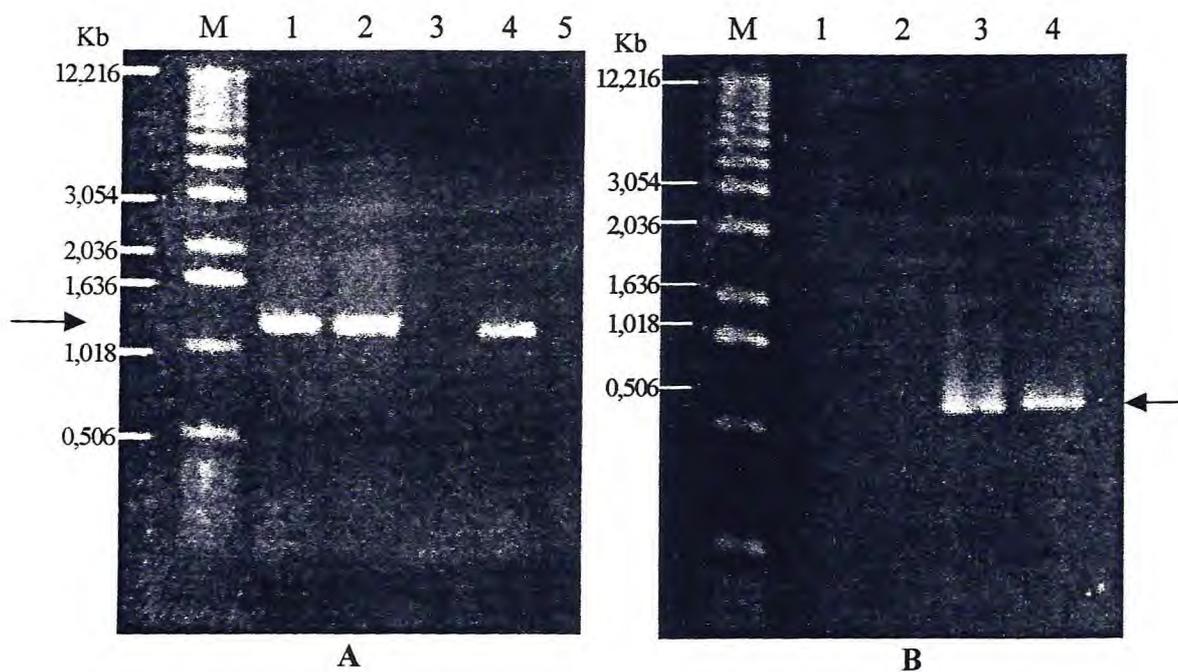


FIGURA 3 - Produtos da amplificação da reação de polimerase em cadeia de plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) cultivadas e de *Macroptilium lathyroides* com mosaico dourado. **A** - 1,2 Kb (seta), usando par de primers para o DNA A (PAL1v1978 e PAR1c496). M - marcador molecular de 1,0 Kb; 1 e 2 - tomateiro cultivado no campo; 3 - tomateiro sadio; 4 - *Macroptilium lathyroides* com mosaico dourado e 5 - *M. lathyroides* sadio; **B** - 0,5 Kb (seta), usando par de primers para o DNA B (PCRc1 e PBL1v2040). M - marcador molecular de 1,0 Kb; 1 e 2 - tomateiro sadio; 3 e 4 - tomateiro cultivado no campo com sintomas de begomovírus.



FIGURA 4 - Vista de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) cultivado em estufa, Guaraciaba do Norte, Ceará, 1999.

Na última avaliação aos 90 dias após o transplante, verificou-se que 90% das amostras foliares coletadas no campo estavam infetadas por begomovírus, contra 7,31% de amostras de tomateiro cultivado na estufa.

A avaliação final mostrou que das amostras submetidas ao teste de ELISA indireto, 53,65% das coletadas no campo encontravam-se infetadas pelo begomovírus contra 7,31% das amostras de tomateiro cultivado na estufa (TABELA 5). No campo, o controle da mosca-branca foi realizado com duas pulverizações semanais, enquanto na estufa, o controle resumiu-se a uma aplicação.

4.2 – Begomovírus em *Macroptilium lathyroides*

4.2.1 – Identificação sorológica

Teste de ELISA indireto contra anti-soro para MaGMV demonstrou que amostras de *M. lathyroides* com sintomas de mosaico dourado colhidas no campo (FIGURA 5) e cultivadas em casa de vegetação estavam infetadas por um begomovírus sorologicamente relacionado ao MaGMV.

Os resultados de leitura após 60 min da colocação do substrato revelaram uma média de absorção de 0,179 para plantas de *M. lathyroides* sadias, e uma variação de 0,652 a 0,926 para as que apresentaram sintoma de mosaico dourado.

4.2.2 – Identificação por PCR

A utilização dos primers PAL1v1978 e PAR1c496 para o componente de DNA A de MaGMV, possibilitou a amplificação de fragmento de aproximadamente 1,2 Kb (FIGURA 6), enquanto que os primers PBL1v2040 e PCRC1, para componente B de DNA de MaGMV possibilitaram a amplificação de fragmento em torno de 0,50 Kb (FIGURA 6).

4.2.3 – Transmissão por mosca-branca em casa de vegetação

Resultados de testes sorológicos confirmaram a transmissão da possível estirpe



FIGURA 5 – Vista parcial de um campo com feijão-de-rola (*Macroptilium lathyroides*) no Sertão Central do Ceará apresentando sintomas de mosaico dourado.

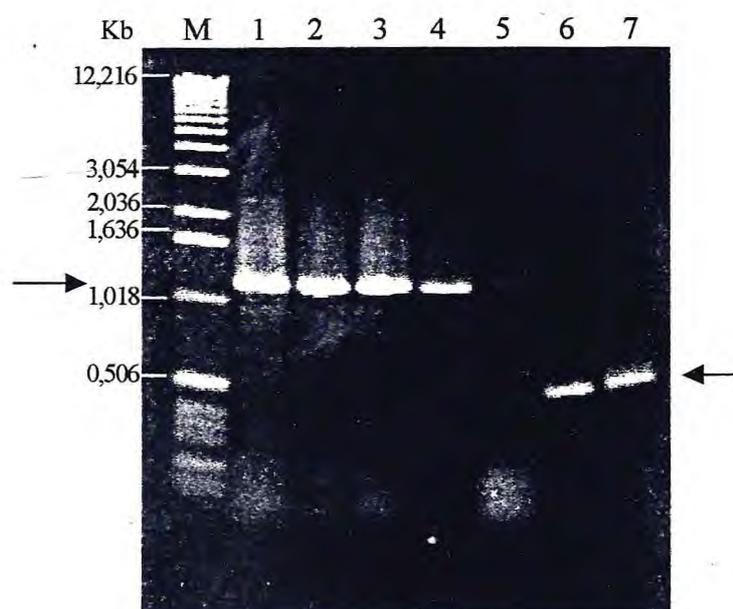


FIGURA 6 – Produtos da amplificação da reação de polimerase em cadeia. 1) *Canavalia ensiformis*; 2) *Macroptilium atropurpureum*; 3) *M. lathyroides*; 4) *Phaseolus vulgaris* e 5) *P. lunatus*, usando-se o par de primers para DNA A e de 6) *Cassia tora* e 7) *M. lathyroides* usando-se o par de primers de DNA B.

de MaGMV por mosca-branca em condições de gaiolas, em casa de vegetação. As amostras submetidas à técnica de PCR para detecção e identificação do begomovírus naturalmente transmitido em casa de vegetação confirmaram os resultados sorológicos.

4.2.4 – Transmissão de begomovírus por enxertia

Os resultados de teste sorológico com amostras foliares de *M. lathyroides*, inoculados por enxertia, mostram que o vírus foi transmitido por este processo a partir de plantas de *M. lathyroides* infetadas.

Sintomas de mosaico dourado (FIGURA 7) foram observados nas plantas submetidas a enxertia, sendo as observações sintomatológicas confirmadas por ELISA e pela técnica da PCR.

4.2.5 – Estudo de gama de hospedeiros

Amostras foliares de plantas de *C. ensiformis*, *C. tora*, *M. atropurpureum*, *P. lunatus* e *P. vulgaris* inoculadas com o begomovírus por mosca-branca apresentaram resultados positivos quando testados por ELISA indireto (TABELA 6), sendo que as espécies *C. ensiformis*, *P. lunatus* e *P. vulgaris* apresentaram os maiores índices de absorvância indicando a possibilidade de concentração viral mais elevada. Embora *C. tora* tenha exibido sintomas fracos (FIGURA 8), a mesma apresentou-se como hospedeiro alternativo em potencial, tendo em vista sua ampla distribuição no Nordeste, em razão da sua elevada resistência à seca.

A presença do vírus em *C. ensiformis*, *C. tora*, *M. atropurpureum*, *M. lathyroides*, *P. vulgaris* e *P. lunatus* foi confirmada pela técnica da PCR (FIGURA 6).

4.3 – Hibridização de ácido nucléico

Os resultados do processamento da membrana com sondas moleculares específicas para begomovírus foram positivos para duas amostras de *M. lathyroides* com sintomas de mosaico dourado e duas amostras de tomateiro com sintomas de begomovirose.

sendo que a intensidade da reação foi mais forte para uma delas (FIGURA 9). Não ocorreram reações com as amostras de plantas sadias (controle) de tomateiro e de *M. lathyroides*.

TABELA 6 – Reações sintomatológicas e resultados sorológicos com anti-soro específico para *Macroptilium golden mosaic virus* (MaGMV) de espécies vegetais submetidas a inoculação do begomovírus em casa de vegetação, Fortaleza, Ceará, 2000

Espécie Vegetal	Sintoma*	ELISA – Absorbância**
<i>Canavalia ensiformis</i>	Lc	1,556
<i>Cassia tora</i>	Df	0,466
<i>Phaseolus lunatus</i>	Lc	1,772
<i>P. vulgaris</i>	MI	1,387
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Lc	0,331
<i>M. lathyroides</i>	Md	0,837
<i>M. lathyroides</i> (sadio)	-	0,111

* Lc- lesão clorótica; Df- distorção foliar; MI- mosaico leve; Md- mosaico dourado

** Leitura de absorbância realizada 60 minutos depois da adição do substrato



FIGURA 7 – Planta de feijão-de-rola (*Macropitium lathyroides*), mantida em casa de vegetação, inoculada por enxertia com o begomovírus obtido de *M. lathyroides*, exibindo sintomas de mosaico dourado.



FIGURA 8 – Planta de matapasto (*Cassia tora*), cultivada em casa de vegetação, inoculada pela mosca-branca (*Bemisia argentifolii*) com begomovírus obtido de *Macroptilium lathyroides*, exibindo manchas cloróticas.

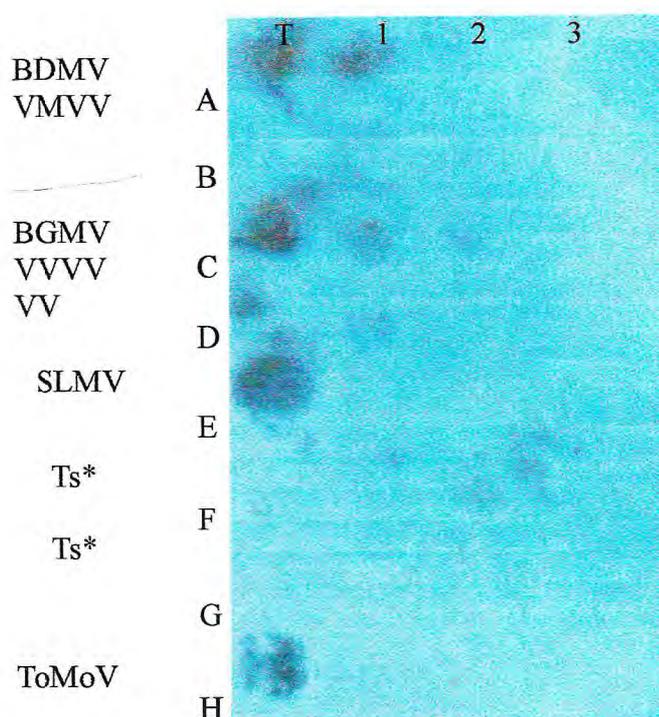


FIGURA 9 – Resultados de hibridização com sondas moleculares específicas para begomovírus.

Membrana com sondas moleculares específicas para begomovírus exibindo resultados positivos em A1, C1 e D1 (*Macroptilium lathyroides*) e C2, D2 e F2 (*Lycopersicon esculentum*). (T) testemunhas homólogas para os anti-soros dos respectivos begomovírus: BDMV – *Bean dwarf mosaic virus*; BGMV – *Bean golden mosaic virus*; SLQV – *Squash leaf curl virus*; ToMoV – *Tomato mottle virus*.

Ts* = Tomateiro sadio.

5 – DISCUSSÃO

5.1 – Begomovírus em tomateiro

Os resultados obtidos através da sorologia, PCR e hibridização de ácido nucléico indicam que o vírus constatado em tomateiro na Serra da Ibiapaba pertence ao gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*, a qual se constitui na segunda família mais numerosa entre os vírus de plantas (FARIA & ZERBINI 2000).

O uso da PCR para amplificação dos componentes de DNA A e B demonstrou ser o vírus encontrado infetando o tomateiro na Serra da Ibiapaba um begomovírus de genoma bipartite (MURPHY *et al.*, 1995; POLSTON & ANDERSON, 1997), diferente do encontrado na mesma região por LIMA *et al.* (2000) que possui apenas o componente de DNA A. Segundo RIBEIRO *et al.* (1998), existe uma grande variabilidade desses vírus associados à cultura do tomateiro no Brasil. Essa variabilidade pode ser devida a possíveis eventos de recombinação genômica entre os begomovírus (PADIDAM *et al.*, 1999; FARIA *et al.*, 2000; BROWN *et al.*, 2000).

Embora os primers utilizados tenham sido delineados para um isolado de MaGMV (ROJAS *et al.*, 1993), a região comum dos genomas dos begomovírus apresenta similaridades permitindo a detecção e a análise de espécie heteróloga pela PCR (NAVOT *et al.*, 1992). É importante observar os resultados de estudos conduzidos por FONTES *et al.* (1994a) com TGMV e com BGMV, os quais mostraram uma especificidade estrita entre os componentes de DNA A e B.

Nos plantios de tomateiro avaliados foram constatados sintomas de distorção foliar, encarquilhamento, redução foliar e nanismo que correspondem aos verificados por LIMA *et al.* (2000), muito embora a utilização dos mesmos para definir a identificação de um vírus sem antes analisar sua sequência genômica não constitui um procedimento recomendável (RYBICKI, 2000).

Observações realizadas por ocasião da coleta das amostras indicaram que os danos

ocasionados à planta pelo begomovírus tornavam-se maiores à medida que a infecção ocorria mais precocemente nas plantas de tomateiro, afetando tanto a produtividade como a qualidade dos frutos (NITZANY, 1975; IOANNOU, 1985).

Os levantamentos revelaram a presença do begomovírus em todos os municípios visitados. O município de Guaraciaba do Norte apresentou índices percentuais crescentes de amostras foliares de plantas com vírus no período de 1999 a 2001. Resultados obtidos em Guaraciaba do Norte apresentaram variações de 63,3% (Sussuanha II) a 100% (Macapá) de amostras foliares com vírus (TABELA 2). Neste município é muito comum o plantio escalonado, o qual é realizado no intuito de proporcionar produção constante, apesar do mesmo poder favorecer a proliferação de mosca-branca e, conseqüentemente, de begomovírus.

O município de Tianguá também apresentou elevados índices percentuais de amostras foliares com vírus, fator esse possivelmente condicionado pelos plantios localizado em áreas de “carrasco”, as quais apresentam sempre maiores populações de pragas quando comparadas com a zona úmida.

Outro fator que contribuiu muito para os valores assinalados é que dificilmente se faz rotação cultural, sendo o tomateiro plantado continuamente mantendo-se, assim, o potencial de inóculo, o qual, segundo PICÓ *et al.* (1996) e POLSTON & ANDERSON (1997) constitui fator essencial para elevar o grau de incidência de begomovírus no campo. Acresça-se que as pulverizações eram freqüentes e às vezes com a utilização de um mesmo produto seguidamente, fato este que pode induzir à seleção de resistência na população de mosca-branca ao inseticida, o que está de acordo com as colocações de AL-MUSA (1986) e SCHUSTER *et al.* (1993).

A amostragem realizada no ano 2000 (TABELA 3) demonstrou maior grau de incidência do vírus em Ubajara, onde se notou o despreparo dos agricultores para o manejo correto da doença, principalmente no tocante ao controle do inseto vetor, onde o uso de produtos químicos em sucessivas pulverizações pode ter contribuído para selecionar resistência (CAHILL, 1996; HAJI *et al.*, 1996; VILLAS BOAS *et al.*, 1997).

Em 2001 (TABELA 4) amostras coletadas em Tianguá apresentaram um maior percentual de plantas com vírus, devido ao fato de se diferenciar das outras localidades em termos climáticos durante a época do verão, período no qual a população da mosca-branca

aumenta substancialmente e, conseqüentemente, cresce a incidência de begomovírus. Tais observações estão em consonância com as assinaladas por COHEN *et al.* (1988).

Em decorrência dos danos provocados pela incidência de begomovírus (LIMA *et al.*, 2000), alguns horticultores dos municípios de Guaraciaba do Norte e Tianguá passaram a adotar a prática do cultivo protegido. O plantio em estufa teve como meta “tolerância zero” para com o complexo mosca-branca-begomovírus, baseado nas observações de COSTA (2001), em que ações preventivas, que visam o controle do vetor, são diferentes do controle do mesmo na condição de praga. Os resultados da avaliação do controle de begomovírus em estufa foram bastante satisfatórios, pois por ocasião da primeira leitura todas as amostras coletadas no campo apresentavam-se infetadas pelo begomovírus enquanto amostras coletadas na estufa encontravam-se sadias (TABELA 5). O período de 30 dias após o transplântio é de fundamental importância para que as plantas estejam livres de vírus sendo a constatação desse fato de primordial importância para o sucesso do cultivo protegido do tomateiro, garantindo uma boa produtividade, além de frutos de qualidade superior. STANSLY (2000) verificou que plantas que estavam infetadas por TYLCV aos 33 dias produziram 10% de frutos a menos do que as sadias.

Na avaliação final, o percentual de plantas infetadas com begomovírus no campo foi de 53,65% contra 7,31% em estufa.

O controle preventivo do inseto vetor com uma pulverização semanal, utilizando-se produtos alternados, mostrou-se uma medida eficiente, pois ao tempo que controlava o inseto vetor mantinha o equilíbrio biológico evitando, assim, uma possível seleção de resistência aos produtos utilizados.

O sistema de proteção utilizado em estufa, tela comum, proporcionou boa aeração às plantas, demonstrando ser eficiente no controle do complexo mosca-branca-begomovírus. É importante ressaltar que, embora malhas finas sejam recomendadas (AL-MUSA, 1986; IOANNOU, 1987; NUCIFORA, 1994), o uso das telas normais combinado com inseticidas também é utilizado.

Os resultados das avaliações da presença de begomovírus em tomateiro cultivado em estufa (FIGURA 4, TABELA 1 e 5) indicam que este sistema de plantio constitui uma boa medida para evitar infecção de begomovírus em tomateiro. Segundo STANSLY (2000), o culti-

vo protegido com estufas é uma medida efetiva para o complexo mosca-branca-begomovírus em Israel, devendo o mesmo ser acompanhado de controle do inseto vetor (AL-MUSA, 1986; IOANNOU, 1987).

5.2 – Begomovírus em *Macroptilium lathyroides*

Os resultados das amostras foliares de *M. lathyroides* com sintomas de mosaico dourado revelaram reação positiva contra anti-soro para MaGMV, com as amostras apresentando leituras de absorvância $A_{405\text{nm}}$ com valores de duas a cinco vezes ao da amostra sadia, indicando a presença de uma espécie de geminivírus do gênero *Begomovirus*. O mesmo anti-soro apresentou reação com alguns begomovírus de diferentes culturas (CANCINO *et al.* 1995).

Os sintomas observados em *M. lathyroides* eram bastante semelhantes aos ocasionados pelo MaGMV (RAMIREZ, 1997; LIMA *et al.* 1999). A utilização do teste de ELISA indireto, no presente caso, mostrou-se bastante útil para a identificação de begomovírus, muito embora a limitação da sorologia na identificação de begomovírus resida na dificuldade de obtenção de anti-soros monoclonais e policlonais (POLSTON & ANDERSON, 1997). Por outro lado, o relacionamento sorológico entre espécies do gênero *Begomovirus* possibilita a utilização de anti-soro policlonal obtido para uma espécie ser usado na detecção de outras que infetam diferentes culturas (MURPHY *et al.*, 1995).

Os resultados dos produtos da PCR de amostras de *M. lathyroides* revelaram a amplificação de um fragmento de DNA A de aproximadamente 1,2 Kb e de um fragmento de DNA B de cerca de 0,50 Kb. Resultados semelhantes foram obtidos por LIMA *et al.* (1999) a partir de plantas de *M. lathyroides* com mosaico dourado coletadas no Sertão Central do Estado do Ceará.

A identificação de begomovírus em plantas daninhas é um método eficaz para constatar ocorrências e contribuir para seu estudo e controle (CHRISTIE *et al.*, 1986). O MaGMV foi parcialmente caracterizado em *M. lathyroides* (ABOUZID *et al.*, 1992; ABOUZID & HIEBERT, 1993, 1994).

Além de confirmarem a presença de MaGMV em *M. lathyroides*, os resultados

desta pesquisa mostram a importância dessa planta como hospedeiro potencial de begomovírus no Estado do Ceará.

O estudo do modo de transmissão de um vírus é de fundamental importância para estudos em casa de vegetação e para o conhecimento epidemiológico de uma doença. No caso dos begomovírus, a transmissão mecânica é muito baixa e a transmissão natural pelo inseto vetor constitui um dos métodos mais simples para estudos em casa de vegetação (WEGE *et al.*, 1994).

Os produtos da amplificação dos componentes de DNA A e B do begomovírus transmitido naturalmente pelo inseto confirmaram a eficiência da metodologia de transmissão natural por mosca-branca virulífera em casa de vegetação, bem como mostraram o potencial das espécies, *C. ensiformis*, *C. tora*, *M. atropurpureum*, *M. lathyroides*, *P. lunatus* e *P. vulgaris* como fonte de vírus.

O estudo da transmissão de begomovírus por enxertia contribuiu para a caracterização do vírus. É sabido que a ausência de transmissão mecânica para alguns begomovírus estudados (FARIA & ZERBINI, 2000) dificultou muito o reconhecimento dos mesmos. A transmissão mecânica dos begomovírus é muito baixa, mas os mesmos se transmitem facilmente por enxertia (BRUNT *et al.*, 1996).

Resultados do estudo da gama de hospedeiros (TABELA 6) revelaram sintomas de manchas cloróticas e deformação foliar em *C. ensiformis*, mosaico dourado em *M. lathyroides* e pequenas pontuações cloróticas em *C. tora*. Como a transmissão mecânica em begomovírus é muito difícil (BRUNT *et al.*, 1996), a transmissão por enxertia se constitui numa excelente prática para estudar e caracterizar um begomovírus.

Os resultados obtidos através da hibridização dos ácidos nucléicos virais com sondas moleculares da AGDIA confirmaram os resultados obtidos por ELISA indireto e PCR para os begomovírus de *M. lathyroides* e *L. esculentum* no Laboratório de Virologia Vegetal da UFC, demonstrando que a hibridização é uma técnica altamente específica, precisa e que possibilita a detecção de concentrações baixas de ácido nucléico no extrato da planta (ZERBINI, 2001).

6 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta pesquisa em condições de campo, laboratório e casa de vegetação permitem as seguintes conclusões:

6.1 – Begomovírus em tomateiro

- a) O vírus constatado em tomateiro na Serra da Ibiapaba pertence ao gênero *Begomovirus*, da família *Geminiviridae*;
- b) O plantio de tomateiro em estufa, aliado ao controle preventivo da mosca-branca, poderá constituir uma boa alternativa para evitar prejuízos decorrentes da infecção de begomovírus;

6.2 – Begomovírus em *Macroptilium lathyroides*

- a) Estudos de sorologia, PCR e hibridização de ácido nucléico indicaram que o vírus que infeta *M. lathyroides* no Ceará pertence ao gênero *Begomovirus*, podendo tratar-se de uma estirpe da espécie MaGMV;
- b) Os testes de ELISA indireto revelaram estreito relacionamento sorológico entre o begomovírus de *M. lathyroides* com o begomovírus que infeta tomateiro na Serra da Ibiapaba;
- c) O estudo de transmissão do begomovírus em casa de vegetação comprovou ser a mosca-branca (*B. argentifolii*) eficiente para o estudo da gama de hospedeiros e da manutenção do vírus *in vivo*;
- d) As espécies vegetais: *C. ensiformis*, *C. tora*, *M. atropurpureum*, *M. lathyroides*, *P. lunatus* e *P. vulgaris* se constituem em importante hospedeiros de begomovírus, podendo contribuir para a sua epidemiologia e sobrevivência;

- e) A transmissão da possível estirpe do MaGMV por enxertia a partir de *M. lathyroides*, mostrou-se eficiente, contribuindo para os estudos de sua caracterização.

7 – BIBLIOGRAFIA

A GRANJA. A mosca-branca assusta produtores e pesquisadores. URL: <http://www.agranja.com/edicoes/0007/rep.1.htm>

ABOUZID, A. M & HIEBERT, E. A comparison of partial sequences from selected geminiviruses naturally infecting weeds and crops in Florida. In: Sweetpotato Whitefly: Supplement to the **Five Year National Research and Action Plan**, 1994. 22pp.

ABOUZID, A. M. & HIEBERT, E. A sequence comparison of selected geminiviruses naturally infecting weeds and crops in Florida. **Phytopathology** **83**:1425. 1993. (Abstract).

ABOUZID, A. M., HIEBERT, E. & STRANDBERG, J.O. Cloning, identification, and partial sequencing of the genomic components of a geminivirus infecting the Brassicaceae. **Phytopathology** **82**:1070. 1992. (Abstract).

ALMEIDA, A.C., NAGATA, T., RESENDE, R.O. & ÁVILA, A.C. de. Whole mount immunostaining: a technique to study virus infection in thrips vectors. **Fitopatologia Brasileira** **24**: 349. 1999. (Resumo).

ALMEIDA, A.M.R. **Deteção e quantificação de vírus pelo teste de ELISA**. In: Almeida, A.M.R & Lima, J.A.A. (Eds). **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Fortaleza, SBF, 2001. pp 63 -87.

AL-MUSA, A.M. Tomato yellow leaf curl virus in Jordan: Epidemiology and control. **Dirasat** **8**:199-208. 1986.

ALVAREZ, P.A. & ABUD-ANTÚN, A.J. Report de República Dominicana. **CEIBA** **36**:39-47. 1995.

ANTIGNUS, Y., BEM-JOSEPH, R., MOR, N. & COHEN, S. The use of UV absorbing films for protection of different crops against virus diseases vectored by *Bemisia tabaci*. **Phytoparasitica** **23**:3. 1995. (Abstract).

ARGERICH, C.A., MELO, P.C.T. & VALDERRAMA, L.A. Update on the agro-industry situation of processing tomatoes in South American countries. In: **Proceedings, 1^o International Conference on the Processing Tomato**, Recife, PE. 1996. pp.15-21.

AUSUBEL, F., BRENT, R., KINGSTON, R., MOORE, D., SIEDMAN, J.G., SMITH, J.A. & STRUHL, K. Current protocols in molecular Biology. New York, Greene Publisng. Vol. II. 15.1-15.7. 1992.

AZZAM, O, FRAZER, J., DE LA ROSA, D., BEAVER, J.S., AHLQUIST, P.G. & MAXWELL, D.P. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. **Virology** 204:289-296. 1994.

BARBOSA, V. The processing tomato growing system under tropical and subtropical conditions. The Brazilian experience. In: **International conference on the processing tomato**, 1. Recife. Proceeding. Alexandria. ASHS/IPA, 1997 pp.94-97.

BEDFORD, I.D., BRIDDON, R. W., BROWN, J.K., ROSELL, R.C. & MARKHAM, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gannadius) biotypes from different geographic regions. **Ann. Appl. Biol.** 125:311-325. 1994.

BELLOWS JR., T.S., PERRING, T.M., GILL, R.J. & HEADRICK, D.H. Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America** 87:195-206. 1994.

BETHKE, J.A, PAINE, T.D. & NUESSELY, G.S. Comparative biology, morphometrics, and development of two populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on cotton and poisettia. **Ann. Ent. Soc. Am.** 84:407-411. 1991.

BEZERRA, I.C., LIMA, M.F., RIBEIRO, S.G., GIORDANO, L.B., ZERBINI, F.M & ÁVILA, A.C. Occurrence of geminivirus in tomato producing areas in Submédio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira** 22:331. 1997. (Resumo).

BIRD, J., BROWN, J.K., SOSA, M. & NAZARIO, G.M. Reporte de Puerto Rico. **CEIBA** 36:37-38. 1995.

BLEICHER, E. & MELO, Q.M.S. **Manejo da mosca-branca *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring 1994**. Fortaleza: EMBRAPA / CNPA (Circular Técnica, 3). 1998. 15pp.

BLEICHER, E. & JESUS, F.M.M. de. **Manejo das pragas do algodoeiro herbáceo para o Nordeste do Brasil**. Campina Grande: EMBRAPA / CNPA, (Circular Técnica, 8).1983. 26p.

BOS, L. Structure and typography of virus names. **Arch. Virol.** **145**: 1505-1507. 2000.

BOS, L. The naming of viruses: an urgent call to order. **Arch. Virol.** **145**:631-636.1999.

BROWN, J.K. & NELSON, M.R. Transmission, host range, and virus-vector relationships of chino del tomate, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. **Plant Disease** **72**:866-869. 1988.

BROWN, J.K. & PAULOS, B.T. Serrano golden mosaic virus: A newly identified whitefly-transmitted geminivirus of pepper and tomato in the United States and Mexico. **Plant Disease** **74**:720-724. 1990.

BROWN, J.K., OSTROW, K.M., IDRIS, A.M. & STENGER, D.C. Chino del tomate virus: Relationships to other Begomovirus and identification of A-component variants that affect symptom expression. **Phytopathology** **90**:546-552. 2000.

BRUNT, A.A., CRABTREE, K., DALLWITZ, M.J., GIBBS, A.J., WATSON, L. & ZURCHER, E.J (Eds.) (1996 onwards). *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Version 16th. January 1997. URL <http://biology.anu.edu.au/groups/MES/vide>.

CAHILL. M., GORMAN, K., KAY, S. & DENHOLM, I. Baseline determination and detection of resistance to imidacloprid in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Bull. Entomol. Res** **86**:343-349. 1996.

CANCINO, M., ABOUZID, A.M., MORALES, F.J., PURCIFULL, D.E., POLSTON, J.E. & HIEBERT, E. Generation and characterization of three monoclonal antibodies useful in detecting and distinguishing bean golden mosaic virus isolates. **Phytopathology** **85**:484-490. 1995.

CHANNARAYAPPA, SHIVASHANKAR, G., MUNIYAPPA, V. & FRIST, R.H. Resistance of *Lycopersicon* species to *Bemisia tabaci*, a Tomato leaf curl virus vector. **Can. J. Bot.** **70**:2189-2192. 1992.

CHAVES, P.A.L.R., EIRAS, M., COLARICCIO, A., MOREIRA, S.R. & CHAGAS, C.M. Detecção do Groundnut ringspot vírus em jiló no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira** **25**:439. 2000. (Resumo).

- CHEAVEGATTI, A., GUIMARÃES, L.M.S., SOUSA, E.P., NEGREIROS, A.H.M. & BROMMONSCHENKEL, S.H. Saturação da região genômica do tomateiro que contém o gene TY-1, que confere resistência a geminivírus, com marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira** 26:528. 2001. (Resumo).
- CHRISTIE, R.G., KO, N.J., FALK, B.W., HIEBERT, E., LASTRA, R., BIRD, J. & KIM, K.S. Light microscopy of geminivirus-induced nuclear inclusion bodies. **Phytopathology** 76:124-126. 1986.
- COHEN, S. & ANTIGNUS, Y. Tomato yellow leaf curl virus, a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. **Adv. Dis. Vector Res.** 10:259-288. 1994.
- COHEN, S., KERN, J., HARPAZ, I. & BEM-JOSHEP, R., Epidemiological studies of the Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in the Jordan Valley, Israel. **Phytoparasitica** 16:259-270. 1988.
- CONTINI, E. Desempenho e rumos. **Revista de Política Agrícola.** 2: 61-63. 1996.
- COSTA, A.S. Increase in the population density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legume crops in Brazil. In: Bird, J. & Maramorosh, K. (Eds.) Tropical Disease of Legumes. **New York. Academic Press**, 1975. pp.27-49.
- COSTA, C.L. Métodos tradicionais de controle de viroses de plantas via controle de seus vetores. **Fitopatologia Brasileira** 26:251. 2001. (Resumo).
- CSIZINSZKY, A.A., SCHUSTER, D.J. & KRING, J.B. Color mulches influence yield and insect pest populations in tomatoes. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** 120:778-784. 1995.
- CZOSNEK, H., BER, R., NAVOT, N., ZAMIR, D., ANTIGNUS, Y. & COHEN, S. Detection of tomato leaf curl virus in lysates of plants and insects by hybridization with a viral DNA probe. **Plant Disease** 72:949-951. 1988.
- DAVIS, J.W. & STANLEY, J. Geminivirus genes and vectors. **Trends Genet.** 5:77-81. 1989.
- DELLAPORTA, S.L., WOOD, J. & HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: Version II. **Plant. Mol. Biol. Rep.** 1:19-21. 1983.
- DRY, I.B., RIGDEN, J.E., KRAKE, L.R., MULLINEAUX, P.M. & REZAIAN, M.A.

Nucleotide sequence and genome organization of tomato leaf curl geminivirus. **J. General Virology** **74**:147-151. 1993.

ELMER, J.S., BRAND, L., SUNTER, G., GARDINER, W., BISARO, D.M. & ROGERS, S.G. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus. II. The conserved AL1 ORF product is essential for replication. **Nucleic Acids Research** **16**:7043-7049. 1988.

EL-SERWIY, S.A., ALI, A.A. & RAZOKI, I.A. Effect of intercropping of some host plants with tomato on population density of tobacco whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) and the incidence of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plastic houses. **J. Agric. Water Resour. Res. Plant Prod.** **6**:71-79. 1987.

EMBRAPA.CNPH. Mosca-branca e as geminiviroses do tomateiro. URL:<http://www.cnph.embrapa.br/public/folders/foldmb.html>

ESQUINAS-ALCAZAR, J. & NUEZ, F. **Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate**. In: F. Nuez (Ed.) El cultivo del Tomate. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, 1995. pp.14-42.

FARIA, J.C. & MAXWELL, D.P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. **Phytopathology** **89**:262-268.1999.

FARIA, J.C., SOUZA-DIAS, J.A.C., SLACK, S.A. & MAXWELL, D.P. A new geminivirus associate with tomato in the State of São Paulo, Brazil. **Plant Disease** **81**:423. 1997.

FARIA, J.C. & ZERBINI, F.M. Família *Geminiviridae* – Taxonomia, Replicação e movimento. **RAPP** **8**:27-57.2000.

FARIA, J.C., BEZERRA, I.C., ZERBINI, F.M., RIBEIRO, S.G. & LIMA, M.F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira** **25**:125-137 2000.

FAUQUET, C.M., MAXWELL, D.P., GRONENBORN, B. & STANLEY, J. Revised proposal for naming geminiviruses. **Arch. Virol.** **145**:1743-61. 2000.

FERREIRA, P.T.O., BEZERRA, I.C., VILLAS BOAS, G.L., RIBEIRO, S.G. & GIORDANO, L.B. Avaliação de fontes de resistência a isolado de geminivírus com genoma bipartido transmitido por *Bemisia argentifolii* em *Lycopersicon* spp. **Fitopatologia Brasileira** **24**:131-135. 1999.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de Olericultura**. Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2000. 402pp.

FITCHEN, J.H. & BEACHY, R.N. Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. **Annu. Ver. Microbiol.** 47: 739-63. 1993.

FLORES, E., SILBERSCHIMIDT, K. & KRAMER, M. Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. **O Biológico** 26:65-69. 1960.

FONTES, E.P.B., GLADFELTER, H.J., SCHAFFER, R.L., PETTY, I.T.D. & HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origin have a modular organization. **Plant Cell** 6:405-416.1994b.

FONTES, E.P.B., GLADFELTER, H.J., SCHAFFER, R.L., PETTY, I.T.D., & HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. **Plant Cell** 4:597-608. 1994a.

FRANCKI, R.I.B., FAUQUET, C., KNUDSON, D.L. & BROWN, F., Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. **Arch. Virol. Suppl.** 2. 1991.

FREITAS-ASTUA, J., YANG, Y., POLSTON, J.E. & HIEBERT, E. Obtenção de plantas transgênicas de fumo resistentes aos **Begomovirus** ToMoV e TYLCV. **Fitopatologia Brasileira**. 26: 536. 2001. (Resumo).

FUNDAÇÃO CEARENSE DE AMPARO À PESQUISA. **Plano de fomento à pesquisa e ao desenvolvimento tecnológico em agricultura irrigada no Ceará**. Fortaleza. 1999. 29p.

GALVÃO, R.M., FERNANDES, A.V., ALMEIDA, J.D., ALFENAS, P.F., ANDRADE, E.C. & FONTES, E.P.B. Abstracts on the **2nd International Workshop on Bemisia and Geminiviral Diseases L-93**. 1998.

GARDINER, W., SUNTER, G., BRAND, L., ELMER, J.S., ROGERS, S.G. & BISARO, D.M. Genetics analysis of tomato golden mosaic virus: The coat protein is not required for systemic spread or symptom development. **EMBO Journal** 7:899-904. 1988.

GIBBS, A. J. Virus nomenclature descending into chaos. **Arch. Virol.** 145:1505-1507.2000.

GILBERTSON, R.L., HIDAYAT, S.H., MARTINEZ, R.T., LEONG, S.A, FARIA, J.C., MORALES, F.J. & MAXWELL, D.P. Differentiation of bean-infesting geminiviruses by nucleic acid hybridization probes and aspects of bean golden mosaic in Brazil. **Plant Disease** **75**:336-342. 1991.

GIORDANO, L.B., BEZERRA, I.C., FERREIRA, P.T.O, & BORGES NETO, C.R. Breeding tomatoes for resistance to whitefly transmitted geminivirus with bipartite genome in Brazil. In: **Worldwide Congress on the Processing Tomato, 3.**, Pamplona, Espanha. [Proceedings...] Pamplona: ISHS/AMITON/ AGRUCON, p.116. 1999. URL://www.actahort.org

GOODMAN, R.M., BIRD, J. & THONGMEEARKOM, P. An unusual viruslike particle associated with golden yellow mosaic of beans. **Phytopathology** **67**:37-42. 1977.

GOODMAN, R.M., SHOCK, T.L., BROWNING, K.S. & BOWES JR., G.R. The composition of bean golden mosaic virus and its single stranded DNA genome. **Virology** **106**:168-72. 1980.

GUERRA, M. de S. **Receituário caseiro: alternativas para o controle de pragas e doenças de plantas cultivadas e de seus produtos.** Brasília: EMBRATER (Informe Técnico, 7). 1985. 166pp.

HABER, S., IKEGAMI, M., BAJET, N.B. & GOODMAN, R.M. Evidence for a divide genome in Bean golden mosaic virus, a geminivirus. **Nature** **289**:324-326. 1981.

HAJI, F.N.P., ALENCAR, J. A. de & LIMA, M.F. **Mosca-branca: danos, importância econômica e medidas de controle.** Petrolina, PE: EMBRAPA/CPATSA, (Documento, 83). 1996. 9pp.

HANLEY-BOWDOIN, L., ELMER, J.S. & ROGERS, S.G. Expression of functional replication protein from tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **87**:1446-1450. 1990.

HARBER, S., POLSTON, J. & BIRD, J. The use of DNA to diagnose Plant Disease caused by single-stranded DNA plant viruses. **Canadian Journal of Plant Pathology** **9**:156-161. 1987.

HARRINSON, B.D. Advances in geminivirus research. **Annual Review of Phytopathology** **23**:55-82. 1985.

HARRINSON, B.D., BARKER, H., BOCK, D.R., GUTHERIE, E.J. & MEREDITH, M. Plant viruses with circular single-stranded DNA. **Nature** **270**:760-2. 1977.

HARRISON, B.D., LIU, Y.L., KHALID, S., HAMEED, S., OTIM-NAPE, G.W. & ROBINSON, D.J. Detection and relationships of cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan. **Annals of Applied Biology** **130**:61-75. 1997

HONG, Y. & HARRISON, B.D. Nucleotide sequences from Tomato leaf curl virus from different countries evidence for three geographically separate branches in evolution of whitefly-transmitted geminiviruses. **J. Gen. Virol.** **76**:2043-2049. 1995.

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

IBGE Anuário Estatístico do Brasil. URL: <http://www.fnp.com.br/foldia2/culturas/tomate/tomateproducaoarea.html>.2000.

IDRIS, A.M. & BROWN, J.K. PCR – based detection of Geminiviruses in two whitefly vectors. **Phytopathology** **85**:1184. 1995 (Abstract).

IOANNOU, N. Cultural management of Tomato yellow leaf curl disease in Cyprus. **Plant Pathology** **36**:367-373. 1987.

IOANNOU, N. *Yellow leaf curl* and other virus diseases of tomato in Cyprus. **Plant Pathology** **34**:428-434. 1985.

JEFFREY, J.L., POOMA, W. & PETTY, I.T.D. Genetic requirements for local and systemic movement of tomato golden mosaic virus in infected plants. **Virology** **223**:208-18. 1996.

JUPIN, I., DE KOUCHKOVSKY, F., JOUANNEAU, F. & GRONENBORN, B. Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): involvement of the protein encoded by ORF C4. **Virology** **204**:82-90. 1994.

KASRAWI, M.A., SUWWAN, M.A. & MANSOUR, A. Sources of resistance to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in *Lycopersicon* species. **Euphytica** **37**:61-64. 1988.

KHEYR-POUR, A. BENDAHMANE, M. MATZEIT, V., ACCOTTO, G.P., CRESPI, S. & GRONENBORN, B. Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. **Nucleic Acids Research** **19**:6763-6769. 1991.

KIM, K.S., SHOCK T.L. & GOODMAN, R.M. Infection of *Phaseolus vulgaris* by bean golden mosaic virus: ultrastructural aspects. **Virology** 89:22-33. 1978.

KOONIN, E.V. & ILYNA, T.V. Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. **J. Gen. Virol.** 73:2763-6. 1992.

KUROZAWA, C. & PAVAN, M.A. **Doenças do tomateiro** (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A & Rezende, J.A.M. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. 3ed. São Paulo. **Agronômica Ceres** 2:690-719. 1997.

LAUDE, H. Les plantes transgéniques résistantes aux virus. In: Les plantes transgéniques en agriculture. **Ministère de l'Agriculture de la Pêche et de l'Alimentation** 9:129-142. 1996.

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

LAZAROWITZ, S.G., WU, L.C., ROGERS, S.G. & ELMER, J.S. Sequence-specific interaction with the viral AL 1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. **Plant Cell** 4: 799-809. 1992.

LIMA, J.A. A, GONÇAVES, M.F.B., LIMA, R.C. A & OLIVEIRA, V.B. Elevada incidência de geminivírus em *Macroptilium lathyroides* no sertão central do Ceará. In: **Anais, 8º Encontro Latino Americano e do Caribe sobre Mosca-branca e Geminivírus**, Recife, PE, 1999. p.107.

LIMA, J.A.A., GONÇALVES, M.F.B., OLIVEIRA, V.B., TORRES-FILHO, J & MIRANDA, A.C.M.M. Serological and PCR detection of a Begomovirus infecting tomato fields in Ibiapaba mountain, Ceará. **Fitopatologia Brasileira** 25:104-108. 2000.

LIMA, M.F. Doenças causadas por vírus. **CULTIVAR HF**. 08:16-21. 2001.

LIMA, M.F., BEZERRA, I.C., RIBEIRO, S.G. & ÁVILA, A.C. Distribuição de geminivírus nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale São Francisco. **Fitopatologia Brasileira** 26:81-85. 2001.

LIMA, M.F., BEZERRA, I.C., RIBEIRO, S.G. & ÁVILA, A.C. Distribuição de geminivírus em tomateiro no Submédio do Vale do São Francisco. In: **Anais, 8º Encontro Latino Americano e do Caribe Sobre Moscas Brancas e Geminivírus**, Recife, PE. 1999. p.93.

LINTON, M. Red tomatoes yield abundance of benefits. URL: <http://www.canoeglobalnav/topbottomnav/map> 1998.

LOMONOSSOFF, G.P. Pathogen-derived resistance to plant viruses. **Annual Review of Phytopathology** 33:323-343. 1995.

LOURENÇO, A.L. Perspectivas de danos e controle de *Bemisia argentifolii* no Brasil. In: 16º Congresso Brasileiro de Entomologia, Salvador, BA, Brasil. 1997. pp.8-9.

MATTHEWS, R.E.F. Classification and nomenclature of viruses. **InterVirology** 12:129-296. 1979.

MAYO, M.A. & PRINGLE, C.R. Virus taxonomy: 1997. **J. Gen. Virology** 79:649-657. 1998.

MAYTIS, J.C.D.M. & OLIVEIRA, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathol.** 1:267-274. 1975.

MCGOVERN, R.J., POLSTON, J.E.M., DANYLUCK, G.M., HIEBERT, E. & STANLEY, P.A. Identification of a weed host of tomato mottle geminivirus in Florida. **Plant Disease** 78:1102-1106. 1994.

McKENZIE, C.L., SHATTERS, R.G., MAYER, P. & RICHARD, T. Effect of geminivirus and *Bemisia* infestation on induction of pathogenesis related proteins in tomato. **TEKTRAN**. U.S.A Departmente of Agriculture 2000.

MEDEIROS, R.B. Alternativas de controle de vírus de plantas transmitidos por insetos via plantas transgênicas expressando seqüências não virais. **Fitopatologia Brasileira** 26:252. 2001. (Resumo).

MELO, P.C.T. Agroindústria de tomate em expansão. **Horticultura Brasileira** 17:Artigo de capa. 1999. <http://www.hortbras.com.br>

MELO, P.C.T. Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Asgrow do Brasil Sementes Ltda, Campinas, SP, Brazil. Tech. Bull. 1992. URL:<http://www.catie.ac.cr/information>

MITCHELSON, I., ZAMIR, D. & CZOSNEK, H. Accumulation and translocation of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* tolerance gene Ty-1. **Phytopathology** 84:928-933. 1994.

- MOFFAT, A.S. Geminiviruses emerge as serious crop threat. **Science** **286**:1835. 1999.
- MORALES, F.J. & ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. **Arch. Virol.** **146**:415-441. 2001.
- MOWAT, W.P. & DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. **J. Virol. Methods** **15**:233-247. 1987.
- MUNIYAPPA, V., JALIKOP, S.H., SAIKIA, A.K., CHENNARAYAPPA., SHIVASHANKAR, G., BHAT, A.I. & RAMAPPA, H.K. Reacation of *Lycopersicon* cultivars and wild accessions to Tomato yellow leaf curl virus. **Euphytica** **56**:37-41. 1991.
- MURPHY, F.A., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., GHABRIAL, S.A., JARVIS, A.W., MARTELLI, G.P., MAYO, M.A. & SUMMERS, M.D. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Commitee on Taxonomy of Viruses. **Arch. Virol.** **10** Springer-Verlag. New York. 1995. 586pp.
- NAGAR, S., PEDERSEN, T.J., CARRICK, K.M., HANLEY-BOWDOIN, L. & ROBERTSON, D. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated Plant Cells. **Plant Cell** **7**:705-719. 1995.
- NAGATA, A.K., INOVE-NAGATA, A.K., DE ÁVILA, A.C. & GIORDANO, L.B. Um método eficiente de inoculação de geminivírus para seleção de plantas resistentes do gênero *Lycopersicon*. **Fitopatologia Brasileira** **26**:527. 2001. (Resumo).
- NAKHLA, M.K., MAXWELL, M.D., HIDAYAT, S.H., LANGE, D.R., LONIELLO, A.Q., ROJAS, M.R., MAXWELL, D.P., KITAJIMA, E.W., ROJAS, A., ANDERSON, P. & GILBERTSON, R.L. Two geminiviruses associated with tomatoes in Central America. **Phytopathology** **84**:467. 1994. (Abstract).
- NAVOT, N., BER, R. & CZOSNEK, H. Rapid detection of tomato yellow leaf curl virus in squashes of plants and insect vectors. **Phytopathology** **79**:562-568 1989.
- NAVOT, N., ZEIDAN, M., PICHERSKY, R., ZAMIR, R. & CZOSNEK, H. Use of the polimerase chain reaction to amplify tomato yellow leaf curl virus DNA from infected plants and viruliferous whiteflies. **Phytopathology** **82**:1199-1202. 1992.
- NITZANY, F.E. Tomato yellow leaf curl virus. **Phytopathology Medit.** **14**:127-129. 1975.

NUCIFORA, S. Mallas antiviral para la defensa del cultivo de tomate protegido contra *Bemisia tabaci* vector del TYLCV. **Phytoma** 57:40-48. 1994.

OROZCO, B.M. & HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. **J. Gen. Virology** 70:148-158. 1996.

PADIDAM, M., BEACHY, R.N. & FAUQUET, C.M. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. **J. Gen. Virology** 76:249-263. 1995.

PADIDAM, M., SAWYER, S. & FAUQUET, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology** 265:218-25. 1999.

PALMER, K.E. & RYBICKI, E.P. The molecular biology of mastreviruses. **Adv. Virus Res.** 50:183-234. 1998.

PAPLOMATAS, E.J., PATEL, V.P., HOU, Y.M., NOUEIRY, A.O & GILBERTSON, R.L. Molecular characterization of a new sap-transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in México. **Phytopathology** 84:1215-1224. 1994.

PETTY, I.T.D., COURTS, R.H.A. & BUCK, K.W. Geminivirus coat protein promoter sequences can function in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.** 14:5113-25. 1986.

PICÓ, B., DIÉZ, M.J. & NUEZ, F. Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to Tomato yellow leaf curl virus. **Euphytica** 101:259-271, 1998.

PICÓ, B., DIÉZ, M.J. & NUEZ, F. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. Tomato yellow leaf curl virus – a review. **Scientia Horticulturae** 67:151-196. 1996.

PILLOWSKY, M. & COHEN, S. Tolerance to tomato yellow leaf curl virus derived from *Lycopersicon peruvianum*. **Plant Disease** 74:248-250. 1990.

PILLOWSKY, M. & COHEN, S. Inheritance of resistance of Tomato yellow leaf curl virus in tomatoes. **Phytopathology** 64:632-635. 1974.

POLSTON, J.E. & ANDERSON, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. **Plant Disease** 81:1358-1369. 1997.

POLSTON, J.E. & MCGOVERN, R.J. Introduction of tomato yellow leaf curl virus in Florida and implications for the spread of this and other geminiviruses of tomato. **Plant Disease** **83**:984-988. 1999.

POLSTON, J.E., BOIS, D., SERRA, C.A. & CONCEPCION, S. First report of a tomato yellow leaf curl-like geminivirus from tomato in the Western Hemisphere. **Plant Disease** **78**:831. 1994.

POLSTON, J.E., CHELLEMI, D.O., SCHUSTER, D.J., MCGOVERN, R.J. & STANSLY, P.A. Spatial and temporal dynamics of tomato mottle geminivirus and *Bemisia tabaci* in Florida tomato fields. **Plant Disease** **80**:1022-1028. 1996.

POLSTON, J.E., HIEBERT, E., MCGOVERN, R.J., STANSLY, P.A. & SCHUSTER, D.J. Host range of tomato mottle virus, a new geminivirus infecting tomato in Florida. **Plant Disease** **77**:1181-1184. 1993.

POLSTON, J.E., DODDS, J.A. & PERRING, T.M. Nucleic acid probes and "strains" discrimination of cucurbit geminiviruses. **Phytopathology** **79**:1123-1127. 1989.

POWELL-ABEL, P., NELSON, R.S., DE, B., HOFFMANN, N., ROGERS, S.G., FRALEY, R.T. & BEACHY, R.N. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. **Science** **232**:738-743. 1986.

RAMIREZ, P. Los Geminivirus: **Manejo Integrado de Pragas** **43**:40-54. 1997.

REZENDE, E.A., FILGUEIRA, F.A.R., ZERBINI, F.M., MACIEL-ZAMBOLIM, E., FERNANDES, J.J. & GILBERTSON, R.L. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. **Fitopatologia Brasileira** **21**:424. 1996. (Resumo).

RIBEIRO, S.G., MELLO, L.V., BOITEUX, L.S., KITAJIMA, E.W. & FARIA, J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. **Fitopatologia Brasileira** **19**:330. 1994. (Resumo).

RIBEIRO, S.G., DE ÁVILA, A.C., BEZERRA, I.C., FERNANDES, J.J., FARIA, J.C., LIMA, M.F., GILBERTSON, R.L., MACIEL-ZAMBOLIM, E. & ZERBINI, F.M. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease** **82**:830. 1998. (Note).

RIBEIRO, S.G., BEZERRA, I.C., LIMA, M.F., ÁVILA, A.C. & GIORDANO, L.B. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. In: Programa e Resumos, **8º Encontro Nacional de Virologia**, São Lourenço, M.G. 1996. p.290.

ROBERTS, I.M., ROBINSON, D.J. & HARRINSON, B.D. Serological relationships and genome homologies among geminiviruses. **J. Gen. Virology** **65**:1723-1730.1984.

ROBINSON, D.J., HARRISON, B.D., SEQUEIRA, J.C. & DUNCAN, G.H. Detection of "strains" of African cassava mosaic virus by nucleic acid hybridization and some effects of temperature on their multiplication **Annals of Applied Biology** **105**:483-493. 1984.

ROCHESTER, D.E., FAUQUET, C.M., DEPAULO, J.J. & BEACHY, R.N. Complete nucleotide sequence of the geminivirus, Tomato yellow leaf curl virus (Thailand isolate). **J. Gen. Virology** **75**:477-485. 1994.

ROJAS, M.R., GILBERTSON, R.L., D.R. & MAXWELL, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminivirus. **Plant Disease** **77**:340-347.1993.

RYBICKI, E.P. Taxonomia de vírus de plantas. **RAPP**. **9**:267-288.2001.

RYBICKI, E.P. & HUGHES, F.L. Detection and typing of Maize streak virus and other distantly related geminivirus of grasses by polymerase chain reaction amplification of conserved viral sequences. **J. Gen. Virology** **71**:2519-2526.1990.

SAIKI, R.K., SCHAT, S., FALOONA, F., MULIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A & ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** **230**:1350-1354. 1985.

SALAS, J. & MENDOZA, O. Report de Venezuela. **CEIBA** **36**:49-50. 1995.

SALATI, R., NAHKLA, M., GUZMAN, P., JAQUEZ, J., MAXWELL, D.P. & GILBERTSON, R.L. Epidemiology of *Tomato yellow leaf curl virus* in the Dominican Republic: Characterization of a infections clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. **Fitopatologia Brasileira** **26**:544. 2001. (Resumo).

SANFORD, J.C. & JOHNSON, S.A. The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasite genome. **J. Theor. Biol.** **115**:395-405. 1985.

SANTOS, C.D.G., RESENDE, R.O., ÁVILA, A.C de & BEZERRA, I.C. Círculo parcial de hospedeiros do geminivírus de tomateiro do Distrito Federal determinado por transmissão mecânica e pelo vetor *Bemisia argentifolii* **Fitopatologia Brasileira** **23**:324.1998. (Resumo).

SCHUSTER, D.J. Report. **Bemisia Newsl.** **5**:1-3. 1992.

SHARAF, N. Chemical control of *Bemisia tabaci*. **Agric. Ecosyst. Environ.** **17**:111-127. 1986.

SHUSTER, D.J., STANSLEY, P.A, DEAN, D.G., POLSTON, J.E. & SWANSON. G.S. Progress toward a more sustainable pest management program for tomato. In: Proc. Fla. Tomato Inst. C.S. Vavrina (Ed.) University of Florida, IFAS, **Vegetable Crops Special Series**, PRO-105. 1993. p 77-106.

SOUZA-DIAS, J.A.C., YUKI, V. A, RIBEIRO, S.G. & RAVAGNANE, V.A. Risca amarela da nervura do tomateiro é causada por geminivírus que infecta a batata. **Summa Phytopathologica** **22**:57. 1996. (Resumo).

STANLEY, J. & LATHAM, J.R. A Symptom variant of beet curly top open reading frame C4. **Virology** **190**:506-509. 1992.

STANLEY, J., FRISCHMUTH, T. & ELLWOOD, S. Detective viral DNA ameliorates symptoms of geminiviruses infection in transgenic plants. **Proceeding National Academic Science** **87**:6291-9295. 1990.

STANSLEY, P.A. Cultural control of the whitefly/Geminiviruses complex in tomato 2000. URL: <http://www.imok.ufl.edu/entlab/pres/whitefly/w-fly1.htm> (Fast.Search/B/157).

STANSLEY, P.A., SCHUSTER, D.J., HILGE, L. & CONNER, J.M. Impact and Management of *Tomato yellow leafcurl virus* on tomato in Southwest Florida. 2000. URL: <http://www.imok.ufl.edu/entlab/pres/TYLCV>.

SUNTER.G., HARTITZ, M.D., HORMUDZI, S.G., BROUGH, C.L. & BISARO, D.M Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. **Virology** **179**:69-77. 1990.

TIMMERMANS, M.C.P., DAS, O.P. & MESSING, J. Geminiviruses and their uses extrachromosomal replications. **Ann. Ver. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** **45**:79-112. 1994.

VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARSTENS, E., ESTES, M.K., LEMON, S., MANILOFF, J., MAYO, J.A., MCGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R. & WICKNER, R. *Virus Taxonomy: Seventh report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Academic Press. New York. 2000. 1121p.

VILLAS BÔAS, G.L., FRANÇA, F.H., AVILA, A.C. & BEZERRA, I.C. **Manejo Integrado da mosca-branca *Bemisia argentifolii***. Brasília: EMBRAPA/CNPH (Circular Técnica, 9). 1997.

WEGE, CH., SAUDERS, K., STANLEY, J. & JESKE, H. Phloem-limitation is characteristic of some, but not all geminiviruses with bipartite genome. In: 1st International Symposium on Geminiviruses. 14-17 September 1994, El Ejido, Almería, Spain. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Universidad de Málaga, Spain. 1994. p.63.

WHITHAM, S., DINESH-KUMAR, S.P., CHOI, D., HEHL, R., CORR, C. & BAKER, B. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78**:1101-15. 1994.

WILSON, T.M.A. Strategies to protect crop plants against viruses: pathogen-derived resistance blossoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**:3134-41. 1993.

ZAKAY, Y., NAVOT, N., ZEIDAN, M., KEDAR, N., RABINOWITCH, H.D., CZOSNEK, H. & ZAMIR, D. Screening *Lycopersicon* accessions for resistance to the tomato yellow leaf curl virus: presence of viral DNA and symptom development. *Plant Disease* **75**:279-281. 1991.

ZAMIR, D., EKSTEIN-MICHELSON, I., ZAKAY, Y., NAVOT, N., ZEIDAN, M., SARFATTI, M., ESHED, Y., HAREL, E., PLEBAN, T., VAN-OSS, H., KEDAR, N., RABINOWITCH, H.D. & CZOSNEK, H. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, TY-1. *Theoretical and Applied Genetics* **88**:141-146. 1994.

ZERBINI, F.M., AMBROZEVICIUS, L.P. & NAGATA, A.K.I. Diagnose molecular de Fitoviroses. In: Almeida, A.M.R. & Lima, J.A.A (Eds.) **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Londrina: EMBRAPA SOJA / Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia. 2001. pp.95-124.

ZERBINI, F.M., MACIEL-ZAMBOLIM, E., FERNANDES, J.J., GILBERTSON, R.L. & CARRIJO, I.V. Um novo geminivírus isolado de tomateiro (*L. esculentum*) em Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira* **21**:430. 1996. (Resumo).