



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fitopatologia
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

**ESTUDO DE PLANTAS INVASORAS COMO
FONTE DE BEGOMOVÍRUS PARA O TOMATEIRO.**

SARAH DA SILVA BARRETO

Brasília – DF

2012

SARAH DA SILVA BARRETO

**ESTUDO DE PLANTAS INVASORAS COMO
FONTE DE BEGOMOVÍRUS PARA O TOMATEIRO.**

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

Orientadora

Dra Alice Kazuko Inoue Nagata

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL – BRASIL
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA

Barreto, Sarah da Silva

Estudo de plantas invasoras como fonte de begomovírus para o tomateiro./Sarah da Silva Barreto.
Brasília, 2012.

147p.

Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. Begomovírus – Plantas invasoras.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Estudo de plantas invasoras como fonte de begomovírus para o tomateiro.

À querida Maria José (Tia Tinha),
pelo exemplo de amor,
dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo.

Especialmente à Dra Alice Kazuko Inoue Nagata, pela orientação, dedicação constante ao nosso estudo, ensinamentos, incentivos, e por tudo de bom que me proporcionou impossível de descrever.

Ao amor e razão da minha vida, Felipe Barreto Silveira.

À minha mãe Noêmia da Silva, ao meu irmão Harrison Barreto, à minha tia Alzira Lopes e ao meu primo Alisson Lopes pela compreensão, apoio e presença em minha vida.

Ao Dênis Silveira pela compreensão, ajuda, incentivo e amizade.

Às amigas, Mariana Hallwass e Bruna Pinheiro que sempre me compreenderam, respeitaram e estiveram prontas para me ajudar.

Aos meus companheiros do laboratório Mariana Martins, Leonardo Albuquerque, Mônica Macedo, Maciel Santos, Fernanda Naito, Mariana Fontenelle, Oneilson Aquino e Lúcio Flávio Barbosa.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Fitopatologia.

À Universidade de Brasília pela oportunidade de ingressar na pós-graduação.

Ao CNPq e à Capes pelo apoio financeiro.

À Embrapa Hortaliças pela infraestrutura para a realização deste trabalho.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da **Dra Alice Kazuko Inoue-Nagata**, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e institucional da Embrapa Hortaliças.

**ESTUDO DE PLANTAS INVASORAS COMO
FONTE DE BEGOMOVÍRUS PARA TOMATEIRO.**

SARAH DA SILVA BARRETO

TESE APROVADA em __/__/____ por:

Dra. Simone da Graça Ribeiro
Embrapa Cenargen (Examinador externo)

Dra. Fernanda Rausch Fernandes
Embrapa CNPH (Examinador externo)

Dr. Cláudio Lúcio Costa
Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília (Examinador interno)

Dra Rita de Cássia Pereira Carvalho
Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília (Examinador interno)

Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata
Embrapa CNPH (Orientadora - Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2012

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT	ii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVO GERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO 1: Revisão de literatura	5
1. Geminivírus: Aspectos gerais	6
2. O gênero <i>Begomovirus</i>	7
3. O aleirodídeo <i>Bemisia tabaci</i> e a transmissão de begomovírus.....	9
4. Begomovírus em tomateiro no Brasil.....	11
5. Aspectos gerais sobre begomovírus em plantas invasoras no Brasil	14
6. Relação entre begomovírus em tomateiro e plantas invasoras associadas no Brasil	17
7. Literatura citada.....	22
CAPÍTULO 2: Transmissão de begomovírus de plantas invasoras para o tomateiro por biobalística	29
RESUMO	30
ABSTRACT	31
1. INTRODUÇÃO.....	32
2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1. Amostras de trabalho.....	34
2.2. Amplificação por círculo rolante (RCA) do DNA viral.....	34
2.3. Detecção do ToSRV por PCR	35
2.4. Sequenciamento direto do produto de PCR	36
2.5. Teste de transmissão de begomovírus de amostras de plantas invasoras para tomateiro por biobalística	37
2.6. Análise da infecção.....	40
2.6.1. Observação de sintomas e extração de DNA total de plantas	40
2.6.2. Amplificação por círculo rolante-polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (RCA/RFLP).....	40
2.6.3. Detecção de begomovírus por PCR	41
2.7. Clonagem	42

2.8.	Sequenciamento e análise das sequências	43
2.8.1.	Digestão <i>in silico</i> das sequências	44
3.	RESULTADOS.....	45
3.1.	RCA do DNA total das amostras de plantas invasoras da coleção.....	45
3.2.	Detecção de ToSRV nas amostras de plantas invasoras da coleção e em tomateiro inoculado por biobalística	45
3.3.	Análise do sequenciamento direto do produto de PCR.....	50
3.4.	Testes de transmissão para confirmar que plantas invasoras podem atuar como fonte de ToSRV para o tomateiro	50
3.4.1.	Observação de sintomas e detecção de begomovírus por PCR.....	50
3.4.2.	Análise de RCA/RFLP.....	56
3.4.3.	Clonagem e sequenciamento.....	59
3.4.4.	Análise das sequências	62
3.4.5.	Detecção dos begomovírus por PCR específica.....	65
4.	DISCUSSÃO.....	69
5.	CONCLUSÕES	75
6.	LITERATURA CITADA	76
	CAPÍTULO 3: Transmissão de begomovírus por <i>Bemisia tabaci</i>	79
	RESUMO.....	80
	ABSTRACT.....	81
1.	INTRODUÇÃO	82
2.	MATERIAL E MÉTODOS	85
2.1.	Coleta de amostras e extração de DNA total	85
2.2.	Estudo de transmissão por aleirodídeo	85
2.2.1.	Fonte de inóculo, população de aleirodídeo e espécies de plantas usadas no teste de transmissão	85
2.2.2.	Teste de transmissão por aleirodídeos.....	86
2.3.	Análise da infecção.....	87
2.3.1.	Observação dos sintomas e extração de DNA total	87
2.3.2.	Detecção por RCA/RFLP e PCR e análise dos isolados virais.....	88
3.	RESULTADOS.....	91
3.1.	Detecção de begomovírus nas plantas coletadas em Goianópolis por PCR.....	91

3.2.	Análise dos isolados virais das amostras coletadas em Goianópolis por RCA/RFLP	92
3.3.	Análise da infecção após teste de transmissão de begomovírus por aleirodídeos	94
3.3.1.	Observação dos sintomas e extração de DNA total	94
3.3.2.	Deteção de begomovírus nas plantas inoculadas por PCR	98
3.3.3.	Análise por RCA/RFLP dos isolados virais transferidos para plantas invasoras e de tomate após teste de transmissão por aleirodídeos	99
3.3.4.	Deteção de begomovírus por PCR específica	109
3.4.	Correlação entre análise de RCA/RFLP e a PCR específica	117
4.	DISCUSSÃO.....	122
5.	CONCLUSÕES.....	130
6.	LITERATURA CITADA	132
	CONCLUSÕES GERAIS.....	1344

RESUMO GERAL

BARRETO, Sarah da Silva. **Estudo de plantas invasoras como fonte de begomovírus para o tomateiro.** 2012. 147p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Os begomovírus pertencem ao gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae* e são transmitidos pelo aleirodídeo *Bemisia tabaci* (Gennadius), conhecido como mosca-branca. Esses vírus causam severas doenças em muitas culturas, e o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das mais severamente afetadas. No Brasil, somente *Nicandra physaloides* (L.), uma planta invasora comum no cultivo de tomate, foi relatada com infecção natural por *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), importante begomovírus para o tomateiro. Portanto, o objetivo desse estudo foi identificar os begomovírus presentes em plantas invasoras, especialmente o ToSRV, e avaliar a se essas plantas podem servir como fonte desse vírus para o tomateiro. Dois ensaios foram realizados: no primeiro, isolados de begomovírus presentes em amostras de plantas invasoras (na forma de DNA total) da coleção de begomovírus da Embrapa Hortaliças foram inoculados por biobalística em plantas de tomateiro e na planta invasora correspondente ou relacionada. Como resultado, ToSRV foi o principal vírus transferido dessas amostras para plantas de tomate, enquanto Euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) foram predominantes nas plantas invasoras (*Crotalaria juncea* L., *Euphorbia heterophylla* L. e *Sida santaremnensis* H. Monteiro). No segundo ensaio, plantas de *E. heterophylla*, *N. physaloides*, *Sida* sp. e tomate foram coletadas numa região produtora de tomate de mesa no Estado de Goiás e avaliadas em teste de transmissão pelo vetor. De modo semelhante, isolados de ToSRV em infecção mista com EuYMV e/ou SiMMV foram transmitidos para plantas de tomate por aleirodídeos confinados em *E. heterophylla* e *Sida* sp.; por outro lado, quando plantas de *N. physaloides* e tomateiro foram usadas como fonte de inóculo, ToSRV predominou nas plantas inoculadas. Esse estudo demonstrou que as plantas invasoras *Crotalaria* sp., *E. heterophylla* e *Sida* sp. podem atuar como hospedeiras alternativas de ToSRV para o tomateiro.

Palavras-chave: EuYMV, geminivírus, SiMMV, *Solanum lycopersicum*, ToSRV.

Orientadora – Alice Kazuko Inoue Nagata – Embrapa Hortaliças.

GENERAL ABSTRACT

BARRETO, Sarah da Silva. **Study of weeds as a begomovirus source to tomato.** 2012. 147p.

Thesis (Doctorate in Plant Pathology) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

Begomoviruses belong to the genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*, and are transmitted by the aleirodid *Bemisia tabaci* (Gennadius), known as whitefly. These viruses cause severe diseases in many crops, and tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most severely affected. In Brazil, only *Nicandra physaloides* (L.), a common weed that occurs in tomato fields, has been found naturally infected with *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), an important begomovirus to tomatoes. Therefore, the objective of this study was to identify the begomoviruses from the weeds, particularly ToSRV isolates, and to evaluate the ability of these plants to serve as a virus source to tomato plants. Two studies were performed. In the first, some begomovirus infected weed samples (total DNA) from the begomovirus collection of Embrapa Vegetables were selected for inoculation to tomato plants by biolistic. As a result, it was observed that ToSRV was the major virus transferred from weeds to tomato plants, while *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) and *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) were predominant in the weeds (*Crotalaria juncea* L., *Euphorbia heterophylla* L. and *Sida santaremnensis* H. Monteiro). In the second study, *E. heterophylla*, *N. physaloides*, *Sida* sp. and tomato plants were collected in a fresh tomato growing area of Goiás State, Brazil, and evaluated by transmission tests using the vector. Similarly to the first study, ToSRV isolates, in mixed infection with EuYMV and/or SiMMV, were transmitted to tomato plants by aleirodids confined in *E. heterophylla* and *Sida* sp.; and ToSRV was apparently the predominant virus present in *N. physaloides* and tomato plants inoculated by aleirodids confined in *N. physaloides* and tomato plants. This study demonstrated that other weed species (*Crotalaria* sp., *E. heterophylla* and *Sida* sp.) can act as alternative host of begomoviruses to tomato, in addition to *N. physaloides*.

Keywords: EuYMV, geminivirus, SiMMV, *Solanum lycopersicum*, ToSRV.

Supervisor: Alice Kazuko Inoue Nagata – Embrapa Hortaliças

INTRODUÇÃO GERAL

Os begomovírus, transmitidos pelo aleirodídeo *Bemisia tabaci*, causam severas doenças em culturas economicamente importantes, como feijão, mandioca, caupi, algodão, tomate e pimentão, em todo o mundo (Faria *et al.*, 2000; Morales & Anderson, 2001; Polston & Anderson, 1997). Além das plantas cultivadas, muitas espécies de plantas invasoras têm sido relatadas como hospedeiras naturais de begomovírus, principalmente das famílias Malvaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Caparaceae, Sterculiaceae e Convolvulaceae (Assunção *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2002; Morales & Anderson, 2001; Santos *et al.*, 2003). Além de muitas delas serem infectadas por begomovírus, são também boas hospedeiras do inseto-vetor, possibilitando a manutenção da praga no campo durante a entressafra (Thompson, 2011). Adicionalmente, muitas possuem ciclo de vida perene, funcionando como reservatório permanente do vetor e do begomovírus no campo.

No Brasil, o primeiro relato de um vírus transmitido por aleirodídeos ocorreu na década de 1930, quando o agente causal do mosaico comum do algodoeiro foi transmitido de plantas de *Sida micrantha* com clorose infecciosa para plantas sadias de algodão (Costa, 1937; 1954). Esse também foi o primeiro relato, na América Latina, de planta cultivada com doença associada à *B. tabaci* (Thompson, 2011). Já na década de 1960, Costa (1965) descreveu o mosaico dourado do feijoeiro, causado pelo *Bean golden mosaic virus* (BGMV), e mais duas doenças, as quais tinham o agente causal transmitido de plantas invasoras para feijoeiro por aleirodídeos, porém consideradas sem importância econômica. Somente dez anos depois, severas epidemias causadas pelo BGMV foram observadas em vários estados produtores de feijão (Costa, 1975; 1976; Faria *et al.*, 1994). Em tomateiro, os primeiros registros de doenças virais surgiram a partir de 1960 (Flores *et al.*, 1960), e posteriormente, novas doenças foram descritas, porém sem importância econômica (Costa, 1975).

Somente a partir da década de 1990 observou-se o aumento na incidência de begomovírus em campos de tomateiro nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco e Distrito Federal (Faria *et al.*, 1997b; Ribeiro *et al.*, 1998). Acredita-se que os surtos epidêmicos começaram a ocorrer devido à introdução e disseminação do biótipo B de *B. tabaci* no Brasil (Faria *et al.*, 2000; França *et al.*, 1996; Lourenção & Nagai, 1994). Esse vetor, ao contrário do biótipo A (antes relatado no Brasil) coloniza facilmente o tomateiro e apresenta ampla gama de hospedeiras, inclusive plantas invasoras (Brown *et al.*, 1995; Lourenção & Nagai, 1994).

Em plantas invasoras, há relatos de begomovírus no Brasil desde 1937 (Costa, 1937; 1976; Costa & Bennet, 1950) e a partir de então várias espécies vêm sendo relatadas como hospedeiras naturais e experimentais de begomovírus (Ambrozevícius *et al.*, 2002; Assunção *et al.*, 2006; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Faria & Maxwell, 1999; Jovel *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2011). Estudos indicam a existência de uma grande diversidade genética viral em plantas invasoras, sendo que alguns mostraram a presença de infecção mista por longos períodos. A co-infecção com diferentes isolados virais é um pré-requisito para ocorrência de recombinação e pseudo-recombinação, contribuindo para o surgimento de novos vírus e, conseqüentemente, no aumento da diversidade viral (Padidam *et al.*, 1999).

A dispersão ou introdução de begomovírus em uma lavoura pode ocorrer pela ação de aleirodídeos, a partir de fontes de vírus de áreas próximas ou de fontes alternativas (Costa, 1976) iniciando o processo de infecção primária. Acredita-se que o novo biótipo facilitou o processo de transferência de begomovírus presentes em plantas invasoras ou selvagens para plantas cultivadas. Estudos no Brasil e no mundo demonstram que begomovírus presentes em plantas invasoras podem ser transmitidos para plantas cultivadas tanto pelo inseto-vetor como por inoculação artificial; bem como de plantas cultivadas para plantas invasoras (Aranha *et al.*, 2011; Cotrim *et al.*, 2007; Frischmuth *et al.*, 1997; Raj *et al.*, 2003). A maioria dos begomovírus relatados em plantas invasoras

parece ser específica para essas plantas e acredita-se que, quando naturalmente transmitidos para plantas cultivadas, causam doenças em baixa incidência e, portanto, sem importância econômica (Costa, 1965). Ainda hoje, pouco se conhece sobre a ocorrência em plantas invasoras de espécies de begomovírus com impacto econômico para plantas cultivadas (Barbosa *et al.*, 2009; Kashina *et al.*, 2003; Salati *et al.*, 2002).

No Brasil, nas regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste, onde se concentram as principais áreas produtoras de tomate, é comum encontrar plantas invasoras dentro ou próximo da área cultivada com sintomas semelhantes àqueles exibidos pelas plantas de tomate infectadas por begomovírus, como mosaico amarelo, deformação foliar e nanismo (Ambrozevícius *et al.*, 2002; Arnaud *et al.*, 2007; Assunção *et al.*, 2006). No Distrito Federal e no Estado de Goiás as plantas invasoras mais comumente encontradas nos plantios de tomate são: *Crotalaria* spp., *Euphorbia heterophylla*, *Nicandra physaloides* e *Sida* spp. Algumas espécies de begomovírus foram relatadas no Brasil infectando essas plantas invasoras: Euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV) em *E. heterophylla* (Fernandes *et al.*, 2011); *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV), *Sida mottle virus* (SiMoV) e *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) em espécies de *Sida* (Jovel *et al.*, 2004; não publicado) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em *N. physaloides* (Barbosa *et al.*, 2009).

O ToSRV é um importante begomovírus que ocorre em tomateiro, principalmente na região central do Brasil (Fernandes *et al.*, 2008), e seu relato em plantas de *N. physaloides* naturalmente infectadas no campo é recente (Barbosa *et al.*, 2009). É possível que outras plantas invasoras atuem como reservatório natural de ToSRV servindo como inóculo primário, aumentando as chances de disseminação desse vírus para o tomateiro. Portanto, os objetivos desse estudo foram determinar se plantas invasoras, além de *N. physaloides*, são hospedeiras de ToSRV; identificar os begomovírus presentes nas plantas invasoras e comprovar a atuação dessas plantas como fonte de begomovírus para o tomateiro.

OBJETIVO GERAL

Detectar e identificar espécies de begomovírus em plantas invasoras e avaliar o potencial dessas plantas servirem como fonte de inóculo para o tomateiro (*Solanum lycopersicum*) por testes de transmissão artificial (biobalística) e pelo inseto-vetor (*Bemisia tabaci*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a presença de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e outras espécies de begomovírus em amostras de plantas invasoras coletadas em áreas produtoras de tomate.
- Transferir os isolados de begomovírus de plantas invasoras (infectadas com ToSRV) para o tomateiro e para a planta hospedeira de origem por biobalística.
- Analisar por amplificação por círculo rolante/polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RCA/RFLP), clonar e identificar os isolados virais presentes nas plantas invasoras selecionadas como fontes de inóculo, e aqueles transferidos para as plantas inoculadas.
- Transmitir isolados de begomovírus presentes em plantas invasoras para o tomateiro pelo inseto-vetor (*B. tabaci*), bem como aqueles presentes em tomateiro para plantas invasoras e identificá-los pela análise de RCA/RFLP e reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos específicos.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. Geminivírus: Aspectos gerais

A maioria dos vírus que infectam plantas tem seu genoma formado por RNA, sendo que apenas três famílias apresentam vírus com o genoma formado por DNA. Estes vírus pertencem às famílias *Caulimoviridae*, na qual os vírus possuem genoma de DNA fita dupla; *Nanoviridae* e *Geminiviridae*, ambos com genoma de DNA fita simples e circular.

Os geminivírus, membros da família *Geminiviridae*, causam doenças consideradas como um dos principais problemas da produção agrícola nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, afetando severamente culturas como feijão, mandioca, algodão, cucurbitáceas, milho, pimenta e tomate (Legg & Fauquet, 2004; Martin & Shepherd, 2009; Morales & Anderson, 2001). O aumento mundial da população e distribuição do inseto-vetor, o aleirodídeo *Bemisia tabaci*; a expansão do cultivo em monocultura e a ocorrência de um maior trânsito global de plantas facilitaram a emergência de geminivírus (Navas-Castillo *et al.*, 2011). Entre os vírus de plantas, os geminivírus estão entre os mais importantes economicamente e melhor caracterizados. O rápido progresso obtido nos estudos com esses vírus foi devido a três atributos principais: possuem genoma pequeno (2,5-5,0 kb); se replicarem usando fita dupla de DNA (ds DNA) que é facilmente manipulada por métodos padrões de clonagem; e serem transmissíveis por métodos de inoculação independente do inseto-vetor (Rojas *et al.*, 2005).

A partícula viral, com formato de icosaedros incompletos e geminados, é a principal característica dos geminivírus, de onde deriva o nome da família (do latim “geminus” significa geminado). O genoma é constituído por DNA circular de fita simples (ssDNA) com 2,5-2,6 kb, e pode ser monopartido (composto por uma única fita de ssDNA) ou bipartido (composto por duas fitas de ssDNA, encapsidadas separadamente) (Brown *et al.*, 2012). A capa protéica é conservada em sua capacidade para formar os vírions, porém é divergente quanto à especificidade para transmissão pelo inseto-vetor. A replicação ocorre por intermediários de DNA de fita dupla (dsDNA) pelo mecanismo

de círculo rolante. Todos os geminivírus possuem uma região intergênica que contém a origem de replicação e uma estrutura em forma de *stem-loop* contendo uma sequência de nove nucleotídeos conservados, que está envolvida na replicação por círculo rolante (Rojas *et al.*, 2005).

A variabilidade genética dos geminivírus é gerada por três processos: mutação, recombinação e pseudo-recombinação. A maioria dos estudos sobre evolução, diversidade e emergência desses vírus aponta a recombinação como o principal mecanismo evolutivo para os geminivírus (Padidam *et al.*, 1999; Paprotka *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2007). No entanto, estudos recentes demonstraram que a mutação pode ser um processo tão frequente quanto à recombinação para a geração de novos vírus (Duffy & Holmes, 2008; Ge *et al.*, 2007).

A família é formada por quatro gêneros de acordo com a estrutura do genoma, sequência nucleotídica, gama de hospedeiras, tropismo no tecido vegetal e tipo de inseto-vetor: *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus* e *Topocuvirus* (Rojas *et al.*, 2005). Os begomovírus são transmitidos pelo aleirodídeo *B. tabaci* para dicotiledôneas e podem ter o genoma bipartido, formado por dois componentes denominados DNA-A e DNA-B, ou monopartido composto por apenas um componente. Os demais gêneros possuem genoma monopartido, sendo que os vírus dos gêneros *Mastrevirus* e *Curtovirus* são transmitidos por cigarrinhas para monocotiledôneas e dicotiledôneas, respectivamente. Apesar da restrita gama de hospedeiras, alguns mastrevírus também podem infectar dicotiledôneas. Os topocuvírus são transmitidos por membracídeos para dicotiledôneas (Brown *et al.*, 2012). A seguir o gênero *Begomovirus*, alvo deste estudo, é apresentado em detalhes.

2. O gênero *Begomovirus*

Os begomovírus infectam ampla gama de hospedeiras dicotiledôneas no Velho Mundo (Europa, Ásia, África e Austrália) e no Novo Mundo (Américas) (Rojas *et al.*, 2005). Tornaram-se um problema devido às perdas causadas por doenças em culturas economicamente importantes como

mandioca, algodão, (não publicado), cucurbitáceas, crucíferas, fumo, tomate, batata, feijão, batata-doce, quiabo, soja, pimenta, poinsetia (Polston & Anderson, 1997).

Na natureza, esses vírus são disseminados por diferentes biótipos do aleirodídeo *Bemisia tabaci* e sua distribuição está relacionada à disseminação do vetor (Jones, 2003). Sabe-se que a capacidade de transmissão desses vírus difere entre os biótipos (Thompson, 2011). Dentre eles, o biótipo B apresenta grande capacidade para transmitir os begomovírus e ampla gama de hospedeiras, características que, entre outros fatores, podem ter contribuído para a emergência de diversos begomovírus (Jones, 2003; Navas-Castillo *et al.*, 2011).

Esse gênero contém a maioria das espécies de geminivírus, com 196 espécies definitivas; enquanto *Mastrevirus*, *Curtovirus* e *Topocovirus* têm respectivamente 14, sete e uma espécies. A espécie-tipo do gênero é a *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), descrita em *Phaseolus vulgaris* (feijoeiro) (Brown *et al.*, 2012).

Em geral, os begomovírus do Velho Mundo possuem genoma monopartido ou bipartido, enquanto aqueles do Novo Mundo são bipartidos. Em ambos, mono e bipartidos, a transcrição do genoma é feita tanto no sentido viral quanto no complementar. Nos begomovírus bipartidos, os componentes de DNA-A e DNA-B têm aproximadamente 2,6 kb cada um, e não apresentam similaridade de sequência, com exceção da região comum (“common region”, CR) que possui cerca de 200 nucleotídeos (nt) e é altamente conservada (>90% de identidade). Essa região contém a origem de replicação e sequências essenciais para replicação e transcrição de cada componente. Em geral, o DNA-A é responsável pela replicação e encapsidação da partícula viral. No sentido viral codifica a capa protéica (“coat protein”, CP) e uma proteína relacionada ao movimento (“movement protein”, MP) (ausente nos begomovírus do Novo Mundo), e no sentido complementar codifica a “replication associated-protein” (Rep), a “transcriptional activator protein” (TrAP), a “replication enhancer protein” (REn) e a proteína AC4. A CP encapsida a fita de ssDNA e pode estar envolvida

no movimento viral, enquanto a MP está relacionada ao movimento e sintomas. A Rep inicia a replicação viral e pode regular o ciclo celular para induzir o hospedeiro a fornecer fatores que auxiliam a replicação viral; a REn auxilia a replicação viral; a TrAP tem a função de ativar a transcrição dos genes da CP no DNA-A e da “nuclear shuttle protein” (NSP) no DNA-B, e a proteína AC4 é importante na expressão dos sintomas. O DNA-B codifica a proteína do movimento (MP) no sentido complementar, e a “nuclear shuttle protein” (NSP) no sentido viral, relacionadas ao movimento intra e intercelular, definição da gama de hospedeiras e desenvolvimento de sintomas (Brown *et al.*, 2012; Rojas *et al.*, 2005). Nos begomovírus monopartidos, o DNA-A é similar ao DNA-A dos bipartidos, em tamanho e organização genômica. No sentido viral codificam a CP e MP, e no sentido complementar codificam para as proteínas essenciais para replicação (Rep e REn) e também a TrAP envolvida no movimento viral conferido no ICTV 2012. O DNA-A dos begomovírus bipartidos se replica autonomamente, mas em geral os dois componentes são necessários para o estabelecimento da infecção sistêmica. Entretanto, para alguns begomovírus, como o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) demonstrou-se a ocorrência de infecção sistêmica na ausência do DNA-B (Fontenelle *et al.*, 2007).

3. O aleirodídeo *Bemisia tabaci* e a transmissão de begomovírus

Os aleirodídeos, popularmente conhecidos como moscas-brancas, pertencem à ordem Hemiptera, família *Aleyrodidae* e ocorrem praticamente em todas as regiões do mundo. Aproximadamente 1300 espécies de aleirodídeos (distribuídas em mais de 120 gêneros) foram descritas, no entanto, poucas são consideradas pragas e, menos ainda, são aquelas que transmitem vírus de plantas (Jones, 2003). Dentre elas destaca-se *B. tabaci*, transmissora de vírus dos gêneros *Begomovirus*, *Ipomovirus*, *Crinivirus*, *Carlavirus* e *Torradovirus*; e *Trialeurodes vaporariorum*, vetor de vírus dos gêneros *Crinivirus* e *Torradovirus* (Navas-Castillo *et al.*, 2011).

Os begomovírus são o maior grupo de vírus transmitidos por *B. tabaci*. Esse vetor constitui um complexo de biótipos, identificados com base em características filogenéticas e biológicas (como padrão de esterase, gama de hospedeiras, indução de reações fitotóxicas, adaptação à hospedeira, resistência a inseticidas, eficiência de transmissão de vírus e composição de endossimbiontes). Entre outros fatores, a seleção ou a introdução de determinados biótipos pode ter implicações na epidemiologia das doenças causadas por begomovírus e na emergência desses vírus (Navas-Castillo *et al.*, 2011). O biótipo B, um dos mais estudados, foi disseminado do Mediterrâneo (seu provável centro de origem) para diversas regiões do Mundo, tornando-se predominante em países como Estados Unidos, Austrália, Venezuela e Brasil, enquanto os biótipos nativos foram quase extintos. Ao mesmo tempo epidemias severas e o surgimento de novos begomovírus foram observados em muitas culturas, a exemplo do tomateiro (Morales & Anderson, 2001; Thompson, 2011).

A transmissão dos begomovírus pelo inseto-vetor é circulativa não propagativa (Costa, 1998; Czosnek & Ghanim, 2002). No entanto, existem evidências de sua possível replicação no vetor (Mehta *et al.*, 1994; Sinisterra *et al.*, 2005). Resumidamente, as partículas virais são ingeridas do floema pelo estilete do vetor, seguem pelo trato digestivo e entram na hemolinfa. Então, alcançam a glândulas salivares e, finalmente, entram no ducto salivar de onde são excretadas com a saliva durante a alimentação. Na hemolinfa existem células de defesa que fagocitam proteínas estranhas, microorganismos e restos celulares. No entanto, as partículas virais são protegidas por uma proteína produzida por bactérias endossimbiontes presentes no vetor, como os homólogos da chaperonina GroEL (Czosnek & Ghanim, 2002).

Características do processo de transmissão como o período de acesso de aquisição, latência, inoculação e persistência do vírus no vetor foram determinadas para algumas espécies de begomovírus, no entanto estudos mais aprofundados foram obtidos com o *Tomato yellow leaf curl virus* (não relatado no Brasil) (Thompson, 2011). De uma forma geral, quanto maior o tempo de

aquisição e inoculação maior é a probabilidade de transmissão. Um período de latência é necessário para o vetor tornar-se virulífero, e o período de persistência é relativamente longo, por semanas ou por toda a vida do inseto (Costa, 1998).

4. Begomovírus em tomateiro no Brasil

Na América do Sul, o primeiro relato de uma doença em tomateiro associada ao vetor *B. tabaci* ocorreu no Estado de São Paulo na década de 1960 (Flores *et al.*, 1960), e pode ter sido causada por begomovírus presentes em malváceas selvagens. Em seguida, seis doenças associadas à transmissão pelo aleirodídeo foram descritas (Costa, 1975), incluindo o mosaico dourado, causado pelo *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). Esse vírus foi caracterizado, e a sua capacidade de ser transmitido por aleirodídeos foi demonstrada (Maytis *et al.*, 1975). No entanto, essas doenças apresentavam pouca importância econômica, e o aumento da incidência do TGMV em tomateiro foi atribuído à migração em massa de aleirodídeos presentes nas culturas de soja, feijão e algodão (Costa, 1976). Ao contrário do que ocorria em tomateiro, nessas culturas as populações de aleirodídeos eram elevadas, e especialmente o feijoeiro era severamente afetado por begomovírus.

Acredita-se que, até a década de 1980, provavelmente predominava o biótipo A de *B. tabaci*, que colonizava abundantemente plantas de soja, feijão e algodão, porém muito pouco o tomateiro. A partir de 1991, surtos populacionais de *B. tabaci* foram observados com alta frequência e associados a desordens fisiológicas nas hospedeiras. Tratava-se do biótipo B de *B. tabaci* (Costa & Brown 1991) que pode ter sido introduzido no Brasil a partir de plantas infestadas (Melo, 1992). Severas infestações desse biótipo foram registradas em plantas ornamentais, plantas invasoras e também em tomateiro estaqueado em algumas regiões de São Paulo (Lourenção & Nagai, 1994) sendo rapidamente constatado em outros estados. (França *et al.*, 1996).

O aumento populacional do biótipo B de *B. tabaci* foi associado aos relatos da ocorrência ou aumento na incidência de begomovírus em tomateiro no Distrito Federal (Ribeiro *et al.*, 1994), São Paulo (Lourenção & Nagai, 1994), Bahia (Ribeiro *et al.*, 1996), Minas Gerais (Faria *et al.*, 1997a), Pernambuco e Rio de Janeiro (Ribeiro *et al.*, 2003). Comparado ao A, o biótipo B possui melhor adaptação e dispersão; maior gama de hospedeiras, inclusive plantas invasoras; e coloniza com eficiência o tomateiro (Brown *et al.*, 1995). Assim sendo, a hipótese mais aceita para o aumento na incidência e diversidade de begomovírus no tomateiro no Brasil considera que o novo biótipo, por ser um vetor mais agressivo, pode ter facilitado o processo de transmissão de vírus restritos a plantas silvestres e/ou invasoras para o tomateiro (Ribeiro *et al.*, 2003).

Estimativas de perdas foram realizadas em diferentes regiões produtoras e observaram-se perdas superiores a 50% na produção de tomate em Minas Gerais (Rezende *et al.*, 1996; Zerbini *et al.*, 1996) e de até 100% em algumas áreas no Submédio São Francisco (Bezerra *et al.*, 1997). Um estudo realizado sob condições controladas mostrou uma redução de 60% na produtividade de tomateiro suscetível a um begomovírus geneticamente relacionado ao *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Giordano *et al.*, 2005). Os efeitos das diferentes espécies de begomovírus sobre a fisiologia da produção do tomateiro ainda são pouco estudados.

Atualmente, além do TGMV, existem cinco espécies de begomovírus aceitas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) em tomateiro, descritas no Brasil: *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Ribeiro *et al.*, 2003), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes *et al.*, 2006), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (Barbosa *et al.*, 2009), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (Calegario *et al.*, 2007) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (Faria *et al.*, 1997a). Além desses vírus, isolados de *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) e *Sida mottle virus* (SiMoV), originalmente descritos em plantas invasoras, foram relatados em tomateiro (Calegário, 2004; Cotrim *et al.*, 2007).

Atualmente, há registros da ocorrência de diferentes espécies de begomovírus em todos os estados produtores, sendo eles: Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Distrito Federal e Goiás. Levantamentos realizados nas principais regiões produtoras de tomate para processamento industrial e consumo *in natura* indicam a existência de uma alta diversidade genética de begomovírus (Ambrozevícius *et al.*, 2002; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Inoue-Nagata *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2003), no entanto algumas espécies predominam em certas regiões. Na região Centro-Oeste predomina ToSRV no Distrito Federal e Goiás; enquanto na região Sudeste predominam ToCMoV e Tomato golden vein virus (TGVV) em Minas Gerais, e ToYVSV e ToSRV em São Paulo. Já na região Nordeste predomina Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV) na Bahia e Pernambuco. Esses levantamentos indicam que a população de begomovírus em tomateiro pode ser instável ou sofrer variações entre as regiões geográficas (Fernandes *et al.*, 2008).

O controle das begomoviroses ainda é muito difícil, por isso um conjunto de medidas deve ser adotado visando diminuir a incidência das doenças (Costa, 1976). Dentre as mais empregadas estão o controle químico do vetor e uso de cultivares resistentes a begomovírus, sendo essa última aplicada principalmente em tomateiro para consumo *in natura* (Faria *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2008). Na legislação brasileira existe uma instrução normativa que regulamenta o cultivo de tomateiro para processamento industrial e determina o uso do manejo integrado de pragas, destruição de restos culturais e vazios sanitários (SDA IN 024, publicada em 15/04/03). Adicionalmente, outras medidas podem ser adotadas como isolamento de viveiros, escolha da idade ideal para o transplante das mudas em campo, escolha da época de plantio e eliminação de fontes de inóculo tanto dos begomovírus como de alelodídeos (Vilas-Boas *et al.*, 1997; Zerbini *et al.*, 2005).

Apesar dos avanços em diferentes campos de estudos, as doenças causadas pelos begomovírus continuam sendo um problema na cultura do tomateiro, não apenas no Brasil, mas em outras regiões

do mundo (Hanssen *et al.*, 2010; Morales & Anderson, 2001; Varma & Malathi, 2003), e por isso muitos esforços visam melhorar o manejo das doenças causadas por esses vírus.

5. Aspectos gerais sobre begomovírus em plantas invasoras no Brasil

O aleirodídeo, *B. tabaci*, pode ter sido introduzido da Ásia e África para América durante a colonização por espanhóis e portugueses, e aqui encontrou muitas hospedeiras, principalmente, plantas selvagens das famílias *Euphorbiaceae*, *Malvaceae* e *Solanaceae* (Thompson, 2011).

No Brasil, a associação entre uma planta invasora e a transmissão de vírus por aleirodídeos para planta cultivada, provavelmente, ocorreu na década de 1930. Nessa época, suspeitava-se que o mosaico comum do algodoeiro poderia estar relacionado com a clorose infecciosa das malváceas, que ocorria em espécies de *Sida* no Estado de São Paulo (Costa, 1937). Posteriormente, demonstrou-se que o agente causal do mosaico comum do algodoeiro podia ser transmitido de plantas de *Sida micrantha*, com clorose infecciosa, para plantas sadias de algodão (Orlando & Silberschmidt, 1946).

No final da década de 1940 no Estado de São Paulo, Costa & Bennett (1950) descreveram o mosaico em plantas de *E. heterophylla*, que também foi associado à transmissão por aleirodídeos. Mais tarde, duas doenças sem importância econômica foram relatadas em feijoeiro. A primeira, denominada “bean crumpling”, teve o agente causal transmitido de plantas *E. heterophylla* (com mosaico) para plantas sadias de feijão, enquanto o agente causal da segunda doença, conhecida como “bean dwarf mosaic”, foi transmitido de plantas de *Sida* spp. (com clorose infecciosa) para feijoeiro sadio, ambos pelo vetor (Costa, 1965). Estudos semelhantes também foram realizados para outras culturas como soja, quiabo e tomate, demonstrando que plantas invasoras, principalmente malváceas e euforbiáceas, poderiam servir como reservatório de begomovírus transmitidos por aleirodídeos (Costa, 1976; Costa & Carvalho, 1960). Infelizmente, muitos desses isolados virais não foram identificados.

Algumas evidências indicam a importância das interações existentes entre plantas invasoras, plantas cultivadas, begomovírus e inseto-vetor, na ocorrência de viroses de forma natural e a sua contribuição para gerar novos isolados virais. A primeira é a constatação em plantas cultivadas de begomovírus originalmente descritos em plantas invasoras Faria & Maxwell (1999) coletaram em São Paulo, uma planta de feijão naturalmente infectada com um begomovírus relacionado com o *Abutilon mosaic virus* (AbMV). Fernandes-Acioli *et al.* (2011) também coletaram plantas de feijão no Estado de Goiás e isolaram o DNA-A completo de SiMMV. Em soja, Fernandes *et al.* (2009) relataram a ocorrência de SiMMV em Goiás. Uma estirpe do SiMMV foi isolada de uma planta de quiabo coletada em Goiás (Aranha *et al.*, 2011). Em tomateiro foram relatadas as espécies de SiMMV em Minas Gerais (Calegário, 2004), e SiMoV nos Estados de Minas Gerais e São Paulo (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Cotrim *et al.*, 2007).

A segunda evidência está relacionada com a presença em plantas invasoras de begomovírus comumente relatados em plantas cultivadas. No Brasil, são poucos esses tipos de relatos. Apenas dois registros foram feitos: ToSRV, importante begomovírus para o tomateiro, foi isolado de plantas de *N. physaloides* naturalmente infectadas (Barbosa *et al.*, 2009); e BGMV, responsável por severas epidemias em feijoeiro, foi isolado de *Macroptilium lathyroides* também em condições de campo (Silva *et al.*, 2011). Ambos os vírus são de extrema importância pelos impactos econômicos das doenças causadas. Epidemiologicamente, esse tipo de interação é muito importante, já que plantas invasoras que hospedam begomovírus severos para plantas cultivadas podem servir como reservatório natural e contribuir com o processo de infecção primária e disseminação do vírus. Costa (1954) havia sugerido essa hipótese, quando observou que a infecção de plantas de algodão com mosaico comum poderia ocorrer a partir de aleirodídeos que se tornavam virulíferos após alimentação em plantas de *Sida* sp. com clorose infecciosa e, posteriormente, transferiam o agente causal para o algodão.

A terceira evidência é a ocorrência de infecção mista tanto em plantas cultivadas (Ribeiro *et al.*, 2003; Roye *et al.*, 1999) como em plantas invasoras, principalmente, em espécies de malváceas (Costa & Carvalho, 1960; Jeske *et al.*, 2010; Jovel *et al.*, 2004). Os begomovírus detectados em infecções mistas, geralmente, são isolados que infectam preferencialmente plantas cultivadas ou plantas invasoras. Além disso, são poucos os casos em que begomovírus de uma cultura e de uma planta invasora foram encontrados simultaneamente. O primeiro registro de uma infecção mista com uma espécie de begomovírus, originalmente detectada em plantas invasoras, e outra de importância econômica para planta cultivada foi feito por Faria & Maxwell (1999), que detectaram em uma mesma planta de feijão fragmentos com alta porcentagem de identidade nucleotídica com o BGMV e AbMV. No Brasil, até o momento não há relatos sobre infecção mista com begomovírus economicamente importantes em planta invasora.

A importância das infecções mistas está no fato de causar sintomas mais severos (Faria & Maxwell, 1999), além de ser um dos pré-requisitos para a ocorrência de recombinação entre dois vírus, uma estratégia importante na evolução dos begomovírus (Ahmad *et al.*, 2011; Padidam *et al.*, 1999). Eventos de recombinação foram detectados entre isolados de begomovírus que comumente infectam plantas cultivadas (Garcia-Andres *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2007) e também entre isolados encontrados em plantas invasoras (Ahmad *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011). Apesar de não ter sido observada infecção mista, eventos de recombinação foram detectados entre o BGMV e uma provável nova espécie de begomovírus isolada de *Macroptilium lathyroides* (Silva *et al.*, 2011).

Levantamentos realizados em diferentes regiões do Brasil indicam que os begomovírus que infectam plantas invasoras possuem alta diversidade de espécies. Jovel *et al.* (2004) demonstraram que um complexo de espécies de begomovírus está associado ao mosaico em plantas de *S. micrantha*. Assunção *et al.* (2006) fizeram o primeiro relato no Brasil e no mundo de *Herissantia crispa*

(*Malvaceae*), *Waltheria indica*, *Triumfetta semitriloba* (*Sterculiaceae*) e *Desmodium* sp. (*Fabaceae*) com infecção por begomovírus, além de *Macroptilium lathyroides* (*Fabaceae*), *Sida rhombifolia* (*Malvaceae*), *Cnidoscolus urens*, *E. heterophylla* (*Euphorbiaceae*) e *Cleome* sp. (*Caparaceae*) anteriormente relatadas. Silva *et al.* (2011) encontraram cinco espécies de plantas da família *Fabaceae* (*Calopogonium mucunoides*, *Canavalia* sp., *Centrosema brasilianum*, *Macroptilium atropurpureum* e *M. lathyroides*) infectadas com diferentes begomovírus, inclusive por novas espécies e observaram que a recombinação é um evento comum entre os begomovírus isolados dessas plantas.

As interações existentes entre begomovírus, plantas invasoras e cultivadas podem ter sido facilitadas pela emergência do novo biótipo (biótipo B) de *B. tabaci*, um vetor com maior eficiência de disseminação e alta polifagia, que ao se alimentar em um número maior de hospedeiras ampliou as chances de transferência de begomovírus antes restritos às plantas invasoras para plantas cultivadas, e vice-versa, bem como a possibilidade de begomovírus recombinados de infectar e se adaptar a uma nova hospedeira (Ribeiro *et al.*, 2003).

6. Relação entre begomovírus em tomateiro e plantas invasoras associadas no Brasil

No Brasil, a primeira doença em tomateiro associada à aleirodídeos foi denominada “clorose infecciosa” e, pode ter sido causada por um begomovírus transferido a partir de malváceas selvagens (Flores *et al.*, 1960). Outras doenças foram descritas em tomateiro, porém sem causar danos econômicos (Costa, 1975; Maytis *et al.*, 1975).

Por volta de 1990, os begomovírus tornaram-se um problema nas principais regiões produtoras de tomate do país (Faria *et al.*, 2000) e paralelamente, observou-se uma alta diversidade entre as espécies de begomovírus isoladas dessa cultura. Esses fatos foram associados à introdução do biótipo B de *B. tabaci*, um vetor mais agressivo, que facilmente coloniza o tomateiro. Esse novo

cenário levantou a hipótese de que begomovírus presentes em plantas selvagens e/ou invasoras poderiam ser transferidos para o tomateiro pelo novo biótipo (Lourenção & Nagai, 1994; Ribeiro *et al.*, 2003). Alguns fatos suportam essa hipótese, o primeiro é a ocorrência natural em tomateiro de begomovírus originalmente detectados em plantas invasoras, como as espécies de SiMMV e SiMoV (Calegário, 2004; Cotrim *et al.*, 2007). O segundo foi a infecção natural de *N. physaloides*, planta invasora associada ao cultivo de tomate, com ToSRV (Barbosa *et al.*, 2009). Outro fato é o relacionamento filogenético entre os begomovírus isolados de tomateiro e aqueles de plantas invasoras (Ambrozevícius *et al.*, 2002; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008), como, por exemplo, o *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), uma espécie isolada de tomateiro que apresenta relação filogenética com SiMoV, SYMV e SiMMV - espécies de begomovírus encontradas em *Sida* sp. (Andrade *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007).

Em algumas regiões do Brasil, estudos têm indicado uma alta diversidade genética tanto entre begomovírus encontrados infectando plantas de tomate como em plantas invasoras associadas. Na região Sudeste, Ambrozevícius *et al.* (2002) verificaram alta diversidade genética entre begomovírus detectados em tomateiro e nas plantas invasoras *Sidastrum micranthum* e *Blainvillea rhomboidea*, sugerindo pelo menos quatro novas espécies. Castillo-Urquiza *et al.* (2008) encontraram seis novas espécies de begomovírus, três em tomateiro e três nas plantas invasoras *B. rhomboidea*, *Sida rhombifolia* e *S. micrantha*, comuns em campos de tomate, além disso, sugeriram a existência de uma origem comum entre os begomovírus de tomate e *Sida* no Brasil. Na região Nordeste, Arnaud *et al.* (2007) detectaram begomovírus em diferentes híbridos de tomateiro e nas plantas invasoras *Amaranthus spinosus*, *A. viridis*, *Ageratum conyzoides* e *Bidens pilosa*, e confirmaram a transmissão de begomovírus de tomateiro para tomateiro sadio por enxertia e via extrato foliar, e de plantas invasoras infectadas para tomateiro sadio por enxertia. Posteriormente, Silva *et al.* (2010)

demonstraram a transmissão de begomovírus de tomateiro para essas quatro espécies de plantas invasoras por aleirodídeos.

Na região Centro-Oeste, especificamente no estado de Goiás e no Distrito Federal, as espécies de *Crotalaria* sp., *Euphorbia heterophylla*, *Nicandra physaloides* e *Sida* sp. são plantas invasoras comumente encontradas em plantios de tomateiro. Essas plantas pertencem às famílias *Fabaceae*, *Euphorbiaceae*, *Solanaceae* e *Malvaceae*, respectivamente. Espécies de plantas selvagens e/ou invasoras dessas famílias há muito tempo são conhecidas como boas hospedeiras de aleirodídeos e dos vírus transmitidos por esse vetor (Thompson, 2011). A seguir serão descritos os principais begomovírus relatados nessas plantas.

Begomovírus descritos em *Sida* spp.:

Em *Sida* spp. existem 14 espécies de begomovírus definitivas, sendo que SiMMV, SiMoV, SiYMV foram descritas no Brasil (Brown *et al.*, 2012), e muitas espécies novas têm sido propostas (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007b; Paprotka *et al.*, 2010; Wyant *et al.*, 2011). No Brasil, espécies de *Sida* há muito tempo são estudadas como hospedeiras de begomovírus e têm sido associadas com doenças causadas por begomovírus em plantas cultivadas, como algodão, tomate e feijoeiro (Costa, 1954; 1965; Flores *et al.*, 1960).

Begomovírus em *E. heterophylla*:

Em *E. heterophylla*, atualmente três espécies de begomovírus são aceitas pelo ICTV: *Euphorbia leaf curl Guangxi virus* (EuLCGxV), *Euphorbia leaf curl virus* (EuLCuV) e *Euphorbia mosaic virus* (EuMV). Duas espécies tentativas foram descritas: *Euphorbia mosaic Peru virus* (EuMPV) e *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV). O primeiro relato de plantas de *E. heterophylla* com mosaico foi feito no Brasil (Costa & Bennet, 1950; Costa & Carvalho, 1960).

Posteriormente, ocorrências de uma doença semelhante foram feitas em Porto Rico, Peru, Venezuela, Jamaica e México (Thompson, 2011). O EuMV-YP, isolado do México, foi o primeiro begomovírus associado ao mosaico em *E. heterophylla* com o genoma completamente sequenciado (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007a). Em seguida, sequências de outros isolados de EuMV também foram determinadas. Uma nova espécie associada ao mosaico em plantas de *E. heterophylla* foi descrita no Peru, o Euphorbia mosaic Peru virus (EuMPV) (Shepherd *et al.*, 2008). Recentemente, Fernandes *et al.* (2011) também propuseram uma nova espécie de begomovírus, o Euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), encontrado naturalmente em plantas de *E. heterophylla*, coletadas em diferentes localidades do Estado de Goiás e Distrito Federal, no período de 2002 a 2009. A sequência do DNA-A da nova espécie apresentou identidade máxima de sequência de nucleotídeos de 87,3% com EuMPV e análises filogenéticas demonstraram que o novo vírus pertence a uma linhagem diferente dos isolados de EuMV. Paprotka *et al.* (2010) encontram dois isolados de begomovírus infectando naturalmente plantas de *E. heterophylla* no Estado de Mato Grosso do Sul, e os classificaram como EuMV. No entanto, esses dois isolados são claramente mais relacionados com a nova espécie proposta, EuYMV. Até o momento, o agente causal do mosaico em *E. heterophylla* descrito na década de 1950 por Costa & Bennett (1950) não foi identificado.

Begomovírus em *Crotalaria* spp.:

Nessa planta existe apenas uma espécie tentativa: Sunn hemp leaf distortion virus (SHLDV) (Brown *et al.*, 2012). Porém outros begomovírus como o *Tomato leaf curl virus* (ToLCV), *Cotton leaf curl virus Burewala virus* (CLCuBwV) e o *Cotton leaf curl virus Multan betasatellite* (CLCuMB) foram detectados e podem estar associados ao complexo viral “leaf curl disease” que ocorre em *C. juncea* na Índia (Khan *et al.*, 2002; Kumari *et al.*, 2010; Raj *et al.*, 2003). Sequências completas do DNA-A de SHLDV (número de acesso: NC013019, GQ183868 e FJ455449), *Papaya*

leaf curl virus (PaLCuV, número de acesso: Q200448, GQ200447 e GQ200446), e do betasatélite Radish leaf curl betasatellite (número de acesso: GQ200445) foram depositadas em bancos de dados de sequências, todas isoladas de plantas de *C. juncea* com “leaf distortion disease” (dados não publicados).

Begomovírus em *N. physaloides*:

Em *N. physaloides* há registro de apenas um begomovírus, porém de grande importância econômica no cultivo de tomateiro no Brasil: o ToSRV (Barbosa *et al.*, 2009). Esse vírus foi isolado de plantas de *N. physaloides* naturalmente infectadas crescendo ao redor de áreas de tomateiro em São Paulo e foi transmitido por aleirodídeos de plantas de *N. physaloides* para o tomateiro.

7. Literatura citada

- AHMAD, J., SINGH, B. R., AL-KHEDHAIRY, A. A., ALARIFI, S., KHAN, A. J. & MUSARRAT, J. 2011. Characterization of Sunn hemp begomovirus and its geographical origin based on in silico structural and functional analysis of recombinant coat protein. *African Journal of Biotechnology* 10, 2600-2610.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, D. L., SCHAFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.
- AMBROZEVÍCIUS, L. P., CALEGARIO, R. F., FONTES, E. P. B., CARVALHO, M. G. & ZERBINI, F. M. 2002. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 27, 372-377.
- ANDRADE, E. C., MANHANI, G. G., ALFENAS, P. F., CALEGARIO, R. F., FONTES, E. P. & ZERBINI, F. M. 2006. Tomato yellow spot virus, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology* 87, 3687-3696.
- ARANHA, S. D. A., ALBUQUERQUE, L. C. D., BOITEUX, L. S. & INOUE-NAGATA, A. K. 2011. Detection and complete genome characterization of a begomovirus infecting okra (*Abelmoschus esculentus*) in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 36, 14-20.
- ARNAUD, L. S. E. P., SANTOS, C. D. G., LIMA, J. A. A. & FEITOSA, F. A. A. 2007. Predominância de begomovírus em tomateiros na região produtora da Ibiapaba, Ceará, e sua detecção natural em plantas daninhas. *Fitopatologia Brasileira* 32, 241-246.
- ASSUNÇÃO, I. P., LISTIK, A. F., BARROS, M. C. S., AMORIN, E. P. R., SILVA, S. J. C., O. SILVA, I., RAMALHO-NETO, C. E. & LIMA, G. S. A. 2006. Diversidade genética de Begomovirus que infectam plantas invasoras na região nordeste. *Planta Daninha* 24, 239-244.
- BARBOSA, J. C., BARRETO, S. S., INOUE-NAGATA, A. K., REIS, M. S., FIRMINO, A. C., BERGAMIN, A. & REZENDE, J. A. M. 2009. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. *Journal of General Plant Pathology* 75, 440-443.
- BEDFORD, I. D., KELLY, A., BANKS, G. K., BRIDDON, R. W., CENIS, J. L. & MARKHAM, P. G. 1998. *Solanum nigrum*: An indigenous weed reservoir for a tomato yellow leaf curl geminivirus in southern Spain. *European Journal of Plant Pathology* March 104, 221-222.
- BEZERRA, I. C., RIBEIRO, S. G., GIORDANO, L. B., ZERBINI, F. M. & DE ÁVILA, A. C. 1997. Occurrence of geminivirus in tomato producing areas in Submédio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira* 22, 331.
- BIRD, J. & SANCHEZ, Y. 1971. Whitefly-transmitted viruses in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 55, 461-467.
- BROWN, J. K., FAUQUET, C. M., BRIDDON, R. W., ZERBINI, M., MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2012. *Geminiviridae*. In *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. Pages 351-373. Edited by A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens & E. J. Lefkowitz. London: Elsevier/Academic Press.
- BROWN, J. K., FROHLISH, D. R. & ROSELL, R. C. 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? . *Annual Review of Entomology* 40, 511-534.
- CALEGÁRIO, R. F. (2004). Caracterização de um isolado do begomovírus *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV). Viçosa, Brasil: Universidade Federal de Viçosa.
- CALEGARIO, R. F., FERREIRA, S. D. S., DE ANDRADE, E. C. & ZERBINI, F. M. 2007. Characterization of tomato yellow spot virus, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 42, 1335-1343.
- CASTILLO-URQUIZA, G. P., BESERRA, J. E., JR., BRUCKNER, F. P., LIMA, A. T., VARSANI, A., ALFENAS-ZERBINI, P. & MURILO ZERBINI, F. 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology* 153, 1985-1989.

- COLLINS, A., BROWN, J., MUJADDAD REHMAN, M. & ROYE, M. 2009. Complete nucleotide sequence of an isolate of *Euphorbia mosaic virus* that infects *Euphorbia heterophylla* and *Wissadula amplissima* in Jamaica. *Archives of Virology* 154, 1859-1860.
- COSTA, A. S. 1937. Nota sobre o mosaico do algodoeiro. *Revista de Agricultura* 12, 453-470.
- COSTA, A. S. 1954. Identidade entre o mosaico comum do algodoeiro e a clorose indecciosa das malváceas. *Bragantia* 13, 23-27.
- COSTA, A. S. 1965. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. *Plant Prot Bull FAO* 13, 2-12.
- COSTA, A. S. 1975. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat to widespread virus infection of legume crops in Brazil. In *Tropical diseases of legumes*, p. 171. Edited by J. Bird & K. Maramorosh. New York: Academic Press.
- COSTA, A. S. 1976. Espécies suscetíveis ao mosaico dourado do feijoeiro que podem servir de reservatório do vírus. *Fitopatologia Brasileira* 9, 37.
- COSTA, A. S. & BENNET, C. W. 1950. Whitefly transmitted virus diseases of *Euphorbia prunifolia*. *Phytopathology* 40, 266-283.
- COSTA, A. S. & BROWN, J. K. 1991. Variation in biological characteristics and esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci*, and the association of one population with silverleaf symptom induction. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 61, 211-219.
- COSTA, A. S. & CARVALHO, A. M. 1960. Comparative studies between the *Abutilon* and *Euphorbia* mosaic virus. *Phytopathol Z* 38, 129-152.
- COSTA, C. L. 1998. Vetores de vírus de plantas - 1. Insetos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 6, 103-169.
- COTRIM, M. A. D. A., KRAUSE-SAKATE, R., NARITA, N., ZERBINI, F. M. & PAVAN, M. A. 2007. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica* 33, 300-303.
- CZOSNEK, H. & GHANIM, M. 2002. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci* - insights from studies with Tomato yellow leaf curl virus. *Annals of Applied Biology* 140, 215-231.
- DEBROT, E. & CENTENO, F. 1986. Ocorrência del virus mosaico de las euforbiáceas infectando a *Euphorbia heterophylla* L. em Venezuela. *Agronomia Tropical* 35, 5-12.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 1, 13-15.
- DUFFY, S. & HOLMES, E. C. 2008. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus tomato yellow leaf curl virus. *Journal of Virology* 82, 957-965.
- FARIA, J. C., BEZERRA, I. C., ZERBINI, F. M., RIBEIRO, S. G. & LIMA, M. F. 2000. Situação atual das geminiviruses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 25, 125-137.
- FARIA, J. C. & MAXWELL, D. P. 1999. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology* 89, 262-268.
- FARIA, J. C., OLIVEIRA, M. N. & YOKOYAMA, M. 1994. Comparative response of bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes to the inoculation with bean golden mosaic virus at the seedling stage. *Fitopatologia Brasileira* 19, 566-572.
- FARIA, J. C., SOUZA-DIAS, J. A. C., SLACK, S. A. & MAXWELL, D. P. 1997a. A New Geminivirus Associated with Tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease* 81, 423-423.
- FARIA, J. C., SOUZA DIAS, J. A. C. & SLACK, S. A. 1997b. A new geminivirus associated with tomato in the state of São Paulo, Brazil. *Plant Disease* 81, 423.
- FAUQUET, C. M., BRIDDON, R. W., BROWN, J. K., MORIONES, E., STANLEY, J., ZERBINI, M. & ZHOU, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* 153, 783-821.
- FERNANDES-ACIOLI, N. A. N., PEREIRA-CARVALHO, R. C., FONTENELE, R. S., LACORTE, C., RIBEIRO S., G., FONSECA, M. E. N. & BOITEUX, L. S. 2011. First report of *Sida micrantha* mosaic virus in *Phaseolus vulgaris* in Brazil., 1196-1196.
- FERNANDES, F. R., ALBUQUERQUE, L. C., OLIVEIRA, C. L., CRUZ, A. R. R., ROCHA, W. B., PEREIRA, T. G., NAITO, F. Y. B., DIAS, N. D. M., NAGATA, T., FARIA, J. C., ZERBINI, F. M.,

- ARAGÃO, F. J. L. & INOUE-NAGATA, A. K. 2011. Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting *Euphorbia heterophylla* plants. *Archives of Virology* 156, 2063-2069.
- FERNANDES, F. R., CRUZ, A. R., FARIA, J. C., ZERBINI, F. M. & ARAGAO, F. J. 2009. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. *Archives of Virology*.
- FERNANDES, F. R., DE ALBUQUERQUE, L. C., DE BRITTO GIORDANO, L., BOITEUX, L. S., DE AVILA, A. C. & INOUE-NAGATA, A. K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36, 251-258.
- FERNANDES, F. R., DE ALBUQUERQUE, L. C. & INOUE-NAGATA, A. K. 2010. Development of a species-specific detection method for three Brazilian tomato begomoviruses. *Tropical Plant Pathology* 35, 43-47.
- FERNANDES, J. J., CARVALHO, M. G., BROMMONSCHENKEL, S. H., FONTES, E. P. B. & ZERBINI, F. M. 2006. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology* 55, 513-522.
- FIALLO-OLIVÉ, E., NAVAS-CASTILLO, J., MORIONES, E. & MARTÍNEZ-ZUBIAUR, Y. 2012. Begomoviruses infecting weeds in Cuba: increased host range and a novel virus infecting *Sida rhombifolia*. *Archives of Virology* 157, 141-146.
- FLORES, E., SILBERSCHMIDT, K. & KRAMER, M. 1960. Observações de "clorose infecciosa" das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico* 26, 65-69.
- FONTENELLE, M. R., LUZ, D. F., GOMES, A. P. S., FLORENTINO, L. H., ZERBINI, F. M. & FONTES, E. P. B. 2007. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus Tomato chlorotic mottle virus. *Virus Research* 126, 262-267.
- FRANÇA, F. H., VILAS-BOAS, G. L. & CASTELO-BRANCO, M. 1996. Occurrence of *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (*Homoptera: Aleyrodidae*) in the Federal District. *An Soc Entomol Brasil* 25, 369-372.
- FRISCHMUTH, T., ENGEL, M., LAUSTER, S. & JESKE, H. 1997. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, Sida-infecting bipartite geminiviruses in Central America. *Journal of General Virology* 78, 2675-2682.
- GARCIA-ANDRES, S., MONCI, F., NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. 2006. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology* 350, 433-442.
- GE, L. M., ZHANG, J. T., ZHOU, X. P. & LI, H. Y. 2007. Genetic structure and population variability of tomato yellow leaf curl China virus. *Journal of Virology* 81, 5902-5907.
- GIORDANO, L. B., FONSECA, M. E. N., SILVA, J. B. C., INOUE-NAGATA, A. K. & BOITEUX, L. S. 2005. Efeito da infecção precoce por Begomovirus com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. *Horticultura Brasileira* 23, 815-818.
- GREGORIO-JORGE, J., BERNAL-ALCOCER, A., BANUELOS-HERNANDEZ, B., ALPUCHE-SOLIS, A., HERNANDEZ-ZEPEDA, C., MORENO-VALENZUELA, O., FRIAS-TREVINO, G. & ARGUELLO-ASTORGA, G. 2010. Analysis of a new strain of *Euphorbia mosaic virus* with distinct replication specificity unveils a lineage of begomoviruses with short Rep sequences in the DNA-B intergenic region. *Virology Journal* 7, 275.
- GWYNNE, D. C. & MURRAY, R. B. 1985. *Weed biology and control in agriculture and horticulture*. London: Batsford Academic and Educacional.
- HAIBLE, D., KOBER, S. & JESKE, H. 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods* 135, 9-16.
- HANSEN, I. M., LAPIDOT, M. & THOMMA, B. P. 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. *Mol Plant Microbe Interact* 23, 539-548.
- HERNANDEZ-ZEPEDA, C., IDRIS, A. M., CARNEVALI, G., BROWN, J. K. & MORENO-VALENZUELA, O. A. 2007a. Molecular characterization and experimental host range of Euphorbia mosaic virus-Yucatan Peninsula, a begomovirus species in the *Squash leaf curl virus* clade. *Plant Pathology* 56, 763-770.

- HERNANDEZ-ZEPEDA, C., IDRIS, A. M., CARNEVALI, G., BROWN, J. K. & MORENO-VALENZUELA, O. A. 2007b. Molecular characterization and phylogenetic relationships of two new bipartite begomovirus infecting malvaceous plants in Yucatan, Mexico. *Virus Genes* 35, 369-377.
- HIGGINS, D. G., BLEASBY, A. J. & FUCHS, R. 1992. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Computer applications in the biosciences : CABIOS* 8, 189-191.
- HOU, Y.-M., PAPLOMATAS, E. J. & GILBERTSON, R. L. 1998. Host Adaptation and Replication Properties of Two Bipartite Geminiviruses and Their Pseudorecombinants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 208-217.
- INOUE-NAGATA, A. K., GIORDANO, L. B., FONSECA, M. E. N., RIBEIRO, S. G., ÁVILA, A. C., ALBUQUERQUE, L. C. & BOITEUX, L. S. (2004). Occurrence of begomovirus in tomato and other plants in Central Brazil. In 4th International Geminivirus Symposium, p. W3. Cape Town, South Africa.
- INOUE-NAGATA, A. K., MARTIN, D. P., BOITEUX, L. S., GIORDANO, L. B., BEZERRA, I. C. & AVILA, A. C. 2006. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 41, 1329-1332.
- JESKE, H., GOTTHARDT, D. & KOBER, S. 2010. In planta cloning of geminiviral DNA: The true *Sida micrantha mosaic virus*. *Journal of Virological Methods* 163, 301-308.
- JONES, D. R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* 109, 195-219.
- JOVEL, J., RESKI, G., ROTHENSTEIN, D., RINGEL, M., FRISCHMUTH, T. & JESKE, H. 2004. *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. *Archives of Virology* 149, 829-841.
- KASHINA, B. D., MABAGALA, R. B. & MPUNAMI, A. 2003. Tomato yellow leaf curl begomovirus disease in Tanzania: status and strategies for sustainable management. *Journal of Sustainable Agriculture* 2003; 22, 23-41.
- KASHINA, B. D., MABAGALA, R. B. & MPUNAMI, A. A. 2002. Reservoir weed hosts of tomato yellow leaf curl Begomovirus from Tanzania. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 2002; 35, 269-278.
- KHAN, J. A., SIDDIQUI, M. K. & SINGH, B. P. 2002. The natural occurrence of a begomovirus in sunn hemp (*Crotalaria juncea*) in India. *Plant Pathology Oxford* 51, 398.
- KUMAR, A., KUMAR, J., KHAN, Z. A., YADAV, N., SINHA, V., BHATNAGAR, D. & KHAN, J. A. 2010. Study of betasatellite molecule from leaf curl disease of sunn hemp (*Crotalaria juncea*) in India. *Virus Genes* 41, 432-440.
- KUMARI, P., SINGH, A. K., CHATTOPADHYAY, B. & CHAKRABORTY, S. 2010. Molecular characterization of a new species of Begomovirus and betasatellite causing leaf curl disease of tomato in India. *Virus Research* 152, 19-29.
- LEGG, J. P. & FAUQUET, C. M. 2004. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. *Plant Molecular Biology* 56, 585-599.
- LIMA, L. H. C., CAMPOS, L., MORETZSOHN, M. C., NAVIA, D. & DE OLIVEIRA, M. R. V. 2002. Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) populations in Brazil revealed by RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 25, 217-223.
- LOURENÇÃO, A. L. & NAGAI, H. 1994. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. *Bragantia* 53, 53-59.
- MARTIN, D. & SHEPHERD, D. 2009. The epidemiology, economic impact and control of maize streak disease. *Food Security* 1, 305-315.
- MAYTIS, J. C., SILVA, D. M., OLIVEIRA, A. R. & COSTA, A. S. 1975. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica* 1, 267-275.
- MCGOVERN, R. J., POLSTON, J. E. & MULLAHEY, J. J. 1994. *Solanum viarum*: Weed reservoir of plant viruses in Florida. *International Journal of Pest Management* 40, 270-273.
- MEHTA, P., WYMAN JEFFREY, A., NAKHLA, M. K. & MAXWELL DOUGLAS, P. 1994. Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* 87, 1291-1297.

- MELO, P. C. T. (1992). Mosca branca ameaça produção de hortaliças. In *Asgrow do Brasil Sementes: Informe Técnico*. Campinas, S.P, Brazil.
- MORALES, F. J. & ANDERSON, P. K. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* 146, 415-441.
- NASCENTE, A. S., PEREIRA, W. & MEDEIROS, M. A. 2004. Interferência das plantas daninhas na cultura do tomate para processamento. *Horticultura Brasileira* 22, 602-606.
- NAVAS-CASTILLO, J., FIALLO-OLIVE, E. & SANCHEZ-CAMPOS, S. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology* 49, 219-248.
- ORLANDO, A. & SILBERSCHMIDT, K. 1946. Estudos sobre a disseminação natural do vírus da "clorose infecciosa" das malváceas (*Abutilon virus 1* Baur) e sua relação com o inseto-vetor *Bemisia tabaci* (Genn.). *Arch Inst Biol* 17, 1-36.
- PADIDAM, M., SAWYER, S. & FAUQUET, C. M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265, 218-225.
- PAPROTKA, T., METZLER, V. & JESKE, H. 2010. The first DNA 1-like alpha satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. *Virology* 404, 148-157.
- POLSTON, J. E. & ANDERSON, P. K. 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 81, 1358-1369.
- RAJ, S. K., SINGH, R., PANDEY, S. K. & SINGH, B. P. 2003. Association of a geminivirus with a leaf curl disease of sunn hemp (*Crotalaria juncea*) in India. *European Journal of Plant Pathology* 109, 467-470.
- REZENDE, E. A., FILGUEIRA, F. A. R., ZERBINI, F. M., MACIEL-ZAMBOLIM, E., FERNANDES, J. J. & GILBERTSON, R. L. 1996. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 21, 424.
- RIBEIRO, S. G., AMBROZEVÍCIUS, L. P., DE AVILA, A. C., BEZERRA, I. C., CALEGARIO, R. F., FERNANDES, J. J., LIMA, M. F., MELLO, R. N., ROCHA, H. & ZERBINI, F. M. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting geminiviruses in Brazil. *Archives of Virology* 148, 281-295.
- RIBEIRO, S. G., BEZERRA, I. C., LIMA, M. F., DE ÁVILA, A. C. & GIORDANO, L. B. (1996). Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. In 8º Encontro Nacional de Virologia, p. 290. São Lourenço, MG.
- RIBEIRO, S. G., DE AVILA, A. C., BEZERRA, I. C., FERNANDES, J. J., FARIA, J. C., LIMA, M. F., GILBERTSON, R. L., MACIEL ZAMBOLIM, E. & ZERBINI, F. M. 1998. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. *Plant Disease* 82, 830.
- RIBEIRO, S. G., MARTIN, D. P., LACORTE, C., SIMÕES, I. C., ORLANDINI, D. R. S. & INOUE-NAGATA, A. K. 2007. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology* 97, 702-711.
- RIBEIRO, S. G., MELLO, L. V., BOITEUX, L. S., KITAJIMA, E. W. & FARIA, J. C. 1994. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District. *Fitopatologia Brasileira* 19, 330.
- ROJAS, M. R., GILBERTSON, R. L., RUSSELL, D. R. & MAXWELL, D. P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77, 340-347.
- ROJAS, M. R., HAGEN, C., LUCAS, W. J. & GILBERTSON, R. L. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* 43, 361-394.
- RONCHI, C. P., SERRANO, L. A. L., SILVA, A. A. & GUIMARÃES, O. R. 2010. Manejo de plantas daninhas na cultura do tomateiro. *Planta Daninha* 28, 215-228.
- ROYE, M. E., MCLAUGHLIN, W. A., NAKHLA, M. K. & MAXWELL, D. P. 1997. Genetic Diversity Among Geminiviruses Associated with the Weed Species *Sida* spp., *Macroptilium lathyroides*, and *Wissadula amplissima* from Jamaica. *Plant Disease* 81, 1251-1258.
- ROYE, M. E., WERNECKE, M. E., MCLAUGHLIN, W. A., NAKHLA, M. K. & MAXWELL, D. P. 1999. Tomato dwarf leaf curl virus, a new bipartite geminivirus associated with tomatoes and peppers in

- Jamaica and mixed infection with tomato yellow leaf curl virus. *Plant Pathology Oxford* June, 1999; 48, 370-378.
- SALATI, R., NAHKLA, M. K., ROJAS, M. R., GUZMAN, P., JAQUEZ, J., MAXWELL, D. P. & GILBERTSON, R. L. 2002. *Tomato yellow leaf curl virus* in the Dominican Republic: characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. *Phytopathology* 92, 487-496.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. & MANIAT, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANTANA, F. M., INOUE-NAGATA, A. K., NAGATA, T., RIBEIRO, S. G., ÁVILA, A. C. & GIORDANO, L. B. 2007. Detecção de um begomovírus em amostras foliares de tomateiro com sondas não-radioativas. *Ciência Rural* 37, 269-272.
- SANTOS, C. D., DE AVILA, A. C., INOUE NAGATA, A. K. & RESENDE, R. O. 2004. Espécies vegetais hospedeiras de begomovírus isolados de tomateiro em Goiás e no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* 29, 450-455.
- SANTOS, C. D. G., ÁVILA, A. C. D. & RESENDE, R. D. O. 2003. Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca. *Fitopatologia Brasileira* 28, 664-673.
- SHEPHERD, D. N., MARTIN, D. P., LEFEUVRE, P., MONJANE, A. L., OWOR, B. E., RYBICKI, E. P. & VARSANI, A. 2008. A protocol for the rapid isolation of full geminivirus genomes from dried plant tissue. *Journal of Virological Methods* 149, 97-102.
- SILBERSCHMIDT, K. 1943. Estudos sobre a transmissão experimental da "clorose infecciosa" das malvaceas. *Arq Inst Biol São Paulo* 14, 105-156.
- SILVA, A. K. F., SANTOS, C. D. G. & NASCIMENTO, A. K. Q. 2010. Transmissão de begomovírus de plantas daninhas para tomateiros pela mosca-branca. *Planta Daninha* 28, 507-514.
- SILVA, S. J. C., CASTILLO-URQUIZA, G. P., HORA-JÚNIOR, B. T., ASSUNÇÃO, I. P., LIMA, G. S. A., PIO-RIBEIRO, G., MIZUBUTI, E. S. G. & ZERBINI, F. M. 2011. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. *Plant Pathology* 61, 457-467.
- SINISTERRA, X. H., MCKENZIE, C. L., HUNTER, W. B., POWELL, C. A. & SHATTERS, R. G., JR. 2005. Differential transcriptional activity of plant-pathogenic begomoviruses in their whitefly vector (*Bemisia tabaci*, Gennadius: Hemiptera Aleyrodidae). *Journal of General Virology* 86, 1525-1532.
- STADEN, R. 1996. The staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology* 5, 233-241.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. & KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.
- THOMPSON, W. M. O. 2011. *The Whitefly, Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminivirus-Infected Host Plants: *Bemisia tabaci*, Host Plants and Geminiviruses: Springer.
- VARMA, A. & MALATHI, V. G. 2003. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* 142, 145-164.
- VILAS-BOAS, G. L., FRANÇA, F. H., AVILA, A. C. & BEZERRA, I. C. (1997). Manejo integrado da mosca-branca *Bemisia argentifolii*. In *Circular técnica da EMBRAPA Hortaliças*. Brasília. Brasil.
- VINCZE, T., POSFAI, J. & ROBERTS, R. J. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* 31, 3688-3691.
- WYANT, P. S., GOTTHARDT, D., SCHAFFER, B., KRENZ, B. & JESKE, H. 2011. The genomes of four novel begomoviruses and a new *Sida micrantha* mosaic virus strain from Bolivian weeds. *Archives of Virology* 156, 347-352.
- WYANT, P. S., STHROMEIER, S., SCHAFFER, B., KRENZ, B., ASSUNÇÃO, I. P., LIMA, G. S. A. & JESKE, H. 2012. Circular DNA genomics (circomics) exemplified for geminiviruses in bean crops and weeds of northeastern Brazil. *Virology Journal* 427, 151-157.
- ZERBINI, F. M., ANDRADE, E. C., BARROS, D. R., FERREIRA, S. S., LIMA, A. T. M., ALFENAS, P. F. & MELLO, R. N. 2005. Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. *Australasian Plant Pathology* 34, 475-480.

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

CAPÍTULO 2

**TRANSMISSÃO DE BEGOMOVÍRUS DE PLANTAS INVASORAS PARA
TOMATEIRO POR BIOBALÍSTICA**

TRANSMISSÃO DE BEGOMOVÍRUS DE PLANTAS INVASORAS PARA TOMATEIRO POR BIOBALÍSTICA

RESUMO

O *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) é atualmente uma das principais espécies de begomovírus que infectam o tomateiro (*Solanum lycopersicum*) no Brasil. Muitas plantas invasoras que ocorrem na área de cultivo do tomate são hospedeiras de begomovírus, no entanto apenas *Nicandra physaloides* foi relatada com infecção natural por ToSRV. Nesse estudo, begomovírus presentes em *Crotalaria* sp., *Euphorbia heterophylla* e *Sida* sp., naturalmente infectadas, foram transferidos por biobalística para o tomateiro, em particular isolados de ToSRV. Esse vírus ocorreu em baixa concentração nas plantas invasoras e em infecção mista com Euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV). Em contraste, outros begomovírus como o EuYMV e o SiMMV foram os principais vírus transferidos para plantas invasoras. Adicionalmente, uma nova estirpe de SiMMV isolada de plantas de *Sida* sp. foi identificada. Esse foi o primeiro relato de ToSRV em *Crotalaria* sp., *E. heterophylla* e *Sida* sp., indicando que essas plantas podem ser fonte desse vírus para o tomateiro no campo.

Palavra-chave: geminivírus, *Solanum lycopersicum*, ToSRV.

TRANSMISSION OF WEEDS INFECTING BEGOMOVIRUS TO TOMATO BY BIOLISTIC

ABSTRACT

Nowadays, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) is a one of major begomovirus that infect tomato plants (*Solanum lycopersicum*) in Brazil. Many weed plants occur in the tomato fields and some are hosts of begomoviruses, however only *Nicandra physaloides* has been found infected with ToSRV. In this study, begomoviruses from naturally infected *Crotalaria* sp., *Euphorbia heterophylla* and *Sida* sp. were transferred to tomato plants by biolistic inoculation, mainly ToSRV isolates. This virus occurred in at low titer in the weeds and in mixed infection with Euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV) and *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV). In contrast, other begomoviruses such as EuYMV and SiMMV were transferred to weeds. Additionally, a new strain of SiMMV isolated from *Sida* sp. was identified. This is the first report of ToSRV in *Crotalaria* sp., *E. heterophylla* and *Sida* sp., indicating that these weeds can act as a ToSRV source to tomato in the field.

Keywords: geminivirus, *Solanum lycopersicum*, ToSRV.

1. INTRODUÇÃO

As plantas invasoras são um sério problema para a agricultura brasileira, sendo em tomateiro uma grande preocupação entre os produtores. De forma geral, uma planta é considerada invasora quando ocorre em local e momento indesejado interferindo negativamente no desenvolvimento de uma cultura. Diferentes espécies de plantas invasoras são comumente encontradas em plantios de tomateiro causando reduções significativas na produtividade (Nascente *et al.*, 2004; Ronchi *et al.*, 2010). Além dos danos diretos ocasionados pela competição por espaço, nutrientes, energia solar e água, essas plantas podem afetar o tomateiro indiretamente funcionando como fonte de inóculo de diferentes patógenos e/ou pragas.

Especificamente no patossistema begomovírus-tomateiro, as plantas invasoras têm relevante importância, pois são hospedeiras do aleirodídeo *Bemisia tabaci* e de begomovírus, ambos considerados um problema para essa cultura. *B. tabaci* é uma das principais pragas do tomateiro, reduzindo a produtividade e a qualidade dos frutos e, além disso, pode atuar como vetor de begomovírus (Maytis *et al.*, 1975), considerado um fator limitante à produção em algumas regiões do Brasil (Faria *et al.*, 2000).

A interação entre plantas invasoras e a transmissão de begomovírus por *B. tabaci* para tomateiro é antiga. Acredita-se que a primeira doença causada por um begomovírus nessa cultura ocorreu pela transmissão do agente causal de plantas malváceas, com clorose infecciosa, por aleirodídeos (Flores *et al.*, 1960; Thompson, 2011). Outros estudos demonstraram a transmissão de begomovírus de plantas invasoras para o tomateiro e vice-versa (Barbosa *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2010) e begomovírus originalmente isolado de plantas invasoras foi relatado em tomateiro (Cotrim *et al.*, 2007). No Brasil, recentemente um importante begomovírus encontrado frequentemente em plantas de tomate, o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), foi isolado da planta invasora *Nicandra physaloides*, comum no cultivo de tomate (Barbosa *et al.*, 2009). Isso confirmou,

de fato, as antigas suspeitas de que plantas invasoras atuam como fonte de begomovírus para o tomateiro e, além disso, reforçou a hipótese de que outras espécies de plantas invasoras podem ser hospedeiras não apenas de ToSRV, mas também de outros begomovírus. Apesar de todos os avanços nos estudos de begomovírus, são escassos os trabalhos que demonstram a real importância das plantas invasoras como fonte desses vírus, notadamente em tomateiro. A comprovação de que plantas específicas podem atuar como fonte de begomovírus é essencial para elaborar um conjunto de recomendações para o controle dos vírus.

Portanto, o objetivo desse estudo foi determinar se outras espécies de plantas invasoras, além de *N. physaloides*, são hospedeiras de isolados de begomovírus capazes de infectar o tomateiro; transmitir os isolados de begomovírus dessas plantas para o tomateiro por inoculação artificial (biobalística); e identificar as espécies de begomovírus presentes nas plantas invasoras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras de trabalho

Trinta amostras de DNA total, de sete espécies de plantas invasoras (*Crotalaria* spp., *E. heterophylla*, *Malva* spp., *N. physaloides*, *Phaseolus vulgaris*, *Sida* spp. e *Solanum americanum*), foram selecionadas da coleção de begomovírus da Embrapa Hortaliças para investigar a presença de ToSRV (Tabela 1). Essas plantas foram coletadas em diferentes áreas produtoras de tomate de mesa localizadas no Distrito Federal e municípios do Estado de Goiás, no período de 2005 a 2009. Nesse contexto, todas as plantas presentes nessas áreas foram consideradas como plantas invasoras, de acordo com Gwynne & Murray (Gwynne & Murray, 1985), inclusive *P. vulgaris* (que é uma importante planta cultivada). A maioria apresentava algum sintoma, provavelmente, causado por infecção com begomovírus, como mosaico, nanismo, enrolamento, amarelecimento, clorose internerval e deformação foliar.

Em estudo anterior (dados não publicados), comprovou-se que as trinta amostras continham begomovírus, os quais foram transmitidos para mudas de tomateiro cv. Viradoro por biobalística. No entanto, tanto a infecção dessas amostras (usadas como fonte de inóculo) como das plantas de tomate inoculadas foi confirmada apenas por reação em cadeia da polimerase (PCR) com o par de oligonucleódeos universal para begomovírus PAL1v1978/PAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993). Assim sendo, as amostras da coleção bem como as de tomate (que apresentaram resultado positivo após inoculação) foram selecionadas para análises mais detalhadas, compondo as amostras de trabalho.

2.2. Amplificação por círculo rolante (RCA) do DNA viral

O DNA total das amostras da coleção foi submetido à RCA para aumentar a concentração do DNA circular viral (Haible *et al.*, 2006) utilizando a enzima *Phi-29* DNA polymerase (NEB). A

reação consistiu de 0,5 µL do DNA total, 1,0 µL do tampão da enzima *Phi-29* DNA polimerase (NEB), 1,0 µL de BSA (100X), 1,0 µL de dNTPs (10mM, GE Healthcare), 1,0 µL do oligonucleotídeo hexanucleotídeo randômico (10µM), 0,1 µL da enzima *Phi-29* DNA polimerase (NEB) e 5,4 µL de água estéril. A amplificação do DNA viral foi realizada em estufa a 30°C por 20 horas. Em seguida, a reação foi submetida à inativação da enzima *Phi-29* DNA polimerase a 65°C por 10 min. Para confirmar a amplificação e estimar a concentração do DNA viral, 1,0 µL de cada amostra foi aplicado em gel de agarose a 1,0% (preparado em tampão Tris borato-EDTA 0,5X) e submetido à eletroforese. Utilizou-se um marcador de tamanho (1-kb Plus DNA ladder - Invitrogen). Após a corrida, o gel foi corado por brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. O restante da reação foi armazenado a -20°C até o uso.

2.3. Detecção do ToSRV por PCR

A detecção de ToSRV por PCR foi realizada nas amostras da coleção e de tomate inoculadas. Para detectar ToSRV nas trinta amostras da coleção, dois tipos de reações foram utilizadas. A primeira usando apenas o DNA total e o par de oligonucleotídeos para o DNA-A: 1- ToSRV1f (5'-AAG GCG ACG TCT TTG GAA GG-3') e ToSRV2r (5'-CTC AGC GGC CTT GTT ATA TTT-3') que amplifica um fragmento entre a CP e Rep com 820 pb (Fernandes *et al.*, 2010). A segunda reação foi realizada utilizando o DNA viral amplificado por RCA, e dois pares de oligonucleotídeos: 1- ToSRV1f/ToSRV2r para o DNA-A (descrito acima) e 2- ToSB1450F (5'-GGGTCTAATGTGCCTGTAC-3') e ToSB1880R (5'-CACTACTTTTCGTCGTCG-3') para o DNA-B que amplifica um fragmento do gene da proteína do movimento (MP) com 430 pb.

A detecção de ToSRV nas plantas de tomate inoculadas a partir das trinta amostras da coleção foi realizada utilizando apenas o DNA total com o par de oligonucleotídeos para o DNA-A.

A reação de PCR consistiu de um volume final de 10 µL, contendo 1,0 µL de DNA total ou 1,0 µL do DNA viral amplificado por RCA, 1,0 µL do tampão 10X da enzima *Taq* polimerase (100mM Tris-HCl, pH 8,3, e 500mM KCl, Invitrogen), 0,8 µL de MgCl₂ (50mM, Invitrogen), 0,4 µL de dNTPs (2,5mM, GE Healthcare), 0,1 µL de cada oligonucleotídeo (10µM), 0,1 µL da enzima *Taq* DNA polimerase (5U/µL, Invitrogen) e 6,5 µL de água estéril. Previamente, realizou-se o gradiente de temperatura de anelamento para determinar a temperatura ideal de anelamento. Então, o DNA viral foi amplificado no termociclador Mastercycler (Eppendorf) programado para 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, com as seguintes condições: 94°C por 1 min (desnaturação), 62°C por 2 min (anelamento) e 72°C por 3 min (extensão), finalizando a reação a 72°C por 5 min. O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,2% (preparado em tampão Tris borato-EDTA 0,5X) corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. O marcador molecular usado foi de 1-kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

2.4. Sequenciamento direto do produto de PCR

Dez das trinta amostras da coleção foram aleatoriamente selecionadas para realizar o sequenciamento direto do produto de PCR amplificado com o par de oligonucleotídeos para o DNA-B de ToSRV por que?. Após eletroforese, o produto de PCR foi recuperado do gel e purificado com o kit de extração de gel PureLink DNA extraction kit (Invitrogen) e enviado para Macrogen Inc (Seoul, Coréia do Sul) para o sequenciamento com os oligonucleotídeos utilizados na amplificação. As sequências nucleotídicas do fragmento viral foram comparadas com outras disponíveis no banco de dados público (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o algoritmo Blastn (Altschul *et al.*, 1997).

2.5. Teste de transmissão de begomovírus de amostras de plantas invasoras para tomateiro por biobalística

O teste de transmissão foi realizado utilizando dois tipos de fonte de inóculo: o primeiro representado por quatro amostras do total de trinta amostras selecionadas da coleção de begomovírus, e o segundo composto por amostras obtidas após a primeira inoculação. Além do tomateiro, espécies de plantas invasoras também foram inoculadas. As amostras selecionadas como fonte de inóculo e as espécies de plantas usadas para inoculação estão detalhadas na Tabela 1.

As quatro amostras selecionadas como fonte de inóculo para a primeira inoculação foram nomeadas com o próprio número da amostra da coleção de begomovírus da Embrapa Hortaliças, representado pelo símbolo # seguido do número, por exemplo #768. Já as amostras selecionadas como fonte para a segunda inoculação foram nomeadas com o número da amostra usada como fonte na primeira inoculação, seguido por uma letra (inicial da hospedeira) e um número referente à planta inoculada. Por exemplo, a amostra #768/T5, é o DNA total de uma planta de tomate inoculada com a amostra da coleção #768, identificada pelo número 5.

a) Primeira inoculação

As quatro amostras selecionadas como fonte de inóculo para realizar a primeira inoculação foram: #768 (*Crotalaria* sp.), #780 (*Sida* sp.), #1646 (*Nicandra physaloides*) e #3539 (*Euphorbia heterophylla*), denominadas amostras originais selecionadas (AOS). O DNA viral de cada amostra previamente amplificado por RCA (conforme item 2.2) foi inoculado por biobalística (Paplomatas *et al.*, 1994) em mudas de tomateiro da cultivar Viradoro e na espécie da planta invasora da mesma espécie ou relacionada (*C. juncea*, *S. santaremnensis*, *N. physaloides* e *E. heterophylla*), em quatro repetições para cada espécie. Para cada reação de bombardeamento utilizou-se 500 ng do DNA viral amplificado para inocular oito mudas. No momento da inoculação, as mudas apresentavam duas a

quatro folhas verdadeiras. Como controle negativo, plantas invasoras e de tomateiro foram inoculadas apenas com as partículas de tungstênio (livres de DNA). As mudas inoculadas foram pulverizadas com inseticida contra aleirodídeos e mantidas em casa-de-vegetação. Com frequência, as mudas foram observadas para verificar o surgimento de sintomas e certificar a ausência de insetos. A inoculação, com cada uma das quatro amostras, foi repetida três vezes. A exceção foi para a amostra #1646 (*N. physaloides*), em que apenas uma inoculação foi realizada e quatro mudas de cada planta foram inoculadas, porque em testes prévios uma alta taxa de infecção foi obtida das plantas inoculadas. Após 20 a 30 dias o DNA total foi extraído e a infecção analisada como descrito no item 2.6 (a seguir).

b) Segunda inoculação

Baseado nos resultados da primeira inoculação, uma amostra de DNA total de cada planta invasora e de tomate, inoculadas com as quatro AOS, foi selecionada como fonte de inóculo para realizar a segunda inoculação em novas mudas de tomateiro e nas plantas invasoras correspondentes ou relacionadas. Os procedimentos para inoculação e análise da infecção foram os mesmos empregados para a primeira inoculação. A inoculação foi repetida três vezes, exceto para a amostra #1646/N14.

Tabela 1. Amostras selecionadas, como fonte de inóculo, para o teste de transmissão por biobalística dos isolados virais para tomateiro cv. Viradoro e para plantas invasoras da mesma espécie ou relacionadas.

1ª inoculação			2ª inoculação		
Fontes de inóculo (AOS) ^a		Plantas inoculadas	Fontes de inóculo		Plantas inoculadas
Amostras	Origem		Amostras	Origem (1ª inoculação)	
#768	DNA total de <i>Crotalaria</i> sp.	<i>C. juncea</i>	#768/C3	DNA total de <i>C. juncea</i> após inoculação a partir da AOS #768	Tomateiro <i>C. juncea</i>
		Tomateiro ^b	#768/T5	DNA total de tomateiro após inoculação a partir da AOS #768	Tomateiro <i>C. juncea</i>
#780	DNA total de <i>Sida</i> sp.	<i>S. santaremnensis</i>	#780/S9	DNA total de <i>S. santaremnensis</i> após inoculação a partir da AOS #780	Tomateiro <i>S. santaremnensis</i>
		Tomateiro	#780/T11	DNA total de tomate após inoculação a partir da AOS #780	Tomateiro <i>S. santaremnensis</i>
#1646	DNA total de <i>N. physaloides</i>	<i>N. physaloides</i>	#1646/N14	DNA total de <i>N. physaloides</i> após inoculação a partir da AOS #1646	Tomateiro <i>N. physaloides</i>
		Tomateiro	#1646/T17	DNA total de tomate após inoculação a partir da AOS #1646	Tomateiro <i>N. physaloides</i>
#3539	DNA total de <i>E. heterophylla</i>	<i>E. heterophylla</i>	#3539/E21	DNA total de <i>E. heterophylla</i> após inoculação a partir da AOS #3539	Tomateiro <i>E. heterophylla</i>
		Tomateiro	#3539/T24	DNA total de tomate após inoculação a partir da AOS #3539	Tomateiro <i>E. heterophylla</i>

^a AOS = Amostras originais selecionadas, usadas como fonte de inóculo na primeira inoculação.

^b Mudas de tomateiro cv. Viradoro foram usadas para inoculação.

2.6. Análise da infecção

2.6.1. Observação de sintomas e extração de DNA total de plantas

O DNA total foi extraído utilizando-se o método de extração CTAB de acordo com Doyle & Doyle (1991) com pequenas modificações. Aproximadamente 0,5 mg de tecido foliar foi macerado em microtubo de 2,0 mL contendo 650 µL de tampão CTAB (2% CTAB, 100 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM de NaCl e 0,2% de 2-β-mercaptoetanol) e cinco esferas metálicas com 1,0 mm de diâmetro (para auxiliar a maceração do tecido foliar). Os tubos foram colocados em agitador (Precellys - Bertin Technologies) programado para dois ciclos a 1500 rpm por 30 seg, e então incubados a 65°C por 5 min. Em seguida, 650 µL de clorofil (24 partes de clorofórmio:1 parte álcool isoamílico) foram adicionados aos tubos, os quais foram vigorosamente agitados e centrifugados a 9000 rpm por 10 min em microcentrífuga. Em média, 400 a 500 µL do sobrenadante foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL contendo 300 µL de isopropanol. Os tubos foram levemente agitados e mantidos a temperatura ambiente por 30 min, e então centrifugados a 12000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e 300 µL de etanol 70% gelado foram adicionados aos tubos para lavagem do *pellet* a 12000 rpm por 3 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 150 µL de Tris-HCL (10 mM, pH 7,8) estéril. Os tubos, contendo o DNA total, foram armazenados a -20 °C.

2.6.2. Amplificação por círculo rolante-polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (RCA/RFLP)

As quatro AOS e as plantas inoculadas (após a primeira e segunda inoculação) foram analisadas por RCA/RFLP (Haible *et al.*, 2006). O DNA viral amplificado por RCA (como descrito

no item 2.2) foi digerido com a enzima de restrição MspI para analisar o perfil de restrição dos isolados de begomovírus de cada amostra. A reação de digestão consistiu de um volume final de 10 µL contendo 1,0 µL do DNA viral amplificado por RCA na concentração de aproximadamente 100 ng/µL, 1,0 µL do tampão da enzima (NEB), 0,2 µL da enzima MspI (NEB) e 7,8 µL de água estéril. A reação foi incubada em estufa a 37°C por 6 horas. Em seguida, os produtos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (preparado em tampão Tris borato EDTA 1,0X, corado por brometo de etídeo e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. O marcador molecular usado foi de 1-kb Plus DNA ladder (Invitrogen). A análise baseou-se no somatório estimado do tamanho do genoma viral e no tipo de perfil de restrição apresentado em cada amostra

2.6.3. Detecção de begomovírus por PCR

O DNA total das plantas inoculadas foi submetido a PCR com o par de oligonucleotídeos universal para begomovírus PAL1v1978/PAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993) e a reação foi realizada como descrito no item 2.3, no entanto, utilizando-se DNA total e temperatura de anelamento de 55°C.

Em seguida, realizou-se a PCR específica para detecção dos begomovírus *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), *Sida micranta mosaic virus* (SiMMV) e ToSRV com os seguintes pares de oligonucleotídeos: 1)- EuA170F (5'-AAAGTAATTGACATTATTCGATATC-3') e EuA1084R (5'-RAATTGGGTGTCGTCGGTC-3') que amplifica um fragmento entre a região intergênica e a REN com 914 pb do DNA-A de EuYMV; 2)- SimA1500F (5'-GGCAATCCTGTGTCTCGGTT-3') e SimA2114R (5'-GGGAGAAGTTACCGGAAAAG-3') que amplifica um fragmento do gene da Rep com 614 pb do DNA-A de SiMMV; 3)- ToSRV1f/ToSRV2r para o DNA-A de ToSRV; e 4)- ToSB1450F/ToSB1880R para o DNA-B de ToSRV (os dois últimos estão descritos no item 2.3). Os pares de oligonucleotídeos para detectar EuYMV e SiMMV foram desenhados a partir de sequências nucleotídicas obtidas nesse trabalho usando o programa Oligo analyzer versão 3.1 (Integrated DNA

Technologies, Inc.). As condições da reação foram realizadas como descrito no item 2.3, porém utilizando-se DNA viral amplificado por RCA.

As quatro AOS, anteriormente investigadas quanto a presença de ToSRV, também foram avaliadas por PCR com os oligonucleotídeos específicos para EuYMV e SiMMV.

2.7. Clonagem

Dois grupos de amostras foram selecionados para clonagem. O primeiro é formado pelas AOS usadas como fonte de inóculo na primeira inoculação. O segundo é representado por amostras obtidas após a primeira e segunda inoculações (incluindo aquelas selecionadas como fonte de inóculo para a segunda inoculação) (Tabela 1). A seleção das amostras do segundo grupo foi baseada na análise de RCA/RFLP.

Inicialmente, o DNA viral de cada amostra foi amplificado por RCA (Inoue-Nagata *et al.*, 2004) e digerido com 12 enzimas de restrição (BamHI, ClaI, EcoRI, EcoRV, HindIII, KpnI, PstI, SacI, SacII, SpeI, XbaI e XhoI) para selecionar aquelas capazes de clivar o DNA em um único ponto, gerando um fragmento de aproximadamente 2,6-kb. A reação de digestão foi realizada de acordo com as instruções do fabricante das enzimas (NEB, Invitrogen, Pharmacia e Promega) e o produto de digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,7%. Em seguida, o gel contendo as amostras de DNA viral foi utilizado para realizar hibridização por “Southern blot”, conforme procedimentos descritos por Sambrook *et al.* (1989). Utilizou-se sonda não radioativa específica para o DNA-A de begomovírus, correspondente ao gene da capa protéica (com aproximadamente 900 pb), sintetizada por PCR de acordo com Santana *et al.* (2007).

As enzimas capazes de clivar o DNA-A em um único ponto foram utilizadas para realizar uma nova digestão com volume final de 40,0 µL, contendo 20,0 µL do DNA viral amplificado por RCA, 4,0 µL do tampão da enzima, 0,8 µL da enzima e 15,2 µL de água estéril, mantida a 37°C por

12 horas. O volume total de digestão foi aplicado em gel de agarose 0,7% e submetido à eletroforese. O tempo de exposição à luz ultravioleta foi o mínimo possível para evitar ruptura do DNA. O DNA viral (inserto) foi purificado com o kit de extração de gel PureLink DNA extraction kit (Invitrogen) e a quantificação estimada por eletroforese. Paralelamente, o vetor pBluescript SK+ (Stratagene) foi digerido com a mesma enzima de restrição usada para digestão do inserto, desfosforilado e preparado de acordo com procedimentos descritos em Sambrook *et al.* (1989). Em seguida, procedeu-se a ligação do inserto ao vetor em uma reação consistindo de 6,25 a 6,5 µL do inserto (50-100 ng/µL), 0,5-0,75 µL do vetor (100 ng/µL), 2,0 µL do tampão 5X da enzima T4 DNA ligase e 1,0 µL da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), a 16°C por 12 horas. Dessa reação, 5,0 µL foram utilizados para transformação em 50,0 µL de célula competente de *Escherichia coli* DH5α por eletroporação. As células transformadas foram plaqueadas e incubadas a 37°C por 12 horas. Em média 5 colônias brancas (contendo os clones) foram transferidas, individualmente, para tubos de ensaio contendo 5,0 mL de meio LB líquido com 5,0 µL de ampicilina (50 mg/µL), os quais foram incubados a 37°C por 12 horas com agitação a 150 rpm. Em seguida, realizou-se a purificação plasmidial (Sambrook *et al.*, 1989), e a presença do inserto foi confirmada pela digestão dos clones com a enzima de restrição utilizada no processo de clonagem, resultando em um fragmento correspondente ao vetor e outro ao inserto, analisados por eletroforese. Os clones, foram então digeridos com a enzima de restrição MspI, e aqueles com perfil de restrição distinto foram selecionados e submetidos a purificação plasmidial com QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) para sequenciamento. A preservação das colônias contendo os clones foi feita em glicerol e armazenadas a -80°C (Sambrook *et al.*, 1989).

2.8. Sequenciamento e análise das sequências

O sequenciamento foi realizado pela MacroGen Inc. (Seoul, Coréia do Sul) por caminamento de oligonucleotídeos em sequenciador automático. Quatro fragmentos de sequências, amplificados

com um par de oligonucleotídeos do vetor e dois internos, foram suficientes para obtenção da sequência completa do DNA-A. O par de oligonucleotídeos interno foi desenhado com o programa Oligo Analyzer (Integrated DNA Technologies, Inc.), e sintetizado pela Macrogen Inc.

As sequências foram montadas e analisadas no Standen Package program (Staden, 1996) e submetidas à pesquisa BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) para comparação com outras espécies de begomovírus depositadas no banco de dados público. A identificação preliminar da espécie foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus - ICTV (Brown *et al.*, 2012; Fauquet *et al.*, 2008). Múltiplos alinhamentos e comparação de sequências foram feitos com o programa Clustal V (Higgins *et al.*, 1992) presente no programa MegaAlign, usando os seguintes parâmetros: “Gap opening penalty = 15 e Gap extension penalty = 6.66” (Tamura *et al.*, 2007). Em seguida, a árvore filogenética foi construída pelo método neighbor-joining com 3000 repetições, com o modelo “maximum composite likelihood”.

2.8.1. Digestão *in silico* das sequências

As sequências foram submetidas à digestão *in silico* com a enzima de restrição MspI, usando o programa Nebcutter (Vincze *et al.*, 2003) (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), para comparação com os perfis de restrição obtidos após RCA/RFLP, e também com aqueles de sequências de isolados conhecidos.

3. RESULTADOS

3.1. RCA do DNA total das amostras de plantas invasoras da coleção

O DNA total das trinta amostras da coleção de begomovírus pertencentes às espécies de plantas invasoras *Crotalaria* spp., *E. heterophylla*, *Malva* spp., *N. physaloides*, *P. vulgaris*, *Sida* spp. e *S. americanum* foi amplificado por RCA e a concentração do DNA viral amplificado variou de 100 a 200 ng/μL. *P. vulgaris* é uma importante planta cultivada, no entanto todas as plantas coletadas dentro ou próximo às áreas de cultivo do tomateiro foram consideradas como plantas invasoras de acordo com definição de Gwynne & Murray (1985).

3.2. Detecção de ToSRV nas amostras de plantas invasoras da coleção e em tomateiro inoculado por biobalística

Dentre as trinta amostras da coleção, ToSRV foi detectado em oito amostras das plantas invasoras *E. heterophylla*, *Malva* sp., *N. physaloides* e *Sida* spp. após PCR específica utilizando o DNA total. As amostras de *Crotalaria* sp., *P. vulgaris* e *S. americanum* apresentaram resultado negativo (Tabela 2). No entanto, plantas de tomate inoculadas com DNA viral a partir das amostras de *Crotalaria* sp. e *P. vulgaris* apresentaram resultado positivo para a detecção de begomovírus com o par de oligonucleotídeos universal (Tabela 3). Então, o DNA viral das 30 amostras foi amplificado por RCA e submetido a PCR. A presença de ToSRV foi detectada em 19 amostras, incluindo uma amostra de *Crotalaria* sp. e *P. vulgaris*.

A PCR também foi realizada com o par de oligonucleotídeos para o DNA-B de ToSRV para confirmar a presença desse vírus (Tabela 2). O tamanho do produto amplificado após PCR com os

pares de oligonucleotídeos para o DNA-A e DNA-B foi de ca. 800 pb e 530 pb, respectivamente, em todas as amostras positivas.

Tabela 2. Detecção de ToSRV, por reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do DNA total e do DNA circular viral submetido a amplificação por círculo rolante (RCA), em amostras de plantas invasoras da coleção de begomovírus da Embrapa Hortaliças, coletadas em campos de tomate no Distrito Federal/DF e municípios do Goiás/GO entre 2005 e 2009.

Espécies de plantas invasoras da coleção de begomovírus	PCR com	PCR específica para detectar ToSRV ^b		
	oligonucleotídeo	DNA total	DNA viral amplificado por RCA	
	universal para begomovírus ^a	Oligonucleotídeos para o DNA-A	Oligonucleotídeos para o DNA-A	Oligonucleotídeos para o DNA-B
<i>Crotalaria</i> sp.	0/1	0/1	1/1	1/1
<i>Euphorbia heterophylla</i>	4/17	4/17	12/17	12/17
<i>Phaseolus vulgaris</i>	0/3	0/3	1/3	1/3
<i>Malva</i> spp.	1/2	1/2	1/2	1/2
<i>Nicandra physaloides</i>	2/3	2/3	2/3	2/3
<i>Sida</i> spp.	1/2	1/2	2/2	2/2
<i>Solanum americanum</i>	0/2	0/2	0/2	0/2
Total de amostras positivas	8/30	8/30	19/30	19/30

^a Utilizou-se o par de oligonucleotídeos universal para begomovírus PAL1v1978/PAR1c496, realizada por estudo anterior.

^b Com pares de oligonucleotídeos para ToSRV: ToSRV1f/ToSRV2r para o DNA-A, e ToSB1450F/ToSB1880R para o DNA-B.

Esse resultado indicou que ToSRV estava presente em amostras da maioria das plantas invasoras analisadas, com exceção de *S. americanum*.

A seguir as plantas de tomate que apresentaram detecção positiva para begomovírus com par de oligonucleotídeos universal (Tabela 3) foram também investigadas quanto à presença de ToSRV. A reação foi realizada usando apenas o DNA total e o par de oligonucleotídeos para o DNA-A. Do total de 62 amostras positivas, ToSRV foi detectado em 48 amostras de tomateiro inoculadas a partir de amostras de *Crotalaria* sp., *E. heterophylla*, *P. vulgaris*, *Malva* sp., *N. physaloides* e *Sida* spp., sugerindo que essas plantas podem atuar como fonte desse vírus no campo para o tomateiro.

A diferença entre o número de amostras amplificadas com o par de oligonucleotídeos universal e com os específicos, nas amostras de tomate após a inoculação, sugere que outros isolados virais presentes nas fontes de inóculo foram transferidos para o tomateiro. Alternativamente, a concentração desse vírus pode não ter sido suficiente para detecção por PCR utilizando apenas o DNA total. Como esperado, o tamanho do produto amplificado após a PCR foi de ca. 800 pb.

Em conjunto, esses resultados indicaram que diferentes espécies de plantas invasoras podem ser hospedeiras naturais de ToSRV, que esse vírus foi transmitido para plantas de tomateiro, por biobalística, e que outros isolados de begomovírus estavam presentes em algumas amostras de plantas invasoras e foram transferidos para tomateiro por biobalística. Além disso, a detecção por PCR usando o DNA viral previamente amplificado por RCA foi melhor do que a partir do DNA viral diretamente do DNA total extraído.

Tabela 3. Detecção de ToSRV, por reação em cadeia da polimerase (PCR), em amostras de plantas de tomate inoculadas por biobalística a partir de diferentes fontes de inóculo provenientes de plantas invasoras da coleção de begomovírus da Embrapa Hortaliças.

Espécies de plantas invasoras	No. de amostras selecionadas como fontes de inóculo para inocular tomateiro^a	PCR com oligonucleotídeo universal para begomovírus^b	PCR específica para detectar o DNA-A de ToSRV^d
<i>Crotalaria</i> spp.	1	2/8 ^c	2/2
<i>Euphorbia heterophylla</i>	17	37/136	29/37
<i>Phaseolus vulgaris</i>	3	4/24	2/4
<i>Malva</i> spp.	2	2/16	2/2
<i>Nicandra physaloides</i>	3	10/24	9/10
<i>Sida</i> spp.	2	5/16	4/5
<i>Solanum americanum</i>	2	2/16	0/2
Total	30	62/240	48/62

^a Cada amostra foi inoculada em oito mudas de tomateiro cv. Viradoro.

^b A PCR foi realizada com o par de oligonucleotídeos universal para begomovírus PAL1v1978/PAR1c496, em estudo anterior.

^c No. de plantas infectadas/No. de plantas inoculadas.

^d A PCR específica foi realizada com DNA total apenas e somente as plantas positivas após para begomovírus foram testadas.

3.3. Análise do sequenciamento direto do produto de PCR

Dez amostras da coleção foram selecionadas, aleatoriamente, para confirmar a presença de ToSRV pelo sequenciamento direto do produto de PCR amplificado com o par de oligonucleotídeos para o DNA-B. A análise com o algoritmo Blastn mostrou que os fragmentos de sequências apresentaram >92% de identidade nucleotídica com o gene da proteína de movimento de isolados de ToSRV, depositados em bancos de dados públicos. Além disso, pela análise dos cromatogramas, diferentes picos foram observados indicando a provável existência de infecção mista nas amostras selecionadas (dados não mostrados).

3.4. Testes de transmissão para confirmar que plantas invasoras podem atuar como fonte de ToSRV para o tomateiro

Após detectar ToSRV nas amostras de plantas invasoras da coleção (por PCR específica e sequenciamento direto do produto de PCR), e nas amostras de tomateiro (por PCR específica) previamente inoculadas a partir dessas amostras, quatro amostras foram selecionadas para realizar novas inoculações por biobalística para confirmar que as mesmas poderiam atuar como fonte de ToSRV para o tomateiro. Além do tomateiro, as espécies de plantas invasoras relacionadas também foram inoculadas.

3.4.1. Observação de sintomas e detecção de begomovírus por PCR

a) Primeira inoculação

As AOS #768 (*Crotalaria* sp.), #780 (*Sida* sp.), #1646 (*N. physaloides*) e #3539 (*E. heterophylla*) foram selecionadas como fonte de inóculo para realizar a primeira inoculação por apresentarem detecção positiva para ToSRV. Esse vírus foi detectado

nas plantas de tomate, previamente inoculadas a partir dessas amostras e as sequências do produto de PCR amplificado a partir dessas quatro amostras apresentaram alta identidade com o DNA-B de isolados de ToSRV.

Com a inoculação, isolados de begomovírus presentes nas quatro AOS foram transferidos para as respectivas plantas invasoras (*C. juncea*, *S. santaremnensis*, *N. physaloides* e *E. heterophylla*) e também para tomateiro cv. Viradoro, como esperado (Tabela 4). Sintomas de infecção por begomovírus foram observados nas plantas após a inoculação: mosaico em *E. heterophylla* e *S. santaremnensis* (inoculadas a partir de #3539 e #780), manchas cloróticas em *C. juncea* (inoculada a partir de #768), e nanismo, deformação foliar e mosaico em *N. physaloides* (inoculada a partir de #1646). Em tomateiro inoculado a partir das mesmas amostras os sintomas foram mais fracos, representados por mosqueado e manchas cloróticas. O DNA total foi extraído das plantas com e sem sintomas e utilizado para análise da infecção.

A infecção foi confirmada por PCR com o par de oligonucleotídeos universal para begomovírus PAL1v1978/PAR1c496, e um fragmento de aproximadamente 1,5 kb foi amplificado em pelo menos uma amostra de planta invasora e de tomate inoculada, além disso somente plantas com algum tipo de sintoma foram positivas após PCR (Tabela 4).

De uma forma geral, foi difícil a obtenção de plantas infectadas, tanto das espécies de invasoras como de tomate, após inoculação com as amostras #780, #768 e #3539. Na tentativa de contornar esse problema, a inoculação com essas amostras foi realizada mais de três vezes e, mesmo assim, o número de plantas positivas foi baixo (dados não mostrados). Por outro lado, plantas infectadas de *N. physaloides* e tomate foram facilmente obtidas após inoculação com a amostra #1646. Esse fato eliminou a possibilidade de escape no procedimento de inoculação por biobalística. Plantas

invasoras e de tomate inoculadas apenas com DNA plasmidial não apresentaram qualquer tipo de sintoma e a detecção de begomovírus foi negativa (dados não mostrados).

Tabela 4. Detecção de begomovírus, por reação em cadeia da polimerase (PCR), em plantas invasoras e de tomate após a primeira inoculação dos isolados virais, presentes em quatro amostras da coleção de begomovírus da Embrapa Hortaliças, por biobalística.

AOS	Plantas inoculadas	PCR com oligonucleotídeo universal para begomovírus ^b
#768 (<i>Crotalaria</i> sp.)	<i>C. juncea</i>	3/24 ^c
	Tomateiro	3/24
#780 (<i>Sida</i> sp.)	<i>S. santaremnensis</i>	2/24
	Tomateiro	1/24
#1646 (<i>N. physaloides</i>) ^a	<i>N. physaloides</i>	4/4
	Tomateiro	3/4
#3539 (<i>E. heterophylla</i>)	<i>E. heterophylla</i>	3/24
	Tomateiro	3/24

^a Para a amostra #1646 (*N. physaloides*) a inoculação foi realizada apenas uma vez porque uma alta taxa de plantas infectadas foi obtida em testes prévios.

^b Utilizou-se o par de oligonucleotídeos universal para begomovírus PAL1v1978/PAR1c496.

^c No. de plantas infectadas/No. de plantas inoculadas.

b) Segunda inoculação

Após a primeira inoculação, amostras provenientes de plantas invasoras e de tomateiro (inoculadas a partir das AOS) foram selecionadas como novas fontes de inóculo para realizar a segunda inoculação, sendo elas #768/C3 (*C. juncea*), #780/S9 (*S. santaremnensis*), #1646/N14 (*N. physaloides*) e #3539/E21 (*E. heterophylla*) originadas

de plantas invasoras, e #768/T5, #780/T11, #1646/T17 e #3539/T24 provenientes de plantas de tomateiro cv. Viradoro (Tabela 6).

Após a inoculação das plantas invasoras usando fontes de inóculo provenientes de plantas invasoras observou-se o desenvolvimento de sintomas como mosaico, deformação e nanismo em *N. physaloides* inoculadas a partir da amostra #1646/N14, e forte mosaico amarelo em plantas de *E. heterophylla* e *S. santaremnensis* após inoculação a partir das amostras #3539/E21 e #780/S9, respectivamente. Nenhum tipo de sintoma foi observado nas plantas de *C. juncea* inoculadas a partir da amostra #768/C3. Quando as plantas invasoras foram inoculadas a partir das fontes de inóculo oriundas de tomateiro, somente *N. physaloides* exibiu sintoma de mosaico após inoculação a partir da amostra #1646/T17, enquanto *C. juncea*, *S. santaremnensis* e *E. heterophylla* não apresentaram qualquer tipo de sintoma após inoculação a partir de #768/T5, #780/T11 e #3539/T24.

Em tomateiros inoculados a partir das fontes de inóculo originadas de plantas invasoras, mosaico e rugosidade foliar foram observados em plantas de tomate após inoculação a partir da amostra #1646/N14 e leve clorose foi observada em tomateiros inoculados a partir das amostras #768/C3 e #3539/E21, respectivamente. Nenhum tipo de sintoma foi observado em plantas de tomate inoculadas com a amostra #780/S9. Quando os tomateiros foram inoculados a partir das fontes de inóculo originadas de tomateiro, pelo menos uma planta exibiu sintoma de mosaico.

A infecção foi confirmada por PCR com o par de oligonucleotídeos universal para begomovírus PAL1v1978/PAR1c496, e todas as as plantas com sintomas apresentaram detecção positiva (Tabela 5). Em geral, os isolados virais presentes nas fontes de inóculo provenientes de plantas invasoras foram transferidos para as plantas invasoras (*S. santaremnensis*, *N. physaloides* e *E. heterophylla*). A exceção foi para *C.*

juncea inoculada a partir da amostra #768/C3 (*C. juncea*) que apresentou resultado negativo para begomovírus. Por outro lado, begomovírus foi detectado em tomateiro inoculados a partir das amostras #768/C3, #1646/N14 e #3539/E21 (Tabela 5).

Os isolados virais presentes nas fontes de inóculo originadas de tomateiro (#768/T5, #780/T11, #1646/T17 e #3539/T24) foram transferidos para o tomateiro. No entanto, todas as plantas invasoras inoculadas a partir das mesmas fontes de inóculo apresentaram resultado negativo para esse vírus (Tabela 5).

A transferência de begomovírus para ambas as plantas inoculadas, aparentemente, só ocorreu a partir das amostras #1646/N14, #1646/T17 e #3539/E21. Porém, o número de plantas de tomate infectadas a partir da amostra #3539/E1 foi menor em relação às plantas de *E. heterophylla*. Isso indicou que o isolado presente nas amostras #1646/N14 e #1646/T17 parece estar adaptado tanto ao tomateiro como a *N. physaloides*, enquanto aquele presente na amostra #3539/E21 está mais adaptado a *E. heterophylla*, já que mais plantas foram infectadas a partir da mesma fonte de inóculo.

Tabela 5. Detecção de begomovírus, por reação em cadeia da polimerase (PCR), em plantas invasoras e de tomate após a segunda inoculação dos isolados virais, presentes em fontes de inóculo provenientes de plantas invasoras e de tomateiro obtidas após a primeira inoculação, por biobalística.

Amostras	Fontes de inóculo		Plantas inoculadas	PCR com oligonucleotídeo universal para begomovírus ^a
	Origem			
#768/C3	DNA total de <i>C. juncea</i>		Tomateiro	1/23 ^b
	inoculada a partir da AOS #768		<i>C. juncea</i>	0/32
#768/T5	DNA total de tomateiro		Tomateiro	3/24
	inoculado a partir da AOS #768		<i>C. juncea</i>	0/24
#780/S9	DNA total de <i>S. santaremnensis</i>		Tomateiro	0/24
	inoculada a partir da AOS #780		<i>S. santaremnensis</i>	2/16
#780/T11	DNA total de tomate inoculado		Tomateiro	3/32
	a partir da AOS #780		<i>S. santaremnensis</i>	0/24
#1646/N14	DNA total de <i>N. physaloides</i>		Tomateiro	1/4
	inoculada a partir da AOS #1646		<i>N. physaloides</i>	2/4
#1646/T17	DNA total de tomate inoculado		Tomateiro	2/8
	a partir da AOS #1646		<i>N. physaloides</i>	2/8
#3539/E21	DNA total de <i>E. heterophylla</i>		Tomateiro	1/8
	inoculada a partir da AOS #3539		<i>E. heterophylla</i>	7/24
#3539/T24	DNA total de tomate inoculado		Tomateiro	1/16
	a partir da AOS #3539		<i>E. heterophylla</i>	0/24

^a Utilizou-se o par de oligonucleotídeos universal para begomovírus PAL1v1978/PAR1c496.

^b Três inoculações foram realizadas, exceto para a amostra #1646/N14.

Em geral, esses resultados mostraram que poucas plantas de tomate foram infectadas por isolados de begomovírus presentes nas fontes de inóculo provenientes de plantas invasoras. Já aqueles isolados presentes nas fontes de inóculo oriundas de

tomateiro foram transferidos apenas para o tomateiro após a segunda inoculação. E os isolados presentes nas plantas invasoras selecionadas como fonte de inóculo foram transferidos para as plantas invasoras (com exceção de *C. juncea*). É possível que diferentes isolados virais estavam presentes nas AOS #768 (*Crotalaria* sp.), #780 (*Sida* sp.), #1646 (*N. physaloides*) e #3539 (*E. heterophylla*). Após as duas transferências, é possível que diferentes isolados tenham sido selecionados de acordo com a hospedeira: aqueles de plantas invasoras foram prevalentes e, por isso, foram facilmente transferidos ou replicados em plantas invasoras, enquanto aqueles de tomateiro (também presentes nas AOS) foram selecionados após inoculação nessa hospedeira, e por sua vez, preferencialmente transmitido para novas plantas de tomate, e não para plantas invasoras após a segunda inoculação. A exceção foi observada em plantas de *N. physaloides* e tomateiro, nas quais a infecção por begomovírus foi confirmada após inoculação a partir de ambas as fontes de inóculo: #1646/N14 (proveniente de *N. physaloides*) e #1646/T17 (proveniente de tomateiro), indicando que o mesmo isolado viral também estava presente na amostra #1646 (*N. physaloides*) e se replica bem nessas hospedeiras.

3.4.2. Análise de RCA/RFLP

Os isolados de begomovírus presentes nas amostras selecionadas como fontes de inóculo e nas plantas inoculadas foram amplificados por RCA e digeridos com a enzima de restrição MspI. Três tipos de perfis de restrição foram observados nas quatro AOS usadas como fonte de inóculo na primeira inoculação: o tipo I, representado pelas amostras #768 (*Crotalaria* sp.) e #3539 (*E. heterophylla*) (Figura 1, Colunas 1 e 20) indicando que os begomovírus presentes nessas amostras são similares; o tipo II obtido da amostra #780 (*Sida* sp.) (Figura 1, Coluna 8) e o tipo III representado pela amostra

#1646 (*N. physaloides*) (Figura 1, Coluna 12). Pelo somatório estimado dos fragmentos de DNA de cada perfil, aparentemente todas as AOS estariam infectadas com um único begomovírus (#768 Σ = 4,9 kb, #780 Σ = 5,0 kb , #1646 Σ = 5,4 kb e 3539 Σ = 4,9 kb) (Figura 1), considerando que o tamanho do genoma completo de um begomovírus tem aproximadamente 5,0 kb, sendo 2,5 kb para cada componente (DNA-A e DNA-B). No entanto, a análise do tipo de perfil de restrição obtido das plantas inoculadas mostrou que: os begomovírus presentes em tomateiro e *N. physaloides* (Figura 1, Colunas 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19) foram idênticos àquele da amostra #1646 usada para inoculação (Figura 1, Coluna 12), ambos com perfil de restrição tipo III, indicando a presença de apenas um isolado. Diferentemente, os begomovírus presentes em tomateiros inoculados com as amostras #768, #780 e #3539 apresentaram perfil de restrição distinto (Figura 1, Colunas 5, 6, 7, 11, 24, 25 e 26) ao das amostras usadas para inoculação (Figura 1, Colunas 1, 8 e 20), porém idêntico ao da amostra #1646 (Figura 1, Coluna 12), todos correspondentes ao perfil de restrição do tipo III. Já o perfil de restrição dos begomovírus presentes nas plantas invasoras *C. juncea*, *E. heterophylla* (tipo I) (Figura 1, Colunas 2, 3, 4, 21, 22 e 23) e *S. santaremnensis* (tipo II) (Figura 1, Colunas 9 e 10) foi idêntico ao das amostras usadas para inoculação #768, #3539 e #780, indicando a presença de diferentes isolados nessas amostras. De modo semelhante, após a segunda inoculação o perfil de restrição das plantas inoculadas correspondeu àquele presente nas fontes de inóculo (dados não mostrados).

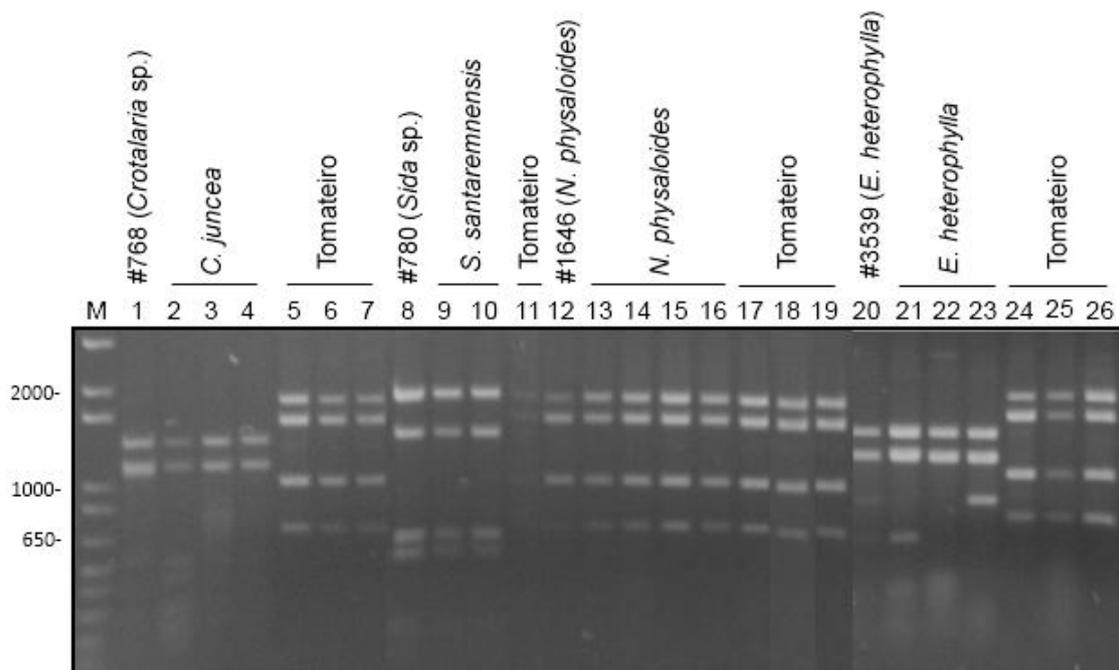


Figura 1. Gel de eletroforese dos produtos de DNA viral submetidos à amplificação por círculo rolante e análise do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RCA/RFLP), com a enzima de restrição MspI, presente nas amostras selecionadas para a primeira inoculação e transferidos para as plantas inoculadas: #768 (*Crotalaria* sp.) (1), *Crotalaria juncea* (2, 3 e 4) e tomateiro (5, 6 e 7); #780 (*Sida* sp.) (8), *Sida santaremnensis* (9 e 10) e tomateiro (11); #1646 (*Nicandra physaloides*) (12), *N. physaloides* (13, 14, 15 e 16) e tomateiro (17, 18 e 19); #3539 (*Euphorbia heterophylla*) (20), *E. heterophylla* (21, 22 e 23) e tomateiro (24, 25 e 26). M: marcador 1-kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Considerando apenas o somatório dos fragmentos de DNA somente um isolado de viral estaria causando infecção nas AOS. Entretanto, após a inoculação de plantas invasoras e de tomate tornou-se perceptível a presença de mais de um isolado de begomovírus nas amostras #768 (*Crotalaria* sp.), #780 (*Sida* sp.) e #3539 (*E. heterophylla*), já que perfis de restrição distintos foram obtidos das plantas inoculadas. De forma oposta, apenas um tipo de perfil de restrição foi obtido das plantas

inoculadas com a amostra #1646 (*N. physaloides*), o qual foi idêntico ao perfil dessa fonte de inóculo, indicando a presença ou predominância de apenas um isolado viral.

3.4.3. Clonagem e sequenciamento

Os begomovírus presentes nas AOS, bem como em oito amostras obtidas após a primeira inoculação foram identificados pela clonagem e sequenciamento de pelo menos um clone de DNA-A. Além disso, essas amostras foram representativas do perfil de restrição presente nas demais plantas inoculadas.

Ao todo 19 clones foram selecionados para sequenciamento. A identificação foi feita de acordo com os critérios estabelecidos pelo ICTV que determina o limite de 89% para a identificação de espécie (Brown *et al.*, 2012). Após análise das sequências, sete delas com ca. 2611 nt apresentaram >95,9% de identidade de sequência nucleotídica com o DNA-A de EuYMV (NC_0125531), três sequências com ca. 2693 nt apresentaram >87,9% de identidade de sequência nucleotídica com o DNA-A de SiMMV (NC_0053301) e nove sequências com ca. 2591 nt apresentaram >98,5% de identidade de sequência nucleotídica com o DNA-A de ToSRV (NC_009607.1). Do grupo das AOS, EuYMV foi isolado das amostras #768 (*Crotalaria* sp.) e #3539 (*E. heterophylla*), SiMMV da amostra #780 (*Sida* sp.) e ToSRV da amostra #1646 (*N. physaloides*). Do grupo das plantas invasoras inoculadas, EuYMV e ToSRV foram obtidos de *C. juncea* inoculada a partir da amostra #768 (*Crotalaria* sp.). Apenas SiMMV foi isolado de *S. santaremnensis* após inoculação a partir da amostra #780 (*Sida* sp.), EuYMV foi obtido de *E. heterophylla* inoculada a partir da amostra #3539 (*E. heterophylla*) e ToSRV foi isolado de *N. physaloides* inoculada a partir da amostra #1646 (*N. physaloides*). De uma planta de tomate inoculada com a amostra #768,

EuYMV e ToSRV foram isolados. Apenas ToSRV foi obtido das demais plantas inoculadas a partir das amostras #780, #1646 e #3539 (Tabela 6).

Os begomovírus isolados das AOS, bem como aqueles transferidos para as plantas inoculadas foram correlacionados com perfil de restrição obtidos pela análise de RCA/RFLP (item 3.4.2). As sequências de EuYMV foram associadas ao perfil de restrição tipo I (Figura 1, Colunas 1, 2, 3, 4, 20, 21, 22 e 23), as sequências de SiMMV foram atribuídas ao perfil tipo II (Figura 1, Colunas 8, 9 e 10) e aquelas de ToSRV corresponderam ao perfil tipo III (Figura 1, Colunas 5, 6, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 24, 25 e 26). Das amostras de *C. juncea* (Figura 1, Coluna 3) e tomateiro (Figura 1, Coluna 5) inoculadas a partir da amostra #768, clones de ToSRV e EuYMV foram isolados de uma mesma planta (Tabela 6). No entanto, o perfil de restrição predominante em *C. juncea* correspondeu ao tipo I (atribuído a EuYMV), enquanto na planta de tomate predominou o perfil tipo III (atribuído a ToSRV), isso indicou que uma espécie viral predominou sobre a outra, mas ambas, fortuitamente, puderam ser clonadas, confirmando a ocorrência de infecção mista nessas plantas, e conseqüentemente, na fonte de inóculo.

Para confirmar a correlação entre o perfil de restrição e as três espécies isoladas, as sequências de cada uma foram submetidas à digestão *in silico* com MspI (Vincze *et al.*, 2003). Uma perfeita associação entre os perfis de restrição obtidos por RCA/RFLP e aqueles digeridos *in silico* foi observada (dados não mostrados).

Tabela 6. Espécies de begomovírus clonadas das amostras originais selecionadas como fonte de inóculo (AOS) e das plantas invasoras e de tomate inoculadas por biobalística.

AOS	Clones obtidos (espécies)	Amostras de plantas infectadas selecionadas para clonagem ^a	Clones obtidos (espécies)
#768 (<i>Crotalaria</i> sp.)	768-a (EuYMV)	#768/C3 (<i>C. juncea</i>)	768/Cro3a (ToSRV)
	768-b (EuYMV)		768/Cro3b (EuYMV)
	768-c (EuYMV)	#768/T5 (Tomateiro)	768/Tom5a (EuYMV) 768/Tom5b (ToSRV)
#780 (<i>Sida</i> sp.)	780 (SiMMV)	#780/S9 (<i>S. santaremnensis</i>)	780/Si9a (SiMMV) 780/Si9b (SiMMV)
		#780/T11 (Tomateiro)	780/Tom11 (ToSRV)
#1646 (<i>N. physaloides</i>)	1646 (ToSRV)	#1646/N14 (<i>N. physaloides</i>)	1646/Nic14 (ToSRV)
		#1646/T17 (Tomateiro)	1646/Tom17a (ToSRV) 1646/Tom17b (ToSRV)
#3539 (<i>E. heterophylla</i>)	3539 (EuYMV)	#3539/E21 (<i>E. heterophylla</i>)	3539/E21 (EuYMV)
		#3539/T24 (Tomateiro)	3539/Tom24a (ToSRV) 3539/Tom24b (ToSRV)

^a Amostras selecionadas como fonte de inóculo para realizar a segunda inoculação.

3.4.4. Análise das sequências

As sete sequências de DNA-A de EuYMV DNA-A apresentaram >97,6% de identidade nucleotídica uma com a outra, e 95,9-96,8% com a sequência do isolado referência EuYMV (NC_0125531). As nove sequências de ToSRV apresentaram >98,7% de identidade nucleotídica entre si e 98,5-99,0% com ToSRV (NC_0096071). Já as três sequências de SiMMV apresentaram >98,8% de identidade de sequência uma com a outra, e 87,9-88,7% com SiMMV (NC_0053301). Apesar da identidade de sequência desses isolados ter sido menor que 89% com outros isolados de SiMMV, eles foram classificados como isolados de SiMMV de acordo com os demais critérios de classificação do ICTV. Os isolados de EuYMV e ToSRV foram identificados como variantes de estirpes relatadas, enquanto aqueles de SiMMV foram identificados como uma nova estirpe do *Sida micrantha mosaic virus*, de acordo com o critério do ICTV no qual isolados com <93% de identidade de sequência nucleotídica pertencem a uma nova estirpe (Brown *et al.*, 2012).

O genoma do DNA-A dos isolados obtidos possuem organização típica dos begomovírus bipartidos do Novo Mundo, com uma fase aberta de leitura (ORF) no sentido viral que codifica a capa proteica (CP); e quatro ORFs no sentido complementar que codificam as proteínas conhecidas como Rep, REn, TrAP e AC4. A região intergênica com ca. 300 nt, contendo a origem de replicação (TAATATTAC) também foi identificada.

A árvore filogenética foi construída usando as 19 sequências determinadas nesse estudo e aquelas disponíveis nos bancos de dados públicos, totalizando 80 sequências. O *Tomato yellow leaf curl China virus* (ToYLCCNV) foi usado como “outgroup”. Para simplificação, apenas três grupos foram ilustrados na Figura 2. Todas as sequências de ToSRV (Figura 2A), incluindo aquelas de *N. physaloides* (1646 e 1646/Nic14) e de

tomateiro inoculado (1646/Tom17, 768/Tom5b, 3539/Tom24a, 3539/Tom24b e 780/Tom11), bem como de *C. juncea* (768/Cro3a) foram agrupadas juntas constituindo o primeiro grupo. Isso indicou que os isolados de ToSRV presentes nas amostras de plantas invasoras e de tomateiro são similares. No segundo grupo, os novos isolados de SiMMV oriundos das amostras #780 (780) e da *S. santaremnensis* inoculada (780/S9a, 780/S9b) foram agrupadas com todas as outras sequências de SiMMV, entretanto esses isolados formaram um subgrupo claramente distinto (Figura 2B), devido à baixa identidade com os outros isolados de SiMMV relatados até agora. Todas as sequências obtidas de EuYMV provenientes das amostras #768 (768a, 768b, 768c), #3539 (3539) e das plantas inoculadas *C. juncea* (768/Cro3b), *E. heterophylla* (3539/E21) e tomateiro (768/T5a) foram agrupadas com os outros isolados de EuYMV (Figura 2C).

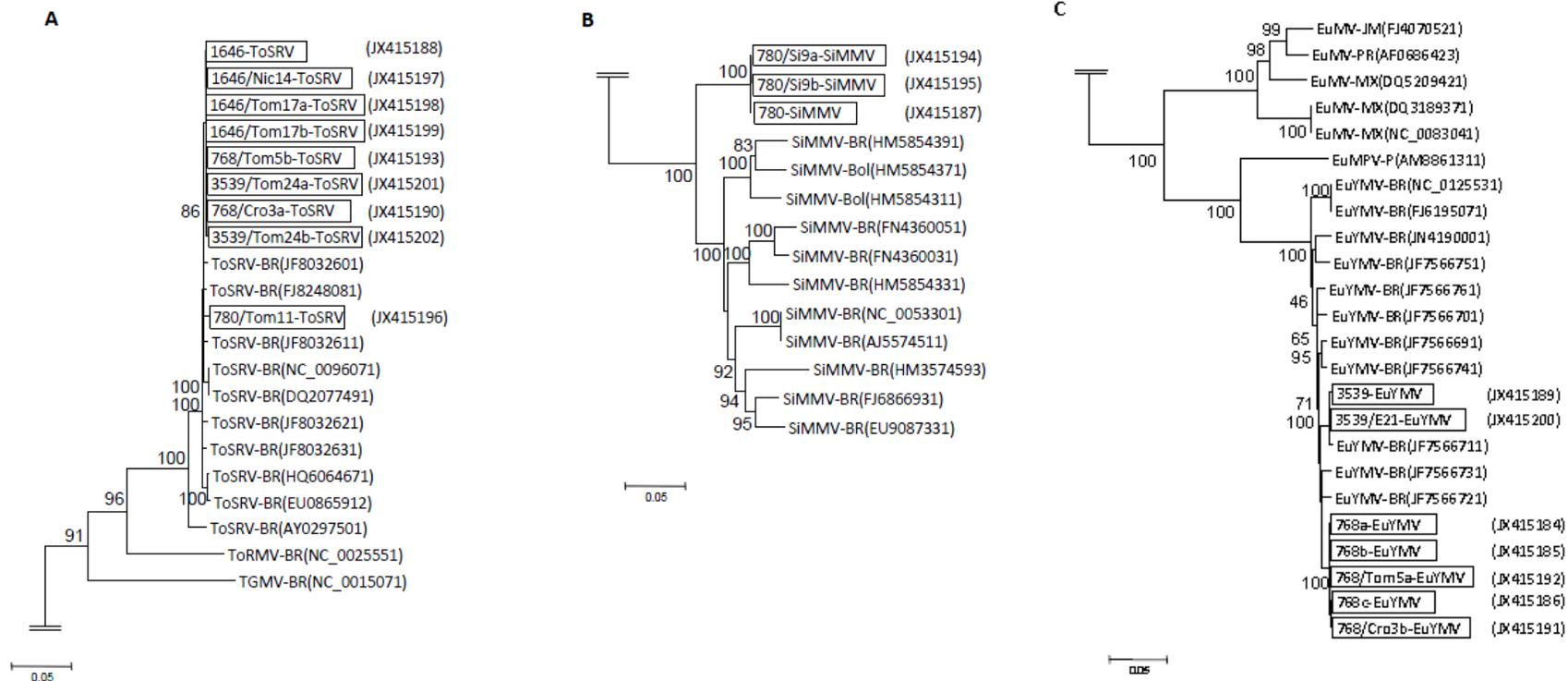


Figura 2. Grupos selecionados da árvore filogenética das sequências do DNA-A de isolados de ToSRV (A), SiMMV (B) e EuYMV (C). As sequências de begomovírus desse estudo estão destacadas em caixas. As espécies virais usadas na análise foram: EuMV - *Euphorbia mosaic virus*, EuMPV - *Euphorbia mosaic Peru virus*, EuYMV - *Euphorbia yellow mosaic virus*, SiMMV - *Sida micrantha mosaic virus*, TGMV - *Tomato golden mosaic virus*, ToRMV - *Tomato rugose mosaic virus* e ToSRV - *Tomato severe rugose virus*. O *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCV) foi usado como “outgroup” (não mostrado). A árvore foi construída pelo método “neighbour-joining” e modelo “maximum composite likelihood” no programa Mega 5.10 (“bootstrap” com 3000 repetições). As sequências obtidas nesse estudo foram depositadas no GenBank e os números de acesso são indicados entre parênteses. A barra horizontal indica o número de substituições por sítio.

3.4.5. Detecção dos begomovírus por PCR específica

A PCR específica foi realizada para confirmar a presença de EuYMV, SiMMV e ToSRV nas AOS usadas como fonte de inóculo na primeira inoculação e nas plantas inoculadas (Fig. 3). A detecção foi realizada com o DNA viral previamente amplificado por RCA.

As três espécies virais foram detectadas em todas as AOS usadas como fonte de inóculo para a primeira inoculação (Tabela 7). Todas as plantas de *C. juncea* e tomate inoculadas a partir da amostra #768 apresentaram infecção mista com EuYMV e ToSRV, sendo que em uma planta de *C. juncea* SiMMV também foi detectado. As três espécies virais foram detectadas nas plantas de *S. santaremnensis* e tomate após inoculação a partir da amostra #780. ToSRV foi detectado em todas as amostras de *N. physaloides* e tomateiro inoculados a partir da amostra #1646, sendo que em uma amostra de cada EuYMV também estava presente. Após inoculação a partir da amostra #3539, EuYMV e ToSRV foram detectados em todas as plantas de *E. heterophylla* e tomateiro, sendo que SiMMV também foi observado em uma amostra de cada planta (Tabela 7).

Tabela 7. Detecção de EuYMV, SiMMV e ToSRV, por reação em cadeia da polimerase (PCR), em plantas invasoras e de tomate após a primeira inoculação por biobalística dos isolados virais presentes em quatro amostras (AOS) da coleção de begomovírus da Embrapa Hortaliças.

AOS ^a	Plantas inoculadas	PCR com oligonucleotídeo universal para begomovírus ^b	PCR específica ^d		
			EuYMV	SiMMV	ToSRV ^e
#768 (<i>Crotalaria</i> sp.)	<i>C. juncea</i>	3/24 ^c	3/3	1/3	3/3
	Tomateiro	3/24	3/3	0/3	3/3
#780 (<i>Sida</i> sp.)	<i>S. santaremnensis</i>	2/24	2/2	2/2	2/2
	Tomateiro	1/24	1/1	1/1	1/1
#1646 (<i>N. physaloides</i>)	<i>N. physaloides</i>	4/24	1/4	0/4	4/4
	Tomateiro	3/24	1/3	0/3	3/3
#3539 (<i>E. heterophylla</i>)	<i>E. heterophylla</i>	3/24	3/3	1/3	3/3
	Tomateiro	3/24	3/3	1/3	3/3

^a As quatro amostras usadas como fonte de inóculo foram positivas para EuYMV, SiMMV e ToSRV.

^b A PCR foi realizada com o par de oligonucleotídeo universal para begomovírus PAL1v1978/PAR1c496.

^c No. de plantas de tomate infectadas/No. de plantas de tomate inoculadas.

^d Somente as plantas que apresentaram detecção positiva para begomovírus foram submetidas à PCR específica, a qual foi realizada com DNA viral amplificado por RCA e com os pares de oligonucleotídeos para EuYMV, SiMMV e ToSRV.

^e A detecção foi realizada com os pares de oligonucleotídeos para o DNA-A e DNA-B de ToSRV.

As amostras usadas como fonte de inóculo para realizar a primeira inoculação (AOS) e algumas amostras das plantas inoculadas (Tabela 7) foram selecionadas para ilustrar a detecção das espécies virais (Figura 3). Essas oito amostras de plantas inoculadas são aquelas utilizadas como fonte de inóculo na segunda inoculação (Tabela 5). O tamanho dos produtos amplificados de cada espécie viral foi de 914 pb para EuYMV, 614 pb para SiMMV, e 800 pb para o DNA-A e 430 pb para o DNA-B de ToSRV, em todas as amostras que apresentaram resultado positivo.

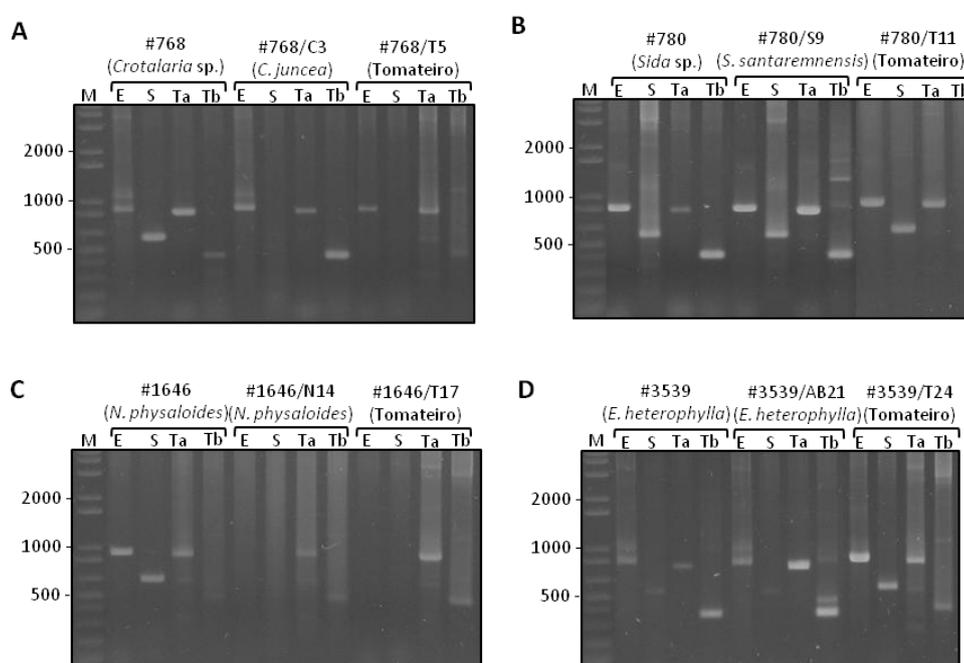


Figura 3. Géis de eletroforese dos produtos amplificados a partir das amostras selecionadas como fonte de inóculo (AOS) e das plantas inoculadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos específicos para EuYMV, SiMMV e ToSRV. **A** - #768 (*Crotalaria* sp.) e plantas inoculadas. **B** - #780 (*Sida* sp.) e plantas inoculadas. **C** - #1646 (*N. physaloides*) e plantas inoculadas. **D** - #3539 (*E. heterophylla*) e plantas inoculadas. **M**: marcador 1-kb Plus DNA ladder (Invitrogen); **E**: par de oligonucleotídeo EuA170F/EuA1084R para o DNA-A de EuYMV com 914 pb; **S**: par de oligonucleotídeo SimA1500F/SimA2114R para o DNA-A de SiMMV com 614 pb; **Ta**: par de oligonucleotídeo ToSRV1f/ToSRV2r para o DNA-A de ToSRV com 800 pb; **Tb**: par de oligonucleotídeo ToSB1450F/ToSB1880R para o DNA-B de ToSRV com 430 pb.

Esses resultados indicaram a ocorrência de infecção mista nas amostras #768 (*Crotalaria* sp.), #780 (*Sida* sp.), #1646 (*N. physaloides*) e #3539 (*E. heterophylla*), já que produtos específicos de EuYMV, SiMMV e ToSRV foram amplificados de todas elas. A infecção mista também foi observada em todas as plantas inoculadas, e a maioria dos vírus detectados nessas plantas correspondeu àqueles encontrados nas amostras utilizadas como fonte de inóculo, demonstrando que além de ToSRV outros vírus também foram transferidos tanto para as plantas invasoras como para o tomateiro.

4. DISCUSSÃO

As doenças causadas por begomovírus são um grave problema para muitas plantas cultivadas, especialmente em regiões mais quentes, onde a população do vetor, *B. tabaci*, parece ser maior. Além disso, algumas plantas invasoras têm sido relatadas como hospedeiras de begomovírus para culturas economicamente importantes (Bedford *et al.*, 1998; Kashina *et al.*, 2002; McGovern *et al.*, 1994) tornando-as potencialmente importantes na epidemiologia das doenças causadas por esses vírus.

Nesse estudo, begomovírus presentes nas plantas invasoras *Crotalaria* sp., *E. heterophylla*, *N. physaloides* e *Sida* sp. foram transferidos para plantas de tomate por biobalística, especialmente ToSRV, um importante begomovírus em tomateiro no Distrito Federal e Goiás (Fernandes *et al.*, 2008). Pela análise das sequências desses vírus, concluiu-se que todos os isolados pertenciam a espécies e estirpes anteriormente descritas no Brasil. As exceções foram os isolados de SiMMV, presentes em *Sida* sp. e nas plantas de *S. santaremnensis*, os quais foram classificados como uma nova estirpe do *Sida micrantha mosaic virus*, nomeada *Sida micrantha mosaic virus-Santaremnensis* (SiMMV-Santaremnensis).

Infecções mistas foram detectadas e confirmadas por testes de inoculação, análise de RCA/RFLP, PCR e sequenciamento. Inicialmente, o somatório estimado do genoma indicou a ocorrência de apenas um isolado viral nas amostras de *Crotalaria* sp., *E. heterophylla*, *N. physaloides* e *Sida* sp. (AOS). Entretanto o perfil de restrição das AOS foi claramente distinto daqueles obtidos das plantas de tomate inoculadas com o DNA viral proveniente dessas amostras (exceto a amostra #1646). Isso indicou que o vírus predominante nas plantas invasoras (*Crotalaria* sp., *E. heterophylla* e *Sida* sp.) não foi o principal vírus transferido para as plantas de tomate.

Na natureza, infecções mistas com begomovírus são comuns em plantas invasoras, e alguns estudos têm mostrado a importância dessas plantas como um local para ocorrência de recombinação, competição e seleção (Jeske *et al.*, 2010; Jovel *et al.*, 2004; Roye *et al.*, 1997; Wyant *et al.*, 2012). No sistema agrícola, infecções mistas em plantas invasoras e seus efeitos na epidemiologia de doenças causadas por begomovírus são pouco estudados. Um deles indicou que a planta invasora *Solanum nigrum*, frequentemente infectada com diferentes isolados do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), poderia atuar como reservatório para recombinação entre esses vírus. Dessa planta foi isolado o *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus* (TYLCAxV), um recombinante, o qual foi encontrado em campos comerciais de tomate no Sul da Espanha (Garcia-Andres *et al.*, 2006).

A identificação dos begomovírus por clonagem e sequenciamento mostrou que isolados de EuYMV estavam presentes em *Crotalaria* sp. e *E. heterophylla*, de SiMMV em *Sida* sp. e de ToSRV em *N. physaloides*. Após a inoculação, isolados de ToSRV foram obtidos de todas as plantas de tomate, enquanto EuYMV foi isolado de *C. juncea* e *E. heterophylla*, SiMMV de *S. santaremnensis*, e ToSRV de *N. physaloides*. ToSRV e EuYMV foram isolados de uma mesma planta de *C. juncea* e tomate inoculadas a partir da amostra #768 (*Crotalaria* sp.). Isso confirmou que ToSRV estava presente nas amostras de plantas invasoras provenientes de campos de tomateiro.

O perfil de restrição foi perfeitamente associado ao vírus identificado. O perfil de restrição tipo I correspondeu a isolados de EuYMV, aqueles do tipo II foram atribuídos aos isolados de SiMMV, e o tipo III foi associado aos isolados de ToSRV. Nas amostras de tomate e *C. juncea* infectadas com EuYMV e ToSRV (após inoculação a partir da amostra #768) ocorreu a predominância de um perfil de restrição sobre o outro de acordo com a hospedeira: em *C. juncea* o perfil de restrição de EuYMV foi

predominante sobre o de ToSRV, e na planta de tomate o perfil de restrição de ToSRV predominou sobre EuYMV. Possivelmente, EuYMV coloniza melhor *C. juncea*, enquanto ToSRV preferencialmente coloniza tomateiro.

Há indícios que begomovírus menos adaptados a determinada hospedeira causam nenhum ou poucos sintomas e apresentam baixo título viral na planta (Hou *et al.*, 1998). Esse fato, explicaria porque o perfil correspondente a ToSRV foi observado nas plantas de tomate e não nas plantas invasoras (com exceção de *N. physaloides*). Além disso, a espécie viral mais adaptada pode ter sido preferencialmente clonada apesar da presença de outros vírus. Durante a competição entre muitos vírus, o hospedeiro parece atuar com um filtro favorecendo aqueles mais adaptados.

A PCR realizada com oligonucleotídeos específicos para cada espécie viral demonstrou que todas as amostras apresentaram infecção mista com diferentes isolados, incluindo *N. physaloides* que, aparentemente, estava infectada apenas com ToSRV. Porém, a detecção de alguns vírus (especialmente ToSRV) não foi observada quando a PCR foi realizada apenas com DNA viral diretamente do DNA total. Isso indicou que a população de DNA viral nas amostras deveria ser enriquecida por RCA antes da PCR, permitindo a detecção daqueles vírus presentes em baixo título viral. Em uma situação semelhante, a simples PCR não pôde ser usada para detectar TYLCV em amostras de plantas invasoras na República Dominicana (Salati *et al.*, 2002). Neste caso, o problema foi contornado usando uma grande quantidade de DNA total na reação. No entanto, a fim de evitar a adição de inibidores da PCR (os quais podem estar presentes no DNA total), e elevar os riscos de falsos negativos, a amplificação do DNA viral por RCA pode ser eficiente nos casos que em o DNA alvo ocorre em baixa concentração na amostra.

Das quatro espécies analisadas, *N. physaloides* foi a única anteriormente relatada como hospedeira natural de ToSRV (Barbosa *et al.*, 2009). Aqui, confirmou-se que essa planta é uma excelente hospedeira alternativa de ToSRV. Provavelmente esse vírus está bem adaptado a essa planta, conseqüentemente sua eliminação é recomendável para reduzir a fonte de inóculo de ToSRV para o tomateiro.

Espécies de *Crotalaria* são comuns em áreas cultivadas no Brasil, principalmente, devido ao seu uso como adubo verde e na rotação de cultura para reduzir a população de nematóides. Alguns begomovírus foram relatados ou descritos nesse gênero. *C. juncea* está associada a “leaf curl disease” na Índia (Khan *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2010; Raj *et al.*, 2003), e os begomovírus *Papaya leaf curl virus* (PaLCuV) (Número de acesso GQ200446.1) e Sunn hemp leaf distortion virus (SHLDV) (NC_013019.1) foram isolados dessa planta (dados não publicados). No Brasil, plantas da família *Fabaceae* são usualmente infectadas com o *Bean golden mosaic virus*-BGMV (Faria & Maxwell, 1999), e três novas espécies de begomovírus foram descritas em *Macroptilium lathyroides* (Silva *et al.*, 2011). Nesse estudo os begomovírus encontrados em *Crotalaria* sp. foram EuYMV, e também ToSRV e SiMMV. A rotação de cultura com espécies de *Crotalaria* deve ser então bem planejada para evitar problemas com a incidência de begomovírus em tomateiro.

Um possível begomovírus em *E. heterophylla* foi o primeiro a ser detalhadamente estudado no Brasil (Costa & Bennet, 1950; Costa & Carvalho, 1960). A doença causada nessas plantas foi denominada “euphorbia mosaic disease” e plantas infectadas eram (e ainda são) frequentemente encontradas com sintoma intenso de mosaico. Mais tarde, uma doença semelhante foi descrita na Venezuela e Porto Rico (Bird & Sanchez, 1971; Debrot & Centeno, 1986), e isolados do *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) foram relatados in *E. heterophylla* na América Central (Collins *et al.*,

2009; Fiallo-Olivé *et al.*, 2012; Gregorio-Jorge *et al.*, 2010; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007a). Outra espécie tentativa, Euphorbia mosaic Peru virus (EuMPV), também foi isolada dessa planta no Peru (Shepherd *et al.*, 2008). No Brasil, um novo begomovírus infectando *E. heterophylla* foi descrito, o EuYMV (Fernandes *et al.*, 2011). Até agora, todos os begomovírus encontrados nessas plantas aqui no Brasil foram classificados como isolados do EuYMV. No presente estudo, demonstrou-se que além de EuYMV, outros vírus podem estar presentes nessa planta, ToSRV e SiMMV.

Por fim, desde 1940 há relatos de plantas de *Sida* exibindo sintomas da clorose infecciosa das malváceas (Silberschmidt, 1943). Mais tarde, diferentes espécies de begomovírus foram relatadas nessas plantas em muitos países. No Brasil, três espécies foram descritas: *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV), *Sida mottle virus* (SiMoV) e *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) (Brown *et al.*, 2012), sendo que mais três espécies foram propostas (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Wyant *et al.*, 2012). Aqui, uma nova estirpe do SiMMV foi isolada de plantas de *Sida* naturalmente infectadas.

Isolados de ToSRV estavam presentes em plantas de *Crotalaria* sp., *E. heterophylla*, *Sida* sp. e *N. physaloides* naturalmente infectadas crescendo em campos de cultivo de tomateiro. Esses isolados foram preferencialmente transferidos para plantas de tomate por biobalística, uma demonstração clara de que esse vírus está mais adaptado ao tomateiro. Em contraste, EuYMV preferencialmente infectou plantas de *C. juncea* e *E. heterophylla* e SiMMV foram transferidos para plantas de *S. santaremnensis*. Aparentemente, ocorreu uma redução de ToSRV nas plantas invasoras (usadas como fonte de inóculo, exceto *N. physaloides*) após sucessivas inoculações em tomateiro, nas condições desse teste. Portanto, parece que ToSRV não está bem adaptado a essas plantas invasoras (com exceção de *N. physaloides*). Apesar disso, essas plantas podem ser importantes fontes de inóculo primário desse vírus, pois a maioria é

perene e amplamente distribuída no Brasil. Aliado a isso, em condições naturais essas plantas podem ter a carga viral frequentemente renovada por aleirodídeos que adquiriram o vírus de tomateiro. Ou ainda, é possível que no campo essa diferença quanto à adaptação a hospedeira se torne menos relevante: uma vez que o vetor adquira ToSRV (mesmo em baixa concentração) de uma planta invasora (pouco eficiente) e o transmita para o tomateiro (esta uma ótima hospedeira), talvez seja suficiente para iniciar a disseminação do vírus. Para elucidar essa questão, testes de transmissão pelo vetor são essenciais. Essa informação é particularmente importante, já que uma medida legislativa, aplicada para algumas regiões do Brasil, determina um período de dois meses sem produção de tomate, durante o ano. Em tais circunstâncias, a eliminação dessas plantas invasoras (e de outras fontes de begomovírus para o tomateiro) pode ser de extrema importância para garantir a eficiência da medida. Em outros países, uma medida semelhante é baseada em um período livre de hospedeiro do vetor, para manejar o TYLCV em tomateiro. Por exemplo, na República Dominicana, um estudo demonstrou que plantas invasoras podem atuar como reservatório de TYLCV durante o período livre de hospedeiro do vetor e no início da estação de cultivo do tomate, indicando que tais plantas deveriam ser eliminadas para assegurar a efetividade da medida (Salati *et al.*, 2002).

O principal objetivo desse estudo foi demonstrar a importância das plantas invasoras, além de *N. physaloides*, como fonte de ToSRV no campo. Evidências foram mostradas que *Crotalaria* sp., *E. heterophylla* e *Sida* sp. podem atuar como fonte de ToSRV para o tomateiro, mas, aparentemente, elas são menos eficientes do que *N. physaloides* e o tomateiro. Além disso, esse foi o primeiro relato de infecção natural de *Crotalaria* sp., *E. heterophylla* e *Sida* sp. com ToSRV, e também de *Crotalaria* sp. com EuYMV.

5. CONCLUSÕES

ToSRV foi encontrado nas plantas invasoras *Crotalaria* sp., *E. heterophylla* e *Sida* sp., naturalmente infectadas, e foi transferido por biobalística para plantas de tomate. Assim, foi possível demonstrar que essas plantas podem atuar como fonte de ToSRV nas lavouras. Além desse vírus, EuYMV e SiMMV também estavam presentes nessas plantas, no entanto esses vírus foram preferencialmente transferidos para as plantas invasoras em detrimento de serem transferidas para o tomateiro.

Todos os isolados de EuYMV, SiMMV e ToSRV são variantes de uma mesma espécie e estirpe, com exceção de uma nova estirpe encontrada em *Sida* sp., a qual foi transferida para plantas de *S.santaremnensis*.

Com exceção de *N. physaloides*, a concentração de ToSRV nas demais plantas invasoras foi baixa e sua detecção por PCR foi realizada a partir do DNA viral amplificado por RCA. Isso indica que ToSRV apresenta capacidade de colonização dessas plantas, mas com uma eficiência inferior do que observado em tomateiro e em *N. physaloides*. A aparente redução do título viral de ToSRV nas plantas invasoras (usadas como fonte de inóculo) após as inoculações em tomateiro, nas condições desse teste, indicou que essas plantas invasoras (exceto *N. physaloides*) possivelmente apresentem uma baixa eficiência como fonte de ToSRV para o tomateiro.

Infecções mistas foram reveladas após as inoculações em hospedeiras distintas pela análise de RCA/RFLP, e foram confirmadas pela clonagem e sequenciamento e por PCR específica.

Esse foi o primeiro relato da infecção de *Crotalaria* sp., *E. heterophylla* e *Sida* sp. com ToSRV, e de *Crotalaria* sp. com EuYMV, e provavelmente da ocorrência de infecção mista de um vírus importante para o tomateiro com outro originalmente detectado em plantas invasoras, nessas espécies analisadas.

6. LITERATURA CITADA

- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, D. L., SCHAFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.
- BARBOSA, J. C., BARRETO, S. S., INOUE-NAGATA, A. K., REIS, M. S., FIRMINO, A. C., BERGAMIN, A. & REZENDE, J. A. M. 2009. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. *Journal of General Plant Pathology* 75, 440-443.
- BEDFORD, I. D., KELLY, A., BANKS, G. K., BRIDDON, R. W., CENIS, J. L. & MARKHAM, P. G. 1998. *Solanum nigrum*: An indigenous weed reservoir for a tomato yellow leaf curl geminivirus in southern Spain. *European Journal of Plant Pathology* March 104, 221-222.
- BIRD, J. & SANCHEZ, Y. 1971. Whitefly-transmitted viruses in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 55, 461-467.
- BROWN, J. K., FAUQUET, C. M., BRIDDON, R. W., ZERBINI, M., MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2012. *Geminiviridae*. In *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. Pages 351-373. Edited by A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens & E. J. Lefkowitz. London: Elsevier/Academic Press.
- CASTILLO-URQUIZA, G. P., BESERRA, J. E., JR., BRUCKNER, F. P., LIMA, A. T., VARSANI, A., ALFENAS-ZERBINI, P. & MURILO ZERBINI, F. 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology* 153, 1985-1989.
- COLLINS, A., BROWN, J., MUJADDAD REHMAN, M. & ROYE, M. 2009. Complete nucleotide sequence of an isolate of *Euphorbia mosaic virus* that infects *Euphorbia heterophylla* and *Wissadula amplissima* in Jamaica. *Archives of Virology* 154, 1859-1860.
- COSTA, A. S. & BENNET, C. W. 1950. Whitefly transmitted virus diseases of *Euphorbia prunifolia* *Phytopathology* 40, 266-283.
- COSTA, A. S. & CARVALHO, A. M. 1960. Comparative studies between the *Abutilon* and *Euphorbia* mosaic virus. *Phytopathol Z* 38, 129-152.
- COTRIM, M. A. D. A., KRAUSE-SAKATE, R., NARITA, N., ZERBINI, F. M. & PAVAN, M. A. 2007. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica* 33, 300-303.
- DEBROT, E. & CENTENO, F. 1986. Ocurrencia del virus mosaico de las euforbiaceas infectando a *Euphorbia heterophylla* L. em Venezuela. *Agronomia Tropical* 35, 5-12.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 1, 13-15.
- FARIA, J. C., BEZERRA, I. C., ZERBINI, F. M., RIBEIRO, S. G. & LIMA, M. F. 2000. Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 25, 125-137.
- FARIA, J. C. & MAXWELL, D. P. 1999. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology* 89, 262-268.
- FAUQUET, C. M., BRIDDON, R. W., BROWN, J. K., MORIONES, E., STANLEY, J., ZERBINI, M. & ZHOU, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* 153, 783-821.
- FERNANDES, F. R., ALBUQUERQUE, L. C., OLIVEIRA, C. L., CRUZ, A. R. R., ROCHA, W. B., PEREIRA, T. G., NAITO, F. Y. B., DIAS, N. D. M., NAGATA, T., FARIA, J. C., ZERBINI, F. M., ARAGÃO, F. J. L. & INOUE-NAGATA, A. K. 2011. Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting *Euphorbia heterophylla* plants. *Archives of Virology* 156, 2063-2069.
- FERNANDES, F. R., DE ALBUQUERQUE, L. C., DE BRITTO GIORDANO, L., BOITEUX, L. S., DE AVILA, A. C. & INOUE-NAGATA, A. K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36, 251-258.

- FERNANDES, F. R., DE ALBUQUERQUE, L. C. & INOUE-NAGATA, A. K. 2010. Development of a species-specific detection method for three Brazilian tomato begomoviruses. *Tropical Plant Pathology* 35, 43-47.
- FIALLO-OLIVÉ, E., NAVAS-CASTILLO, J., MORIONES, E. & MARTÍNEZ-ZUBIAUR, Y. 2012. Begomoviruses infecting weeds in Cuba: increased host range and a novel virus infecting *Sida rhombifolia*. *Archives of Virology* 157, 141-146.
- FLORES, E., SILBERSCHMIDT, K. & KRAMER, M. 1960. Observações de "clorose infecciosa" das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico* 26, 65-69.
- GARCIA-ANDRES, S., MONCI, F., NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. 2006. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology* 350, 433-442.
- GREGORIO-JORGE, J., BERNAL-ALCOCER, A., BANUELOS-HERNANDEZ, B., ALPUCHE-SOLIS, A., HERNANDEZ-ZEPEDA, C., MORENO-VALENZUELA, O., FRIAS-TREVINO, G. & ARGUELLO-ASTORGA, G. 2010. Analysis of a new strain of *Euphorbia mosaic virus* with distinct replication specificity unveils a lineage of begomoviruses with short Rep sequences in the DNA-B intergenic region. *Virology Journal* 7, 275.
- GWYNNE, D. C. & MURRAY, R. B. 1985. *Weed biology and control in agriculture and horticulture*. London: Batsford Academic and Educacional.
- HAIBLE, D., KOBER, S. & JESKE, H. 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods* 135, 9-16.
- HERNANDEZ-ZEPEDA, C., IDRIS, A. M., CARNEVALI, G., BROWN, J. K. & MORENO-VALENZUELA, O. A. 2007. Molecular characterization and experimental host range of *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan Peninsula, a begomovirus species in the *Squash leaf curl virus* clade. *Plant Pathology* 56, 763-770.
- HIGGINS, D. G., BLEASBY, A. J. & FUCHS, R. 1992. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Computer applications in the biosciences* : CABIOS 8, 189-191.
- HOU, Y.-M., PAPLOMATAS, E. J. & GILBERTSON, R. L. 1998. Host Adaptation and Replication Properties of Two Bipartite Geminiviruses and Their Pseudorecombinants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 208-217.
- INOUE-NAGATA, A. K., GIORDANO, L. B., FONSECA, M. E. N., RIBEIRO, S. G., ÁVILA, A. C., ALBUQUERQUE, L. C. & BOITEUX, L. S. (2004). Occurrence of begomovirus in tomato and other plants in Central Brazil. In 4th International Geminivirus Symposium, p. W3. Cape Town, South Africa.
- JESKE, H., GOTTHARDT, D. & KOBER, S. 2010. In planta cloning of geminiviral DNA: The true *Sida micrantha mosaic virus*. *Journal of Virological Methods* 163, 301-308.
- JOVEL, J., RESKI, G., ROTHENSTEIN, D., RINGEL, M., FRISCHMUTH, T. & JESKE, H. 2004. *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. *Archives of Virology* 149, 829-841.
- KASHINA, B. D., MABAGALA, R. B. & MPUNAMI, A. A. 2002. Reservoir weed hosts of tomato yellow leaf curl Begomovirus from Tanzania. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 2002; 35, 269-278.
- KHAN, J. A., SIDDIQUI, M. K. & SINGH, B. P. 2002. The natural occurrence of a begomovirus in sunn hemp (*Crotalaria juncea*) in India. *Plant Pathology Oxford* 51, 398.
- KUMAR, A., KUMAR, J., KHAN, Z. A., YADAV, N., SINHA, V., BHATNAGAR, D. & KHAN, J. A. 2010. Study of betasatellite molecule from leaf curl disease of sunn hemp (*Crotalaria juncea*) in India. *Virus Genes* 41, 432-440.
- MAYTIS, J. C., SILVA, D. M., OLIVEIRA, A. R. & COSTA, A. S. 1975. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica* 1, 267-275.
- MCGOVERN, R. J., POLSTON, J. E. & MULLAHEY, J. J. 1994. *Solanum viarum*: Weed reservoir of plant viruses in Florida. *International Journal of Pest Management* 40, 270-273.

- NASCENTE, A. S., PEREIRA, W. & MEDEIROS, M. A. 2004. Interferência das plantas daninhas na cultura do tomate para processamento. *Horticultura Brasileira* 22, 602-606.
- RAJ, S. K., SINGH, R., PANDEY, S. K. & SINGH, B. P. 2003. Association of a geminivirus with a leaf curl disease of sunn hemp (*Crotalaria juncea*) in India. *European Journal of Plant Pathology* 109, 467-470.
- ROJAS, M. R., GILBERTSON, R. L., RUSSELL, D. R. & MAXWELL, D. P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77, 340-347.
- RONCHI, C. P., SERRANO, L. A. L., SILVA, A. A. & GUIMARÃES, O. R. 2010. Manejo de plantas daninhas na cultura do tomateiro. *Planta Daninha* 28, 215-228.
- ROYE, M. E., MCLAUGHLIN, W. A., NAKHLA, M. K. & MAXWELL, D. P. 1997. Genetic Diversity Among Geminiviruses Associated with the Weed Species *Sida* spp., *Macroptilium lathyroides*, and *Wissadula amplissima* from Jamaica. *Plant Disease* 81, 1251-1258.
- SALATI, R., NAKHLA, M. K., ROJAS, M. R., GUZMAN, P., JAQUEZ, J., MAXWELL, D. P. & GILBERTSON, R. L. 2002. *Tomato yellow leaf curl virus* in the Dominican Republic: characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. *Phytopathology* 92, 487-496.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. & MANIAT, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANTANA, F. M., INOUE-NAGATA, A. K., NAGATA, T., RIBEIRO, S. G., ÁVILA, A. C. & GIORDANO, L. B. 2007. Detecção de um begomovírus em amostras foliares de tomateiro com sondas não-radioativas. *Ciência Rural* 37, 269-272.
- SANTOS, C. D., DE AVILA, A. C., INOUE NAGATA, A. K. & RESENDE, R. O. 2004. Espécies vegetais hospedeiras de begomovírus isolados de tomateiro em Goiás e no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* 29, 450-455.
- SHEPHERD, D. N., MARTIN, D. P., LEFEUVRE, P., MONJANE, A. L., OWOR, B. E., RYBICKI, E. P. & VARSANI, A. 2008. A protocol for the rapid isolation of full geminivirus genomes from dried plant tissue. *Journal of Virological Methods* 149, 97-102.
- SILBERSCHMIDT, K. 1943. Estudos sobre a transmissão experimental da "clorose infecciosa" das malvaceas. *Arq Inst Biol São Paulo* 14, 105-156.
- SILVA, A. K. F., SANTOS, C. D. G. & NASCIMENTO, A. K. Q. 2010. Transmissão de begomovírus de plantas daninhas para tomateiros pela mosca-branca. *Planta Daninha* 28, 507-514.
- SILVA, S. J. C., CASTILLO-URQUIZA, G. P., HORA-JÚNIOR, B. T., ASSUNÇÃO, I. P., LIMA, G. S. A., PIO-RIBEIRO, G., MIZUBUTI, E. S. G. & ZERBINI, F. M. 2011. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. *Plant Pathology* 61, 457-467.
- STADEN, R. 1996. The staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology* 5, 233-241.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. & KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.
- THOMPSON, W. M. O. 2011. *The Whitefly, Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminivirus-Infected Host Plants: *Bemisia tabaci*, Host Plants and Geminiviruses: Springer.
- VINCZE, T., POSFAI, J. & ROBERTS, R. J. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* 31, 3688-3691.
- WYANT, P. S., STHROMEIER, S., SCHAFFER, B., KRENZ, B., ASSUNÇÃO, I. P., LIMA, G. S. A. & JESKE, H. 2012. Circular DNA genomics (circomics) exemplified for geminiviruses in bean crops and weeds of northeastern Brazil. *Virology Journal* 427, 151-157.

CAPÍTULO 3

TESTE DE TRANSMISSÃO DE BEGOMOVÍRUS

POR *BEMISIA TABACI*

Teste de transmissão de begomovírus por *Bemisia tabaci*

RESUMO

Algumas plantas invasoras presentes em lavouras de produção de tomate são boas hospedeiras de begomovírus, bem como do seu vetor, *Bemisia tabaci*, entretanto, poucas informações estão disponíveis sobre a atuação das plantas invasoras como fonte de begomovírus para o tomateiro a partir da transmissão pelo vetor. Esse estudo teve como objetivo avaliar quatro espécies de plantas invasoras quanto à sua capacidade de servir de fonte de inóculo de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em transmissão pelo vetor. Além de *Nicandra physaloides*, a infecção com ToSRV e outros begomovírus foi confirmada em plantas de *Euphorbia heterophylla* e *Sida* sp. coletadas em uma área produtora de tomate no Estado de Goiás. Após testes de transmissão pelo vetor (*B. tabaci* biótipo B), o ToSRV em infecção mista com *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) e/ou *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) foi eficientemente transmitido das plantas invasoras para tomateiro. Em contraste, isolados de EuYMV e SiMMV foram os principais vírus transferidos para as plantas invasoras (*E. heterophylla* e *Sida santaremnensis*). A identificação dos isolados virais foi realizada por análise de RCA/RFLP (amplificação por círculo rolante/polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição) e reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos específicos para cada espécie viral. Este estudo demonstrou que *E. heterophylla* e *Sida* sp. podem ser eficientes fontes de ToSRV e outros vírus para o tomateiro na presença do vetor em condições de campo.

Palavras-chave: *Bemisia tabaci*, *Solanum lycopersicum*, ToSRV.

Transmission test of begomovirus by *Bemisia tabaci*

ABSTRACT

Some weeds that occur in tomato fields are good hosts for begomovirus and *Bemisia tabaci*, the vector of this virus. However, information is scarce regarding the role of weeds as begomovirus source by vector transmission. This study aimed at evaluating the ability of four weed species to act as inoculum source of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) by vector transmission. In addition to *Nicandra physaloides*, the infection with ToSRV and other begomoviruses was confirmed in *Euphorbia heterophylla* and *Sida* sp. collected in the tomato growing area in Goias State, Brazil. After transmission tests by the vector (*B. tabaci* biotype B), ToSRV, in mixed infection with *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) and/or *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV), was efficiently transmitted from the weeds to tomato plants. In contrast, EuYMV and SiMMV were the major viruses transferred to weeds (*E. heterophylla* e *Sida santaremnensis*). The viral isolates were identified by RCA/RFLP analysis (rolling circle-amplification/restriction fragment length polymorphism) and polymerase chain reaction (PCR) with specific primers for each viral species. This study demonstrated that *E. heterophylla* and *Sida* sp. can be efficient sources of ToSRV and other begomoviruses to tomato plants in the presence of vector in field conditions.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, ToSRV, *Bemisia tabaci*.

1. INTRODUÇÃO

Bemisia tabaci, popularmente conhecida como mosca-branca, é um aleirodídeo da ordem Hemiptera, família Aleyrodidae, que ocorre praticamente em todas as regiões do mundo e apresenta uma ampla gama de plantas hospedeiras. Além da sua importância como praga, causando danos diretos em diversas culturas, atua também como vetor de importantes vírus (Navas-Castillo *et al.*, 2011).

Os begomovírus são transmitidos por esse aleirodídeo para plantas dicotiledôneas e causam severas doenças em importantes culturas. Esses vírus pertencem ao gênero *Begomovirus* (Família *Geminiviridae*) e possuem genoma constituído por DNA circular de fita simples (ssDNA) que é encapsidado em uma partícula com formato de icosaedros geminados. A maioria desses vírus tem o genoma bipartido, composto por duas moléculas de ssDNA, denominadas DNA-A e DNA-B. Há ainda aqueles com genoma monopartido, composto por apenas uma molécula de ssDNA (homóloga ao DNA-A dos bipartidos) (Brown *et al.*, 2012).

Muitas espécies de plantas invasoras são hospedeiras de aleirodídeos e, desde muito tempo, doenças virais associadas a esse vetor foram descritas, principalmente em malváceas e euforbiáceas (Thompson, 2011). Algumas dessas doenças foram relacionadas àquelas que ocorriam em plantas cultivadas. Estudos demonstraram que aleirodídeos alimentados em plantas de *S. micrantha* com clorose infecciosa eram capazes de transferir “o agente causal” para plantas saudáveis de algodão, provocando o mosaico comum do algodeiro (Costa, 1954). Flores *et al.* (1960) descreveram a primeira doença viral em tomateiro associada a aleirodídeos na América do Sul e acreditavam que essa doença estava relacionada à clorose infecciosa das malváceas. Em feijoeiro, duas doenças também foram associadas ao mosaico de *E. heterophylla* e à clorose

infecciosa de plantas de *Sida* spp. (Costa, 1965), porém, a etiologia de muitos desses vírus ainda permanece desconhecida.

No Brasil, a ocorrência de severas epidemias e a emergência de novas espécies de begomovírus em tomateiro foi associada ao surgimento do biótipo B de *B. tabaci* (França *et al.*, 1996; Lourenção & Nagai, 1994; Ribeiro *et al.*, 2003). Em geral, aceita-se a idéia de que as plantas invasoras funcionam como fonte de diversidade de begomovírus que, por sua vez, necessitavam de uma ponte de ligação, nesse caso o biótipo B de *B. tabaci*, para alcançarem o tomateiro (Ribeiro *et al.*, 2003). Já na década de 1950, Costa (1954) sugeriu que a introdução do agente causal do mosaico comum do algodoeiro na lavoura se dava por aleirodídeos que se tornavam virulíferos após alimentação em plantas de *S. micrantha* com clorose infecciosa, presentes dentro ou próximas à lavoura. É possível que esse mesmo mecanismo ocorra para o patossistema begomovírus-tomateiro, e que as plantas invasoras associadas ao cultivo de tomateiro tenham um papel importante no ciclo da doença, funcionando como fonte de inóculo primário.

Há relatos de importantes begomovírus de tomateiro infectando plantas invasoras, como o *Tomato mottle virus* (TMoV) encontrado em *Solanum viarum*, o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) isolado de *S. americanum* e o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) isolado de *N. physaloides*, sendo que todos foram transmitidos das respectivas plantas invasoras para tomateiro por *B. tabaci* (Barbosa *et al.*, 2009; Bedford *et al.*, 1998; McGovern *et al.*, 1994). Além dessas plantas, *Crotalaria* sp., *E. heterophylla* e *Sida* sp. também foram encontradas naturalmente infectadas com ToSRV, o qual foi transmitido para plantas de tomateiro por biobalística (Capítulo 1).

É comum a realização de trabalhos de infecção de plantas por begomovírus utilizando técnicas de inoculação como a agroinoculação, enxertia e bombardeamento.

Esse fato deve-se à dificuldade de manipulação e criação de aleirodídeos. A interação entre a planta hospedeira-begomovírus e *B. tabaci* ainda não é bem esclarecida, e a utilização de outros métodos de inoculação pode não refletir o que de fato ocorre na natureza, ou gerar dados difíceis de serem explicados. No Capítulo 2 a transmissão de begomovírus das plantas invasoras para tomateiro foi realizada por biobalística. Este capítulo teve como objetivo estudar a transmissão de begomovírus de plantas invasoras para tomateiro por *B. tabaci*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta de amostras e extração de DNA total

Quarenta e quatro amostras de plantas invasoras e de tomateiro exibindo sintomas como mosaico, rugosidade e deformação foliar, foram coletadas em uma área produtora de tomate de mesa localizada no município de Goianápolis/GO, no ano de 2010. Quatro espécies de plantas invasoras, mais abundantes na área de cultivo, foram coletadas e transplantadas para vasos de 10 litros (contendo solo estéril), sendo duas de *Crotalaria incana*, sete de *Euphorbia heterophylla*, 12 de *Nicandra physaloides* e 13 de *Sida* spp. Essas plantas foram pulverizadas com inseticida Confidor 700 WG (Imidacloprid) para a eliminação de *B. tabaci* e mantidas em telado protegido contra insetos, na Embrapa Hortaliças. Devido ao porte, coletaram-se apenas ramos foliares de 10 plantas de tomateiro cultivar Dominador (tolerante a begomovírus). As 44 amostras foliares foram armazenadas a 16°C, e no dia seguinte o DNA total foi extraído de acordo com o método CTAB (Doyle & Doyle, 1991) com modificações (detalhado no item 2.6.2 do Capítulo 2) e mantido a -20°C até o uso.

2.2. Estudo de transmissão por aleirodídeo

2.2.1. Fonte de inóculo, população de aleirodídeo e espécies de plantas usadas no teste de transmissão

Das amostras coletadas em Goianápolis, uma amostra de cada espécie de planta invasora e três de tomateiro, denominadas AB2 (*E. heterophylla*), Ni6 (*N. physaloides*), Si7 (*Sida* sp.), T2, T6 e T9 (tomateiro cv. Dominador), foram selecionadas para realizar o teste de transmissão pelo aleirodídeo. No mesmo dia da coleta, folhas de cada amostra foram colocadas em água para recuperação da turgescência, e no dia seguinte, utilizadas

no teste de transmissão. As plantas invasoras selecionadas como fonte de inóculo foram mantidas em telado.

Utilizou-se uma população do aleirodídeo *B. tabaci* biótipo B avirulífera, obtida do criatório da Embrapa Hortaliças, produzida em plantas de repolho (*Brassica oleracea* var. capitata), espécie não hospedeira de begomovírus.

Plantas de tomateiro cv. Viradoro, suscetível a begomovírus; *E. heterophylla*, *N. physaloides* e *Sida santaremnensis* foram inoculadas quando apresentavam aproximadamente 2 a 4 folhas verdadeiras. As mudas foram produzidas e mantidas em telados durante o experimento.

2.2.2. Teste de transmissão por aleirodídeos

As amostras AB2 (*E. heterophylla*), Ni6 (*N. physaloides*) e Si7 (*Sida* sp.) foram utilizadas como fonte de inóculo para transmissão dos isolados virais por aleirodídeos para mudas de tomateiro cv. Viradoro e de plantas invasoras da mesma espécie ou relacionadas (plantas do mesmo gênero, quando a espécie não foi identificada) (*E. heterophylla*, *N. physaloides* e *Sida santaremnensis*). Os testes de transmissão foram realizados três vezes para cada fonte de inóculo proveniente das plantas invasoras, e o número de plantas inoculadas foi variável. A inoculação de cada espécie de planta foi realizada em gaiolas separadas.

De forma semelhante, testes de transmissão também foram realizados utilizando-se as amostras T2, T6 e T9 (tomateiro cv. Dominador) como fonte de inóculo, para verificar se isolados de begomovírus poderiam ser transmitidos para mudas das espécies de plantas invasoras ou correlacionadas (citadas acima), e também para tomateiro cv. Viradoro. Esse teste foi realizado uma vez para cada amostra usada como fonte de

inóculo. As mudas de plantas invasoras e de tomateiro foram colocadas dentro de uma mesma gaiola para inoculação.

Para a inoculação, duas folhas de cada amostra foram colocadas, individualmente, dentro de tubos de polietileno de 50 mL, contendo 10 mL de meio ágar-água 1%. A seguir, com o auxílio de um sugador bucal, aproximadamente 300 aleirodídeos foram transferidos (das plantas de repolho do criatório) para dentro de cada tubo (contendo a folha), onde permaneceram por um período de acesso de aquisição (PAA) de 48 horas. As mudas foram colocadas dentro de gaiolas teladas (dimensões 1,2x0,8x0,5m), as quais foram seladas com fita adesiva. Ao final do PAA, os insetos (provenientes de dois tubos/amostra) foram soltos, cuidadosamente, dentro das gaiolas através de dois orifícios, que também foram imediatamente selados. Aproximadamente 300 insetos foram usados para a inoculação de 10 mudas. O período de acesso de inoculação foi de 7 dias, e as mudas foram irrigadas com filete de água por cima da gaiola. Após esse período, os insetos foram eliminados com aplicação dos inseticidas Confidor 700 WG (Imidacloprid) e Tiger 100 EC (Pyriproxyfen), e as mudas foram mantidas no telado por 30 dias para análise da infecção.

2.3. Análise da infecção

2.3.1. Observação dos sintomas e extração de DNA total

A cada dois ou três dias as plantas inoculadas foram observadas quanto ao surgimento de sintomas, e após 20-30 dias o DNA total foi extraído de acordo com o método CTAB (Doyle & Doyle, 1991) com modificações, como descrito no item 2.6.1 do Capítulo 2, e analisado como descrito a seguir.

2.3.2. Detecção por RCA/RFLP e PCR e análise dos isolados virais

Inicialmente, as amostras coletadas em Goianápolis e as amostras inoculadas (após o teste de transmissão) foram analisadas quanto à presença de begomovírus por reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos universais PAL1v1978/PAR1c496. Em seguida, o DNA viral presente nas amostras foi submetido à amplificação por círculo rolante e análise por polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RCA/RFLP), e PCR com oligonucleotídeos específicos para três espécies de begomovírus.

a) Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA total das amostras coletadas em Goianápolis, juntamente com as amostras inoculadas, foi submetido a PCR para amplificação do DNA viral com o par de oligonucleotídeos PAL1v1978/PAR1c496 universal para begomovírus (Rojas *et al.*, 1993). A reação consistiu de um volume final de 10 µL, contendo 1,0 µL de DNA total, 1,0 µL do tampão 10X da enzima *Taq* DNA polimerase (100mM Tris-HCl, pH 8,3 e 500mM KCl, Invitrogen), 0,8 µL de MgCl₂ (50mM, Invitrogen), 0,4 µL de dNTPs (2,5mM, GE Healthcare), 0,1 µL de cada oligonucleotídeo (10µM), 0,1 µL da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 6,5 µl de água estéril. O DNA viral foi amplificado no termociclador Mastercycler (Eppendorf) programado para 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, com as seguintes condições: 94°C por 1 min, 55°C por 2 min e 72°C por 3 min, finalizando a reação a 72°C por 5 min. O produto da PCR foi analisado por eletroferese em gel de agarose a 1,2% corado por brometo de etídeo. O marcador molecular usado foi de 1-kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

b) PCR específica

As amostras com detecção positiva após a PCR com o par de oligonucleotídeos universal foram submetidas a PCR específica para detecção do DNA viral de ToSRV, EuYMV e SiMMV, com os mesmos pares de oligonucleotídeos utilizados no Capítulo 2 (item 2.6.3).

Para detectar ToSRV duas estratégias foram aplicadas. Na primeira, a reação de PCR foi realizada com o DNA total e o par de oligonucleotídeos para o DNA-A ToSRV1f/ToSRV2r (Fernandes *et al.*, 2010). Na segunda, o DNA viral foi previamente amplificado por RCA (como descrito no item 2.2 do Capítulo 2 para uso na reação da PCR com dois pares de oligonucleotídeos: 1)- ToSRV1f/ToSRV2r e 2)- ToSB1450F/ToSB1880R. A PCR para detecção de EuYMV e SiMMV foi realizada com DNA total e com DNA viral amplificado por RCA, com os seguintes pares de oligonucleotídeos: 1- EuA170F/EuA1084R para detectar EuYMV; e 2- SimA1500F/SimA2114R para detectar SiMMV. A reação foi realizada com temperatura de anelamento a 62°C, e as demais condições foram mantidas como descritas acima.

c) Análise dos isolados virais por RCA/RFLP

O DNA total de todas as amostras foi submetido à RCA para amplificação do DNA viral, que em seguida foi digerido com a enzima de restrição MspI, para análise por RFLP (Haible *et al.*, 2006). As reações de RCA e digestão foram realizadas como descrito no Capítulo 2 (item 2.6.2). A análise foi baseada no somatório dos fragmentos de restrição para estimar o tamanho do genoma viral, e no tipo de perfil de restrição do DNA viral presente e amplificado de cada amostra. Além disso, com base nos resultados obtidos no Capítulo 2, os perfis de restrição do produto da RCA obtidos das

plantas-fonte e das plantas inoculadas foram comparados com perfis de isolados conhecidos de EuYMV, SiMMV e ToSRV. Para isso, sequências dos componentes de DNA-A e DNA-B de cada espécie foram digeridas *in silico* (Vincze *et al.*, 2003) com a enzima de restrição MspI (utilizando o programa Ncb cutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) para comparação com os perfis obtidos. As sequências escolhidas foram: DNA-A e DNA-B de SiMMV da amostra #780 (*Sida* sp.); DNA-A de EuYMV e ToSRV provenientes, respectivamente, das amostras #3539 (*E. heterophylla*) e #1646 (*N. physaloides*) obtidas no Capítulo 2; DNA-A de ToSRV (AY0297501), DNA-B de EuYMV (NC_0125542), ToSRV (NC_0096121) e SiMMV (NC_0053311).

3. RESULTADOS

3.1. Detecção de begomovírus nas plantas coletadas em Goianópolis por PCR

O DNA total das 44 amostras coletadas em campo foi submetido à PCR com o par de oligonucleotídeos universal para begomovírus PAL1v1978/PARc496. A infecção por begomovírus foi confirmada em seis amostras de *E. heterophylla*, 11 de *N. physaloides*, cinco de *Sida* sp. e nove de tomateiro cv. Dominador. As duas amostras de *C. incana* não estavam infectadas por begomovírus (Tabela 1).

Tabela 1. Detecção de begomovírus em amostras de plantas invasoras e de tomateiro, coletadas em Goianópolis em 2010 por PCR com o par de oligonucleotídeos universal para begomovírus e por RCA/RFLP.

Espécies de plantas	No. de plantas infectadas/No. de plantas coletadas	
	PCR com oligonucleotídeo universal para begomovírus ^a	RCA/RFLP ^b
<i>C. incana</i>	0/2	0/2
<i>E. heterophylla</i>	6/7	7/7
<i>N. physaloides</i>	11/12	11/12
<i>Sida</i> spp.	5/13	6/13
Tomateiro cv. Dominador	9/10	9/10
Total	31/44	33/44

^a PCR com o par de oligonucleotídeos universal PAL1v1978/PAR1c496 para begomovírus.

^b Amplificação do DNA viral por RCA seguido de digestão com a enzima de restrição MspI.

3.2. Análise dos isolados virais das amostras coletadas em Goianópolis por RCA/RFLP

O DNA viral das amostras coletadas em Goianópolis foi amplificado por RCA e, em seguida, digerido com a enzima de restrição MspI para análise do tamanho estimado do genoma e do tipo de perfil de restrição. Cada perfil de restrição obtido foi comparado com os perfis de isolados conhecidos.

Após amplificar o DNA viral, fragmentos de restrição foram observados em duas amostras (uma de *E. heterophylla* e a outra de *Sida* sp.) que, anteriormente, apresentaram resultado negativo na detecção por PCR (Tabela 1).

A complexidade da infecção das plantas coletadas em Goianópolis está ilustrada na Figura 1. Inicialmente, procedeu-se o somatório dos fragmentos de restrição para estimar o tamanho do genoma viral, que variou de 4,6 a 9,4 kb. Aparentemente, para a maioria das amostras de plantas invasoras apenas um isolado viral estaria causando infecção, já que o genoma completo de um begomovírus tem ~ 5,0 kb (2,5 kb para o DNA-A e 2,5 kb para o DNA-B). Somente as amostras 4 e 5 de *E. heterophylla* (Figura 1A), 7 de *N. physaloides* (Figura 1B) e 2 e 13 de *Sida* sp. (Figura 1C) apresentaram somatório estimado do genoma maior ou igual a 6,4 kb, sugerindo a presença de mais de um begomovírus, semelhante a maioria das amostras de tomateiro cv. Dominador (Figura 1D).

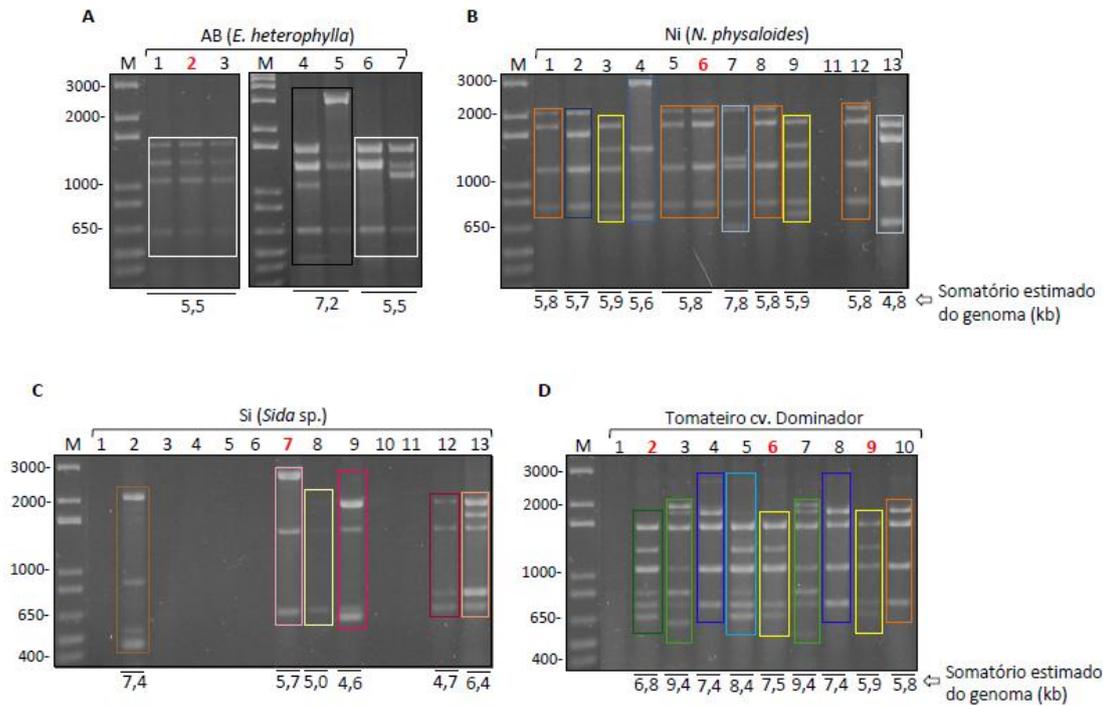


Figura 1. Géis de eletroforese dos produtos do DNA viral, presente em amostras de plantas invasoras e de tomateiro coletadas em Goianápolis, analisados pela amplificação por círculo rolante (RCA) e polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) com a enzima de restrição *MspI*. O somatório estimado do genoma está indicado abaixo da coluna de cada amostra. **A)** *Euphorbia heterophylla*. **B)** *Nicandra physaloides*. **C)** *Sida* spp. **D)** Tomateiro cv. Dominador. **M:** marcador 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen). As plantas utilizadas como fonte de inóculo no teste de transmissão estão destacadas em vermelho.

Pela análise do perfil de restrição, 16 tipos de padrões foram observados, indicados por diferentes cores na Figura 1. As amostras de *E. heterophylla* apresentaram dois tipos de perfis de restrição (Figura 1, A), enquanto as de *N. physaloides* apresentaram seis tipos (Figura 1, B). Já cada uma das amostras de *Sida* spp. exibiu um tipo de perfil de restrição, totalizando seis tipos (Figura 1, C). Nas amostras de tomateiro cv. Dominador seis tipos de perfis também foram observados (Figura 1, D). Alguns perfis de restrição foram mais frequentes e ocorreram tanto em amostras de *N. physaloides* como em tomateiro. De uma forma geral, a análise do perfil de restrição

indicou que os isolados virais presentes em cada espécie de planta foram diferentes, pois perfis de restrição distintos foram observados: o perfil das amostras de *E. heterophylla* e *Sida* sp. foram distintos daqueles obtidos das amostras de *N. physaloides* e tomateiro.

Uma amostra de cada planta invasora e três de tomateiro foram aleatoriamente selecionadas como fonte de inóculo para o estudo de transmissão pelo aleirodídeo, sendo elas: AB2 de *E. heterophylla*, Si7 de *Sida* sp., Ni6 de *N. physaloides*, e T2, T6 e T9 de tomateiro cv. Dominador, destacadas na Figura 1.

3.3. Análise da infecção após teste de transmissão de begomovírus por aleirodídeos

O teste de transmissão por aleirodídeos foi realizado para avaliar a capacidade das amostras AB2 de *E. heterophylla*, Si7 de *Sida* sp. e Ni6 de *N. physaloides* atuarem como fonte de begomovírus para tomateiro, bem como para a hospedeira original ou relacionada. A transmissão de begomovírus das amostras T2, T6 e T9 provenientes de tomateiro cv. Dominador para plantas invasoras também foi avaliada.

3.3.1. Observação dos sintomas e extração de DNA total

Aleirodídeos confinados por 48 hs nas amostras usadas como fonte de inóculo foram usados para inocular mudas de tomateiro cv. Viradoro e de plantas invasoras (*E. heterophylla*, *N. physaloides* e *S. santaremnensis*). Ao todo, 320 plantas foram inoculadas e 165 exibiram sintomas (Tabela 2). Em geral, os sintomas foram visualizados 10 a 15 dias após a inoculação. O DNA total de todas as plantas inoculadas foi extraído e armazenado até a análise.

Sintomas de mosaico amarelo e redução de crescimento foram observados nas plantas de *E. heterophylla*, enquanto plantas de tomateiro cv. Viradoro exibiram

mosaico, forte deformação foliar e nanismo após inoculação com aleirodódeos confinados na amostra AB2 (*E. heterophylla*) (Figura 2).

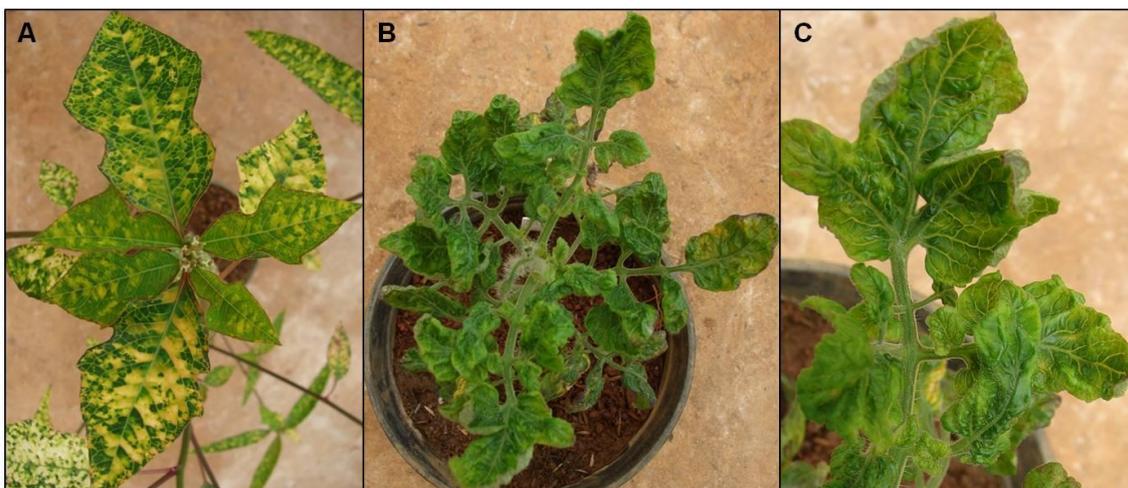


Figura 2. Sintomas em *E. heterophylla* e tomateiro após inoculação com aleirodódeos confinados na fonte de inóculo AB2 (*E. heterophylla*). **A)** Mosaico em *E. heterophylla*. **B)** Mosaico e forte deformação foliar em tomateiro cv. Viradoro. **C)** Detalhe da deformação foliar em tomateiro.

Tanto as plantas de *N. physaloides* como as de tomateiro cv. Viradoro apresentaram forte deformação foliar, mosaico e nanismo (Figura 3) após inoculação com aleirodódeos que adquiriram o vírus da amostra Ni6 (*N. physaloides*).



Figura 3. Sintomas em *N. physaloides* e tomateiro após inoculação com aleirodódeos confinados na fonte de inóculo Ni6 (*N. physaloides*). **A)** Manchas cloróticas em *N. physaloides*. **B)** Clorose internerval e forte deformação foliar em tomateiro cv. Viradoro.

Forte mosaico foi observado nas plantas de *S. santaremnensis*, enquanto as plantas de tomateiro cv. Viradoro exibiram deformação foliar, rugosidade, mosaico, clorose internerval e redução de crescimento (Figura 4) após inoculação com aleirodídeos confinados na amostra Si7 (*Sida* sp.).



Figura 4. Sintomas em *S. santaremnensis* e tomateiro após inoculação com aleirodídeos confinados na fonte de inóculo Si7 (*Sida* sp.). **A)** Mosaico em *S. santaremnensis*. **B)** Mosaico, clorose e deformação foliar em tomateiro cv. Viradoro. **C)** Detalhe do sintoma de clorose internerval em tomateiro.

No teste de transmissão usando a amostra T2 (tomateiro e cv. Dominador), sintomas de mosaico, rugosidade e nanismo foram observados tanto nas plantas de tomateiro cv. Viradoro como nas plantas de *N. physaloides*. Plantas de *S. santaremnensis* exibiram mosaico, e nenhum sintoma foi observado nas plantas de *E. heterophylla*. Quando aleirodídeos foram confinados na amostra T6, as plantas de tomateiro, *N. physaloides* e algumas de *E. heterophylla* exibiram sintoma de mosaico, enquanto nenhum tipo de sintoma foi observado nas plantas de *S. santaremnensis*. Após inoculação com aleirodídeos que adquiriram o vírus da amostra T9, somente plantas de tomateiro e *N. physaloides* apresentaram sintomas de mosaico, enquanto as plantas de *E. heterophylla* e *S. santaremnensis* não exibiram qualquer tipo de sintoma (Tabela 2).

Tabela 2. Teste de transmissão de begomovírus para tomateiro e plantas invasoras por aleirodódeos (biótipo B de *B. tabaci*) confinados em diferentes fontes de inóculo.

Fontes de inóculo	Plantas inoculadas	Sintomas ^c	PCR com oligonucleotídeo universal para begomovírus ^d	Porcentagem de plantas infectadas
AB2	<i>E. heterophylla</i>	39/64	44/64	68,7
(<i>E. heterophylla</i>)	Tomateiro ^b	23/65	23/65	35,3
Ni6	<i>N. physaloides</i>	17/22	17/22	77,3
(<i>N. physaloides</i>)	Tomateiro	19/22	19/22	86,3
Si7	<i>S. santaremnensis</i>	8/18	8/18	44,4
(<i>Sida</i> sp.)	Tomateiro	21/49	21/49	42,8
	<i>E. heterophylla</i>	0/5	0/5	0
T2	<i>N. physaloides</i>	7/7	7/7	100,0
(Tomateiro) ^a	<i>S. santaremnensis</i>	1/6	4/6	66,6
	Tomateiro	11/11	11/11	100,0
	<i>E. heterophylla</i>	0/5	0/5	0
T9	<i>N. physaloides</i>	3/8	2/8	25,0
(Tomateiro)	<i>S. santaremnensis</i>	0/6	0/6	0
	Tomateiro	4/12	4/12	33,3
	<i>E. heterophylla</i>	2/5	2/5	40,0
T6	<i>N. physaloides</i>	5/5	5/5	100,0
(Tomateiro)	<i>S. santaremnensis</i>	0/5	0/5	0
	Tomateiro	5/5	5/5	100,0
Total		165/320	172/320	-

^a As fontes de inóculo T2, T9 e T6 são tomateiro cv. Dominador.

^b Utilizou-se plantas de tomateiro cv. Viradoro para inoculação.

^c N° de plantas sintomáticas/N° de plantas inoculadas.

^d Utilizou-se o par de oligonucleotídeos universal PAL1v1978/PAR1c496 para begomovírus.

^e No. de plantas infectadas/No. de plantas inoculadas.

3.3.2. Detecção de begomovírus nas plantas inoculadas por PCR

O DNA total das 320 plantas inoculadas foi submetido à PCR com o par de oligonucleotídeos universal para begomovírus PAL1v1978/PAR1c496. O vírus foi detectado em 172 amostras (Tabela 2).

A detecção de begomovírus foi observada em 44 plantas de *E. heterophylla* e 23 de tomateiro inoculadas com aleirodídeos que adquiriram o vírus da amostra AB2 (*E. heterophylla*); 17 plantas de *N. physaloides* e 19 de tomate após inoculação com aleirodídeos que adquiriram o vírus da amostra Ni6 (*N. physaloides*) e, oito plantas de *S. santaremnensis* e 21 de tomate inoculadas com aleirodídeos que adquiriam o vírus da planta-fonte Si7 (*Sida* sp.) (Tabela 2).

Já no teste de transmissão, utilizando aleirodídeos que adquiriram o vírus da amostra T2 a detecção de begomovírus foi positiva em 11 plantas de tomateiro, sete de *N. physaloides* e quatro de *S. santaremnensis*, enquanto as plantas de *E. heterophylla* apresentaram resultado negativo. Quando aleirodídeos foram confinados na amostra T6, cinco plantas de tomate, cinco de *N. physaloides* e duas de *E. heterophylla* apresentaram detecção positiva para begomovírus, enquanto as plantas de *S. santaremnensis* apresentaram resultado negativo. Por outro lado, apenas quatro plantas de tomate e duas de *N. physaloides* foram infectadas por vírus transmitidos por aleirodídeos da amostra T9, e as plantas de *E. heterophylla* e *S. santaremnensis* apresentaram resultado negativo (Tabela 2).

Esses resultados indicaram que as plantas invasoras *E. heterophylla*, *N. physaloides* e *Sida* sp. podem atuar como fonte de begomovírus para o tomateiro em transmissão por aleirodídeos. Já quando o tomateiro infectado foi utilizado como fonte de begomovírus, as quatro espécies foram infectadas, porém menor eficiência de infecção foi obtida em *E. heterophylla* e *S. santaremnensis*.

3.3.3. Análise por RCA/RFLP dos isolados virais transferidos para plantas invasoras e de tomate após teste de transmissão por aleirodídeos

Todas as plantas inoculadas (Tabela 2), bem como as plantas usadas como fonte de inóculo foram submetidas à RCA/RFLP e três tipos de perfis de restrição foram predominantes e atribuídos aos isolados de EuYMV, SiMMV e ToSRV, sendo que os outros tipos de perfis observados foram resultantes da combinação entre os perfis das três espécies virais.

Após o teste de transmissão usando plantas invasoras como fonte de inóculo (AB2 - *E. heterophylla*, Ni6 - *N. physaloides* e Si7 - *Sida* sp.), em geral, o perfil de restrição das plantas invasoras inoculadas foi distinto das plantas de tomate, porém semelhante ao da fonte de inóculo (Figuras 5 a 7). Diferentemente, no teste de transmissão usando as fontes de inóculo provenientes de tomateiro (T2, T6 e T9 - tomateiro cv. Dominador), tanto as plantas invasoras como as de tomate apresentaram perfil de restrição idêntico ao perfil das fontes de inóculo (Figura 8).

Do total de plantas analisadas (Tabela 2), um grupo de cada espécie de planta inoculada foi selecionado para uma análise detalhada e para ilustrar os perfis de restrição obtidos. A maioria das plantas de *E. heterophylla* infectadas apresentaram o mesmo tipo de perfil de restrição (Figura 5B), que foi idêntico ao da amostra AB2 (*E. heterophylla*) usada como fonte de inóculo (Figura 5A). A exceção foi a amostra 4, em que um fragmento de ca. 1,0 kb foi adicionalmente observado. Já as plantas de tomate apresentaram diferentes perfis de restrição (Figura 5C), indicando que outro isolado viral foi transferido para essas plantas, além daquele predominante na amostra AB2 (*E. heterophylla*). Então, o perfil de restrição dessas amostras foi comparado ao perfil de restrição de isolados conhecidos de EuYMV e ToSRV (baseado nos resultados do

Capítulo 2). O perfil de restrição da maioria das plantas de *E. heterophylla* inoculadas foi idêntico ao perfil das sequências de DNA-A e DNA-B de EuYMV digeridas *in silico*, com todos os fragmentos presentes. Já nas plantas de tomate, a diversidade dos perfis de restrição foi o resultado da combinação entre fragmentos do DNA-A e DNA-B tanto de EuYMV como de ToSRV, em todas as plantas infectadas (Figura 5B). Na amostra AB2 (*E. heterophylla*), o perfil de restrição predominante foi associado à EuYMV (Figura 5A) e, somente após o teste de transmissão, foi possível observar a presença de ToSRV, já que o perfil de restrição desse vírus foi observado em todas as amostras de tomateiro.

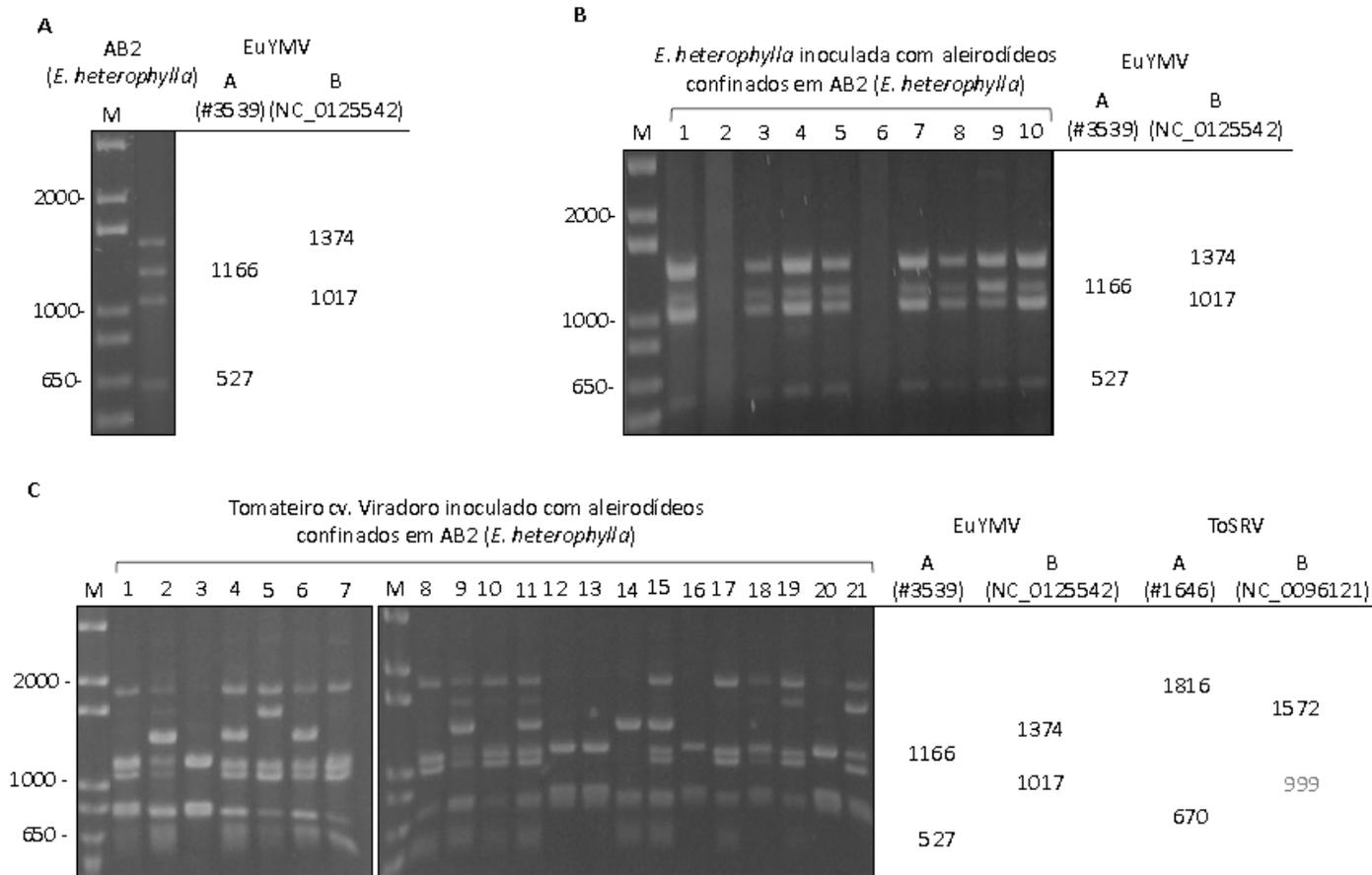


Figura 5. Géis de eletroforese dos produtos do DNA viral, analisados por RCA/RFLP, presente na fonte de inóculo e nas plantas inoculadas após o teste de transmissão por aleirodídeos. **A)** Fonte de inóculo AB2 (*Euphorbia heterophylla*). **B)** *E. heterophylla*. **C)** Tomateiro cv. Viradoro. À direita de cada gel é indicado o tamanho dos fragmentos obtidos pela digestão *in silico* de seqüências de DNA-A e/ou DNA-B de isolados conhecidos (EuYMV - *Euphorbia yellow mosaic virus* e ToSRV - *Tomato severe rugose virus*). Fragmentos previstos que não foram detectados estão na cor cinza. **M:** marcador 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

O perfil de restrição das plantas de *S. santaremnensis* inoculadas (Figura 6B) foi semelhante ao da amostra Si7 (*Sida* sp.) (Figura 6A), no entanto fragmentos de tamanhos distintos foram observados em quatro das sete plantas infectadas (amostras 2, 5, 6 e 7). Já o perfil de restrição das plantas de tomate diferiu da fonte de inóculo bem como das plantas de *S. santaremnensis* (Figura 6C). A comparação do perfil de restrição das amostras de *S. santaremnensis* com perfis de isolados conhecidos de SiMMV e ToSRV indicou que os fragmentos de ca. 1,4, 0,6 e 0,5 kb podem corresponder aos fragmentos do DNA-A e/ou DNA-B do isolado de SiMMV (#780). Enquanto, os fragmentos de ca. 1,8 kb (na amostra 5) e 1,0 kb (nas amostras 2, 5, 6 e 7) foram associados aos fragmentos de ca. 1816 e 999 b do DNA-A e DNA-B de ToSRV. Inicialmente, os fragmentos de ca. 0,85 e 2,50 kb não foram correlacionados a qualquer fragmento dos isolados de SiMMV (amostra #780) e ToSRV. Então, sequências de outros isolados desses vírus, depositados nos bancos de dados, foram investigados. Alguns isolados de SiMMV apresentaram um fragmento semelhante após digestão *in silico* do componente de DNA-B. Assim, o fragmento de ca. 2,5 kb foi associado ao fragmento de 2,553 kb do isolado referência de SiMMV (NC_0053311) (Figura 6B). O fragmento de ca. 850 b não foi associado a nenhum dos vírus investigados. Na maioria das plantas de tomateiro, os perfis de restrição apresentaram fragmentos correspondentes ao DNA-A e DNA-B tanto de SiMMV como de ToSRV (Figura 6C).

Somente três amostras apresentaram perfil de restrição com fragmentos associados a apenas SiMMV (Figura 6C, Colunas 1, 4 e 8). Em algumas amostras de tomate o fragmento de ca. 2,5 kb também foi observado, indicando que diferentes isolados de SiMMV podem estar presentes na amostra Si7 e foram transferidos tanto para plantas de *S. santaremnensis* como para tomateiro. O fragmento de ca. 1,1 kb observado em 11 amostras (Figura 3C, Colunas 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15 e 18) não foi associado a nenhum dos fragmentos dos isolados de SiMMV e ToSRV. Na fonte de inóculo, Si7 (*Sida* sp.), isolados de SiMMV foram predominantes, indicando que ToSRV ocorreu em uma concentração muito baixa, que não permitiu sua visualização no perfil de restrição dessa hospedeira (mesmo após amplificação por RCA), como sugerido para a amostra AB2 (*E. heterophylla*).

À semelhança do que ocorreu com as plantas de *E. heterophylla* e tomate inoculadas com aleirodídeos confinados na amostra AB2 (*E. heterophylla*), diferentes isolados virais podem ter sido transferidos da amostra Si7 (*Sida* sp.) pelo aleirodídeo para as plantas de *S. santaremnensis* e tomate.

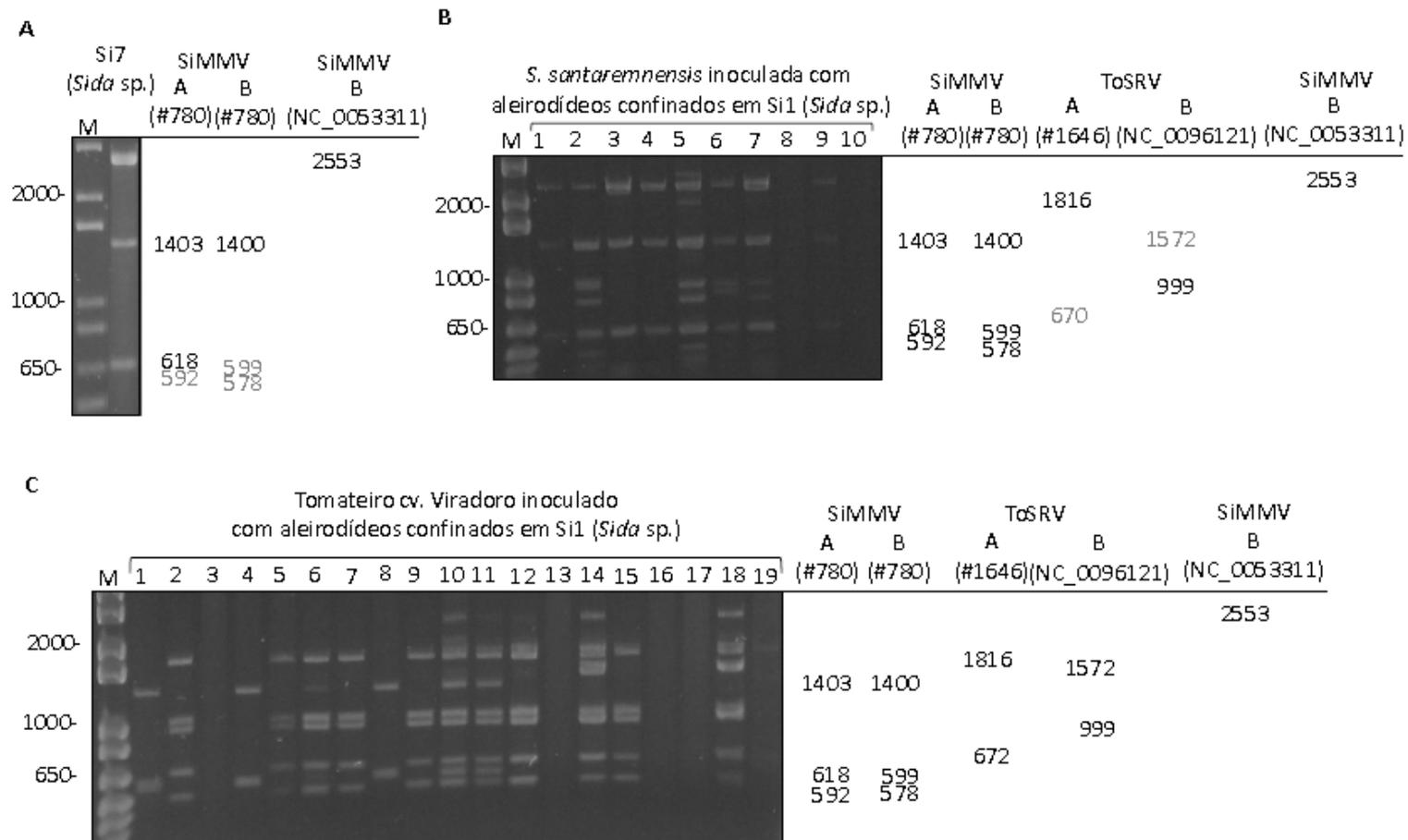


Figura 6. Géis de eletroforese dos produtos do DNA viral, analisados por RCA/RFLP, presente na fonte de inóculo e nas plantas inoculadas após o teste de transmissão por aleirodídeos. **A)** Fonte de inóculo Si7 (*Sida* sp.). **B)** *Sida santaremnensis*. **C)** Tomateiro cv. Viradoro. À direita de cada gel está indicado o tamanho dos fragmentos obtidos pela digestão *in silico* de sequências de DNA-A e/ou DNA-B de isolados conhecidos (SiMMV - *Sida micrantha mosaic virus* e ToSRV - *Tomato severe rugose virus*). Fragmentos previstos que não foram detectados estão na cor cinza. **M:** marcador 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Os perfis de restrição das plantas de *N. physaloides* (Figura 7B) e de tomate (Figura 7C) inoculadas com a amostra Ni6 (*N. physaloides*) foram idênticos e facilmente associados ao perfil de restrição de ToSRV (#1646 e NC_0096121). Esse perfil ficou ligeiramente diferente do perfil da amostra Ni6, provavelmente causado por uma pequena diferença nas condições da eletroforese.

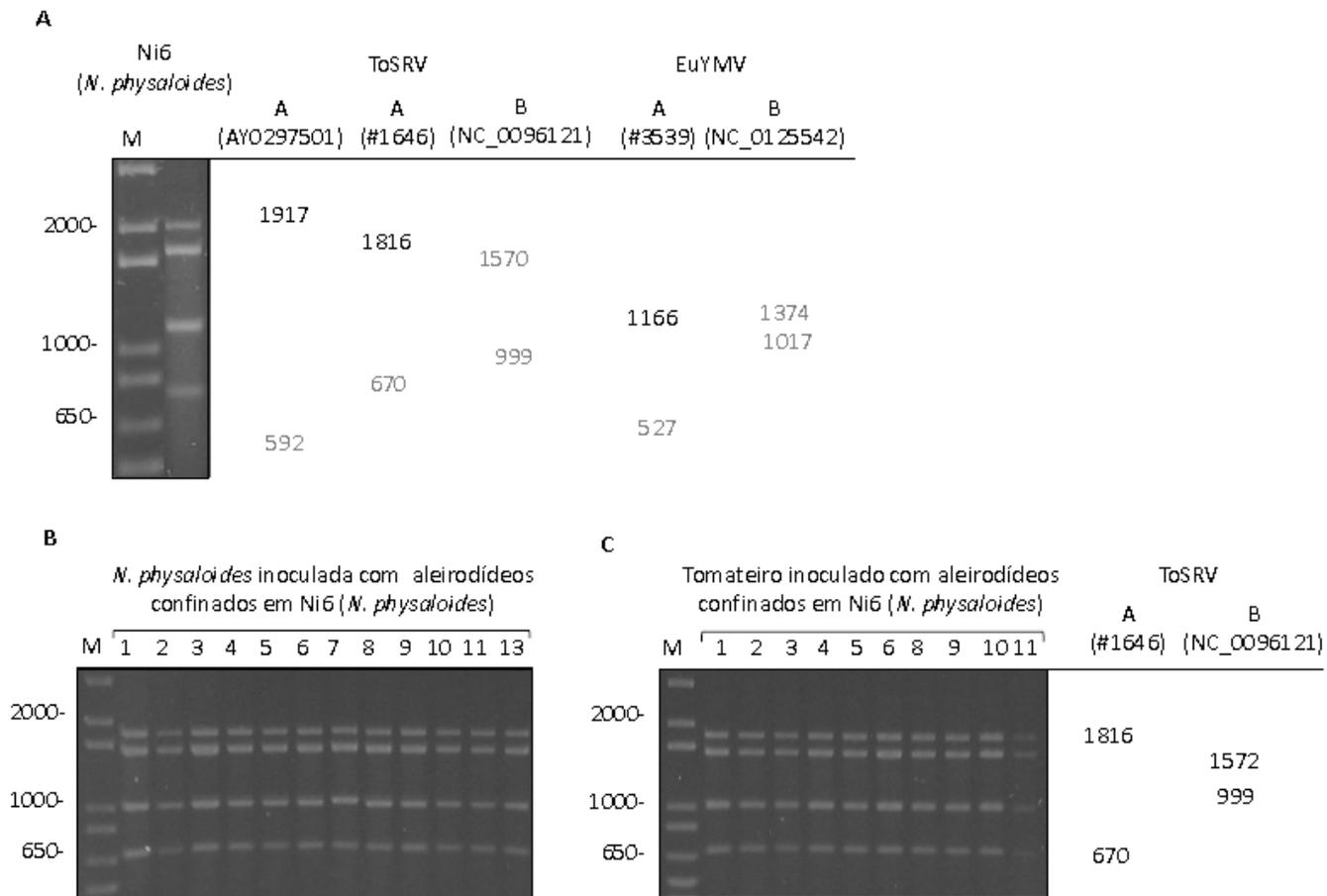


Figura 7. Géis de eletroforese dos produtos do DNA viral, analisados por RCA/RFLP, presente na fonte de inóculo e nas plantas inoculadas após o teste de transmissão por aleirodódeos. **A)** Fonte de inóculo Ni6 (*N. physaloides*). **B)** *N. physaloides*. **C)** Tomateiro cv. Viradoro. À direita de cada gel está indicado o tamanho dos fragmentos obtidos pela digestão *in silico* de seqüências de DNA-A e/ou DNA-B de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV).). Fragmentos previstos que não foram detectados estão na cor cinza. **M:** marcador 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

As plantas de tomateiro, *N. physaloides* e *S. santaremnensis* inoculadas com aleirodódeos que adquiriram o vírus da amostra T2 (tomateiro cv. Dominador) também apresentaram perfil de restrição idêntico ao de ToSRV (#1646 e NC_0096121) (Figura 8, B, C e D), porém diferente da amostra usada como fonte de inóculo (Figura 8A). De forma semelhante, as plantas de tomate e *N. physaloides* inoculadas por aleirodódeos confinados na amostra T6 (tomateiro cv. Dominador) apresentaram perfil de restrição diferente dessa amostra, porém idêntico ao de ToSRV (dados não ilustrados), no entanto as plantas de *E. heterophylla* (Figura 8E) apresentaram perfil de restrição muito semelhante ao da amostra T6 (Figura 8A). No perfil de restrição das amostras de *E. heterophylla* todos os fragmentos correspondentes aos isolados de ToSRV (#1646 e NC_0096121) foram observados (ca. 1,8, 1,5, 1,0 e 0,67 kb), além do fragmento de ca. 2,5 kb associados ao isolado de SiMMV (NC_0053311) e de ca. 1,3 kb associado à EuYMV (NC_0125542) (Figura 8E). No perfil das amostras T2 e T6, os fragmentos de ca. 1,8 kb e 0,7 kb foram associados aos fragmentos de 1,816 kb e 0,670 kb de ToSRV, enquanto o de ca. 1,2 kb foi relacionado ao fragmento de 1,166 kb de EuYMV (#3539), e aquele de ca. 1,4 kb parece corresponder aos fragmentos de 1,403 e/ou 1,400 kb do isolado de SiMMV (#780) (Figura 5A). Já, os fragmentos de ca. 0,8 kb e 0,9 kb não foram associados a nenhum isolado das três espécies virais investigadas. Mais de uma espécie viral foi observada nas amostras T2 e T6, no entanto apenas um isolado viral parece ter sido transferido e/ou preferencialmente replicado nas plantas de tomate, *N. physaloides* e *S. santaremnensis*, e somente nas amostras de *E. heterophylla* mais de um isolado viral foi observado.

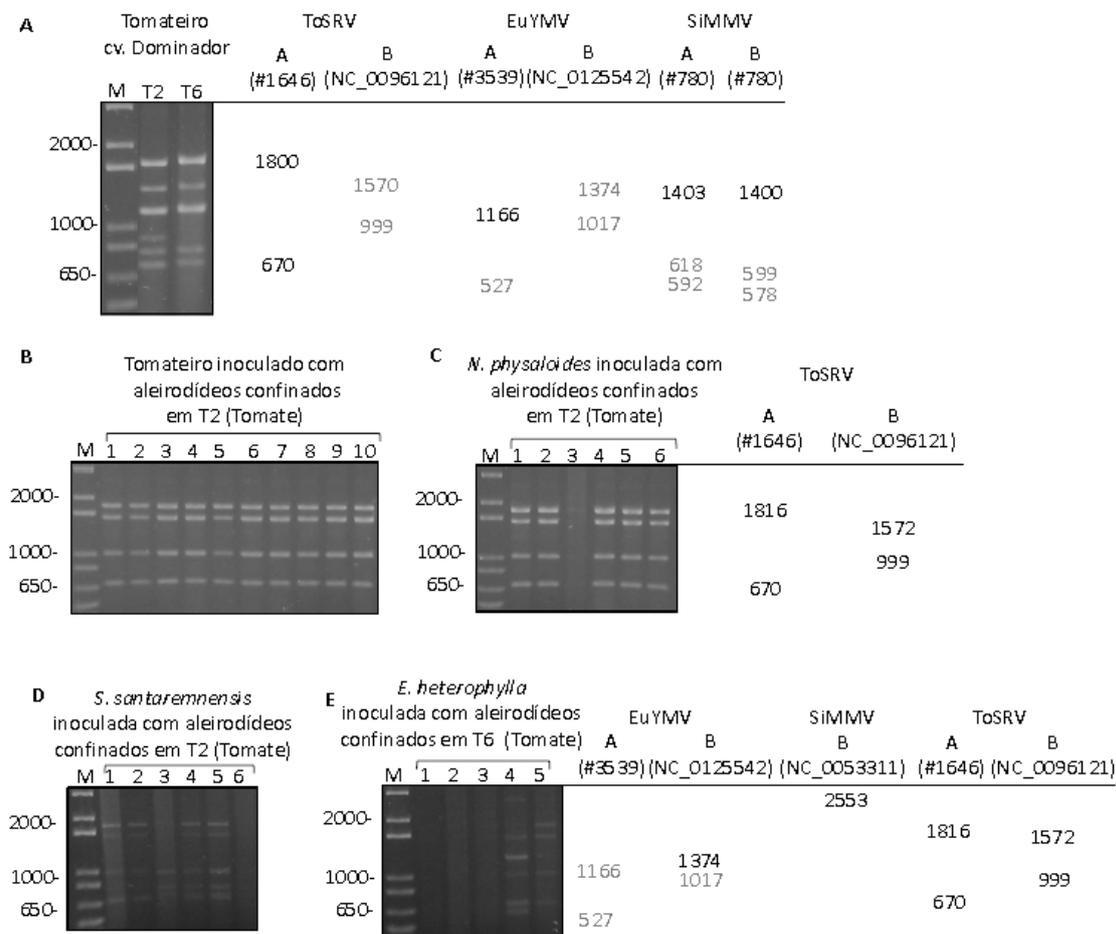


Figura 8. Géis de eletroforese dos produtos do DNA viral, analisados por RCA/RFLP, presente nas fontes de inóculo e nas plantas inoculadas após o teste de transmissão por aleirodódeos. **A)** Fontes de inóculo T2 e T6 (tomateiro cv. Dominador). **B)** Tomateiro cv. Viradoro. **C)** *Nicandra physaloides*. **D)** *Sida santaremnensis*. **E)** *Euphorbia heterophylla*. À direita de cada gel está indicado o tamanho dos fragmentos obtidos pela digestão *in silico* de sequências de DNA-A e/ou DNA-B de isolados conhecidos (EuYMV - *Euphorbia yellow mosaic virus*, SiMMV - *Sida micrantha mosaic virus* e ToSRV - *Tomato severe rugose virus*). Fragmentos previstos que não foram detectados estão na cor cinza. **M:** marcador 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Esses resultados mostraram que após o teste de transmissão diferentes perfis de restrição foram observados nas plantas inoculadas com as amostras AB2 (*E. heterophylla*), Si7 (*Sida* sp.) e T6 (tomateiro cv. Dominador), indicando a ocorrência de infecção mista nessas fontes de inóculo. Por outro lado, nas amostras Ni6 (*N. physaloides*) e T2 (tomateiro cv. Dominador), provavelmente, apenas um isolado viral

estaria presente (ou predominantemente presente), pois os perfis de restrição obtidos das plantas inoculadas foram idênticos. A comparação do perfil de restrição das plantas inoculadas com o de isolados conhecidos indicou, claramente, que as amostras AB2 (*E. heterophylla*), Si7 (*Sida* sp.) e T6 (tomate cv. Dominador) podem estar infectadas com EuYMV, SiMMV, EuYMV e SiMMV, respectivamente, e também com ToSRV, já que o perfil desse vírus foi observado, principalmente, nas plantas de tomate inoculadas. No entanto, o perfil de restrição predominante nas plantas de *E. heterophylla*, tanto da amostra AB2 como das inoculadas, foi associado a EuYMV; e na amostra Si7 (*Sida* sp.) e nas plantas inoculadas de *S. santaremnensis*, o perfil predominante foi associado a dois isolados de SiMMV. Já nas amostras Ni6 (*N. physaloides*) e T2 (tomateiro cv. Dominador), aparentemente, apenas ToSRV estava presente, pois todas as plantas inoculadas apresentaram perfil de restrição típico desse vírus. O perfil de restrição da amostra T2 similar ao da amostra Ni6, das plantas inoculadas e do isolado de ToSRV digerido *in silico*. Diferentemente, o perfil de restrição da amostra T6 e das plantas de *E. heterophylla* consistiu de uma mistura de fragmentos de ToSRV, EuYMV e SiMMV, enquanto em tomateiro e *N. physaloides*, inoculadas com aleirodídeos confinados na mesma amostra, o perfil de ToSRV foi predominante.

3.3.4. Detecção de begomovírus por PCR específica

As amostras coletadas em Goianápolis, que apresentaram resultado positivo para infecção com begomovírus na PCR universal, foram submetidas a PCR específica para detecção de EuYMV, SiMMV e ToSRV. Após o teste de transmissão, as plantas infectadas também foram analisadas.

Do grupo das amostras coletadas em campo (Tabela 3), EuYMV foi detectado em todas as amostras de *E. heterophylla*, sendo que em uma delas SiMMV e ToSRV

também foram detectados. Das cinco amostras de *Sida* spp., SiMMV foi detectado em três amostras e ToSRV nas demais. Todas as amostras de *N. physaloides* foram positivas para infecção com ToSRV, que foi detectado em infecção simples ou mista com EuYMV e/ou SiMMV. Da mesma forma, em tomateiro cv. Dominador, ToSRV foi detectado na maioria das amostras em infecção simples ou mista com EuYMV e/ou SiMMV. Somente em uma amostra apenas EuYMV foi detectado.

A detecção de ToSRV nas amostras de *E. heterophylla* e *Sida* sp. foi muito baixa. Além disso, após a análise de RCA/RFLP das amostras coletadas no campo, fragmentos de restrição foram observados em duas amostras, que anteriormente apresentaram resultado negativo na PCR com o par de oligonucleotídeos universal para begomovírus (Tabela 1). Assim como relatado no Capítulo 2, o DNA viral das amostras foi amplificado por RCA para aumentar a população viral, e em seguida submetido à PCR específica (Tabela 3). Do total de sete amostras de *E. heterophylla*, ToSRV foi detectado em quatro amostras. Além disso, EuYMV foi detectado em uma amostra que, anteriormente, apresentou resultado negativo para esse vírus, confirmando o resultado obtido pela análise de RCA/RFLP (Tabela 1). Das 13 amostras de *Sida* spp., ToSRV foi detectado em quatro, metade em infecção simples e as demais com SiMMV (Tabela 3). Uma amostra, com detecção negativa para begomovírus (Tabela 1) em análise por PCR, mostrou estar infectada com SiMMV (Tabela 3).

Tabela 3. Detecção de begomovírus em amostras de plantas invasoras e de tomateiro, coletadas em área produtora de tomate de mesa em Goianópolis/GO, no ano de 2010.

Amostras coletadas	PCR universal ^a	PCR específica ^b											
		DNA total						DNA viral amplificado por RCA					
		EuYMV	SiMMV	ToSRV	EuYMV e ToSRV	SiMMV e ToSRV	Todas	EuYMV	SiMMV	ToSRV	EuYMV e ToSRV	SiMMV e ToSRV	Todas
<i>E. heterophylla</i>	6/7	5/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	3/7 ^c	0/7	0/7	3/7	0/7	1/7
<i>N. physaloides</i>	11/12	0/11	0/11	4/11	2/11	1/11	4/11	0	0	0	0	0	0
<i>Sida</i> spp.	5/13	0/5	3/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/13	2/13	2/13	0/13	2/13	0/13
Tomateiro	9/10	1/9	0/9	3/9	2/9	1/9	2/9	0	0	0	0	0	0

^a No. de plantas infectadas/No. de plantas coletadas, após PCR com o par de oligonucleotídeos universal PAL1v1978/PAR1c496 para begomovírus.

^b PCR com oligonucleotídeos específicos para ToSRV (ToSRV1f/ToSRV2r e ToSB1450F/ToSB1880R para o DNA-A e DNA-B), EuA170F/EuA1084R para o DNA-A de EuYMV e SimA1500F/SimA2114R para o DNA-A de SiMMV.

^c PCR específica de todas as amostras de *E. heterophylla* e *Sida* sp., após amplificar o DNA viral por RCA.

Nas amostras usadas como fonte de inóculo no teste de transmissão as seguintes espécies virais foram detectadas por PCR: EuYMV e ToSRV em AB2 (*E. heterophylla*); EuYMV, SiMMV e ToSRV em Ni6 (*N. physaloides*); SiMMV e ToSRV em Si7 (*Sida* sp.); EuYMV e ToSRV em T2 e T9; e ToSRV em T6 (todas provenientes de tomateiro cv. Dominador) (Figura 9). A detecção de ToSRV nas amostras AB2 e Si7 só foi possível quando o DNA viral foi amplificado por RCA antes de realizar a PCR. Nas demais amostras (usadas como fonte de inóculo), tanto ToSRV como os outros vírus foram detectados empregando-se, na PCR, apenas o DNA viral diretamente do DNA total. Mesmo após aumentar a população do DNA viral, a intensidade do amplicon de ToSRV foi mais baixa quando comparada a de EuYMV e SiMMV nas amostras AB2 e Si7 (Figura 9, A e B). Por outro lado, nas plantas-fonte Ni6, T2, T9 e T6 a intensidade dos produtos amplificados de ToSRV foi maior em relação à de EuYMV e SiMMV (Figura 9, C, D, E e F).

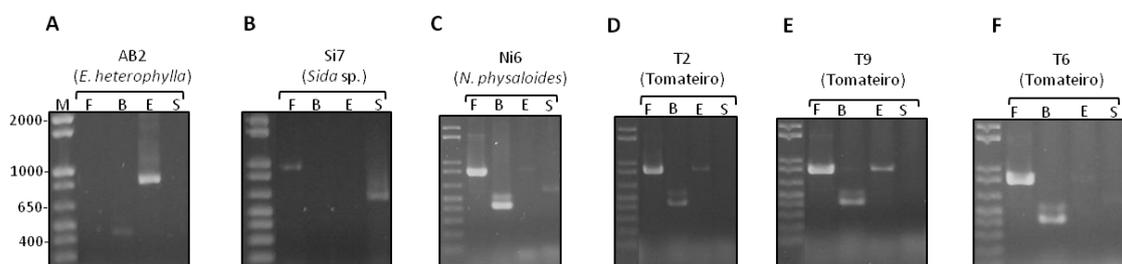


Figura 9. Gel de eletroforese do produto viral amplificado, por reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers específicos para *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), nas amostras de plantas invasoras e de tomateiro selecionadas como fonte de inóculo para o teste de transmissão por aleirodídeos. **A)** AB2 (*E. heterophylla*). **B)** Si7 (*Sida* sp.). **C)** Ni6 (*N. physaloides*). **D, E e F)** Tomateiro cv. Dominador. **M:** marcador 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen). **F:** oligonucleotídeos específicos para o DNA-A de ToSRV (produto amplificado com 800 pb). **B:** oligonucleotídeos específicos para o DNA-B de ToSRV (239 pb). **E:** oligonucleotídeos específicos para o DNA-A de EuYMV (914 pb). **S:** oligonucleotídeos específicos para o DNA-A de SiMMV (614 pb).

Em seguida, as amostras das plantas inoculadas que apresentaram resultado positivo para begomovírus na PCR com o par de oligonucleotídeos universal (Tabela 2) também foram submetidas à PCR específica para verificar quais dos vírus detectados nas amostras usadas como fonte de inóculo foram transmitidos para essas plantas por aleirodódeos (Tabela 4). A reação de PCR foi realizada com DNA viral diretamente do DNA total e com os pares de oligonucleotídeos específicos para EuYMV, SiMMV e ToSRV.

Nas plantas inoculadas com aleirodódeos confinados na amostra AB2 (Tabela 4), EuYMV foi detectado em todas (n=44) as amostras de *E. heterophylla*, sendo que em quatro delas ToSRV também estava presente (uma com o oligonucleotídeo para o DNA-A e as demais para o DNA-B). Em todas as amostras de tomateiro (n=23) detectou-se ToSRV, três em infecção simples e 21 com EuYMV.

Após inoculação com aleirodódeos confinados na amostra Ni6 (Tabela 4), ToSRV foi detectado em todas as amostras de *N. physaloides* (n=17), e duas amostras apresentaram infecção mista (uma com EuYMV e outra com SiMMV). Em tomateiro apenas ToSRV foi detectado em todas as amostras (n=19).

Nas plantas inoculadas com aleirodódeos confinados na amostra Si7 (Tabela 4), apenas SiMMV foi detectado nas amostras de *S. santaremnensis* (n=8). Das 21 plantas de tomateiro, infecção simples com SiMMV foi detectada em uma amostra, enquanto nas demais ToSRV foi detectado em infecção simples (n=9) ou mista com SiMMV (n=11).

ToSRV foi detectado em todas as amostras de *N. physaloides* (n=7), *S. santaremnensis* (n=4) e tomateiro (n=11) inoculadas com aleirodódeos que adquiriram o vírus da amostra T2. SiMMV também foi detectado em uma amostra de *N. physaloides* e de *S. santaremnensis*. De forma semelhante, ToSRV também foi detectado nas

amostras de *N. physaloides* (n=2) e tomateiro (n=4) após inoculação com aleirodídios confinados na amostra T9, sendo que uma amostra de *N. physaloides* também foi positiva para SiMMV. Apenas ToSRV foi detectado nas amostras inoculadas com aleirodídios confinados na amostra T6 (Tabela 4).

Tabela 4. Detecção dos begomovírus transmitidos para tomateiro e plantas invasoras por aleirodídeos (biótipo B de *B. tabaci*) que adquiriram o vírus em diferentes fontes de inóculo.

Fontes de inóculo	Plantas inoculadas	PCR universal ^c	PCR específica ^d			
			EuYMV	SiMMV	ToSRV	
					DNA-A	DNA-B
AB2 (<i>E. heterophylla</i>)	<i>E. heterophylla</i>	44	44	0	1	3
	Tomateiro ^b	23	21	0	23	23
Ni6 (<i>N. physaloides</i>)	<i>N. physaloides</i>	17	1	1	17	17
	Tomateiro	19	0	0	19	19
Si7 (<i>Sida</i> sp.)	<i>S. santaremnensis</i>	8	0	8	0	0
	Tomateiro	21	0	15	18	16
T2 (Tomateiro) ^a	<i>E. heterophylla</i>	0	0	0	0	0
	<i>N. physaloides</i>	7	0	1	7	7
	<i>S. santaremnensis</i>	4	0	1	4	4
	Tomateiro	11	0	0	11	11

T9 (Tomateiro)	<i>E. heterophylla</i>	0	0	0	0	0
	<i>N. physaloides</i>	2	0	1	2	2
	<i>S. santaremnensis</i>	0	0	0	0	0
	Tomateiro	4	0	0	4	4
T6 (Tomateiro)	<i>E. heterophylla</i>	2	0	0	2	2
	<i>N. physaloides</i>	5	0	0	5	5
	<i>S. santaremnensis</i>	0	0	0	0	0
	Tomateiro	5	0	1	5	5

^a As amostras T2, T9 e T6 são tomateiro cv. Dominador.

^b Utilizou-se plantas de tomateiro cv. Viradoro para inoculação.

^c Somente as plantas positivas após PCR com o par de oligonucleotídeos universal foram analisadas.

^d PCR com oligonucleotídeos específicos: ToSRV1f/ToSRV2r e ToSB1450F/ToSB1880R para o DNA-A e DNA-B de ToSRV, EuA170F/EuA1084R para o DNA-A de EuYMV e SimA1500F/SimA2114R para o DNA-A de SiMMV.

3.4. Correlação entre análise de RCA/RFLP e a PCR específica

Após o teste de transmissão, a infecção das plantas inoculadas foi atribuída a diferentes espécies virais (EuYMV, SiMMV e ToSRV) baseado na análise de RCA/RFLP (item 3). A presença desses vírus foi confirmada por PCR com oligonucleotídeos específicos para cada espécie viral (item 4). Para exemplificar a correlação entre a análise de RCA/RFLP e a PCR específica, o mesmo grupo de amostras (plantas inoculadas), anteriormente selecionado para estudar o perfil de restrição no item 3, será detalhado a seguir.

Nas plantas inoculadas com aleirodídeos confinados na amostra AB2 (*E. heterophylla*), EuYMV foi associado ao perfil de restrição das 10 amostras de *E. heterophylla* (Figura 5B). Em tomateiro, uma combinação dos fragmentos de EuYMV e ToSRV foram observados em todas as amostras (Figura 5C). A PCR específica dessas amostras mostrou que apenas EuYMV foi detectado em *E. heterophylla* (Tabela 5), sendo que em uma amostra um fragmento correspondente a ToSRV também estava presente (Figura 5B, Coluna 4). Das 21 amostras de tomateiro, EuYMV e ToSRV foram detectados em 18 delas e nas três amostras restantes apenas ToSRV foi detectado (Tabela 5). No entanto, fragmentos de ambos os vírus foram observados nessas três amostras (Figura 5C, Colunas 5, 12 e 19). Na fonte de inóculo (AB2 - *E. heterophylla*), apenas EuYMV foi associado ao perfil de restrição (Figura 5A), enquanto EuYMV e ToSRV foram detectados por PCR específica (Figura 9A). Mesmo após amplificar o DNA viral para detectar ToSRV, a intensidade do produto amplificado desse vírus foi menor do que de EuYMV.

Após inoculação com aleirodídeos que adquiriram o vírus na amostra Si7 (*Sida* sp.), o perfil de restrição da metade das amostras de *S. santaremnensis* foi associado apenas aos isolados de SiMMV (Figura 6B, Colunas 1, 3, 4 e 9), e a outra metade aos

isolados de SiMMV e de ToSRV (Figura 6B, Colunas 2, 5, 6 e 7). Porém, somente SiMMV foi detectado nessas amostras por PCR específica (Tabela 5). Em tomateiro, três amostras apresentaram perfil de restrição associado somente à SiMMV (Figura 6C, Colunas 1, 4 e 11) e, nas demais, fragmentos de SiMMV e ToSRV foram observados. Após PCR específica, os vírus SiMMV e ToSRV foram detectados em duas das três amostras associadas somente a SiMMV (Figura 6C, Colunas 1 e 4). A intensidade dos produtos amplificados de ToSRV foi muito fraca, indicando que a concentração de SiMMV foi maior nessas amostras e por isso o perfil de restrição foi idêntico àquele da amostra 11 (Figura 6C, Coluna 11), na qual apenas SiMMV foi detectado. Além disso, apenas ToSRV foi detectado em 5 amostras (Tabela 5), nas quais fragmentos de SiMMV também foram observados no perfil de restrição (Figura 6C, Colunas 2, 5, 7, 12 e 15). Nas demais amostras ambos os vírus foram detectados, como observado pela análise de RCA/RFLP (Figura 6C, Colunas 1, 2, 4, 6, 10, 11, 14, 15 e 18). Na fonte de inóculo (Si7 - *Sida* sp.), o perfil de restrição correspondeu somente aos isolados de SiMMV (Figura 6A), enquanto pela PCR específica ToSRV também foi detectado (Figura 9B). Como em AB2 (*E. heterophylla*), a detecção de ToSRV só foi possível após utilizar o DNA viral amplificado por RCA na PCR.

O perfil de restrição das amostras de *N. physaloides* e tomateiro, inoculadas com aleirodídeos confinados na amostra Ni6 (*N. physaloides*), foi associado à ToSRV (Figura 7), e a presença desse vírus foi confirmada por PCR específica em todas as amostras, sendo que duas amostras de *N. physaloides* apresentaram infecção mista (uma com EuYMV e outra com SiMMV). No entanto, nenhum fragmento desses vírus foi observado no perfil de restrição dessas amostras (Figura 7B, Colunas 4 e 6). Em Ni6 (*N. physaloides*) o perfil de restrição foi associado a isolados de ToSRV e EuYMV (Figura

7A), e enquanto EuYMV, SiMMV e ToSRV foram detectados por PCR, utilizando apenas DNA viral diretamente do DNA total (Figura 9C).

As amostras de tomateiro, *N. physaloides* e *S. santaremnensis* inoculadas com aleirodódeos que adquiriram o vírus na amostra T2 também apresentaram perfil de restrição idêntico ao de ToSRV (Figura 8, B, C e D). Como esperado, esse vírus foi detectado em todas essas amostras, sendo que SiMMV também foi detectado em uma amostra de *N. physaloides* (Figura 8C, Coluna 7) e em uma de *S. santaremnensis* (Figura 8D, Coluna 5), porém nenhum fragmento desses vírus foi observado no perfil de restrição dessas amostras. A infecção das amostras de *E. heterophylla*, obtidas após inoculação com aleirodódeos confinados na amostra T6, foi associada a EuYMV, SiMMV e ToSRV pela análise de RCA/RFLP, porém apenas ToSRV foi detectado nessas amostras (Tabela 5). Nas fontes de inóculo, ToSRV e EuYMV foram detectados em T2 e T9, enquanto as três espécies virais foram detectadas em T6 (Figura 9, D, E e F).

Na PCR específica, o resultado negativo para a detecção de EuYMV nas três amostras de tomateiro (inoculado a partir de AB2), de ToSRV nas quatro amostras de *S. santaremnensis* e de SiMMV nas cinco amostras de tomateiro (inoculados a partir de Si7), e de EuYMV e SiMMV nas amostras de *E. heterophylla* (inoculadas a partir de T6) sugeriu que a concentração desses vírus no DNA total foi muito baixa. Por outro lado, alguns isolados virais não foram observados pela análise de RCA/RFLP, mas foram detectados pela PCR específica: três amostras de tomateiro (inoculadas com Si7) apresentaram resultado positivo para ToSRV, nas quais apenas SiMMV foi observado no perfil de restrição; EuYMV e SiMMV foram detectados em uma amostra de *N. physaloides* (inoculada com Ni6) na qual apenas ToSRV foi associado ao perfil de restrição; SiMMV foi detectado em *N. physaloides* e *S. santaremnensis* (inoculadas com

T2) sendo que o perfil de restrição foi atribuído a ToSRV, apenas. Aparentemente, mesmo após amplificar o DNA viral por RCA, a concentração de alguns vírus não aumentou em quantidade suficiente para permitir a visualização pela análise de RCA/RFLP.

Tabela 5. Comparação entre a análise de RCA/RFLP e PCR específica de amostras de plantas invasoras e tomateiro inoculadas com aleirodódeos (biótipo B de *B. tabaci*) que adquiriram o vírus em diferentes fontes de inóculo.

Fontes de inóculo	Plantas inoculadas	Análise RCA/RFLP ^c					PCR específica ^d				
		EuYMV	SiMMV	ToSRV	EuYMV e ToSRV	SiMMV e ToSRV	EuYMV	SiMMV	ToSRV	EuYMV e ToSRV	SiMMV e ToSRV
AB2 (<i>E. heterophylla</i>)	<i>E. heterophylla</i>	8/10	0	0	0	0	8/10	0	0	0	0
	Tomateiro ^b	0 ^c	0	0	21/21	0	0	0	3/21	18/21	0
Ni6 (<i>N. physaloides</i>)	<i>N. physaloides</i>	0	0	12/12	0	0	0	0	10/12	1/12	1/12
	Tomateiro	0	0	10/10	0	0	0	0	10/10	0	0
Si7 (<i>Sida</i> sp.)	<i>S. santaremnensis</i>	0	4/10	0	0	4/10	0	8/10	0	0	0
	Tomateiro	0	3/19	0	0	12/19	0	1/19	5/19	0	9/19
T2 (Tomateiro) ^a	<i>N. physaloides</i>	0	0	5/6	0	0	0	0	5/6	0	1/6
	<i>S. santaremnensis</i>	0	0	5/6	0	0	0	0	4/6	0	1/6
	Tomateiro	0	0	10/10	0	0	0	0	10/10	0	0
T6 (Tomateiro)	<i>E. heterophylla</i>	1/5	1/5	2/5	0	0	0	0	2/5	0	0

^a As amostras T2 e T6 são tomateiro cv. Dominador.

^b Utilizou-se plantas de tomateiro cv. Viradoro para inoculação.

^c Perfis de restrição de isolados conhecidos de EuYMV, SiMMV e ToSRV foram usados para análise.

^d PCR com oligonucleotídeos específicos: ToSRV1f/ToSRV2r e ToSB1450F/ToSB1880R para o DNA-A e DNA-B de ToSRV, EuA170F/EuA1084R para o DNA-A de EuYMV e SimA1500F/SimA2114R para o DNA-A de SiMMV.

4. DISCUSSÃO

Diferentes espécies de plantas invasoras estão associadas ao cultivo de tomateiro no Brasil. Além de competir diretamente com a cultura, essas plantas são boas hospedeiras de aleirodídeos e podem ser infectadas por begomovírus. No Brasil, *N. physaloides* foi a primeira planta invasora relatada como hospedeira de um begomovírus economicamente importante para tomateiro, o ToSRV (Barbosa *et al.*, 2009). No entanto, é esperado que outras espécies de plantas invasoras possam atuar como fontes desse vírus.

No Capítulo 2, além de *N. physaloides*, as plantas invasoras *Crotalaria* sp., *E. heterophylla* e *Sida* sp. foram identificadas como hospedeiras de ToSRV, e a transferência desse vírus para tomateiro foi demonstrada por biobalística, indicando que essas plantas podem atuar como fonte de inóculo. Testes de transmissão como a agroinoculação, enxertia e biobalística são preferidos para realizar a inoculação de um vírus devido à maior facilidade de realização dos ensaios. No entanto, na natureza, esses vírus são transmitidos pelo aleirodídeo *B. tabaci*, por isso testes de transmissão pelo vetor são de extrema importância para se confirmar os resultados obtidos com outros métodos de inoculação.

Nesse capítulo, begomovírus presentes em plantas de *E. heterophylla*, *N. physaloides* e *Sida* sp., coletadas dentro de uma lavoura de tomate, foram transferidos para tomateiro por aleirodídeos; e aqueles presentes em tomateiro também foram transmitidos para *E. heterophylla*, *N. physaloides* e *S. santaremnensis*. Em ambos os testes de transmissão, ToSRV foi transferido para a maioria das plantas infectadas, além de EuYMV e SiMMV.

Infecções mistas foram observadas após testes de transmissão, análise de RCA/RFLP e PCR específica. Inicialmente, o somatório estimado de fragmentos de DNA correspondente ao genoma viral indicou que a maioria das amostras de plantas invasoras e de tomateiro, coletadas em Goianápolis, estava infectada por apenas um isolado viral. No entanto, perfis de restrição distintos foram observados entre as amostras de uma mesma espécie de planta, sugerindo a ocorrência de infecção mista com diferentes isolados de begomovírus. Após o teste de transmissão, o isolado viral predominante em *E. heterophylla* foi o mesmo predominante na fonte de inóculo (*E. heterophylla*), enquanto nas plantas de tomateiro outro isolado também estava presente. De forma semelhante, o isolado viral predominante em *Sida* sp. estava presente nas plantas de *S. santaremnensis*, em infecção simples ou mista. Na maioria das plantas de tomateiro ambos os isolados virais ocorreram em mistura, e apenas três plantas apresentaram fragmentos correspondentes ao isolado predominante na fonte de inóculo (*Sida* sp.). Por outro lado, o mesmo isolado viral foi predominante nas plantas de *N. physaloides* e tomateiro (inoculadas com aleirodídeos confinados em *N. physaloides*), e também em *N. physaloides*, *S. santaremnensis* e tomateiro (inoculadas com aleirodídeos confinados em tomateiro). Exceções foram vistas em plantas de *E. heterophylla* (inoculadas com aleirodídeos confinados em tomateiro) em que vírus distintos também foram observados. Nas fontes de inóculo, *N. physaloides* e tomateiro, outros vírus estavam presentes, além daquele predominante nas plantas inoculadas.

Quando um vírus é menos adaptado a uma hospedeira seu título viral é baixo (Hou *et al.*, 1998). Dessa forma, comprovar a existência de infecção mista pode ser difícil, pois o isolado viral mais adaptado será prevalente nos testes de detecção e/ou isolamento, a exemplo do complexo viral existente em plantas de *Sida* (Jovel *et al.*, 2004). A amplificação da população viral por RCA aliada a outras técnicas tem

permitido com sucesso detectar a presença de diferentes isolados virais numa planta infectada (Jeske *et al.*, 2010). Aqui, o uso de diferentes hospedeiras no teste de transmissão pelo vetor (possibilitando a replicação dos vírus em hospedeiras preferenciais) combinado com análise de RCA/RFLP, permitiu demonstrar que diferentes vírus estavam presentes nas fontes de inóculo e foram transferidos para as plantas inoculadas, nas quais um ou outro isolado foi preferencialmente replicado.

A identificação desses vírus foi feita pela comparação dos perfis de restrição com aqueles de isolados conhecidos digeridos *in silico*. Três tipos principais de perfis foram associados a isolados de EuYMV, SiMMV e ToSRV, sendo que os demais foram resultantes da combinação entre as três espécies virais. Após o teste de transmissão, o perfil predominante nas plantas de *E. heterophylla* correspondeu ao de EuYMV, enquanto nas plantas de tomateiro EuYMV e ToSRV estavam presentes. A infecção das plantas de *S. santaremnensis* foi atribuída a SiMMV em infecção simples ou associada com ToSRV, enquanto na maioria das plantas de tomateiro ambos os vírus ocorreram, sendo que em três plantas apenas SiMMV foi observado. Nas fontes de inóculo, EuYMV predominou em *E. heterophylla* e SiMMV em *Sida* sp., indicando que esses vírus ocorreram em maior concentração nessas plantas. Pelo teste de transmissão, foi possível demonstrar que apesar da baixa concentração de ToSRV nas fontes de inóculo, esse vírus foi transferido e eficientemente replicado em tomateiro, indicando que está bem adaptado a essa hospedeira. O elevado título viral de EuYMV e SiMMV nas fontes de inóculo e, provavelmente, no vetor pode ter contribuído para a frequente ocorrência desses vírus nas plantas de tomateiro. A predominância de SiMMV em três dessas plantas reforça essa idéia. Em algumas plantas de *S. santaremnensis*, ToSRV ocorreu em infecção mista com SiMMV, sugerindo que aleirodídeos, casualmente, podem ter adquirido mais partículas de ToSRV do que de SiMMV favorecendo seu

desenvolvimento nessa planta, ou ainda que esse vírus esteja se adaptando a essa hospedeira. Além disso, maior porcentagem de plantas de tomateiro foram infectadas com ToSRV a partir de *Sida* sp. do que de *E. heterophylla*.

Em contraste, somente ToSRV predominou nas plantas de *N. physaloides* e tomateiro (inoculadas com aleirodídeos confinados em *N. physaloides*), e também nas plantas de *N. physaloides*, *S. santaremnensis* e tomateiro (inoculadas com aleirodídeos que adquiriram o vírus em tomateiros). Nessas fontes de inóculo, ToSRV e EuYMV estavam presentes em *N. physaloides*, e ToSRV em infecção mista com EuYMV ou SiMMV ocorreram em tomateiro. Fragmentos de ToSRV foram mais frequentes no perfil de restrição das duas hospedeiras, indicando que esse vírus está mais adaptado a essas plantas do que EuYMV e SiMMV e, por isso, pode ter sido preferencialmente transferido e/ou replicado nas plantas inoculadas. As exceções foram as plantas de *E. heterophylla* (inoculadas com aleirodídeos confinados em tomateiro) em que EuYMV, SiMMV e ToSRV foram observados. Essa planta parece ser uma boa hospedeira para EuYMV (Fernandes *et al.*, 2011). Já o desenvolvimento de ToSRV pode ter sido favorecido pela sua maior concentração na planta fonte, e por isso mais partículas foram transferidas para a planta inoculada. Quanto ao SiMMV é provável que, fortuitamente, aleirodídeos tenham adquirido esse vírus numa concentração capaz de causar infecção em *E. heterophylla*. Nas condições desse teste, as chances de EuYMV e/ou SiMMV terem sido adquiridos de *N. physaloides* ou tomateiro, numa concentração suficiente para serem transmitidos para novas plantas foram limitadas devido ao curto período de tempo para sucessivos eventos de aquisição e inoculação necessários para compensar o baixo título viral nas fontes de inóculo, e por sua vez no vetor. Em condições de campo, a possibilidade de uma planta (como *N. physaloides* e tomateiro) ser infectada com diferentes vírus (mesmo aqueles menos adaptados) é maior, pois o período de tempo

para repetidos eventos de aquisição e transmissão de vírus de uma planta para outra por uma população de aleirodídeos é relativamente longo. Isso foi reforçado pelos diferentes perfis de restrição obtidos das amostras dessas plantas (coletadas na mesma área). Em geral, quanto maior o período de aquisição e de inoculação maiores são as chances de transmissão do vírus pelo vetor (Costa, 1998).

Outro fato interessante foi a predominância de ToSRV nas plantas inoculadas de *S. santaremnensis*, apesar da presença de SiMMV em tomateiro (usado como fonte de inóculo). Talvez apenas ToSRV tenha sido adquirido e transmitido do tomateiro para essas plantas (devido à sua maior concentração em relação a SiMMV), ou também é possível que ambos os vírus tenham sido transferidos. No entanto, se esse isolado de ToSRV estiver em processo de adaptação a espécies de *Sida*, o seu estabelecimento pode ter sido facilitado (em detrimento ao de SiMMV) devido ao maior título viral no tomateiro e no vetor. De uma forma geral foi possível deduzir que EuYMV parece estar mais adaptado a *E. heterophylla*, SiMMV a espécies de *Sida* e ToSRV a tomateiro e *N. physaloides*.

O teste de transmissão utilizando o vetor demonstrou que ToSRV foi eficientemente transmitido de *E. heterophylla* e *Sida* sp. para tomateiro, juntamente com EuYMV ou SiMMV. Apesar do baixo número de plantas infectadas, ToSRV também foi transmitido para algumas plantas de *E. heterophylla* e *S. santaremnensis*, nas quais EuYMV e SiMMV predominaram. No Capítulo 2, o DNA viral presente em *E. heterophylla* (EuYMV e ToSRV) e *Sida* sp. (SiMMV e ToSRV) foi inoculado por biobalística em tomateiro e plantas invasoras. Pela análise de RCA/RFLP apenas ToSRV foi observado nas plantas de tomateiro, EuYMV em *E. heterophylla* e SiMMV em *S. santaremnensis*. Somente após PCR específica, utilizando o DNA viral amplificado por RCA, foi possível detectar EuYMV e/ou SiMMV nas plantas de

tomateiro, bem como ToSRV nas plantas invasoras inoculadas. É possível que a inoculação por biobalística tenha limitado de algum modo o desenvolvimento de EuYMV e SiMMV nas plantas de tomateiro, bem como o de ToSRV nas plantas invasoras.

A presença desses vírus nas plantas coletadas e nas inoculadas foi confirmada por PCR específica. Nas plantas coletadas (incluindo aquelas usadas como fonte de inóculo), EuYMV e SiMMV foram detectados na maioria das amostras de *E. heterophylla* e *Sida* sp., respectivamente. No entanto, ToSRV foi detectado apenas em uma amostra de *E. heterophylla* (em infecção mista com EuYMV e SiMMV), e em duas amostras de *Sida* sp. (em infecção simples). Quando a PCR foi realizada com o DNA viral amplificado por RCA, aumentando a população de DNA viral, o ToSRV foi detectado em um maior número de amostras de *E. heterophylla* e *Sida* sp., indicando que o vírus estava presente, porém em baixa concentração em relação às espécies predominantes (EuYMV e SiMMV). Diferentemente, ToSRV foi detectado na maioria das amostras de *N. physaloides* e de tomateiro utilizando apenas o DNA viral diretamente do DNA total, tanto em infecção simples como mista com EuYMV e/ou SiMMV. Uma amostra de tomateiro foi positiva apenas para EuYMV, no entanto, pela análise de RCA/RFLP, outros vírus foram observados. Apesar da ocorrência de infecção mista, foi possível observar uma predominância das espécies virais de acordo com a hospedeira: EuYMV em *E. heterophylla*, SiMMV em *Sida* sp. e ToSRV em *N. physaloides* e tomateiro. Nas plantas inoculadas com alerodídeos confinados em *E. heterophylla*, EuYMV foi detectado em todas as plantas de *E. heterophylla*, sendo que três delas apresentaram infecção com ToSRV, enquanto em tomateiro, EuYMV e ToSRV foram detectados na maioria das plantas e três delas apresentaram infecção simples com ToSRV. Após inoculação com aleirodídeos confinados em *Sida* sp., apenas

SiMMV foi detectado nas plantas de *S. santaremnensis*. SiMMV e ToSRV foram detectados na maioria das amostras de tomateiro, sendo que cinco plantas apresentaram infecção simples com ToSRV. Em *E. heterophylla* e *Sida* sp. (usadas como fonte de inóculo), ToSRV só foi detectado após amplificar o DNA viral, enquanto EuYMV e SiMMV foram detectados a partir do DNA viral diretamente do DNA total. ToSRV foi detectado em todas as plantas inoculadas com aleirodídeos confinados em *N. physaloides* e tomateiro. A infecção mista desse vírus com EuYMV e/ou SiMMV foi detectada em algumas plantas de *N. physaloides* e *S. santaremnensis*. Nas fontes de inóculo, ToSRV e EuYMV foi detectado em *N. physaloides* e em duas amostras de tomateiro, enquanto as três espécies virais foram detectadas em uma amostra de tomateiro.

De um modo geral, as espécies virais associadas às plantas infectadas após análise de RCA/RFLP foram confirmadas pela PCR específica. Outros estudos demonstraram que a RCA/RFLP é uma técnica simples e confiável para a detecção e caracterização preliminar de isolados virais desconhecidos (Haible *et al.*, 2006; Paprotka *et al.*, 2010; Wyant *et al.*, 2011). A presença de infecção mista foi observada em um maior número de amostras pela análise de RCA/RFLP. Na PCR específica, somente ToSRV foi detectado em três amostras de tomateiro (inoculado a partir de *E. heterophylla*), no entanto a presença de EuYMV também foi observada no perfil de restrição dessas amostras. Do mesmo modo, em cinco amostras de tomateiro (inoculado a partir de *Sida* sp.) detectou-se somente ToSRV, porém fragmentos de SiMMV também foram observados no perfil de restrição. As plantas de *S. santaremnensis* (inoculadas a partir de *Sida* sp.) apresentaram detecção positiva apenas para SiMMV, mas fragmentos de ToSRV foram observados no perfil de restrição de quatro amostras (de um total de oito infectadas). Apenas ToSRV foi detectado em *E. heterophylla*

(inoculada a partir de tomateiro), sendo que fragmentos de EuYMV e SiMMV estavam presentes no perfil de restrição.

Em contrapartida, outros vírus foram detectados por PCR específica em algumas amostras nas quais apenas ToSRV foi observado pela análise do perfil de restrição. EuYMV e SiMMV foram detectados em uma amostra de *N. physaloides* (inoculada a partir de *N. physaloides* com Ni6) e SiMMV foi detectado em uma amostra de *N. physaloides* e em outra de *S. santaremnensis* (inoculadas a partir de tomateiro).

A diferença entre os testes de detecção das plantas inoculadas pode estar relacionada principalmente à concentração da população viral nas amostras. Após o teste de transmissão, o DNA viral das amostras foi previamente amplificado por RCA para análise RCA/RFLP, e com isso alguns isolados presentes em baixa concentração foram amplificados e visualizados no perfil de restrição. Já a PCR específica foi realizada com o DNA viral diretamente do DNA total, e aqueles vírus presentes nas amostras em uma concentração muito baixa não puderam ser detectados. Por outro lado, alguns isolados virais não foram observados pela análise de RCA/RFLP, mas foram detectados pela PCR específica. Isso indicou que um isolado viral, que já se encontrava em alta concentração na planta, foi muito mais amplificado que outros e por isso apresentou perfil de restrição predominante sobre os demais.

5. CONCLUSÕES

A infestação de uma lavoura de produção de tomate por plantas invasoras pode ter implicações relevantes na ocorrência de doenças causadas por begomovírus (Garcia-Andres *et al.*, 2006). Além de atuarem como fonte de begomovírus, são também hospedeiras do vetor, *B. tabaci*. No Brasil, apenas *N. physaloides* havia sido relatada com infecção natural por ToSRV, um importante begomovírus para o tomateiro (Barbosa *et al.*, 2009).

Nesse estudo, diferentes isolados de begomovírus presentes em amostras de *E. heterophylla*, *N. physaloides* e *Sida* spp. foram transmitidos por aleirodídeos para o tomateiro bem como para plantas invasoras (correspondente ou relacionada).

A identificação dos isolados virais foi realizada pela comparação entre os perfis de restrição obtidos após RCA-RFLP com aqueles de sequências de isolados conhecidos (digeridas *in silico*) que poderiam estar presentes nas plantas infectadas. Nas fontes de inóculo, EuYMV foi o vírus predominante em *E. heterophylla*, enquanto SiMMV ocorreu em *Sida* sp. e ToSRV estava presente em *N. physaloides*. Após o teste de transmissão, os isolados predominantes nas fontes de inóculo também prevaleceram nas plantas invasoras inoculadas (*E. heterophylla*, *N. physaloides* e *S. santaremnensis*), com raras exceções. Em tomateiro, ToSRV ocorreu em infecção mista com EuYMV e/ou SiMMV. A exceção foi observada naqueles inoculados por aleirodídeos que adquiriram o vírus em *N. physaloides*, os quais apresentaram infecção apenas com ToSRV. Isso demonstrou que ToSRV estava presente nas fontes de inóculo, porém em baixa concentração, e somente após a inoculação em tomateiro (provavelmente uma hospedeira preferencial) foi possível inferir sobre a sua presença nessas fontes. Além disso, o teste de transmissão pelo vetor permitiu que outros vírus além de ToSRV também fossem transferidos para o tomateiro. Por outro lado, quando aleirodídeos

foram confinados em tomateiro (aparentemente contendo infecção mista) ToSRV foi preferencialmente transmitido e/ou replicado tanto para novas plantas de tomate como para plantas invasoras.

A presença desses vírus foi confirmada por PCR específica na maioria das amostras, mas a detecção de um maior número de amostras com infecções mistas foi obtida pela análise de RCA-RFLP, indicando que essa técnica é mais sensível para revelar a presença daqueles vírus que estão menos adaptados à hospedeira e por isso apresentaram título viral insuficiente para a detecção por PCR.

6. LITERATURA CITADA

- BARBOSA, J. C., BARRETO, S. S., INOUE-NAGATA, A. K., REIS, M. S., FIRMINO, A. C., BERGAMIN, A. & REZENDE, J. A. M. 2009. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. *Journal of General Plant Pathology* 75, 440-443.
- BEDFORD, I. D., KELLY, A., BANKS, G. K., BRIDDON, R. W., CENIS, J. L. & MARKHAM, P. G. 1998. *Solanum nigrum*: An indigenous weed reservoir for a tomato yellow leaf curl geminivirus in southern Spain. *European Journal of Plant Pathology* March 104, 221-222.
- BROWN, J. K., FAUQUET, C. M., BRIDDON, R. W., ZERBINI, M., MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2012. *Geminiviridae*. In *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. Pages 351-373. Edited by A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens & E. J. Lefkowitz. London: Elsevier/Academic Press.
- COSTA, A. S. 1954. Identidade entre o mosaico comum do algodoeiro e a clorose indecciosa das malváceas. *Bragantia* 13, 23-27.
- COSTA, A. S. 1965. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. *Plant Prot Bull FAO* 13, 2-12.
- COSTA, C. L. 1998. Vetores de vírus de plantas - 1. Insetos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 6, 103-169.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 1, 13-15.
- FERNANDES, F. R., ALBUQUERQUE, L. C., OLIVEIRA, C. L., CRUZ, A. R. R., ROCHA, W. B., PEREIRA, T. G., NAITO, F. Y. B., DIAS, N. D. M., NAGATA, T., FARIA, J. C., ZERBINI, F. M., ARAGÃO, F. J. L. & INOUE-NAGATA, A. K. 2011. Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting *Euphorbia heterophylla* plants. *Archives of Virology* 156, 2063-2069.
- FERNANDES, F. R., DE ALBUQUERQUE, L. C. & INOUE-NAGATA, A. K. 2010. Development of a species-specific detection method for three Brazilian tomato begomoviruses. *Tropical Plant Pathology* 35, 43-47.
- FLORES, E., SILBERSCHMIDT, K. & KRAMER, M. 1960. Observações de "clorose infecciosa" das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico* 26, 65-69.
- FRANÇA, F. H., VILAS-BOAS, G. L. & CASTELO-BRANCO, M. 1996. Occurrence of *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (*Homoptera: Aleyrodidae*) in the Federal District. *An Soc Entomol Brasil* 25, 369-372.
- GARCIA-ANDRES, S., MONCI, F., NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. 2006. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology* 350, 433-442.
- HAIBLE, D., KOBER, S. & JESKE, H. 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods* 135, 9-16.
- HOU, Y.-M., PAPLOMATAS, E. J. & GILBERTSON, R. L. 1998. Host Adaptation and Replication Properties of Two Bipartite Geminiviruses and Their Pseudorecombinants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 208-217.
- JESKE, H., GOTTHARDT, D. & KOBER, S. 2010. In planta cloning of geminiviral DNA: The true *Sida micrantha* mosaic virus. *Journal of Virological Methods* 163, 301-308.
- JOVEL, J., RESKI, G., ROTHENSTEIN, D., RINGEL, M., FRISCHMUTH, T. & JESKE, H. 2004. *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. *Archives of Virology* 149, 829-841.
- LOURENÇÃO, A. L. & NAGAI, H. 1994. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. *Bragantia* 53, 53-59.
- MCGOVERN, R. J., POLSTON, J. E. & MULLAHEY, J. J. 1994. *Solanum viarum*: Weed reservoir of plant viruses in Florida. *International Journal of Pest Management* 40, 270-273.

- NAVAS-CASTILLO, J., FIALLO-OLIVE, E. & SANCHEZ-CAMPOS, S. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology* 49, 219-248.
- PAPROTKA, T., METZLER, V. & JESKE, H. 2010. The first DNA 1-like alpha satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. *Virology* 404, 148-157.
- RIBEIRO, S. G., AMBROZEVÍCIUS, L. P., DE AVILA, A. C., BEZERRA, I. C., CALEGARIO, R. F., FERNANDES, J. J., LIMA, M. F., MELLO, R. N., ROCHA, H. & ZERBINI, F. M. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting geminiviruses in Brazil. *Archives of Virology* 148, 281-295.
- ROJAS, M. R., GILBERTSON, R. L., RUSSELL, D. R. & MAXWELL, D. P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77, 340-347.
- THOMPSON, W. M. O. 2011. *The Whitefly, Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminivirus-Infected Host Plants: *Bemisia tabaci*, Host Plants and Geminiviruses: Springer.
- VINCZE, T., POSFAI, J. & ROBERTS, R. J. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* 31, 3688-3691.
- WYANT, P. S., GOTTHARDT, D., SCHAFFER, B., KRENZ, B. & JESKE, H. 2011. The genomes of four novel begomoviruses and a new *Sida micrantha* mosaic virus strain from Bolivian weeds. *Archives of Virology* 156, 347-352.

CONCLUSÕES GERAIS

As plantas invasoras podem afetar a cultura do tomate de diversas formas. Diretamente, competindo por espaço, nutriente e luz, e também de modo indireto, atuando como fonte de importantes patógenos e/ou pragas.

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que *Crotalaria* sp., *E. heterophylla* e *Sida* sp. também são hospedeiras de ToSRV, e que esse vírus foi preferencialmente transferido para plantas de tomate após testes de transmissão por biobalística e pelo vetor. Em contraste, EuYMV e SiMMV foram predominantes nas plantas invasoras inoculadas, indicando que esses vírus parecem estar mais adaptados à plantas invasoras, e ToSRV ao tomateiro.

Os testes de transmissão aliados a outras técnicas, como a análise por RCA/RFLP, revelaram a presença de infecção mista nas plantas investigadas, pois diferentes vírus foram observados nas plantas inoculadas a partir da mesma fonte de inóculo. No entanto, após o teste de transmissão por biobalística, apenas ToSRV foi observado em tomateiro, e EuYMV ou SiMMV nas plantas invasoras. Já na transmissão pelo vetor, infecções mistas de ToSRV com EuYMV e/ou SiMMV foram observadas, principalmente nas plantas de tomate. Isso demonstrou que o vetor foi mais eficiente e favoreceu a transmissão de mais de um isolado viral, confirmando a sua importância nas relações existentes entre begomovírus, plantas cultivadas e plantas invasoras.

No Brasil, uma medida legislativa determina um período de dois meses livre de tomate nas regiões produtoras. Nesse caso, plantas invasoras infectadas com ToSRV poderiam funcionar como fonte de inóculo primário na ausência do tomateiro, diminuindo a efetividade da medida. Conseqüentemente, a eliminação dessas plantas pode ser altamente favorável ao manejo das doenças causadas por begomovírus em tomateiro. Nesse estudo, foi demonstrada que as quatro espécies de plantas invasoras, de alta incidência em lavouras comerciais de tomateiro, podem atuar como fonte de

begomovírus de tomateiro. No entanto, aparentemente, a transmissão pelo vetor de vírus de planta daninha para planta daninha (sem a passagem por tomateiro) pode resultar na diminuição da população de isolados de ToSRV na planta, podendo este ser eventualmente eliminado da área. Esses resultados sugerem que a manutenção de uma época livre de tomateiro pode ter um alto impacto na diminuição de fonte de inóculo de ToSRV no campo, o que pode resultar na redução da incidência de begomovírus na próxima época de plantio de tomateiro.