

# Ocorrência e variabilidade genética do *Tomato severe rugose virus* em tomateiro e pimentão no Estado de São Paulo

Kelly Cristina Gonçalves Rocha<sup>1\*</sup>; Julio Massaharu Marubayashi<sup>1</sup>; Jesús Navas-Castillo<sup>2</sup>; Marcelo Agenor Pavan<sup>1</sup> e Renate Krause-Sakate<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Produção Vegetal, Setor Defesa Fitossanitária, UNESP, Faculdade de Ciências Agrônomicas, CEP 18603-970, Botucatu, SP;

<sup>2</sup> Estación Experimental "La Mayora", Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 29750 Algarrobo-Costa, Málaga, España.

\*Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor: Bolsista da CAPES.

Autor para correspondência: Kelly Cristina Gonçalves Rocha (kellygoncales@gmail.com)

Data de chegada: 05/06/2009. Aceito para publicação em: 29/07/2010.

1661

## RESUMO

Rocha, K.C.G.; Marubayashi, J.M.; Navas-Castillo, J.; Pavan, M.A.; Krause-Sakate, R. Ocorrência e variabilidade genética do *Tomato severe rugose virus* em tomateiro e pimentão no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.3, p.222-227, 2010.

Um levantamento para avaliar a ocorrência de begomovírus nas culturas de pimentão e tomateiro no estado de São Paulo foi realizado entre janeiro/2007 e julho/2008. O DNA total de amostras de pimentão (710) e de tomateiro (103) foi extraído e a presença de begomovírus foi testada por PCR. Paralelamente, as mesmas amostras foram avaliadas por amplificação por círculo rolante (RCA) seguidas de PCR, e algumas amostras positivas analisadas por RCA-RFLP com a enzima de restrição *HpaII*, a fim de se conhecer a variabilidade genética dos isolados. Os resultados demonstraram que, para a técnica de PCR, 99 amostras de pimentão (13,94%) e 39 de tomateiro (37,86%) foram positivas para a presença de begomovírus, enquanto

que por RCA-PCR, 333 (46,90%) de pimentão e 82 (79,61%) de tomateiro mostrando a maior sensibilidade desta técnica. Seqüências correspondentes à região 5' da capa protéica (CP) e um segmento de gene da região intergênica foram analisadas e indicaram apenas a presença da espécie *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). Porém, seqüenciamento parcial de clones obtidos a partir de produto RCA de tomateiro permitiu a detecção de infecção mista de ToSRV e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV). Por RCA-RFLP quatro padrões de restrição foram observados para o ToSRV em pimentão, enquanto que em tomateiro observaram-se 18 padrões. Os resultados indicam maior diversidade genética dos begomovírus em tomateiro quando comparada com os de pimentão.

**Palavras-chave adicionais:** *Geminiviridae*, *Bemisia tabaci*, levantamento, *Solanum* e *Capsicum*.

## ABSTRACT

Rocha, K.C.G.; Marubayashi, J.M.; Navas-Castillo, J.; Pavan, M.A.; Krause-Sakate, R. Occurrence and genetic variability of *Tomato severe rugose virus* in pepper and tomato plants in São Paulo State. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.2, p.222-227, 2010.

From January/2007 to July/2008 a survey was carried out to evaluate the occurrence of begomoviruses in pepper and tomato crops from São Paulo State. Total DNA was extracted from 710 pepper and 103 tomato samples, and the presence of begomoviruses was tested by Polymerase chain reaction (PCR). The same samples were tested by Rolling Circle Amplification (RCA) followed by PCR, and some positive samples analyzed by RCA-RFLP and cleaved by the restriction enzyme *HpaII* to evaluate the genetic variability of these isolates. By PCR, 99 (13.94%) samples collected from pepper and 39 (37.86%) from tomato were positives for the presence of begomovirus, while by RCA-PCR 333 (46.90%) and 82 (79.61%)

from pepper and tomato, respectively, indicating higher sensitivity of this technique. The 5' region of the coat protein (CP) gene and a segment of the intergenic region was analyzed indicating the presence of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) in pepper and tomato plants. However, the partial sequencing of clones from RCA products from a tomato sample indicated mixed infection of ToSRV with *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV). By RCA-RFLP four restriction profiles were observed for ToSRV in pepper, while 18 profiles for begomovirus from tomato plants, indicating higher degree of genetic variability for begomovirus found in tomato plants compared to that in pepper plants.

**Keywords:** *Geminiviridae*, *Bemisia tabaci*, Field Survey, *Solanum* and *Capsicum*

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.) são as hortaliças mais cultivadas no Brasil. No entanto, as doenças causadas por vírus têm preocupado produtores devido às perdas ocasionadas. Dentre estes destacam-se os begomovírus pertencentes à Família *Geminiviridae* (10).

A família *Geminiviridae* é constituída por quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* (26). Os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* são considerados os mais

importantes pelo número de espécies que infectam plantas cultivadas e invasoras (7, 10), constituindo-se atualmente num dos principais problemas fitossanitários de muitas culturas agrícolas em todo o mundo (20,25). Caracterizam-se por apresentar "partículas geminadas" com morfologia icosaédrica e genoma composto, na maioria das vezes, por duas moléculas de DNA circular de fitas simples, denominadas DNA-A e DNA-B, cada uma com aproximadamente 2.500 nucleotídeos. No entanto, alguns begomovírus originadas no Velho Mundo como o

*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e *Tomato leaf curl virus* (TLCV) têm apenas um componente genômico, o DNA A (26).

As espécies de vírus deste gênero são transmitidas pela mosca-branca, *Bemisia tabaci*, um inseto polífago e cosmopolita (2). No Brasil a incidência de begomovírus aumentou drasticamente após a introdução do biótipo B da *Bemisia tabaci* na década de 90 (21). Desde então, cinco espécies definitivas foram descritas em tomateiro: *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (6,13,23) além de seis espécies tentativas baseado em seqüências de genomas parciais (12). Em pimentão já foram detectadas as espécies ToSRV (3,22) e ToYVSV (21).

Algumas espécies de vírus relacionadas a plantas invasoras como *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (5,7) foram relatadas infectando naturalmente tomateiros. A presença de diversas espécies no campo, todas transmitidas por mosca branca, torna comum a ocorrência de infecções mistas, com dois ou mais vírus presentes na mesma planta (7). Com isso, há um alto grau de diversidade genética dos begomovírus encontrados no Brasil (1).

O presente trabalho teve como objetivos avaliar a ocorrência e a diversidade genética de begomovírus isolados de plantas de tomateiro e pimentão no Estado de São Paulo, utilizando-se PCR e amplificação do genoma viral por RCA (Rolling Circle Amplification), associado ao RFLP, que permite avaliar a variabilidade genética destes isolados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras vegetais

Amostras de tecidos foliares de plantas de pimentão foram coletadas nas principais regiões produtoras do estado de São Paulo, incluindo as áreas de cultivo protegido de Pirajú, Tejuapá, Santa Cruz do Rio Pardo, Sorocaba, São Miguel Arcanjo, Itapetininga, Pirajú, Iacanga, Salto, Avaí e Reginópolis e a campo aberto em Lins, Cafelândia e Sabino. Amostras de tomateiro foram coletadas apenas em cultivo protegido nas regiões de Lins, Sabino, São Miguel Arcanjo, São Pedro do Turvo, Piraju e Santa Cruz do Rio Pardo. Foram coletadas 813 amostras, sendo 710 de pimentão e 103 de tomateiro, durante o período de janeiro/2007 a julho/2008, sendo estas coletas trimestrais. O critério para a escolha e coleta das plantas nas áreas de cultivos foi a presença de sintomas de amarelamento e distorção foliar e relato de infestação de mosca-branca. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e etiquetadas por localidade e mantidas em refrigerador até a extração do DNA total.

### Análise do DNA viral

A extração de DNA genômico total foi realizada segundo o método descrito por Dellaporta (9). O DNA total extraído de cada amostra foi submetido à reação de "Polymerase Chain Reaction" (PCR) utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores "universais" PALIv1978/PAR1c496, que amplificam um fragmento com aproximadamente 1100 bp do DNA-A dos begomovírus correspondente à parte da ORF (Open Reading Frame) AC1 (Rep), à região comum e parte da ORF AV1 (CP) (24). Paralelamente, o DNA total de todas as amostras coletadas foi amplificado por círculo rolante (RCA) segundo método descrito por Inoue-Nagata (15) e Haible (14), por meio do kit Templi Phi (Amersham Biosciences). O método utiliza a DNA polimerase do bacteriófago ø29, que amplifica exponencialmente fita simples ou dupla de DNA circular. O produto de RCA foi utilizado na reação de PCR utilizando-

se os mesmos oligonucleotídeos.

Foram selecionadas 52 amostras de DNA total positivas para begomovírus, sendo 27 isolados de pimentão e 17 de tomateiro e re-amplificadas por PCR, com os pares de oligonucleotídeos V324/C889 (4). Oito amostras de DNA total positivas oriundas de plantas de pimentão apresentaram melhor re-amplificação com os oligonucleotídeos PALIv1978/PAR1c715 (24), e todas foram seqüenciadas. Ambos os oligonucleotídeos amplificam diferentes porções da região codificadora para a proteína capsial. As amostras resultantes do seqüenciamento foram comparadas entre si e com outras seqüências de begomovírus depositadas no GenBank utilizando-se os programas Blast n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e Clustal W (27). A análise filogenética foi realizada com o programa MEGA versão 4.0 (17), utilizando o método de "Neighbor-Joining", com valor de "bootstrap" 2000.

Para estimar a variabilidade genética, DNA amplificado por RCA a partir de DNA total extraído de 45 plantas de pimentão e 34 de tomateiro foram linearizados com a enzima de restrição *Hpa* II. O perfil eletroforético foi observado em gel de poliácridamida 10%, corado com brometo de etídeo, conforme descrito por Haible (14).

Para a análise do genoma viral completo, o DNA de begomovírus amplificado por RCA de pimentão, foi linearizado com *Bam*HI e *Bgl* II, respectivamente e ligado ao vetor plasmidial pBluescript II SK+ previamente clivado com a mesma enzima e eletroporado em células competentes de *Escherichia coli* (DH5a). O seqüenciamento foi realizado por "primer walking" pela MACROGEN, Inc. (Seoul, Coréia do Sul).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Ocorrência e diversidade

De um total de 710 e 103 amostras de pimentão e tomateiro, respectivamente, coletadas nas principais áreas de produção de hortaliças, foram detectadas 99 (13,94%) e 39 (37,86%) amostras positivas para begomovírus em análise por PCR, enquanto que, por RCA-PCR, observaram-se 333 (46,90%) e 82 (79,61%) amostras positivas em pimentão e tomateiro, respectivamente (Tabela 1). Esses resultados evidenciam maior sensibilidade na diagnose de begomovírus quando se associa a RCA com a PCR. A RCA baseia-se na amplificação por círculo rolante de amostras de DNA circulares e, como o componente genômico dos begomovírus é constituído por DNA de fita simples circular, este se torna substrato para a amplificação (14,15). Para begomovírus, a RCA também pode ser utilizada para diagnóstico sem posterior utilização da PCR linearizando-se o produto e observando-se o aparecimento de bandas do tamanho correspondente ao genoma completo dos begomovírus (14).

Os resultados demonstraram predominância da espécie ToSRV em todas regiões amostradas no Estado de São Paulo. A identidade de parte da região codificadora para a CP dos isolados de ToSRV provenientes de pimentão variou de 92 a 99% comparando-se com o isolado ToSRV (número de acesso DQ207749). Para os isolados de tomateiro, a identidade variou de 91 a 98% com o mesmo isolado de ToSRV. Essa variabilidade pode ser observada nas árvores filogenéticas (Figura 1 e 2).

Algumas espécies de begomovírus encontram-se amplamente distribuídas pelo Brasil, enquanto outras estão restritas a certas regiões. A predominância do ToSRV no Estado de São Paulo, tanto em pimentão como em tomateiro, já havia sido observada

**Tabela 1.** Porcentagem de begomovírus detectados utilizando-se a técnica de PCR e RCA, em amostras provenientes de plantas de pimentão e tomateiro, coletadas em diferentes municípios do Estado de São Paulo durante janeiro de 2007 a julho de 2008.

Municípios	Números de Amostras	Resultado positivo para (%)	
		PCR	RCA
<b>PIMENTÃO</b>			
Piraju	53	23	29
Óleo	3	0	0
Tejupá	120	23	77
Santa Cruz do Rio Pardo	74	21	39
Capão Bonito	20	0	4
Itapetininga	139	27	84
São Miguel Arcanjo	109	0	35
Avaí	14	1	8
Lins	42	0	5
Reginópolis	59	3	26
Cafelândia	18	0	10
Sabino	5	0	0
Pirajuí	16	0	11
Iacanga	11	0	2
Timburí	23	0	0
São Manuel	3	0	2
Salto	1	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>710</b>	<b>99</b> (13,94%)	<b>333</b> (46,90%)
<b>TOMATEIRO</b>			
Sabino	12	5	10
São Miguel Arcanjo	34	6	20
São Pedro do Turvo	11	8	11
Pirajú	14	0	9
Santa Cruz do Rio Pardo	18	14	18
Lins	14	6	14
<b>TOTAL</b>	<b>103</b>	<b>39</b> (37,86%)	<b>82</b> (79,61%)

por Nozaki (21) e por Fernandes (12), respectivamente. No Estado de São Paulo também foi verificado o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) em tomateiro (8). Já no Distrito Federal predomina o Tomato golden vein virus (TGVV) e o ToSRV, enquanto que no Nordeste predomina o Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV) (12).

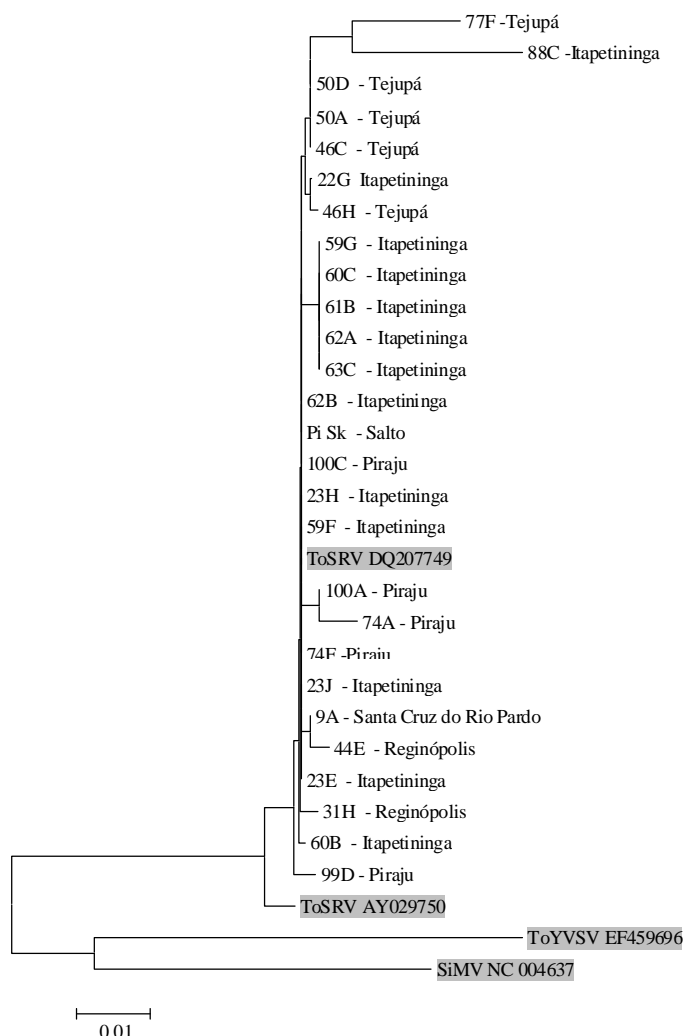
A prevalência de algumas espécies pode estar relacionada a uma melhor eficiência de transmissão pelo inseto vetor (7). A presença de dois ou mais begomovírus na mesma planta aumenta a probabilidade de eventos de recombinação e/ou pseudo-recombinação entre componentes do genoma viral, o que pode levar ao surgimento de novas espécies mais adaptadas ao novo hospedeiro (16,20).

#### Caracterização do genoma viral

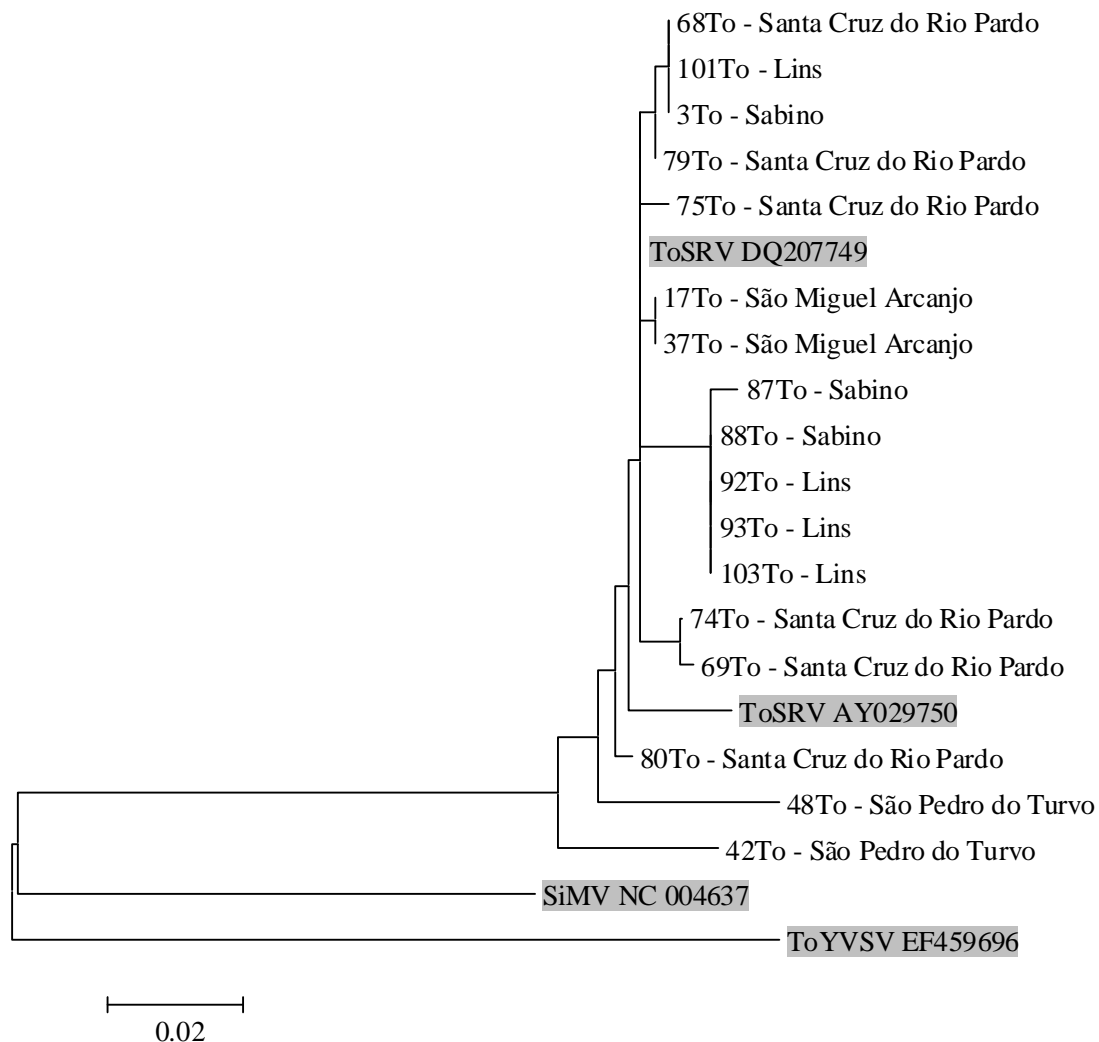
A seqüência completa do DNA-A e do DNA B foi determinada obtendo-se tamanhos de 2591 e 2569 nucleotídeos, respectivamente. Quando comparados a outros begomovírus, os clones 44E e 82A apresentaram maior identidade de seqüência, de

98%, com ToSRV-DNA A (número de acesso DQ 207749) de Petrolina de Goiás, proveniente de pimenta, e de 98% com ToRMV DNA B (número de acesso AF291706), isolado de tomate proveniente de Uberaba. Deste modo, foi comprovada a identidade viral seguindo os critérios taxonômicos atuais para o gênero *Begomovirus* (11,26).

Tanto o DNA-A como o DNA-B apresentaram todas as seqüências conservadas e a organização genômica semelhante a outros begomovírus bipartidos. O DNA-A codifica uma provável ORF no senso viral e quatro no senso complementar. Comparando-se a seqüência nucleotídica do DNA-A verificou-se 98% de identidade para as regiões que codificam CP (AV1) e AC4, e 99% para as regiões AC1 (Rep), AC2 (TrAP) e AC3 (REn) quando comparada ao ToSRV (DQ207749). O DNA B codifica duas ORFs (uma viral e uma complementar) com identidade de 98% para as ORF BV1 (NSP) e BC1 (MP) comparada ao ToRMV (AF291706) e de 97% para a região comum (RC) ou região intergênica entre ambos os componentes A e B.



**Figura 1.** Análise filogenética de begomovírus provenientes de pimentão do Estado de São Paulo e outros begomovírus do GenBank, baseado no alinhamento de nucleotídeos referente à parte da região codificadora para a proteína capsial. Valor de Bootstrap 2000, Programa Mega Versão 4.0. Seqüências de begomovírus utilizadas para comparação: ToSRV (DQ207749), ToSRV (AY029750), SiMV, (NC004637) e ToYVSV (EF459696).



**Figura 2.** Análise filogenética de begomovírus infectando tomateiro no Estado de São Paulo e outros begomovírus do GenBank, baseado no alinhamento de nucleotídeos referente à parte da região codificadora para a proteína capsidial. Valor de Bootstrap 2000, Programa Mega Versão 4.0. Sequências de begomovírus utilizadas para comparação: ToSRV (DQ207749), ToSRV (AY029750), SiMV, (NC004637) e ToYVSV (EF459696).

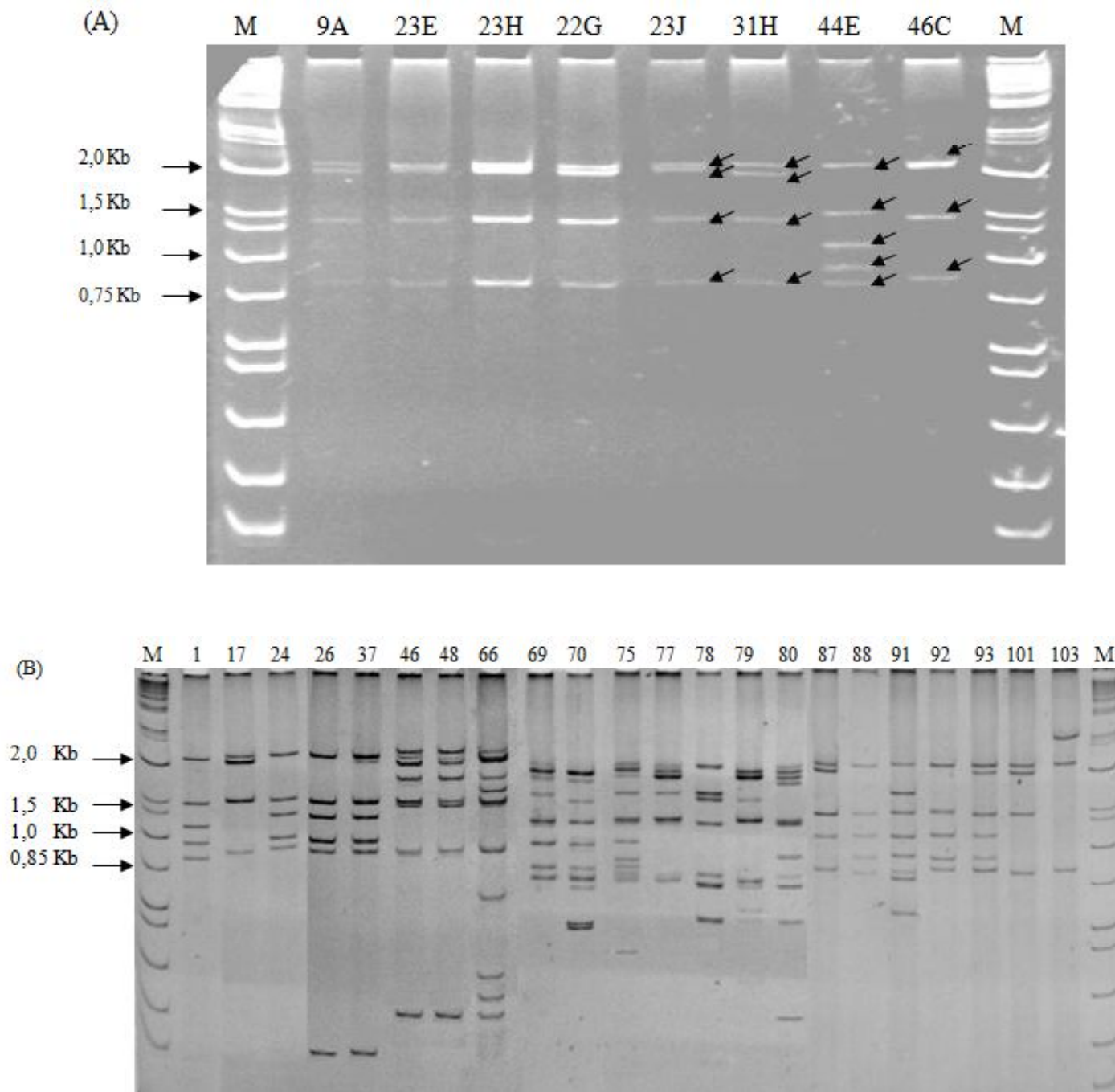
Pela análise por RCA-RFLP com a enzima *Hpa*II foram observados quatro padrões de clivagem para os isolados de ToSRV provenientes de pimentão, indicados pelas setas presentes na Figura 3A. Todos os isolados foram confirmados como ToSRV (Figura 1).

Para o ToSRV proveniente de tomateiro, foram observados 18 padrões de restrição (Figura 3B). Os padrões (24To, 37To, 46To, 48To, 69To, 75To, 79To, 87To, 88To, 92To, 93To, 101To e 103To – Figura 3B) tiveram porções do genoma viral seqüenciados tendo sido confirmada a espécie ToSRV. Dois padrões são possivelmente idênticos aos verificados ao ToSRV encontrado em pimentão: 17; 101 (igual ao 31H em pimentão) e 1; 92 igual ao 44E de pimentão). Este dado indica ocorrência de infecção pelos mesmos isolados de ToSRV em ambas as culturas. Seis padrões (66To, 70To, 77To, 78To, 80To e 91To – Figura 3B), positivos por PCR para begomovírus, não foram seqüenciados.

A amostra 46To apresentou a infecção mista por ToSRV e ToYVSV. A 48To apresentou padrão de restrição idêntico ao da

46To, além de ter sido coletada na mesma área, concluindo-se que esta possivelmente encontrava-se também com infecção mista por ambos vírus. Possivelmente outras infecções mistas não puderam ser detectadas pelo seqüenciamento direto do produto de PCR.

A técnica RCA pode ser utilizada eficientemente associada ao PCR no monitoramento de begomovírus, assim como na clonagem de genoma completo do vírus (15). Neste trabalho a espécie ToSRV foi a única encontrada infectando pimentão e baixa variabilidade genética foi observada nestes isolados. Diferentemente, em tomateiro foram identificadas as espécies ToSRV e ToYVSV, e alta variabilidade genética para os isolados de ToSRV. A maior preferência de mosca-branca biótipo B pelo tomateiro em relação a pimentão poderia explicar a maior diversidade dos isolados de ToSRV e a infecção mista nesta cultura, pois a dinâmica do adulto quanto à alimentação e conseqüente transmissão é possivelmente maior nesta hospedeira. Villas Bôas (28) já observou menor atratividade da mosca branca ao pimentão quando comparada ao tomateiro.



**Figura 3.** Produto de RCA digerido com *HpaII* e separado em gel de poliacrilamida a 10%, a partir de isolados de ToSRV coletados em plantas de pimentão em regiões produtoras do estado de São Paulo. M= 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen). Números indicam diferentes amostras (Cultivar/Município): (A) 9A (Eppo/Santa Cruz do Rio Pardo); 22G (Sandy/Itapetininga); 23E, H e J (Wando/Itapetininga); 31H (Margarita/Reginópolis); 44E (Margarita/Reginópolis) e 46C (Prador/Pirajú). As setas indicam a presença de bandas clivadas por *HpaII*, observando-se quatro padrões de restrição. (B) 1 (Carmen/Sabino); 17 (Santa Clara/São Miguel Arcanjo); 24 (Santa Clara/São Miguel Arcanjo); 26 (Santa Clara/São Miguel Arcanjo); 37 (Santa Clara/São Miguel Arcanjo); 46 (Cordilheira/São Pedro do Turvo); 48 (Cordilheira/São Pedro do Turvo); 66 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 69 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 70 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 75 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 77 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 78 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 79 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 80 (Colibri/Santa Cruz do Rio Pardo); 87 (Paron/Sabino); 88 (Paron/Sabino); 91-93 (Paron/Lins); 101 (Momotaro/Lins) e 103 (Momotaro/Lins).

Mesmo sendo restrita a região das coletas de amostras efetuadas neste trabalho, pode-se inferir a melhor adaptação da espécie ToSRV em tomateiro e pimentão no Estado de São Paulo, servindo como base para os programas de melhoramento genético nestas culturas.

#### AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos ao primeiro autor e ao Consejo Superior de Investigaciones Científicas-CSIC, Málaga, Espanha pelo auxílio financeiro

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Ambrozevicius, L.P.; Calegario, R.F.; Fontes, E.P.B.; Carvalho, M.G.; Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.4, p.372-377, 2002.
- Bedford, I.D.; Briddon, R.W.; Brown, J.K.; Rosell, R.C.; Markham, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. **Annals of Applied Biology**, Inglaterra, v.125, p.311-325, 1994.
- Bezerra-Agasie, I.C.; Ferreira, G.B.; Ávila, A.C.; Inoue-Nagata, A.K. First report of *Tomato severe rugose virus* in chili pepper in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v.90, n.1, p.114, 2006.
- Brown, J. K.; Idris, A. M.; Torres-Jerez, I.; Banks, G. K.; Wyatt, S. D. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. **Archives of Virology**, v.146, p.1581-1598, 2001.
- Calegario, R.F.; Andrade, E.C.; Ferreira, S.S.; Manhani, G.G.; Zerbini, F.M. Biological and molecular characterization of a tomato isolate of *Sida micranthe mosaic virus* (SimMV). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, supl., p.180, 2005. (Resumo)
- Calegario, R.F.; Andrade, E.C.; Ferreira, S.S.; Zerbini, F.M. Characterization of *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), a novel begomovirus infecting tomatoes in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.9, p.1335-1342, 2007.
- Castillo-Urquiza, G.P.; Evando, J. Beserra Jr, A.; Bruckner, F.P.; Lima, A.T.M.; Varsani, A.; Alfenas-Zerbini, P.; Zerbini, F.M. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, New York, v.153, n.10, p.1985-1989, 2008.
- Colariccio, A.; Eiras, M.; Chaves, A.L.R.; Bergmann, J.C.; Zerbini, F.M.; Harakava, R.; Chagas, C.M. Tomato yellow vein streak virus, a new begomovirus on tomato from Brazil: complete DNA-A sequence and some molecular and biological features. **Journal of Plant Pathology**, Oxford, v.89, n.3, p.385-390, 2007.
- Dellaporta, S.L.; Woods, J.; Hicks, J.B. A plant DNA miniprep, version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.1, n.1, p.19-21, 1983.
- Faria, J.C.; Bezerra, I.C.; Zerbini, F.M.; Ribeiro, S.G.; Lima, M.F. Situação atual das geminiviruses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n.2, p. 125-137, 2000.
- Fauquet, C.M.; Briddon, R.W.; Brown, J.K.; Moriones, E.; Stanley, J.; Zerbini, F.M.; Zhou, X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. **Archives of Virology**, New York, v.153, p.783-821, 2008.
- Fernandes, F.R.; Albuquerque, L.C.; Giordano, L.B.; Boiteux, L.S.; Ávila, A.C.; Inoue-Nagata, A.K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, NorWell, v.36, p.251-258, 2008.
- Fernandes, J.J.; Carvalho, M.G.; Andrade, E.C.; Brommonschenkel, S.H.; Fontes, E.P.B.; Zerbini, F.M. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato infecting begomovirus from Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v.55, p.513-522, 2006.
- Haible, D.; Kober, S.; Jeske, H., Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.135, p.9-16, 2006.
- Inoue-Nagata, A.K., Albuquerque, L.C., Rocha, W.B., Nagata, T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.116, p.209-211, 2004.
- Inoue-Nagata, A.K., Martin, D.P.; Boiteux, L.S.; Giordano, L.D.; Bezerra, I.C.; Ávila, A.C. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.8, p.1329-1332, 2006.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I.B.; Nei, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, London, n.5, p.150-163, 2004.
- Lima, A.T.M.; Silva, F.N.; Hallwass, M.; Alves Jr, M.; Rocha, C.S.; Inoue-Nagata, A.; Zerbini, F.M. Pseudorecombination between *Tomato rugose mosaic virus* and *Tomato severe rugose virus*: two distinct DNAs sharing the same DNA-B. **Virus Reviews & Research**, Caxambú, v.13, n.2, p.273, 2008. (Abstract)
- Lourenço, A.L.; Nagai, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v.53, n.1, p.53-59, 1994.
- Monci, F.; Sanchez-Campos, S.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. **Virology**, New York, v.303, p.317-326, 2002.
- Nozaki, D.N. **Estudos biológicos e moleculares de begomovírus infectando pimentão (*Capsicum annum*) no Estado de São Paulo**. 110f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Nozaki, D.N.; Krause-Sakate, R.; Hasegawa, J.M.; Cezar, M.A.; Dziuba, P.H.; Pavan, M.A. **First report of Tomato severe rugose virus infecting pepper plants in Brazil**. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.3, p.5040, 2006.
- Ribeiro, S.G.; Martin, D.P.; Lacorte, C.; Simões, I.C.; Orlandini, D.R.S.; Inoue-Nagata, A.K. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. **Phytopathology**, Saint Paul, v.97, n.6, p.702-711, 2007.
- Rojas, M.R.; Gilbertson, R.T.; Russel, D.R.; Maxwell, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, Saint Paul, v.77, n.4, p.340-347, 1993.
- Rojas, M.R.; Hagen, C.; Lucas, W.J.; Gilbertson, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.361-394, 2005.
- Stanley, J.; Bisaro, D.M.; Briddon, R.W.; Brown, J.K.; Fauquet, C.M.; Harrison, B.D.; Rybicki, E.P.; Stenger, D.C. *Geminiviridae*. In Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball L.A. (Ed.), **Virus taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier/Academic Press: London, 2005, pp.301-326.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.22, p.4673-4680, 1994.
- Villas Bôas, G.L.; França, F.H.; Macedo, N.; Moita, A.W. Avaliação de preferência de *Bemisia argentifolii* por diferentes espécies de plantas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.19, n.2, p.130-134, 2001.