

Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista

Marco Antonio de Andrade Cotrim^{1,3}, Renate Krause-Sakate¹, Nobuiooshi Narita¹, Francisco Murilo Zerbini², Marcelo Agenor Pavan¹

¹Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, CP 237, CEP 18603-970, Botucatu, SP; ²Departamento de Fitopatologia-BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36571-000, Viçosa, MG; ³Bolsista CAPES, parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, e-mail: reatekrause@fca.unesp.br.

Autor(a) para correspondência: Renate Krause Sakate

Data de chegada: 18/08/2005. Aceito para publicação em: 28/09/2006.

1240

RESUMO

Cotrim, A.A.; Krause-Sakate, R.; Narita, N.; Zerbini, F.M.; Pavan, M.A. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.3, p.300-303, 2007.

A diversidade genética de vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) foi analisada em regiões produtoras do Centro-Oeste paulista. No período de janeiro de 2003 a fevereiro de 2004, cento e sessenta e seis amostras de tomate foram coletadas e a presença de begomovírus observada em 60% das amostras, por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos universais para o gênero *Begomovirus*. O sequenciamento direto do produto de PCR de 16 dessas amostras indicou a possível presença do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV),

Sida mottle virus (SiMoV-[BR]) e da espécie tentativa Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV-[BR]). Em duas amostras foi detectada uma possível nova espécie de begomovírus. A presença do ToSRV e do SiMoV ainda não havia sido verificada em tomateiro no estado de São Paulo. Estes resultados indicam a existência de diversidade de espécies de begomovírus infectando o tomateiro nesta região, servindo como um alerta para melhoristas que trabalham na busca de fontes de resistência a esse importante grupo de patógenos.

Palavras-chave adicionais: geminivírus, variabilidade.

ABSTRACT

Cotrim, A.A.; Krause-Sakate, R.; Narita, N.; Zerbini, F.M.; Pavan, M.A. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato from São Paulo Middle-West. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.3, p.300-303, 2007.

The genetic variability of viruses belonging to the *Begomovirus* genus infecting tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill) on field areas from the mid-western region of São Paulo state was evaluated. From January 2003 to February 2004, one hundred and sixty-six tomato samples were collected and the presence of begomoviruses detected on 60% of the samples by PCR, using universal primers for the genus. Direct sequencing of PCR products of 16 selected samples indicated the possible presence of *Tomato severe rugose virus*

(ToSRV), *Sida mottle virus* (SiMoV-[BR]) and the tentative species Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV-[BR]). A possible new species of begomovirus was detected in two samples. The presence of ToSRV and SiMoV had not yet been reported in São Paulo state. These results indicate the existence of genetic diversity of begomovirus species infecting tomatoes in this area, and serve as an alert for breeders searching for resistance against this important group of pathogens.

Additional Keywords: geminivirus, variability

A cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) é de grande importância econômica para o Brasil, com uma área cultivada de mais de 61 mil hectares no ano de 2004 (7). Dentre as inúmeras doenças que afetam o tomateiro, aquelas causadas por begomovírus têm sido limitantes à produção comercial de tomate em diversas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo. Os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* da família *Geminiviridae* são caracterizados por apresentarem partículas icosaédricas geminadas, genoma de DNA circular fita simples e serem transmitidos por moscas-brancas do complexo *Bemisia tabaci* (11).

O aumento explosivo de doenças associadas aos begomovírus no estado de São Paulo foi verificado desde 1992 após a

introdução do biótipo B de *B. tabaci*. Este biótipo é altamente polífago e coloniza o tomateiro e outras solanáceas com alta eficiência, além de um grande número de espécies de plantas da vegetação espontânea (8). Rapidamente este biótipo foi verificado em diferentes regiões do Brasil, acarretando o virtual abandono da tomaticultura intensiva em regiões como o Sub-Médio São Francisco durante os anos de 1997 e 1998, então a principal produtora de tomate para processamento industrial no Brasil. A caracterização molecular dos begomovírus associados a essas epidemias demonstrou tratar-se de novas espécies, indicando que begomovírus nativos presentes em plantas silvestres estavam sendo transferidos para o tomateiro pelo inseto vetor (1,9).

Tabela 1. Porcentagem de identidade de nucleotídeos da porção N-terminal do gene *cp* das amostras analisadas em relação aos begomovírus: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV, número de acesso AY029750), *Sida mottle virus* - [Brasil] (SiMoV-[BR], AY090555) e dois diferentes isolados da espécie tentativa Tomato yellow vein streak virus – Brazil (ToYVSV-[BR], número de acesso U79998 e AY829113).

Amostras	1e	2b	19c	21	26a	28a	30a	31a	31b	49	51	73	74	86	90a	91c	2609	ToSRV	ToYVSV AY829113	ToYVSV U79998	SiMoV
1e	100	81	82	82	96	96	96	96	96	81	82	78	78	99	82	99	81	82	99	94	81
2b		100	99	99	83	83	83	83	83	80	99	83	83	82	98	82	97	97	82	83	81
19c			100	99	82	83	83	83	82	80	100	99	83	82	100	82	99	97	82	82	81
21				100	83	83	83	83	83	80	99	83	83	83	99	83	98	97	83	83	84
26a					100	98	98	98	100	81	82	79	79	97	82	97	81	83	97	95	81
28a						100	98	100	98	82	83	80	80	97	83	97	82	84	97	96	82
30a							100	100	100	82	83	80	80	97	83	97	82	84	97	96	82
31a								100	98	82	83	80	80	97	83	97	82	84	97	96	82
31b									100	81	82	79	79	97	82	97	81	83	97	95	81
49										100	80	84	84	81	80	81	80	80	81	82	94
51											100	83	83	82	100	82	99	97	82	82	81
73												100	100	79	100	82	99	97	82	82	81
74													100	79	83	79	83	96	81	82	81
86														100	83	79	83	85	79	81	87
90a															100	82	99	97	82	82	81
91c																100	81	82	100	95	81
2609																	100	96	81	82	81
ToSRV																		100	82	84	81
ToYVSVAY829113																			100	95	81
ToYVSVU79998																				100	81
SiMoV																					100

Até o presente, foram descritas no Brasil nove espécies de begomovírus em tomateiro. A espécie tentativa Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV-[BR]) (5) e o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV-[BR]) (3) já foram relatadas no Estado de São Paulo.

Possíveis novas espécies podem estar ocorrendo em outras regiões produtoras do estado ainda não analisadas, de modo que o objetivo deste trabalho foi verificar a existência de diversidade genética de espécies de begomovírus infectando o tomateiro em regiões produtoras do Centro-Oeste paulista. Para isto, foram coletadas folhas de 166 tomateiros para mesa entre janeiro de 2003 e fevereiro de 2004 nos municípios de Alvilândia, Campos Novos Paulista, Marília, Oriente, Ocaçu, Vera Cruz e Ubirajara. Todas as plantas apresentavam sintomas de amarelecimento internerval ou das nervuras. As amostras armazenadas a -80°C foram posteriormente submetidas à extração do ácido nucléico segundo Dellaporta et al. (4). A presença de begomovírus foi verificada por PCR utilizando-se inicialmente os oligonucleotídeos PAL1v1978/PAR1c496, universais para o gênero *Begomovirus* (10). A reação de PCR foi efetuada em volume de 25 ml, contendo tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 2,5 mM de MgCl₂, 0,25 μM de mistura de dNTPs, 1,0 mM de cada oligonucleotídeo, uma unidade de *Taq* DNA polimerase e 5 ml de DNA molde. Parte da região codificadora para a proteína capsial amplificada com os oligonucleotídeos PAL1v1978/PAV1c715 (10) de dezesseis das amostras positivas para begomovírus foi seqüenciada e comparada com o banco de genes internacional pelo programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/BLAST>) para posterior construção da árvore filogenética com o programa Mega (<http://www.megasoftware.net/>).

Do total de 166 amostras coletadas, a presença de begomovírus foi confirmada por PCR em 60% destas. Foi constatado que as amostras To-1e, To-26a, To-28a, To-30a, To-31a, To-31b, To-86 e To-91c encontravam-se possivelmente infectadas pelo ToYVSV; To-2b, To-19c, To-21, To-51 e To-

90a com o ToSRV; e To-49 com o SiMoV (Tabela 1). Destas amostras, To-21, To-49 e To-51 foram coletadas do híbrido Débora Max no município de Alvilândia; To-26a, cultivar Santa Clara em Campos Novos Paulista; To-90a, híbrido Débora Max em Marília; To-1e, híbrido Colibri e To-2b, híbrido Débora Plus em Oriente; To-28a, To-31a e To-31b, híbrido Débora Plus e To-30a, híbrido Colibri em Ocaçu; To-91c, híbrido Débora Max em Vera Cruz; To-19c e To-86, híbrido Débora Max e To-73 e To-74 (cv. não identificada) em Ubirajara.

A seqüência de nucleotídeos da porção 5' do gene que codifica a proteína capsial (*cp*) aqui analisada permite uma classificação provisória do isolado (2). Porém, em duas amostras (To-73 e To-74), a análise desta pequena porção do genoma não foi conclusiva, pelo fato da identidade ter sido inferior a 90% para todos os begomovírus analisados. Este resultado indica que possivelmente To-73 e To-74 podem estar infectados por uma nova espécie de begomovírus ainda não relatada infectando tomate, porém a confirmação real só poderia ser efetuada pelo seqüenciamento completo do componente A do genoma viral (6). O isolado 2609 foi identificado neste trabalho como sendo possivelmente da espécie ToSRV.

Os resultados aqui obtidos indicam que o ToSRV e o SiMoV-[BR], até então relatados em tomateiros apenas em Minas Gerais, hoje já se encontram presentes na mesma cultura no estado de São Paulo. Até então somente a espécie tentativa ToYVSV (5) e o ToRMV (3) haviam sido relatados neste estado. Essa observação sugere que as novas espécies de begomovírus detectadas em tomateiro no Brasil após a introdução do biótipo B de *B. tabaci*, e que inicialmente encontravam-se limitadas a certas regiões geográficas, estão sendo disseminadas paulatinamente para outras regiões. Embora o modo de disseminação não tenha sido determinado, esse fato ressalta a necessidade de identificação de fontes de resistência de amplo espectro para a incorporação de resistência a geminivírus em tomateiro no Brasil.

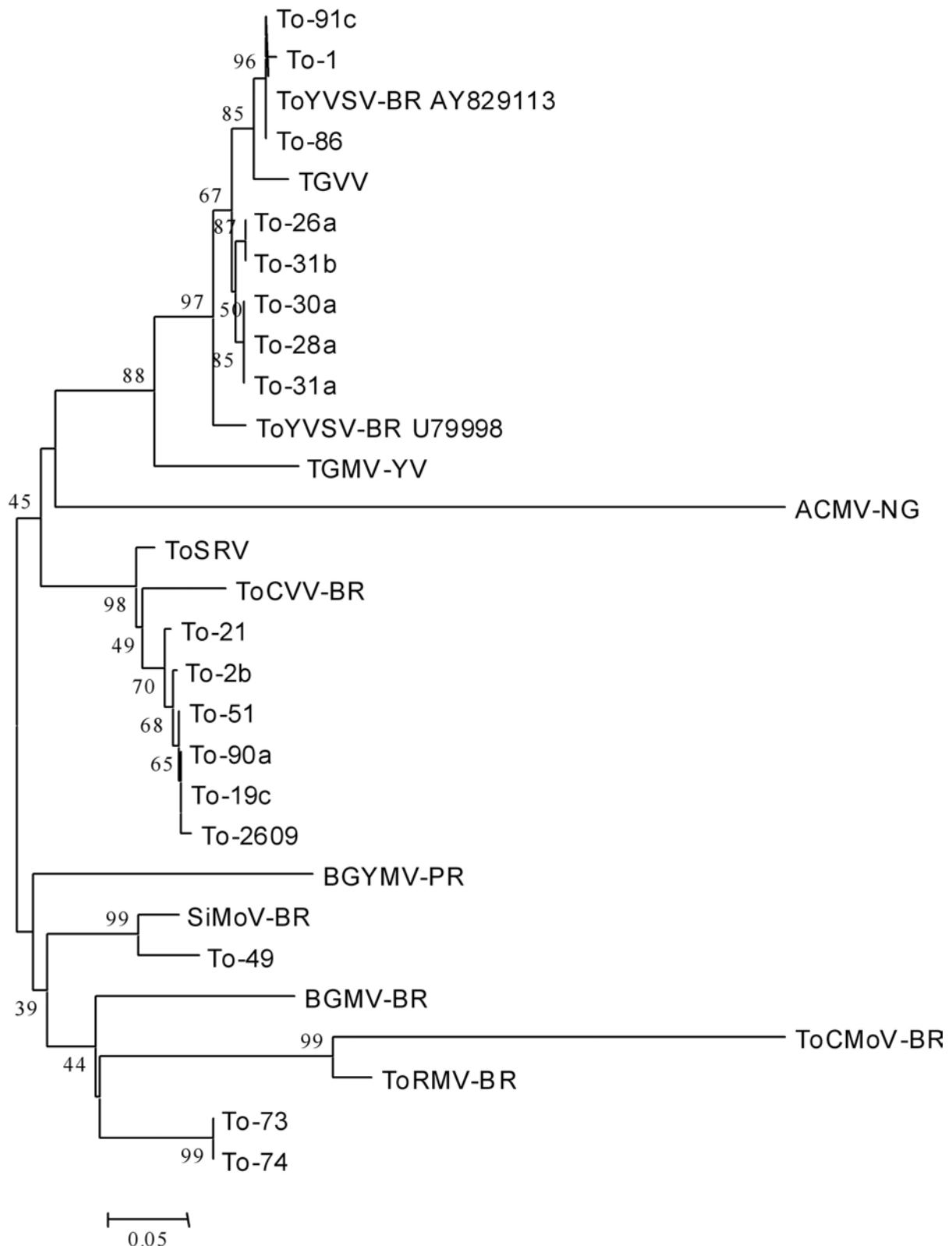


Figura 1. Árvore filogenética preparada com o uso do programa MEGA 3.1 dos nucleotídeos correspondentes a parte da região N-terminal do gene *cp* de begomovírus encontrados infectando tomateiro (*Sida mottle virus* - [Brazil] (SiMoV-[BR], [AY090555](#)), *Tomato chlorotic mottle virus* - [Brazil] (ToCMoV-[BR], [AY049206](#)), *Tomato chlorotic vein virus* - [Brazil] (ToCVV-[BR], [AY049205](#)), *Tomato golden mosaic virus*-Yellow vein (TGMV-YV, [K02029-30](#)), *Tomato golden vein virus* (TGVV, [AY751742](#)), *Tomato rugose mosaic virus*-[Uberlândia] (ToRMV-[Ube], [AF291705-6](#)), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV, número de acesso [AY029750](#)), *Tomato yellow vein streak virus* - Brazil (ToYVSV-[BR], número de acesso [U79998](#) e [AY829113](#)) ou outras culturas como o *African cassava mosaic virus* - [Nigeria] (ACMV-[NG], número de acesso [X17095-6](#)), *Bean golden mosaic virus*- Brazil (BGMV-[BR], [M88686](#)), *Bean golden yellow mosaic virus* - [Puerto Rico] (BGYMV-[PR], [M10070](#)). Valores de bootstrap 2000. Outgroup: ACMV-[NG]. Método Neighbor-Joining.

AGRADECIMENTOS

Rômulo Fujito Kobori (Sakata Seed Sudamérica) por fornecer o isolado 2609. Apoio Financeiro FUNDUNESP, Processo nº 00325/04-DPV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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**, Fortaleza, v.27, n.4, p. 372-377, 2002.
2. 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**, Wien, v.146, n. 8, p.1581-1598, 2001.
3. Colariccio, A.; Bergmann, J.C.; Eiras, M.; Chaves, A.L.R.; Zerbini, F.M.; Chagas, C.M. Presence of *Tomato rugose mosaic virus* on tomato crops in São Paulo State, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, No prelo.
4. Dellaporta, S. L.; Wood, J.; Hicks, J. B. A plant DNA miniprep: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Tucson, v.1, p.19-21, 1983.
5. Faria, J. C.; Souza-Dias, J. A. C.; Slack, S.; Maxwell, D. P. A new geminivirus associated with tomato in the State of Sao Paulo, Brazil. **Plant Disease**, St Paul, v.81, n. 4, p.423, 1997.
6. Fauquet, C.M.; Stanley, J. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: A review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. **Archives of Virology**, Wien, v. 150, n. 8, p. 2151-2179, 2005.
7. IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em dez. 2004.
8. Lourenção, A.L.; & Nagai, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v. 53, n. 1, p. 53-59, 1994.
9. Ribeiro, S.G.; Ambrozevicius, L.P.; Ávila, A.C.; Bezerra, I.C.; Calegario, R.F.; Fernandes, J.J.; Lima, M. F.; Mello, R.N.; Rocha, H.C.; Zerbini, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, Wien, v.148, n. 2, p.281-295, 2003.
10. Rojas, M. R.; Gilbertson, R. L.; Russell, D. R.; Maxwell, D. P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, St Paul, MN, v.77, n. 4, p.340-347, 1993.
11. 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.; Mmaniloff, J., Desselberger, U., Ball L.A. (9eds), **Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier/Academic Press, London, 2005, pp. 301-326.