

Marcadores Moleculares e Geminivírus

Identificação de marcadores moleculares em populações de tomateiro resistentes a geminivírus

Loiva Maria Karnopp, Dra.

Engenheira Agrônoma,

Doutora em Ciências Biológicas.

Laboratório de Genética Molecular - UFPE.

loivamaria@bol.com.br; loiva@pop.com.br

Ilustrações cedidas pela autora

Introdução

O processamento do tomate é um dos segmentos mais importantes da indústria agroalimentar brasileira e vem ganhando mais adeptos, já que a área plantada com tomate rasteiro cresceu bastante na década de 90. Dos 60 mil hectares de tomateiro cultivados, cerca de 40% são destinados à indústria. O valor global de mercado foi de US\$800 milhões na virada do milênio (Filgueira, 2000). As principais áreas de produção encontram-se nas Regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (Faria *et al.*, 2000). O tomate é a hortaliça com maior volume de comercialização no Brasil – 3 milhões de toneladas por ano (IBGE, 2000).

No início da década de 90, a agroindústria de tomate expandiu-se para novas regiões, especialmente no Cerrado, compreendendo áreas dos Estados de Goiás e de Minas Gerais. Em 2000, o Cerrado tornou-se a mais importante zona de produção de tomate industrial do país, com 77% da área plantada, seguido de São Paulo, com 14%, e da Região Nordeste, com apenas 9% (Melo, 2001). Naquele período, também houve um incremento extraordinário da produtividade, que, de cerca de 34,6 t/ha, em 1990, foi para 67 t/ha, na safra de 2000.

Um fator limitante no cultivo do tomateiro são as doenças viróticas, principalmente, devido à dificuldade de seu controle. No submédio São Francisco (PE e BA), os principais problemas estão relacionados com a estrutura produtiva, embora as condi-

ções agroecológicas locais sejam favoráveis à obtenção de matéria-prima de elevado padrão de qualidade e a custo mais baixo que nas demais áreas de produção do país, como São Paulo, Minas Gerais e Goiás. Nessa região, a produção de tomate para indústria está concentrada nas mãos de pequenos e médios produtores que, por utilizarem um sistema de manejo tecnologicamente ineficiente, obtêm uma produtividade muito baixa, em torno de 30 t/ha nas últimas safras; enquanto, no interior de São Paulo, esse índice é de 65 t/ha sob condições climáticas favoráveis.

A produção mundial de tomate para processamento industrial nos últimos dez anos oscilou entre 22,6 e 29,6 milhões de toneladas anuais. Entre os maiores produtores estão os Estados Unidos, a Itália, a Turquia, a Espanha, a Grécia e o Brasil (Silva & Giordano, 2000). A previsão de safra do tomate para consumo e para a indústria, para janeiro de 2003, foi de 3.567,080 toneladas, com um rendimento médio de 58.422 kg/ha e uma área plantada de 61.057 hectares (IBGE, 2003).

A família *Geminiviridae* possui alguns dos fitovírus de maior importância econômica no Brasil e no mundo. Juntamente com os *Tospovirus*, os *Geminivirus* são considerados vírus emergentes, pois a incidência e a severidade das doenças causadas por eles têm aumentado consideravelmente nas últimas décadas, o que parece estar mais relacionado com a explosão populacional de seus respectivos insetos vetores do que com o vírus propriamente dito.

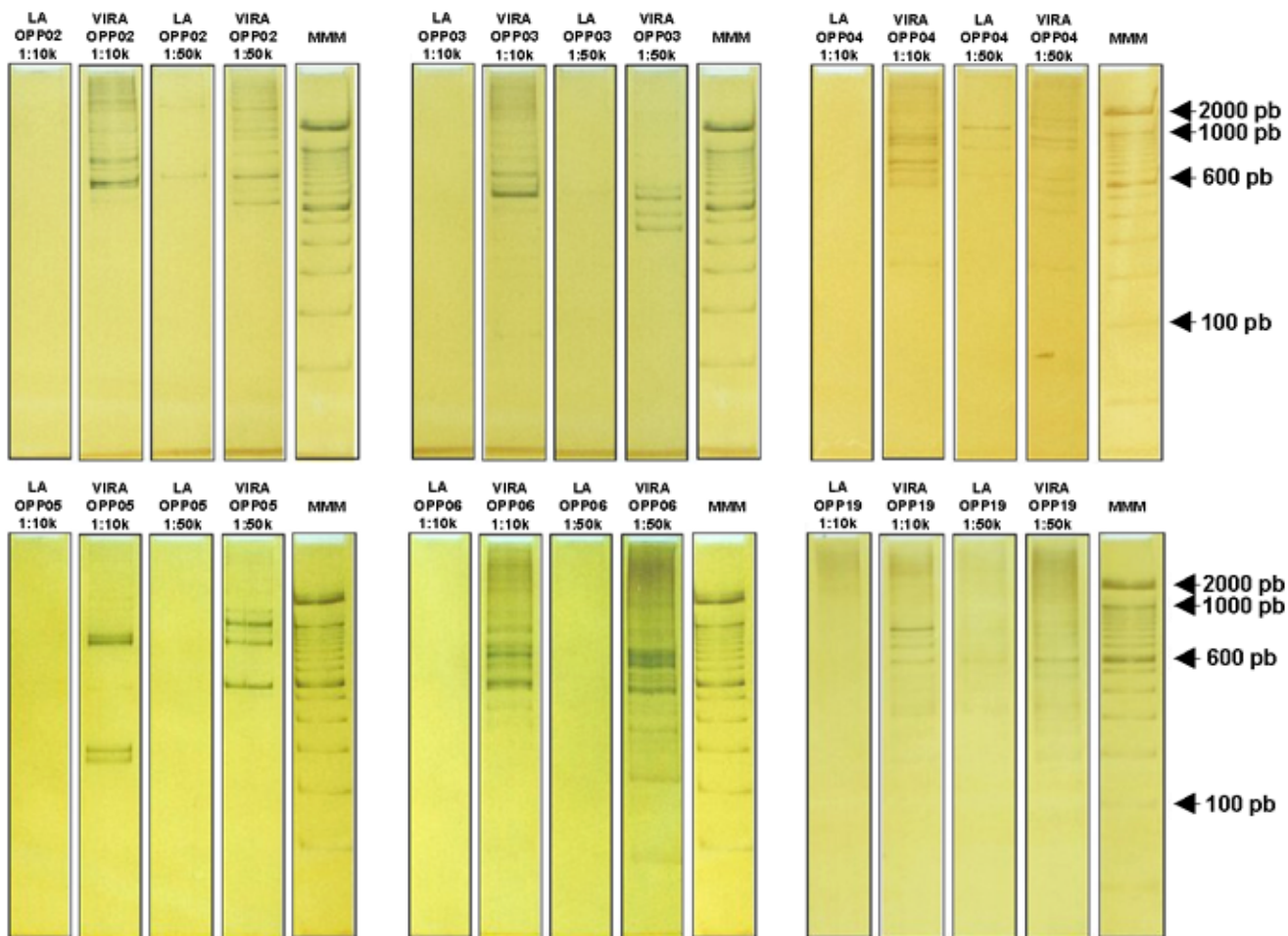


Fig. 1. Padrões de bandas de RAPD produzidos pelos primers OPP02, OPP03, OPP04, OPP05, OPP06 e OPP19. **LA:** linhagem LA3473, resistente a geminivírus, **VIRA:** cultivar Viradoro, suscetível a geminivírus, 1:10 e 1:50: diluições do DNA.

Os geminivírus, assim chamados por estar o seu DNA fita simples disposto em dois componentes circulares, são vírus transmitidos por moscas-brancas do complexo *Bemisia* spp. que infectam dicotiledôneas, e que têm causado severos danos em diversas culturas pelo mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Em muitas áreas, constituem-se o mais grave entrave para a produção de mandioca, feijão, pimenta, tomate e algodão. No Brasil, como em toda a América Latina, os geminivírus causam enormes prejuízos à produção de feijão, infectando-o com a doença conhecida como BGMV ou Mosaico Dourado do Feijoeiro (Hanson & Maxwell, 1999).

A sintomatologia não é parâmetro suficiente para identificar e diferenciar os geminivírus porque os sintomas dependem da época de infecção da planta, do hospedeiro (cultivar), de fatores ambientais, como altas temperaturas e pouca chuva, que

favorecem o aparecimento do vetor e da ocorrência de infecção viral múltipla. As técnicas moleculares têm permitido o desenvolvimento de métodos de detecção universal para toda uma família ou ordem, ou específicos para uma determinada espécie, de forma eficiente, rápida, acurada e de forma otimizada para vírus. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica específica e extremamente sensível e tem sido utilizada para a detecção e o estudo da variabilidade genética de geminivírus, tanto a partir de tecidos de plantas como de DNA extraído de insetos vetores (Mehta *et al.*, 1994, entre outros).

Os insetos do gênero *Bemisia* são polívoros, com, pelo menos, 506 espécies de plantas hospedeiras distribuídas em 74 famílias, entre monocotiledôneas e dicotiledôneas. Como hospedeiros preferenciais desse inseto, estão as brássicas (brócolis, couve-flor, repolho), as cucurbitáceas (abobrinha, melão, chuchu, melancia, pe-

pino), as leguminosas (feijão, feijão-de-vagem, soja), as solanáceas (berinjela, fumo, pimenta, tomate, pimentão), o algodão, a uva e algumas ornamentais, como o bico-de-papagaio (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) e o crisântemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). Tem sido também relatada a sua ocorrência em plantas daninhas, como, entre outras, o picão (*Bidens pilosa* L.), joá-de-capote (*Nicandra physaloides* (L.) Gaertn.), datura (*Datura stramonium* L.) guanxuma (*Sida rhombifolia* L.), pinhão manso (*Jatropha gossypifolia* L.) e *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. (França *et al.*, 2000).

No Nordeste do Brasil, notadamente no Estado do Piauí, o gênero *Bemisia* ocorre em vários hospedeiros. No entanto, é na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) que esse gênero tem maior importância, pois a espécie *B. tabaci* é citada como vetora do Mosaico Amarelo do Caupi (Santos, 1982).

Os danos causados por *B. argentifolii* podem ser de dois tipos: direto, pela sucção de seiva e ação toxicogênica, além de liberação de secreções açucaradas que favorecem o desenvolvimento da fumagina, e indireto, pela transmissão de vírus, geralmente, pertencentes ao grupo geminivírus. Com a introdução do estilete no tecido vegetal, os insetos (adultos e ninfas) provocam alterações no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da planta, debilitando-a e reduzindo, conseqüentemente, a produtividade e a qualidade dos frutos. Em altas densidades populacionais, as perdas podem chegar a 50% na produção. As manchas cloróticas nas folhas são causadas pela injeção de saliva das ninfas e adultos durante a sucção. Infestações muito intensas ocasionam murcha, queda de folhas e perda de frutos (França *et al.*, 2000).

Na cultura do tomate, os danos diretos causados pela mosca branca podem ser visualizados externamente através de anomalias ou desordens fitotóxicas caracterizadas pelo amadurecimento irregular dos frutos, causado pela injeção de toxinas durante a alimentação do inseto. Ao mesmo tempo, as excreções açucaradas produzidas pela mosca favorecem o desenvolvimento da fumagina sobre os frutos e folhas, reduzindo a capacidade fotossintética da planta, e afetando a qualidade e a produção dos frutos. A desuniformidade na maturação dos frutos dificulta o reconhecimento do ponto de colheita e reduz, no caso de tomate para indústria, a qualidade da polpa (Haji *et al.*, 1997).

De maneira geral, a ação dos vírus apresenta como sintomas característicos o amarelecimento total da planta, nanismo acentuado e severo enrugamento das folhas terminais das plantas, podendo ocasionar perda total da produção (Haji *et al.*, 1997). Quando o vírus infecta plantas ainda jovens, essas têm o crescimento paralisado e as perdas na produção podem variar de 40% a 70%. Para o tomate industrial, também são relatados sintomas como clorose, nanismo e encrespamento das folhas, pouca floração e amadurecimento irregular dos frutos, causado, provavelmente, por toxinas injetadas

pelo inseto, o que dificulta o reconhecimento do ponto de colheita desses frutos e reduz a produção e a qualidade da pasta, além de reduzir o grau brix. Internamente os frutos são esbranquiçados, com aspecto esponjoso ou "isoporizados" (França *et al.*, 2000).

Geminivírus no Brasil

O primeiro relato de geminivírus em tomateiro, no Brasil, é da década de 70 (Maytis *et al.*, 1975). Seis diferentes vírus transmitidos pela mosca-branca foram observados, sem, entretanto, causarem danos de importância econômica.

Em 1994, no Distrito Federal, foi observada a ocorrência de nova espécie de geminivírus não relatada em outras regiões do mundo (Ribeiro *et al.*, 1994). Em 1995, a virose expandiu-se por toda a Região Centro-Oeste, causando perdas médias de 40% a 100% (Bezerra *et al.*, 1996).

Nos últimos anos, foram observados em tomateiros, em várias regiões do Brasil, danos significativos causados por geminivírus associados à ocorrência de *B. argentifolii* (França *et al.*, 1996). Em Minas Gerais, Rezende *et al.* (1996) e Zerbini *et al.* (1996) observaram perdas superiores a 50% da produção no cinturão verde de Belo Horizonte e no Triângulo Mineiro. A clonagem e o seqüenciamento de fragmentos de DNA dos componentes A e B de geminivírus isolados dessas duas regiões indicaram tratar-se de dois geminivírus distintos (Ribeiro *et al.*, 1998b). Em São Paulo, um novo geminivírus em tomateiro foi descrito por Faria *et al.* (1997). O surgimento quase simultâneo de novos geminivírus que infectaram tomateiros na Região Sudeste sugere uma mudança nas populações da mosca-branca, com maior predominância de *B. argentifolii* sobre *B. tabaci*. Esse fato criaria condições para que vírus que infectam plantas selvagens invadam o tomateiro e, uma vez adaptados ao novo hospedeiro, dêem origem a um novo vírus através de recombinação ou reagrupamento de componentes. Ressalte-se que os geminivírus vêm sendo relatados em plantas daninhas amplamente disse-

minadas naquela região (Krause *et al.*, 1998, entre outros).

Na Região Nordeste, o primeiro relato de geminivírus foi em 1996, no município de Seabra, na Bahia. Sintomas de mosaico amarelo foram observados em uma plantação de tomateiro com incidência da doença em 100% da cultura. A análise de tecido de plantas sintomáticas revelou a presença de geminivírus com genoma bipartido (Ribeiro *et al.*, 1996). Naquelas áreas, 100% das plantas com menos de dois meses após o transplante apresentavam-se infectadas (Bezerra *et al.*, 1997). Semelhantemente ao relatado para outras regiões, o aparecimento de geminivíroses naquela área ocorreu após o surgimento e a explosão da população de *B. argentifolii* em 1995 e em 1996, em culturas de importância econômica para a região, como melão, melancia e tomate.

Em 1997, a doença foi relatada no submédio São Francisco, a maior região produtora de tomate para processamento industrial do Brasil (Bezerra *et al.*, 1997). Até o momento, a caracterização molecular de geminivírus coletados no submédio São Francisco mostra a presença de três novas espécies não relatadas em outras regiões do mundo. Foram encontradas infecções mistas em uma planta, sugerindo que a situação é mais complexa que a relatada até o momento em outras regiões (Ribeiro *et al.*, 1998a). De acordo com Faria *et al.*, 1997, ainda naquele ano foi detectada uma nova espécie de geminivírus, denominada risca amarela da nervura do tomateiro (*tomato yellow vein streak virus*, TYVSV). No Estado do Rio de Janeiro, foi também observada a presença de geminivírus em amostras coletadas no município de Campos.

No ano de 1998, foi detectada a presença de geminivíroses em material coletado no Ceará (Bezerra *et al.*, 1998). Considerando-se o alto grau de severidade de doenças causadas por esses vírus, a relativa inexistência de fontes naturais de resistência no Brasil, a ampla gama de hospedeiros (plantas daninhas, silvestres e plantas ornamentais) e a pouca informação referente às espécies encontradas no país, essa é, atualmente, a

principal doença de tomate nas regiões produtoras dessa hortaliça para processamento industrial.

Técnicas diagnósticas de fitovírus

Os vírus de plantas são conhecidos por sua extraordinária diversidade genética, tanto dentro da mesma espécie como entre espécies diferentes. Para o diagnóstico correto de uma doença viral, muitas vezes faz-se necessária a aplicação de dois ou mais métodos para o diagnóstico correto do vírus em estudo. A escolha deve ser função da sensibilidade, exatidão e reprodutibilidade do método, quantidade de amostras processadas em um determinado período de tempo, custo do material utilizado, sofisticação dos aparelhos e adaptabilidade às condições de tempo (Zambolim, 1999). Diversos métodos têm sido empregados para detectar geminivírus em tomate, incluindo técnicas sorológicas e PCR.

O RAPD

O RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") é uma técnica derivada da PCR. Uma das limitações da PCR é a necessidade do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência do DNA de interesse. Para que se conheçam essas seqüências, são necessários a clonagem e o seqüenciamento da região. Por isso, com exceção de alguns genes de seqüência conhecida, a PCR apresentou, inicialmente, uso limitado como técnica para a obtenção de marcadores moleculares. O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar *primers* mais curtos e de seqüência arbitrária na reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio da seqüência. Essa técnica foi desenvolvida, independentemente, por dois grupos nos Estados Unidos. Williams *et al.*, em 1990, patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, RAPD, ou seja, DNA polimórfico amplificado ao acaso.

Objetivo

Através da técnica de RAPD, é possível distinguir cultivares resistentes de cultivares suscetíveis a geminivíroses, gerando um padrão de bandas específico para cada grupo. Folhas jovens de plantas da linhagem LA3473 e da cultivar Viradoro foram submetidas à análise por RAPD na tentativa de encontrar marcadores que identificassem resistência ou suscetibilidade.

Material e métodos

Viradoro é uma cultivar destinada ao processamento industrial, resistente ao Viracabeça do tomateiro (Tospovírus), à mancha-de-estenfílio (*Stemphylium solani* Weber), à murcha-de-fusarium (*Fusarium oxysporum* (Schlecht.) f. sp. *Lycopersici* (Fol) (Sacc.) raça 1) e ao nematóide das galhas (*Meloidogyne spp.*), porém suscetível a geminivírus. Como características principais dessa cultivar podem ser citados: hábito de crescimento determinado, excelente cobertura dos frutos, sendo estes firmes e de formato quadrado-oblongo, maturação uniforme, com coloração externa vermelho-escuro brilhante. O brix varia de 4,4% a 4,7% e o peso médio dos frutos é de 70 a 80 gramas. Em condições experimentais, Viradoro tem alcançado a produtividade de 90 toneladas por hectare. Essa cultivar foi selecionada a partir de cinco ciclos de autofecundação desenvolvidos após o quarto retrocruzamento sucessivo para a cultivar IPA-5, tendo como progenitor não recorrente a linhagem TSW-10, com resistência a Tospovírus.

A linhagem LA3473, resistente a geminivírus, possui hábito de crescimento determinado médio, porte médio, frutos alongados de tamanho médio, produz aproximadamente 15 frutos por quilo e sua provável origem é Israel. Essa linhagem possui o gene *wilt*, cujos sintomas são muito semelhantes aos sintomas apresentados pelas plantas infectadas com geminivírus (Ednardo Ferraz, comunicação pessoal).

Semeadura do material

Sementes da linhagem LA3473 e da cultivar Viradoro foram semeadas em bandejas de isopor próprias para este fim e colocadas em casa de vegetação. A porcentagem de germinação foi geralmente superior a 85%. A coleta do material foi efetuada após emissão da terceira folha do tomateiro, em média, com 29 a 35 dias de idade, guardando-se em sacos plásticos individuais, etiquetados e armazenados em freezer a temperatura de 80°C negativos até o momento da extração do DNA.

Extração de DNA total

Para a extração de DNA total, utilizou-se o protocolo de Dellaporta *et al.* (1983), com modificações. Uma pequena amostra de tecido foliar jovem (dois discos foliares) foi macerada em nitrogênio líquido e colocada em um tubo eppendorf de 1,5 ml com 700 µl do tampão de extração (100 µM de EDTA, 2,5 M de NH₄Ac, 100 mM de tampão Tris, pH 8,0), sendo incubada em banho-maria a 65°C. Após o resfriamento, adicionaram-se-lhe 600µl de clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1) e a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 14.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para novos microtubos e 1/10 do volume de SDS 20% + NaCl 1,4M foi-lhe adicionado. Após a homogeneização da solução, repetiu-se a extração com 600 µl de clorofil. A fase aquosa foi transferida para novos microtubos. Adicionou-se 2/3 do volume da solução aquosa de isopropanol gelado (-20°C). A seguir, os microtubos foram centrifugados a 7.000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente. O pellet foi lavado duas vezes em 1 ml de etanol 70% e uma vez em etanol 95%. O etanol foi descartado e o precipitado ficou a temperatura ambiente para secar e, posteriormente, foi ressuspenso em 100 µl de tampão TE. Diversas diluições do DNA foram testadas, entre elas: 1:10; 1:50; 1:100; 1:200; 1:500 e 1:1000.

RAPD

Foram empregados 20 primers da série OPP (Operon Technologies Inc.) para a amplificação do material, cuja mistura básica continha: 10 ng de DNA/ml, 2.5 µl do tampão de PCR (Amersham Pharmacia) (10X); 1.7 µl de MgCl₂ (25 mM); 1.25 µl da solução de dNTPs (2mM cada); 2.5 µl do primer (4µM) e 0.4 µl de Taq polimerase (5 U/ml); água q.s.p. 25 µl. O material foi submetido às seguintes etapas de amplificação: um ciclo de desnaturação a 94°C por 3 min. seguido por 94°C por 15 seg., 42°C por 30 seg. e 72°C por 1 minuto. As três últimas etapas foram repetidas quarenta e três vezes. A amplificação foi concluída a 72°C por 7 minutos.

Visualização do produto de amplificação

Os amplicons foram separados em gel de poliacrilamida 6%. Os géis foram fixados e digitalizados diretamente em scanner de mesa ou fotografados sob transiluminação com luz branca e película em cores.

Estimativa da quantidade de DNA

A estimativa da quantidade de DNA foi efetuada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, utilizando-se um volume conhecido de solução de DNA (marcador de 100 pares de bases, Gibco) como padrão para inferir a concentração de DNA nas amostras.

Resultados e Discussão

A técnica do RAPD é muito utilizada para o estudo da diversidade genética, construção de mapas genéticos, identificação de marcadores ligados a resistência a bactérias, fungos, vírus, determinação da pureza e identificação de híbridos, entre outros (Weikert-Oliveira *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2002). A velocidade, eficiência e confiabilidade da metodologia RAPD em conjunto com a análise numérica, torna essa técnica particularmente apropriada na formulação de estratégias para um manejo efetivo de coleções de

germoplasma em termos de identificação de duplicatas, estimativa da diversidade, monitoramento da erosão genética e aumento do uso das coleções.

O método de extração usado para obter DNA a partir de discos foliares de tomateiros permitiu a obtenção de DNA com grau de pureza elevado, que pode ser empregado em reações de RAPD, sem inibição da Taq polimerase por componentes vegetais contaminantes. O rendimento do método permitiu obter uma quantidade bastante variável de DNA, tipicamente entre 2 e 20 µg de DNA, para cada 2 discos foliares.

Dos 20 primers constantes do kit OPP empregado, apenas 8 produziram produtos de amplificação com DNA de tomateiro. Ao se compararem os padrões de bandas obtidos pela separação em eletroforese em SDS poliacrilamida dos produtos de amplificação gerados no RAPD (Figura 1), 6 primers mostraram ser discriminativos, produzindo um padrão de bandas para a cultivar Viradoro muito distinto daquele obtido para a linhagem LA3473. Para todos esses primers, não foram obtidas bandas para a linhagem LA3473 quando se empregou 1 µl de DNA de tomate previamente diluído 10⁴ vezes em TE. Ao contrário, um padrão composto por, pelo menos, 3 bandas nítidas foi obtido para a cultivar Viradoro nessas condições. A redução da quantidade de DNA alvo na reação, pela diluição prévia do DNA extraído das plantas em 5 x 10⁴ vezes, resultou no aparecimento de uma a três bandas de pouca intensidade na amplificação do DNA obtido da linhagem LA3473 para 4 primers, conservando o padrão complexo de bandas para a outra cultivar, para os 6 primers selecionados.

Os padrões de bandas obtidos para a cultivar Viradoro não foram idênticos quando foram empregadas duas diluições distintas de DNA alvo: exceto para o primer OPP5, os padrões obtidos tendiam a apresentar bandas de peso molecular mais alto para a quantidade maior de DNA alvo. Fontes e concentrações de primers diferentes influenciam o padrão de bandas e certos primers produzem padrões de bandas mais confiáveis quando usados em concentrações mais altas do que o usual, provavelmente porque o DNA genômico

usado possui uma frequência muito rara de sítios de anelamento para esses primers, de modo que sua concentração efetiva para amplificação é diminuída no tubo da reação. Esse efeito também foi observado no mesmo laboratório quando se utilizou DNA de *Musa* com os mesmos primers. No presente trabalho, foi observado efeito semelhante no padrão de bandas, com diferentes concentrações de DNA genômico, como, por exemplo, para a cultivar Viradoro, à medida que havia um aumento da concentração de DNA genômico, bandas de maior peso molecular podiam ser visualizadas, com qualquer um dos cinco primers empregados, exceto o OPP5. A intensidade do marcador RAPD está associada ao grau de homologia entre o primer e a amostra ou à amplificação de outros fragmentos da amostra, o que pode explicar o aparecimento de bandas de menor intensidade no presente trabalho. O poder discriminatório dos primers aleatórios não depende somente do número de padrões gerados, mas também da frequência dos diferentes padrões.

Conclusão

Pode-se inferir deste trabalho que a metodologia utilizada mostrou-se satisfatória para a discriminação de plantas de tomate resistentes e suscetíveis a geminivírus, visto que foi obtido um padrão reproduzível de bandas para o material suscetível.

Apoio Financeiro:

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

Referências Bibliográficas

- Bezerra, I.C.; Lima, M.F.; Ribeiro, S.G.; Giordano, L.B.; Zerbini, F.M.; Ávila, A.C. (1997) **Occurrence of geminivirus in tomato producing areas in Submedial São Francisco**. Fitopatologia brasileira, v.22, p.331.
- Bezerra, I.C.; Ribeiro, S.G.; Ávila, A.C.; Giordano, L.B. (1996) **Survey of geminivirus infection in tomato producing areas in Federal**

- District.** Programa e Resumos, 8º Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, MG, p.289.
- Bezerra, I.C.; Lima, M.F.; Nunes, M.U.C.; Lopes, E.S.; Ávila, A.C. (1998) **New record of geminivirus occurring in Northeast region of Brazil.** Programa e Resumos, 9º Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, MG, p.143.
- Carvalho, G.A.; Sedyiyama, T.; Alzate-Marin, A.L.; Barros, E.G.; Moreira, M.A. (2002) **Identificação de marcadores RAPD ligados a um gene de resistência ao cancro da haste da soja.** Fitopatologia brasileira, v.27, p.474-478.
- Dellaporta, S.L.; Wood, J.; Hicks, J.B. (1983) **A plant DNA minipreparation: version II.** Plant Molecular Biology Reporter, v.1, p.19-21.
- Faria, J.C.; Bezerra, I.C.; Zerbini, F.M.; Ribeiro, S.G.; Lima, M.F. (2000) **Situação atual das geminiviroses no Brasil.** Fitopatologia brasileira, v.25, p.125-137.
- Faria, J.C.; Souza-Dias, J.A.C.; Slack, S.; Maxwell, D.P. (1997) **A new geminivirus associated with tomato in the state of São Paulo, Brazil.** Plant Disease, v.81, p.423.
- Filgueira, F.A.R. (2000) **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.** Viçosa: UFV, 402p., il.
- França, F.H.; Villas Boas, G.L.; Branco, M.C. (1996) **Ocorrência de Bemisia argentifolii Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal.** Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v.25, p.369-372.
- França, F.H.; Villas Boas, G.L.; Branco, M.C.; Medeiros, M.A. (2000) **Manejo integrado de pragas. In: Tomate para processamento industrial,** Brasília: EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia, EMBRAPA Hortaliças, 168p.; il.
- Haji, F.N.P.; Alencar, J.A.; Lima, M.F.; Mattos, M.A.A.; Honda, O.T.; Haji, A.T. (1997) **Avaliação de produtos para o controle da mosca branca (Bemisia spp.) na cultura do tomate (Lycopersicon esculentum Mill.)** Boletim Técnico EMBRAPA, n.84.
- Hanson, S.F.; Maxwell, D.P. (1999) **trans-dominant inhibition of geminiviral DNA replication by bean golden mosaic geminivirus rep gene mutants.** Phytopathology, v.89, p.480-486.
- IBGE. <http://www.ibge.net/home/estatistica/economia/pam/tabela1pam.shtm>.07/2000.
- IBGE. <http://www.ibge.gov.br> Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA). 14/03/2003.
- Krause, R.; Boari, A.J.; Ambrozevícius, L.P.; Maciel-Zambolim, E.; Zerbini, F.M. (1998) **Salvia splendens, natural host of a new geminivirus.** Fitopatologia brasileira, v.23, p.318.
- 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, v.1, p.267-275.
- Mehta, P.; Wyman, J.A.; Nakhla, M.K.; Maxwell, D.P. (1994) **Transmission of Tomato Yellow Leaf Curl geminivirus by Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae).** Journal of Economic Entomology, v.87, p.1291-1297.
- Melo, P.C.T. (2001) **A cadeia agro-industrial do tomate no Brasil: retrospectiva da década de 90 e cenários para o futuro.** Horticultura brasileira, v.19, suplemento.
- 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, Brazil.** Fitopatologia brasileira, v.21, p.424.
- 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.** Programa e Resumos, 8º Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, MG, p.290.
- Ribeiro, S.G.; Bezerra, I.C.; Rezende, R.O.; Lima, M.F.; Resende, L.V.; De Ávila, A.C. (1998a) **Three new geminiviruses in tomato in the state of Pernambuco.** Fitopatologia brasileira, v.23, suplemento.
- Ribeiro, S.G.; De Ávila, A.C.; Bezerra, I.C.; Fernandes, J.J.; Faria, J.C.; Lima, M.F. Gilbertson, R.L.; Maciel-Zambolim, E.; Zerbini, F.M. (1998b) **Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector.** Plant Disease, v.82, p.830.
- 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, Brazil.** Fitopatologia brasileira, 19 (suplemento), p. 330.
- Santos, A.A. dos. (1982) **Doenças do caupi (Vigna unguiculata (L.) Walp) no Estado do Piauí.** In: Reunião Nacional de pesquisa do Caupi. I., 1982, Goiânia. Resumos...Goiânia: EMBRAPA-CNPAF, p.99. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 4).
- Silva, J.B.C.da; Giordano, L.B. (2000) **Produção mundial e nacional.** In: Tomate para processamento industrial, Brasília: EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia, EMBRAPA Hortaliças, 168p.; il.
- Weikert-Oliveira, R.C.B.; Resende, M.A.; Valério, H.M.; Caligiorne, R.B.; Paiva, E. (2002) **Genetic variation among pathogens causing "Helminthosporium" diseases of rice, maize and wheat.** Fitopatologia brasileira, v.27, p.639-643.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. (1990) **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.** Nucleic Acids Research, v.18, p.6531-6535.
- Zambolim, E.M. (1999) **Métodos de diagnose em vírus.** Fitopatologia brasileira, v.24, suplemento, p.236-237.
- Zerbini, F.M.; Maciel-Zambolim, E.; Fernandes, J.J.; Gilbertson, R.L.; Carrijo, I.V. (1996) **Um novo geminivírus isolado de tomateiro (L. esculentum) em Minas Gerais.** Fitopatologia brasileira, v.21, p.430. 