



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IB
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**Efeito do número de indivíduos de *Bemisia tabaci* e idade de mudas de tomateiros na
infecção pelo begomovírus *Tomato severe rugose virus***

CRISTIANO DA SILVA RODRIGUES

Brasília – DF

2017

CRISTIANO DA SILVA RODRIGUES

**EFEITO DO NÚMERO DE INDIVÍDUOS DE *BEMISIA TABACI* E IDADE DE
MUDAS DE TOMATEIROS NA INFECÇÃO PELO BEGOMOVÍRUS *TOMATO
SEVERE RUGOSE VIRUS***

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós Graduação em Fitopatologia.

Orientadora

Dra. Alice Kazuko Inoue-Nagata

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL –DF
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

Rodrigues, Cristiano da Silva.

Efeito do número de indivíduos de *Bemisia tabaci* e idade de mudas de tomateiros na infecção pelo begomovírus *Tomato severe rugose virus* / Cristiano da Silva Rodrigues
Brasília, 2017.

p. 110 : il

Dissertação de mestrado. Programa de Pós graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. Pressão de inóculo de ToSRV – idade de mudas de tomateiro

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Efeito do número de indivíduos de *Bemisia tabaci* e idade de mudas de tomateiros na infecção pelo begomovírus *Tomato severe rugose virus*.

Aos meus avós maternos José Domingues da Silva (Seu Zé) e Maria Barbosa da Silva (Dona Roxa) *in memoriam* dedico este trabalho por incentivarem-me sempre a prosseguir com fé e perseverança.

Dedicatória

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por todas as graças concedidas até aqui e as que virão.

Agradeço a minha orientadora, Alice Kazuko Inoue-Nagata, pela oportunidade de desenvolver um trabalho que gosto e por ter me acolhido com muito carinho. Obrigado por compartilhar ensinamentos valiosos e pela motivação e otimismo constantes. Agradeço muito a atenção, paciência, apoio, incentivo e confiança. Sua dedicação e competência me inspiram!

Muito obrigado ao analista do laboratório de Virologia Vegetal da Embrapa-CNPq Erich Yukio Tempel Nakasu, e ao técnico do laboratório Lúcio Flávio Barbosa, pela paciência, ensinamentos e por esclarecer minhas dúvidas. Sempre muito prestativos!

Muito obrigado à equipe do laboratório, Tadeu, Thaís, Pedro, Thiago, Moana, Vivian, Mônica e Camila, por todas as contribuições, amizade e ótimo convívio. A ajuda de vocês foi essencial na realização deste trabalho!

A todos os meus familiares, em especial a minha irmã Crismara, minha madrinha Evande e Tia Quira, pelo imenso amor e carinho.

Agradeço aos meus pais, Ana Maria e Manoel Antonio, por tudo que já fizeram por mim. Muito obrigado pelo amor, dedicação, confiança e incentivo. Aos senhores, devo tudo o que sou hoje!

A todos os meus amigos, por compartilharem ótimos momentos e torcerem pelo meu sucesso. Em especial a Bruno e Diogo, Charles, Yulle, Éden Felipe, Fabriciano e João Bruno. E a Geysa e Jônatas *in memoriam* pela ajuda e apoio. A todos, os citados e não citados, muito Obrigado por tudo!

As amigas Bianca, Camila, Carina, Daiane, Débora, Joseane e Mariana sempre muito afetuosas. Obrigada pela amizade sincera e apoio constante.

A todos os colegas do Departamento de Fitopatologia da UnB, em especial ao João Gilberto pela amizade recente e sincera e aos alunos da turma do primeiro semestre de 2015 pelos bons e difíceis momentos que compartilhamos.

Aos meus colegas de moradia, Hans e Luduvico, pelo bom convívio e as boas risadas.

Muito obrigado a todos os funcionários e professores do Departamento de Pós-Graduação em Fitopatologia, por dividirem experiências e conhecimentos tão preciosos.

Agradeço aos membros da banca examinadora, Cláudio Lúcio Costa, Adalberto Corrêa Café Filho e Renato de Oliveira Resende, por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

Ao Departamento de Pós-Graduação em Fitopatologia da UnB, pela oportunidade de realizar o Mestrado e o importante acolhimento.

À Embrapa-CNPq, pelo excelente espaço e infraestrutura disponibilizados.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Trabalho realizado junto ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da professora **Dra. Alice Kazuko Inoue-Nagata**, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (Embrapa-CNPH) e Universidade de Brasília (UnB).

EFEITO DO NÚMERO DE INDIVÍDUOS DE *BEMISIA TABACI* E IDADE DE MUDAS DE TOMATEIROS NA INFECÇÃO PELO BEGOMOVÍRUS *TOMATO SEVERE RUGOSE VIRUS*.

CRISTIANO DA SILVA RODRIGUES

DISSERTAÇÃO APROVADA em 20/02/2017 por:

Dr. Cláudio Lúcio Costa

Universidade de Brasília (Examinador Externo)

Dr. Adalberto Corrêa Café Filho

Universidade de Brasília (Examinador Interno)

Dra. Alice Kazuko Inoue-Nagata

Embrapa-CNPH (Presidente - Orientadora)

**BRASÍLIA - DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2017**

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMO GERAL	VII
GENERAL ABSTRACT	IX
INTRODUÇÃO GERAL	11
OBJETIVO GERAL	14
Objetivos específicos	14
CAPÍTULO 1	15
1.1 A cultura do tomateiro	16
1.2 A família Geminiviridae	20
1.3 O gênero Begomovirus	22
1.4 Transmissão dos begomovírus	25
1.5 Epidemiologia de begomoviroses	29
CAPÍTULO 2	34
RESUMO	35
ABSTRACT	36
2.1 Introdução	37
2.2 Material e Métodos	39
2.2.1 Isolado de <i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV)	39
2.2.2 Criação de moscas-brancas (<i>B. tabaci</i>) biótipo B	39
2.2.3 Manutenção do clone 1164-TosRV em plantas fontes	39
2.2.4 Extração de DNA total e confirmação da presença de ToSRV por PCR	40
2.2.5 Produção de mudas de tomateiro para condução dos ensaios	41
2.2.6 Aquisição e inoculação do isolado viral de ToSRV	42
2.2.7 Validação da escala de notas dos sintomas de infecção por ToSRV em tomateiro	43
2.2.8 Efeito da quantidade de inóculo inicial do ToSRV em função de diferentes quantidades de <i>Bemisia tabaci</i> virulíferas sobre plantas de tomateiro	44
2.2.9 Análise estatística	45
2.3 Resultados	45
2.3.1 Validação da escala de notas dos sintomas de ToSRV em tomateiro	45
2.3.2 Influência da quantidade de inóculo de ToSRV por moscas-brancas na incidência da virose	49

2.3.3	Influência da quantidade de inóculo inicial de ToSRV na severidade da virose	55
2.4	Discussão	63
2.5	Conclusões do capítulo	69
CAPÍTULO 3.		70
RESUMO		71
ABSTRACT		72
3.1	Introdução	73
3.2	Material e Métodos	77
3.2.1	Isolado de <i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV)	77
3.2.2	Criação de <i>Bemisia tabaci</i> biótipo B	77
3.2.3	Manutenção do isolado viral em plantas fontes	77
3.2.4	Aquisição e inoculação do isolado viral para condução dos ensaios	78
3.2.5	Efeito de diferentes idades de mudas de tomateiro sobre a taxa de infecção por ToSRV inoculado com moscas-brancas	79
3.3	Resultados	81
3.3.1	Efeito da idade de mudas de tomateiro sobre a incidência de ToSRV em cultivar suscetível Heinz-9553	81
3.3.2	Efeito da idade de mudas sobre a severidade de sintomas causados por ToSRV em cultivar suscetível Heinz-9553	84
3.3.3	Análise da altura e peso fresco das plantas com diferentes idades de mudas inoculadas com ToSRV em cultivar suscetível Heinz-9553	86
3.4	Discussão	90
3.5	Conclusões do capítulo	97
CONCLUSÕES GERAIS		98
LITERATURA CITADA		99

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2: Influência da quantidade inicial de inóculo de *Tomato severe rugose virus* em inoculação por moscas-brancas na taxa de infecção e severidade de sintomas

- Tabela 1.** Porcentagem de plantas de tomateiro infectadas com *Tomato severe rugose vírus* (ToSRV) em cultivar suscetível (S) e resistente (R) submetidas a diferentes pressões de inóculos em quatro repetições do ensaio no tempo. ----- 53
- Tabela 2.** Notas de severidade de sintomas em plantas de tomateiro infectadas com *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em cultivar suscetível (S) e resistente (R) submetidas a diferentes pressões de inóculos em quatro repetições do ensaio no tempo aos 30 dias após a inoculação. ----- 56

Capítulo 3: Influência da idade de mudas de tomateiro na susceptibilidade à infecção por *Tomato severe rugose virus*

- Tabela 1.** Épocas de plantios dos tomateiros realizados pelo Viveiro Vivati para realização do ensaio com diferentes idades de mudas -----**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 2.** Porcentagem de plantas de tomateiro (Heinz-9553) infectadas com *Tomato severe rugose vírus* (ToSRV) inoculadas por moscas-brancas avirulíferas (MBA) e virulíferas (MBV) em diferentes idades de mudas em três repetições do ensaio no tempo aos 30 dias após a inoculação. ----- 82
- Tabela 3.** Notas de severidade de sintomas em plantas de tomateiro (Heinz-9553) infectadas com *Tomato severe rugose vírus* (ToSRV) com diferentes idades de mudas na inoculação por moscas-brancas avirulíferas (MBA) e virulíferas (MBV) em três repetições do ensaio no tempo aos 30 dias após a inoculação. ----- 84
- Tabela 4.** Peso fresco em gramas das plantas de tomateiro (Heinz-9553) infectadas com *Tomato severe rugose vírus* (ToSRV) com diferentes idades de mudas na inoculação por moscas-brancas avirulíferas (MBA) e virulíferas (MBV) em duas repetições do ensaio no tempo 30 dias após a inoculação. ----- 88
- Tabela 5.** Altura em centímetros das plantas de tomateiro (Heinz-9553) infectadas com *Tomato severe rugose vírus* (ToSRV) com diferentes idades de mudas na inoculação por moscas-brancas avirulíferas (MBA) e virulíferas (MBV) em duas repetições do ensaio no tempo 30 dias após a inoculação. ----- 89

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2: Influência da quantidade inicial de inóculo de *Tomato severe rugose virus* em inoculação por moscas-brancas na taxa de infecção e severidade de sintomas

- Figura 1.** Modelo esquemático dos procedimentos realizados para realização das etapas de acesso a aquisição e inoculação do vírus ToSRV em cultivar suscetível (Heinz-9553) e resistente (BRS Sena). Inicialmente folíolos de “plantas fontes” de ToSRV foram fixados em meio ágar-água solidificado em tubos de polietileno de 50 mL e adicionada moscas-brancas para a aquisição viral (A); as moscas-brancas foram coletas com auxílio de um sugador com pressão negativa de vento (B); após o período de aquisição, as moscas-brancas foram coletadas com sugador manual em número exato para cada tratamento (C) e transferidas para as plantas protegidas com copos plásticos em seus respectivos tratamentos, (D); após essa transferência as moscas-brancas foram deixadas pelo período de inoculação de 48 horas.----- 43
- Figura 2.** Representação visual das notas de severidade da infecção por ToSRV em tomateiro suscetível (Heinz-9553). Nota 1 (A): sintoma inicial nas plantas infectadas por ToSRV, caracterizado pelo clareamento das nervuras folheares em alguns folíolos das folhas mais velhas, seguido por clorose internerval suave em alguns folíolos, normalmente na mesma folha com sintoma inicial; Nota 2 (B): aparecimento de clorose internerval suave em folíolos de outras folhas e maior intensidade da clorose em folhas já sintomáticas, acompanhado de início de enrugamento foliar, aparecimento de manchas cloróticas e deformação foliar. Nota 3 (C): sintomas característicos da virose espalhados por todas as folhas das plantas, do ápice a base, sendo observado maior intensidade de clorose nas folhas intermediárias, acompanhada de rugosidade e deformação foliar principalmente nas folhas mais jovens.-----44
- Figura 3.** Sintomas característicos da escala de notas desenvolvida para avaliação das plantas de tomate infectadas com ToSRV nos ensaios desenvolvidos durante a realização dos trabalhos de efeito da pressão de inóculo e das idades de mudas na inoculação sobre a infecção por ToSRV. A-C: plantas em que foi atribuída nota 1, D-F: notas 2; e G-I: nota 3.----- 47
- Figura 4.** Alguns sintomas atípicos observados nas plantas inoculadas com ToSRV durante o desenvolvimento dos ensaios (A-D) e em cultivar resistente BRS Sena (E-F).----- 48
- Figura 5.** Índice de incidência de ToSRV em cultivar suscetível (a) e resistente (b) na repetição 1 com diferentes pressões de inóculo.----- 49
- Figura 6.** Índice de incidência de ToSRV em cultivar suscetível (a) e resistente (b) na repetição 2 com diferentes pressões de inóculo.----- 50
- Figura 7.** Índice de incidência de ToSRV em cultivar suscetível (a) e resistente (b) na repetição 3 com diferentes pressões de inóculo.----- 51

- Figura 8.** Índice de incidência de ToSRV em cultivar suscetível (a) e resistente (b) na repetição 4 com diferentes pressões de inóculo.----- 52
- Figura 9.** Índice de severidade de ToSRV em cultivar suscetível (a) e resistente (b) na repetição 1 do ensaio com diferentes pressões de inóculo.----- 58
- Figura 10.** Índice de severidade de ToSRV em cultivar suscetível (a) e resistente (b) na repetição 2 do ensaio com diferentes pressões de inóculo.----- 59
- Figura 11.** Índice de severidade de ToSRV em cultivar suscetível (a) e resistente (b) na repetição 3 do ensaio com diferentes pressões de inóculo.----- 60
- Figura 12.** Índice de severidade de ToSRV em cultivar suscetível (a) e resistente (b) na repetição 4 do ensaio com diferentes pressões de inóculo.----- 61

Capítulo 3: Influência da idade de mudas de tomateiro na susceptibilidade à infecção por *Tomato severe rugose virus*

- Figura 1.** (A) Mini-bandejas utilizadas para disposição das mudas com diferentes idades na inoculação pelas moscas-brancas em gaiolas confeccionadas com organza (B-C) e posteriormente transplantadas e distribuídas aleatoriamente em compartimentos (D-E) preparados com tecido organza para cada bloco.----- 79
- Figura 2.** Porcentagem de plantas com sintomas de infecção por ToSRV em tomateiros da cultivar Heinz-9553 com diferentes idades de inoculação em três distintas épocas de realização do ensaio (inoculação em: 18/04/2016 – A, 22/09/2016 – B, 02/11/2016 – C).----- 83
- Figura 3.** Média do índice de severidade de sintomas pela infecção de ToSRV em tomateiros da cultivar Heinz-9553 com diferentes idades de inoculação em três distintas épocas de realização do ensaio (inoculação em: 18/04/2016 – A, 22/09/2016 – B, 02/11/2016 – C).----- 85
- Figura 4.** Valores médios do peso fresco das plantas de tomateiro Heinz-9553 com diferentes idades de inoculação com ToSRV, medido após 30 DAI em duas épocas de realização do ensaio (inoculação em: 22/09/2016 – A, 02/11/2016 – B). Os códigos distinguem os diferentes tratamentos com ou sem inoculação do vírus, sendo MBA as plantas confinadas com moscas-brancas avirulíferas, MBV as plantas inoculadas com moscas-brancas virulíferas e SMB as plantas que não tiveram contato com moscas-brancas durante o período de acesso de inoculação. 86
- Figura 5.** Valores médios da altura das plantas de tomateiro Heinz-9553 com diferentes idades de inoculação com ToSRV, medido após 30 DAI em duas épocas de realização do ensaio (inoculação em: 22/09/2016 – A, 02/11/2016 – B). Os códigos distinguem os diferentes tratamentos com ou sem inoculação do vírus, sendo MBA as plantas confinadas com moscas-brancas avirulíferas, MBV as plantas inoculadas com moscas-brancas virulíferas e SMB as plantas que não tiveram contato com moscas-brancas durante o período de acesso de inoculação. 87
- Figura 6.** Sintomas observados nas mudas de tomateiro Heinz-9553 com diferentes idades na inoculação pela mosca-branca do vírus ToSRV. A- muda de 20 dias com nota 2 (presença de clorose internerval, resquícios do clareamento de nervuras e leve

enrugamento e deformação foliar, início da estagnação no desenvolvimento); B- muda de 20 dias com nota 1 aos 18 DAI (acentuada deformação foliar e presença de clareamento de nervuras); C- muda de 30 dias com nota 1/2 (presença de suave deformação foliar, início de enrugamento e redução do tamanho das folhas, clareamento de nervuras e suave clorose internerval); D- muda de 40 dias com nota 2 (presença de clareamento de nervuras em várias folhas); E- muda de 50 dias com nota 2 aos 18 DAI (clorose internerval, enrugamento foliar e resquício de clareamento de nervuras); F- muda de 30 dias com nota 3 aos 23 DAI (clorose internerval em praticamente todas as folhas, rugosidade foliar e aparente redução no crescimento); G- muda de 60 dias com nota 2 (clorose internerval, rugosidade foliar suave).----- 93

RESUMO GERAL

RODRIGUES, Cristiano da Silva **Efeito do número de indivíduos de *Bemisia tabaci* e idade de mudas de tomateiros na infecção pelo begomovírus *Tomato severe rugose virus***. 2017. (110p) Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pertence à família Solanaceae e é cultivado em várias regiões do mundo. O Brasil figura entre os dez maiores produtores mundiais, com os principais estados produtores sendo Goiás, Minas Gerais e São Paulo. Esta hortaliça é produzida para consumo *in natura* e para industrialização. Vários problemas fitossanitários acometem o tomateiro, entre eles as viroses destacam-se entre as principais e as begomoviroses são as de maior incidência nas principais regiões. Os vírus do gênero *Begomovirus*, pertencentes à família *Geminiviridae*, são os agentes causadores destas doenças e possuem genoma formado por DNA circular de fita simples (ssDNA) encapsulados em partículas geminadas. No Brasil a espécie predominante em tomateiro é o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), com relatos frequentes de incidência próximas a 100%. Esses vírus são transmitidos de modo persistente pelo vetor mosca-branca (*Bemisia tabaci*), sendo o biótipo B (espécie MEAM-1) prevalente. Diversos sintomas são associados à infecção por begomovírus, por exemplo, clareamento de nervuras, clorose, clorose internerval, mosaico, redução de crescimento, enrolamento foliar e rugosidade. Esses sintomas podem variar de acordo com muitos fatores, como o estágio fenológico da planta no momento da infecção, a variedade, o ambiente, as condições nutricionais, entre outros. A epidemiologia de doenças investiga os fatores necessários para o desenvolvimento da epidemia, a sua dinâmica e distribuição espacial e temporal, sendo estes essenciais para o sucesso do seu controle. As begomoviroses são de difícil manejo e práticas que reduzam a incidência e disseminação da doença devem ser desenvolvidas e adotadas como parte de um programa de manejo integrado de pragas. Para isso, o conhecimento da epidemiologia destas viroses necessita ser mais aprofundado. Este trabalho objetivou contribuir neste tema com a determinação do efeito da quantidade de inóculo inicial e da idade de mudas de tomateiros na infecção pelo begomovírus *Tomato severe rugose virus* em inoculação por *Bemisia tabaci*. Os ensaios foram realizados com o isolado 1164 de ToSRV do Laboratório de Virologia do Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças (CNPQ/EMBRAPA). No ensaio de pressão de inóculo, foram utilizadas diferentes quantidade de moscas-brancas virulíferas como pressão de inóculo: 1, 5, 10, 15, 30 e 60 indivíduos sobre cultivares de tomate suscetível (Heinz-9553) e resistente (BRS Sena). O experimento foi conduzido em delineamento com blocos casualizados (DBC) com seis repetições por tratamento e uma repetição como testemunha negativa, sendo a parcela experimental composta por uma planta. O ensaio foi repetido quatro vezes. Para a realização do ensaio, após a aquisição de ToSRV por 48 horas pelos indivíduos de *B. tabaci* biótipo B, estes foram confinados com mudas de plantas sadias por um período de acesso de inoculação de 48 horas. Após a inoculação, as plantas foram mantidas para avaliação da incidência e severidade dos sintomas durante 30 dias. As avaliações de severidade seguiram uma escala de notas da virose causada por ToSRV em tomateiros previamente desenvolvida. O ensaio com diferentes idades de mudas de tomateiro foi repetido três vezes no tempo, utilizando um DBC composto por três blocos com 10 repetições cada, compondo a parcela experimental. Para condução do ensaio, foram utilizadas mudas da cultivar de tomateiro suscetível Heinz-9553 com idades de 20, 30, 40, 50 e 60 dias após a semeadura. As mudas foram inoculadas por moscas-brancas virulíferas em um período de 72

horas, após o período de aquisição de 48 horas. Após a inoculação, as plantas foram avaliadas por 30 dias quanto à incidência e severidade da virose e, ao final, foram medidos a altura e o peso fresco. Todos os dados foram analisados estatisticamente pelo teste F ($p=5\%$) e as médias submetidas ao teste de Scott-Knott. Na avaliação de diferentes pressões de inóculo, foram observadas diferenças significativas de incidência e severidade da virose entre as cultivares suscetível e resistente. Houve uma relação direta entre uma maior população de insetos-vetores com uma maior incidência e severidade da doença nas cultivares, bem como o desenvolvimento mais rápido da doença. Quanto às diferentes idades das mudas de tomateiro, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as idades avaliadas. Entretanto, as mudas de 20 dias apresentaram os maiores valores de incidência e severidade (média de 81,0% e 1,9 respectivamente), bem como o desenvolvimento precoce da doença. Já a inoculação em mudas com 60 dias resultou em porcentagem média de incidência inferior a 67%. Em relação à altura e peso das mudas, a presença do vírus significativamente diminuiu ambos os parâmetros, principalmente nas plantas mais novas. Esses resultados sugerem que uma alta população de moscas-brancas virulíferas exerce papel chave no desenvolvimento da virose, acelerando a expressão e severidade dos sintomas tanto em cultivar suscetível como em resistente enquanto que a idade da muda no momento da infecção não influencia significativamente a resposta à virose causada por ToSRV.

Palavras-chave: epidemiologia, idade de mudas, mosca-branca, pressão de inóculo, tomate.

Orientador – Alice Kazuko Inoue-Nagata – Universidade de Brasília/Embrapa Hortaliças.

GENERAL ABSTRACT

RODRIGUES, Cristiano da Silva. **Effect of the number of individuals of *Bemisia tabaci* and the age of tomato transplants on the infection caused by *Tomato severe rugose virus***. 2017. (110p) Dissertation (Masters in Phytopathology) - University of Brasília, Brasília, DF.

The tomato plant (*Solanum lycopersicum*) belongs to the family Solanaceae and is cultivated in several regions of the world. Brazil is among the ten largest producers in the world, and the main producing states are Goiás, Minas Gerais and São Paulo. This vegetable is produced for fresh consumption and for processing. Several phytosanitary problems affect the tomato, viruses are among the major ones, and the begomoviruses are the ones with the highest incidence in most growing regions. Viruses of the genus *Begomovirus*, belonging to the family *Geminiviridae*, are the causal agents of these diseases. They have a genome formed by circular single-stranded DNA (ssDNA) encapsidated in geminated particles. In Brazil the predominant species in tomato is *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), and incidence rates close to 100% are frequently observed. These viruses are transmitted in a persistent manner by the whitefly vector (*Bemisia tabaci*), with MEAM-1 (or B-biotype) being the prevalent species. Several symptoms are associated with the begomovirus infection, for example vein chlorosis, chlorosis, interveinal chlorosis, mosaic, growth reduction, leaf rolling and rugosity. These symptoms may vary depending on many factors, such as the phenological stage of the plant at the time of infection, variety, environment, nutritional conditions, among others. The epidemiology of diseases investigates the factors necessary for the development of the epidemic, its dynamics and distribution, which are essential for the success of its control. Begomoviruses are difficult to manage and practices that reduce the incidence and spread of the disease should be developed and adopted as part of an integrated pest management program. For this, the epidemiology of this virus needs to be further investigated. This work aimed to contribute to this topic with the determination of the effect of initial inoculum pressure and the age of tomato plants on the begomovirus infection by *Tomato severe rugose virus* inoculated by *Bemisia tabaci*. The trials were performed with ToSRV isolate 1164 from the Laboratory of Virology of the National Vegetable Research Center (CNPq / EMBRAPA). In the inoculum pressure study, different amounts of viruliferous whiteflies were used as inoculum pressure: 1, 5, 10, 15, 30 and 60 individuals on susceptible (Heinz-9553) and resistant (BRS Sena) tomato cultivars. The experiment was conducted in a randomized block design (DBC) with six replicates per treatment and one replicate as a negative control. The assay was repeated four times. For this purpose, after the acquisition of ToSRV for 48 hours by the individuals of *B. tabaci* biotype B, they were confined with transplants of healthy plants for a 48 hour inoculation access period. After inoculation, the plants were maintained for 30 days for evaluation of the incidence and severity of symptoms. Severity assessments followed a symptom rating on a numerical scale, which was previously developed for the visual symptom evaluations. The experiments with different ages of tomato transplants were repeated three times in time, using a DBC composed of three blocks with 10 replicates each. For the conduction of the trials, transplants of the susceptible tomato cultivar Heinz-9553 were used, with ages of 20, 30, 40, 50 and 60 days after sowing. The transplants were inoculated by viruliferous whiteflies in a period of 72 hours, after the acquisition period of 48 hours. After inoculation, the plants were evaluated for 30 days for the incidence and symptom severity, and at the end, plant height and fresh weight were measured. All data were statistically analyzed by the F test ($p = 5\%$) and the means submitted to the Scott-Knott test.

In the evaluation of different inoculum pressures, significant differences of incidence and severity of the virus were observed between susceptible and resistant cultivars. There was a direct relationship between the larger population of insect vectors with the higher incidence and severity of the disease in the cultivars, as well as the faster development of the disease in the treatment with high amounts of vectors. Regarding the different ages of the tomato seedlings, no statistically significant difference was observed between the evaluated ages. However, the 20-day seedlings treatment presented the highest values of incidence and severity (mean of 81.0% and 1.9, respectively), as well as an early development of the disease. The inoculation in transplants with 60 days resulted in a mean incidence rate of less than 67%. Regarding the height and weight of the plants, the presence of the virus significantly reduced both parameters, especially in the younger plants. These results suggest that a high viruliferous whitefly population plays an important role in the development of the virus disease, accelerating the expression and severity of symptoms in both susceptible and resistant cultivars, and that the age of the transplants at the time of infection does not significantly influence resistance to caused by ToSRV.

Keywords: epidemiology, age of seedlings, whitefly, inoculum levels, tomato.

Dissertation Advisor: Alice Kazuko Inoue-Nagata

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pertence à família Solanaceae, é cultivado em várias regiões do mundo (Naika *et al.*, 2006). Segundo dados da FAO (2017), a produção mundial foi de aproximadamente 170 milhões de toneladas em 2016, distribuída em cerca de 5 milhões ha com uma produtividade de 34 Ton/ha. No Brasil a área plantada é de 56.880 ha e a sua produção em 2016 foi de 3,5 milhões de toneladas e produtividade de 62-65 Ton/ha. Colocando-se assim entre os 10 maiores produtores mundiais, com os principais estados produtores sendo Goiás, Minas Gerais e São Paulo (IBGE, 2016; FAO, 2017).

Várias doenças acometem o tomateiro, entre elas as viroses se destacam, sendo as ocasionadas pelos *Begomovirus*, atualmente as de maior relevância pela alta incidência e relatos de perdas de até 100% em lavouras de tomate (Polston & Anderson, 1997; Macedo *et al.*, 2014; Briddon, 2015). Os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus*, classificadas na família *Geminiviridae*, possuem genoma em fita simples de DNA circular monopartido ou bipartido, com aproximadamente 2,8 e 5,2 kb, respectivamente e encapsidadas em partículas geminadas (Briddon, 2001; Briddon & Stanley, 2006; ICTV, 2016). Esses vírus estão amplamente disseminados pelas regiões tropicais, subtropicais e também temperadas, onde por vezes há relatos de grandes prejuízos na produtividade (Polston & Anderson, 1997; Mansoor *et al.*, 2003). Os begomovírus são agrupados em aqueles do Novo Mundo e do Velho Mundo, a maioria dos begomovírus do Novo Mundo possui genoma bipartido (Briddon, 2015). Estas espécies virais são transmitidas pelo inseto vetor mosca-banca (*Bemisia tabaci*) em uma relação do tipo circulativa não propagativa (Ghanim *et al.*, 2001). Este vetor possui uma complexa distinção das espécies e vêm sendo tentativamente classificadas em biótipos e atualmente em espécies (Perring, 2001; Dinsdale *et al.*, 2010; De Barro *et al.*, 2011). O papel deste vetor é essencial na epidemiologia das begomoviroses e

vem sendo eficientemente desempenhado pelo biotipo B ou espécie Middle East Asian Mean-1 (MEAM-1) prevalente no Brasil

No país mais de 17 espécies são reconhecidas infectando o tomateiro, entretanto, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) são as de maior ocorrência (Fernandes *et al.*, 2008). Os sintomas mais comumente observados são o mosaico, clareamento das nervuras, manchas cloróticas, clorose internerval, rugosidade, deformação foliar e nanismo (Polston & Anderson, 1997; Faria *et al.*, 2000; Macedo *et al.*, 2014; Bergamin Filho *et al.*, 2016).

Várias estratégias de manejo são empregadas para o controle destas viroses, mas nenhuma é eficiente quando utilizada isoladamente. Entre os principais pontos a serem observados na aplicação do manejo estão a redução das populações de moscas-brancas, a redução ou eliminação das fontes de inóculo nas áreas cultiváveis e alteração da suscetibilidade da cultura (Polston & Anderson, 1997; Seal *et al.*, 2006; Luan *et al.*, 2014). As begomoviroses se constituem em sistema complexo, com muitas interações e envolvendo múltiplos fatores (Jeger, 2004; Van den Bosch *et al.*, 2006), e por esta condição, entre outras, dispõe-se de poucas estratégias de manejo. Vários autores destacam a necessidade de maior conhecimento da epidemiologia destas viroses para que práticas que reduzam a incidência e disseminação da doença possam ser investigadas e adotadas como parte de um manejo integrado (Poston e Anderson, 1997; Colvin *et al.*, 2006; Moriones & Navas-Castillo, 2010; Luan *et al.*, 2014; Mahatma *et al.*, 2016).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes números de indivíduos de *Bemisia tabaci* como níveis de inóculo inicialde ToSRV sobre tomateiros resistente e suscetível no desenvolvimento de epidemias de ToSRV e determinar o efeito da idade de mudas de tomateiros à infecção pelo begomovírus *Tomato severe rugose virus*

(ToSRV) em inoculado por *Bemisia tabaci* quanto a incidência, severidade e características como peso e altura das plantas.

OBJETIVO GERAL

Determinar o efeito de diferente número de indivíduos de *Bemisia tabaci* como níveis de inóculo inicial de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em transmissão por *B. tabaci* em plantas de tomateiro e avaliar a influência da idade de mudas de tomateiro no momento da inoculação de ToSRV no desenvolvimento da doença.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a influência de diferentes números de moscas-brancas virulíferas para ToSRV sobre a incidência de ToSRV em cultivares de tomateiro suscetível (Heinz-9553) e resistente (BRS Sena);

Avaliar a influência de diferentes quantidades de moscas-brancas virulíferas para ToSRV sobre a severidade de sintomas em cultivares de tomateiro suscetível (Heinz-9553) e resistente (BRS Sena);

Estudar o efeito da idade de mudas do tomateiro suscetível Heinz-9553 sobre a incidência e severidade de sintomas após inoculação de ToSRV por moscas-brancas.

Determinar o efeito da infecção por isolado de ToSRV no desenvolvimento de tomateiros (altura e peso) inoculados em diferentes idades.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A CULTURA DO TOMATEIRO

Mundialmente, o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é a segunda mais importante cultura vegetal, com uma produção de 170 milhões de toneladas e produtividade estimada de 33.988,3 kg/ha (FAO, 2017). O Brasil destaca-se entre os dez maiores produtores mundiais de tomate com uma produção de 3.545.760 toneladas no ano de 2016 sobre uma área de 55.676 ha, com produtividade de 63,86 Ton/ha em 2016 (IBGE, 2016). Os maiores estados produtores são Goiás, Minas Gerais e São Paulo, que juntos somam 62,3% da produção de tomate nacional (IBGE, 2016).

Segundo revisão de Naika *et al* (2006), o tomateiro tem origem na zona andina da América do Sul, mas foi domesticado no México e introduzido na Europa em 1544. Mais tarde, disseminou-se da Europa para a Ásia meridional e oriental, África e Oriente Médio, distribuindo-se então para outras partes da América do Sul e do México. O tomateiro produz desde frutos ricos em minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais, açúcares e fibras dietéticas. É uma planta anual, autógama, herbácea, com flores hermafroditas ou perfeitas, que produzem frutos pequenos com tamanho de uma cereja até aqueles com 0,5 Kg conforme a cultivar (Sonnenberg & Silva, 2004). Seu sistema radicular é do tipo pivotante, podendo chegar até 1,5 m de profundidade. O caule da planta jovem de tomateiro é ereto, herbáceo, suculento e coberto por pelos glandulares. As folhas são alternadas, compostas por número ímpar de folíolos, sendo pecioladas e apresentam bordas serrilhadas (Pinto & Casali, 1980; Sasaki & Seno, 1994; Naika *et al.*, 2006).

Como revisado por Orzolek *et al.* (2016), os tomateiros crescem melhor sobre solos bem drenados que tem boa areação e taxa de infiltração de água, com faixa de pH ideal entre 5,8 a 6,6 e níveis nutricionais recomendados conforme a análise do solo.

Os tomates são produzidos para consumo dos frutos frescos, em saladas, ou cozidos, em molhos, sopas e carnes, podendo ser processados em purês, sumos e molho de tomate

(ketchup) e também os frutos enlatados e secos que constituem produtos processados de importância econômica (Naika *et al.*, 2006). Dois grupos de tomateiros produzidos para indústria e para mesa são cultivados, aqueles chamados de crescimento indeterminado (tomate mesa) e os de crescimento determinado, sendo os frutos respectivamente destinados ao consumo fresco ou destinados principalmente à agroindústria, existindo cultivares com dupla aptidão no mercado (Naika *et al.*, 2006, Filgueira, 2003).

O manejo da cultura é diversificado, podendo ser utilizados diferentes tratamentos culturais que são escolhidos, sobretudo, de acordo com o hábito de crescimento das plantas (determinado e indeterminado). As plantas com desenvolvimento determinado são limitadas pela emissão de uma inflorescência terminal e a sua frutificação ocorre em um período relativamente concentrado, dentro de duas ou três semanas, geralmente colhidos mecanicamente (Filgueira, 2003; Naika *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2012; Clemente *et al.*, 2013). Estes tomateiros são conhecidos popularmente como rasteiros (Nascimento *et al.*, 2012). Já os tomateiros com hábito de crescimento indeterminado possuem desenvolvimento contínuo das plantas após a emissão dos botões florais, sendo necessário o tutoramento e a poda (Naika *et al.*, 2006; Clemente *et al.*, 2013). Como o amadurecimento dos frutos é variável e constante em uma mesma planta, a colheita manual ocorre de forma parcelada, podendo ser prolongada por 50 a 90 dias (Filgueira, 2003).

Orzolek *et al.* (2016) relatam que a produção comercial de tomate não se iniciou até depois dos anos de 1860, quando os tomates foram finalmente aceitos popularmente. E que desde 1890, o melhoramento de tomates tem desenvolvido variedades adotadas para o uso ao redor do mundo. O tomateiro possui diferentes tipos de frutos (fresco, uva, cereja, salada, bilocular, multilocular, entre outros), que são absorvidos por diversos mercados. Os autores destacam ainda um recente nicho de mercado, a ornamentação com tomateiros em cestos suspensos principalmente para garagens.

As sementes de tomateiros são produzidas de duas formas básicas, aquelas derivadas de polinização aberta (não híbridas) e as híbridas. As sementes de polinização aberta são facilmente produzidas e geralmente não requerem o isolamento de plantas, sendo produzidas centenas de sementes por cada planta (Openã *et al.*, 2001a). As variedades híbridas de tomateiro têm muitas vantagens comparadas às variedades de polinização aberta. Híbridos geralmente amadurecem mais cedo e mais uniformemente, têm melhor qualidade de frutos e resistência a doenças (Openã *et al.*, 2001b). Com todas estas vantagens, muitos agricultores preferem semear sementes híbridas, apesar dos custos mais elevados das sementes.

Segundo Openã *et al.* (2001 a, b), quase todas as linhas de tomate, incluindo variedades modernas de hoje, são auto-polinizantes, ou seja, as anteras derramam pólen sobre o estigma dentro da flor e o estigma não se projeta para fora desta. Devido a esta estrutura floral e seu mecanismo de polinização, o isolamento de diferentes linhas geralmente não é necessário na polinização aberta. Entretanto, esta é uma das dificuldades da produção de sementes híbridas, que requer uma elevada mão de obra para o isolamento das plantas. Além disso, há a necessidade de habilidades especiais e uma atenção demasiada a detalhes em etapas como a de emasculação e polinização.

Como enfatiza Leal (2006), é de grande importância a escolha adequada da cultivar para que haja sucesso na produção. Desta forma, alguns fatores devem ser considerados e entre eles estão a resistência a doenças, custo das sementes e aceitação no mercado consumidor. Atualmente existem cultivares e híbridos que são resistentes ou tolerantes a diversos tipos de doenças e em algumas situações a sua utilização é fundamental. O custo das sementes é muito variável e para algumas cultivares e híbridos é muito elevado, mas com desempenho compensatório do investimento; a preferência do consumidor pelo tipo de fruto, sendo que há uma grande variação quanto ao tamanho, forma, cor, textura, sabor e durabilidade destes. Entretanto, as variedades de tomateiro apresentaram desempenho diferente sobre condições

ambientais variáveis. A utilização de variedade com resistência a doenças torna-se mais importante quando não existem ainda outras boas opções de manejo (Kelley & Boyhan, 2014). Para estes autores, basicamente, uma variedade deve ser adaptada para a área, produzir um rendimento competitivo e o fruto ser aceito pelos consumidores.

Os plantios comerciais de tomates são geralmente iniciados com a utilização de mudas com 5 a 6 semanas de idade que são transplantadas de estufas para o campo (Kelley & Boyhan, 2014; Orzolek *et al.*, 2016). Kelley & Boyhan (2014) não recomendam a semeadura direta dos tomateiros no campo, devido ao alto custo das sementes híbridas e as condições requeridas para a adequada germinação das sementes. Entre as desvantagens da semeadura direta estão a maior dificuldade no controle de plantas daninhas, a necessidade de condições muito específicas de preparo para as covas e o terreno como um todo, e os efeitos de atraso na colheita observado em tomateiros semeados diretamente no solo.

As mudas são cultivadas em recipientes (bandejas) com substrato e sem a exposição das raízes após a remoção do recipiente. Este tipo de produção é preferido pelos agricultores por diminuir o choque do transplante, devido a redução ou ausência de replante, o rápido retorno do crescimento das mudas após o transplante e também pelo crescimento e produção mais uniforme (Kelley & Boyhan, 2014).

A cultura do tomateiro é atacada por diversos patógenos de importância econômica, com os vírus ocupando lugar de destaque. As três principais doenças de origem viral que afetam o tomateiro no Brasil pertencem aos gêneros *Begomovirus*, *Tospovirus* e *Crinivirus* (Giordano *et al.*, 2000; Barbosa *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008). Atualmente, as begomoviroses são consideradas as mais relevantes viroses, devido à grande incidência observada e a possibilidade de perdas de até 100% nas lavouras de tomateiro dependendo da época de inoculação e a cultivar utilizada (Brown *et al.*, 1995; Seal *et al.*, 2006; Macedo *et al.*, 2014). São vírus que pertencentes à família *Geminiviridae*, sendo constituídos por

moléculas de ssDNA circular encapsidadas em duas partículas icosaédricas geminadas, classificadas dentro de sete gêneros (*Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Eragrovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*) (Brown *et al.*, 2012; Briddon, 2015).

1.2 A FAMÍLIA GEMINIVIRIDAE

A primeira referência a uma doença causada por um geminivírus talvez seja o "Man'youshu", um clássico poema antológico escrito nos anos de 752 pela Imperadora KoKen do Japão, descrevendo uma linda planta que se acredita ser *Eupatorium makinoi* com sintomas de amarelecimento foliar, hoje associados ao begomovírus nomeado *Eupatorium yellow-vein virus* (EpYVV) (Saunders *et al.*, 2003). Em 1977, Harrison *et al.* fizeram uma emocionante e inesperada descoberta de que *African cassava mosaic virus* (ACMV) e *Maize streak virus* (MSV) têm um genoma de ácido desoxirribonucleico de fita simples circular (ssDNA). Estas novas características conduziram à proposta de um novo grupo que foi oficialmente aceito pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) em 1978. (Matthews, 1979; Briddon, 2015).

Esse grupo de vírus foi denominado como a família *Geminiviridae*, apresentando moléculas de ssDNA circular encapsidadas em duas partículas icosaédricas geminadas (Briddon, 2001). Os geminivírus eram divididos até recentemente em quatro diferentes gêneros: *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, *Curtovirus* e *Begomovirus*, baseado na sua organização genômica, hospedeiros, insetos vetores e a sequência genômica (Stanley *et al.*, 2005). Dentro de cada gênero, os vírus têm sido classificados como distintas espécies, estirpes ou isolados com base nas diferenças em características biológicas tais como gama de hospedeiros, tropismo de tecido e patogenicidade, imunologia, diversidade das suas sequências de DNA e compatibilidade funcional dos produtos de gene (Briddon, 2015). Como revisado por Briddon (2015), com base nestas características novos gêneros foram sendo adicionados à família

Geminiviridae, que atualmente é composta de sete gêneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Eragrovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*. Mastrevírus têm genoma monopartido e cada membro é usualmente transmitido por uma única espécie de cigarrinha (Família Cicadellidae). A espécie-tipo deste gênero é *Maize streak virus* (MSV). Os curtovírus, como *Beet curly top virus* (BCTV), são também transmitidos por cigarrinhas e podem infectar uma ampla gama de espécies dicotiledôneas. Eles possuem genoma monopartido, mas demonstram diferenças fundamentais em sua organização genômica e a dos mastervírus. Os vírus do gênero *Topocuvirus* e os gêneros recentemente estabelecidos *Becurtovirus*, *Eragrovirus* e *Turncurtovirus* possuem genoma monopartido, mas permanecem relativamente pouco caracterizados. O gênero *Topocuvirus* contém unicamente um membro, *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), que é transmitido por um membracídeo (Família Membracidae) e tem sua organização genômica similar a dos membros do gênero *Curtovirus*, sendo TPCTV limitado a hospedeiros dentro da família Solanaceae. O gênero *Becurtovirus* possui duas espécies, *Beet curly top Iran virus* (BCTIV) e *Spinach curly top Arizona virus* (SCTAV), são transmitidos por cigarrinhas e infectam algumas dicotiledôneas. O gênero *Turncurtovirus* contém uma única espécie, *Turnip curly top virus* (TCTV), que é transmitida por cigarrinhas e tem sido identificada em ampla variedade de dicotiledôneas hospedeiras. O gênero *Eragrovirus* possui apenas uma espécie, *Eragrostis curvula streak virus* (ECSV), que até agora tem sido identificada em plantas espontâneas (daninhas) monocotiledôneas, estando ainda seu vetor não identificado. Os geminivírus compartilham uma conservada sequência de nove nucleotídeos (TAATATT/AC) onde está localizada a região “hairpin” de origem de replicação da fita viral, e nos becurtovírus e eragrovírus ocorre uma incomum sequência destes nove nucleotídeos (TAAGATTCC) (Fontes *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 2005; Briddon, 2015).

Todos os geminivírus são naturalmente transmitidos por insetos da ordem Hemiptera de maneira persistente, circulativa (Brown *et al.*, 1995). Os topocurvírus são transmitidos por membracídeos como o *Micrutalis malleifera* (subordem Auchenorrhyncha, família Membracidae), enquanto que mastrevírus, curtovírus, becurtovírus e turncurtovírus são transmitidos por cicadelídeos (subordem Auchenorrhyncha, família Cicadellidae). Como informado anteriormente, o gênero *Eragrovirus* ainda não possui vetor identificado. Os begomovírus são transmitidos por moscas-brancas *B. tabaci* (subordem Sternorrhyncha, família Aleyrodidae) (Bridson, 2015).

Autores com Perring *et al.* (1993), Henneberry *et al.* (2000) e Dalton (2006), entre outros, destacam o aumento intenso da emergência de geminivírus como um problema em todo o mundo desde 1960, causando devastação em grande número de culturas tais como tomate, algodão, curcubitáceas e feijão. São epidemias relacionadas a atividades humanas e a dispersão de begomovírus é diretamente correlacionada com a ampla dispersão do biótipo B de *B. tabaci*.

Os begomovírus são um grupo emergente de patógenos virais bem sucedidos, causando severas perdas econômicas a plantas dicotiledôneas amplamente usadas como alimento, fibras e ornamentais nos agroecossistemas tropicais e subtropicais (Mahatma *et al.*, 2016).

1.3 O GÊNERO BEGOMOVIRUS

O gênero *Begomovirus* possui mais de 300 espécies ocasionando virose em diversas famílias botânicas no mundo, sendo a espécie-tipo o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) (ICTV, 2017). Estes vírus possuem genoma com DNA de fita simples (ssDNA) circular, encapsidados por múltiplas subunidades de uma única proteína capsidial, podendo ser monopartido ou bipartido (DNA-A e DNA-B), com tamanhos semelhantes e separadamente encapsidados em partículas geminadas. No Novo Mundo a vasta maioria dos

begomovírus é bipartida (ex. *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e *Tomato golden mosaic virus* (TGMV)), com dois únicos exemplares monopartidos identificados até agora – *Tomato leaf deformation virus* (TLDV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) (Márquez-Martín *et al* 2010; Fauquet & Stanley, 2003; Briddon, 2015; Vu *et al.* 2015). Embora alguns begomovírus originários do Velho Mundo tenham genoma bipartido, por exemplo *African cassava mosaic virus* (ACMV) e *Mungbean yellow mosaic virus* (MYMV), muitos são monopartidos com genoma semelhante ao componente DNA-A, por exemplo *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV).

A maioria dos begomovírus monopartidos é associada com um componente ssDNA adicional, os alfa- e betasatélites. Estes possuem aproximadamente metade do tamanho de seus vírus auxiliares, como é o exemplo dos betasatélites associados às espécies *Ageratum yellow vein virus* (AYVV) e *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMV) (Saunders, Briddon, Stanley, 2008; Briddon & Stanley, 2006; Briddon, 2015). Os mesmos autores descrevem os betasatélites como moléculas determinantes de patogenicidade associadas com várias doenças de plantas exclusivamente causadas por begomovírus monopartidos no Velho Mundo. Eles são completamente dependentes de um componente auxiliar (DNA-A) para sua replicação, encapsidação e transmissão por mosca-branca. Ao contrário dos alfasatélites, betasatélites são claramente associados com seu componente auxiliar independentemente da hospedeira e distribuição geográfica (Briddon *et al.*, 2003). Em contraste aos betasatélites, os alfasatélites são semelhantes a satélites por possuírem replicação autônoma, enquanto que por definição satélites requerem seus vírus auxiliares para replicação, como os betasatélites que necessitam do vírus auxiliar para encapsidação e movimentação em e entre os hospedeiros (Mansoor *et al.*, 1999). Os betasatélites são altamente diversos, apesar de terem uma estrutura conservada e codificarem o produto de um único gene conhecido como β C1, que é determinante de patogenicidade, supressor de silenciamento gênico pós transcricional (PTGS) e silenciamento

gênico transcricional (TGS), liga-se ao DNA e pode possivelmente estar envolvido no movimento viral (Saunders *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2011). Os alfasatélites são menos diversos e codificam um único gene que é um homólogo da REP de nanovírus (outra família de vírus com ssDNA em plantas), entretanto a função biológica deles permanece pouco esclarecida (Briddon, 2015).

As begomoviroses debilitam culturas utilizadas para alimentação e fontes de fibras vegetais nos trópicos e subtropicais e também em agroecossistemas temperados (Polston & Anderson, 1997; Mahatma *et al.*, 2016). A incidência e o número de espécies desse gênero têm aumentado desde os meados de 1970, principalmente devido ao aumento da população do vetor mosca-branca biótipo B (*Middle East-Asia Minor 1* - MEAM-1) (Brown, 1990; Costa & Brown, 1991; Polston & Anderson, 1997; Moriones & Navas-Castillo, 2010; Briddon, 2015). Ao final do século 20, as begomoviroses tornaram-se importantes limitantes para muitas culturas comuns de hortaliças. Atualmente, a virose mais frequentemente observada em cultivos de tomateiro no Brasil é causada por begomovírus (Albuquerque *et al.* 2012). A primeira observação de uma virose associada a begomovírus em tomateiro no Brasil foi registrada nos anos 60 como uma “clorose infecciosa” associando-se a doença a moscas-brancas (*Bemisia tabaci*), possivelmente o biótipo A (Flores *et al.*, 1960). Entretanto, as begomoviroses tornaram-se importantes após a introdução do biótipo B na década de 90, devido principalmente a ser mais polífaga e agressiva (Lourenção & Nagai, 1994; Faria *et al.*, 2000).

Os sintomas de infecção por begomovírus em geral variam com a espécie viral, o isolado, a cultivar, a idade da planta no momento da infecção, o estado nutricional da planta e as condições ambientais. Estes sintomas podem incluir os seguintes, em várias combinações: um mosaico amarelo brilhante, clareamento de nervuras, clorose, clorose internerval, clorose nas margens das folhas, mosqueado, mosaico, mancha clorótica, enrolamento foliar,

deformação foliar, enrugamento foliar, redução no tamanho das folhas, nanismo ou enfezamento das plantas infectadas e abscisão floral (Polston & Anderson, 1997). Apesar de não haver expressão de sintomas nos frutos, há redução do tamanho e quantidade de frutos; quando em infecção precoce, os sintomas são mais severos e há uma paralisação no crescimento da planta (Lopes & Reis, 2011; Macedo *et al.*, 2014; Bergamin Filho *et al.*, 2016).

Muitas espécies de vírus são relatos causando sintomas similares em plantas de tomateiro no Brasil, no entanto duas espécies de begomovírus foram considerados predominantes, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV) (Fernandes *et al.*, 2008). Desde a introdução do biótipo B de *B. tabaci*, a qual é assumida como tendo ocorrido no início dos anos 90, a incidência das begomovirose têm progressivamente aumentado no Brasil, e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) parece predominar nas principais regiões com cultivos de tomateiro, com ocorrência de 100% de incidência nos campos da região central do país (Faria *et al.* 2000; Inoue-Nagata, 2013, Bergamin Filho *et al.*, 2016).

1.4 TRANSMISSÃO DOS BEGOMOVÍRUS

O vetor dos begomovírus, a mosca-branca, é considerada uma das principais pragas da agricultura mundial atualmente. Para Dalton (2006), a dispersão de begomovírus está diretamente correlacionada com a ampla dispersão do biótipo B de *B. tabaci* e sua capacidade de colonizar mais que 1000 plantas hospedeiras, além da elevada capacidade de sustentar populações e reproduzir-se em novas condições ambientais comparado a outros biótipos.

Esses insetos são pequenos aleirodídeos sugadores que possuem corpo de coloração amarela e com dois pares de asas frágeis, cobertas por uma substância pulverulenta branca,

com limitada capacidade de vôo, mas bastante agressivos devido à alta taxa de reprodução e polifagia de algumas espécies (Byrne & Bellows, 1991).

Segundo Sparks (2014), adultos de moscas-brancas podem causar danos diretos pela alimentação, tipicamente as ninfas são os estádios mais prejudiciais. Os diferentes ínstaes da ninfa são sésseis, com exceção do primeiro, sendo que estes ocorrem na parte de baixo das folhas. Moscas-brancas, particularmente o biótipo B podem ser uma praga severa em cultivos de tomateiro no outono dos Estados Unidos da América. Essas moscas-brancas podem causar diferentes prejuízos no outono, quando as populações são grandes o suficiente para causar desfolha e pode produzir bastante melação “honeydew” e fumagina por ser um problema de contaminação na colheita. Em populações muito baixas, entretanto, esta praga causa amadurecimento irregular de frutos e pode transmitir varias doenças virais, incluindo TYLCV. As moscas-brancas não são comumente um problema na estação de primavera na Georgia (EUA).

No Brasil, até 2005, segundo Leal (2006), ataques intensos de *Bemisia tabaci* não ocorrem todos os anos, sendo mais comuns após longos períodos de seca. A praga suga a seiva do tomateiro e, quando ocorrem superpopulações, a produção fica comprometida e os frutos e as folhas inferiores ficam cobertos por fumagina. Entretanto, pequenas populações de moscas-brancas podem indiretamente causar grandes prejuízos, atuando como vetores de viroses. O uso de inseticidas é ecologicamente desfavorável e tem sido largamente ineficiente devido à frequente necessidade de pulverizações que tornam a prática dispendiosa e inevitavelmente conduz ao surgimento de resistência a inseticidas dentro das populações de moscas-brancas (Briddon, 2015).

A espécie *B. tabaci* possui uma complexa classificação devido à alta similaridade genotípica e morfológica, mas com características biológicas e comportamentais diferentes (Perring, 2001). Diante desta complexidade, Perring (2001) determinou a partir de

ferramentas moleculares o agrupamento desses insetos em 24 biótipos e 41 populações de *B. tabaci* diferentes em todo o mundo. Entretanto, em 2010 Dinsdale *et al.* (2010) realizaram testes moleculares que separaram as moscas-brancas em um complexo de 11 grupos bem definidos filogeneticamente e 24 espécies morfológicamente indistinguíveis, com base na análise de sequências do gene mitocondrial citocromo oxidase I. Fazem parte dessas espécies duas pragas globalmente importantes: Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1, anteriormente conhecido como biótipo B) e Mediterranean (MED, biótipo Q) (De Barro *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012). Nessa nova classificação, o biótipo B corresponde a espécie Middle East-Asia Minor 1 e o biótipo A corresponde a espécie New World. Neste trabalho será utilizada a classificação de biótipos e não a classificação em espécies.

O vetor realiza a transmissão de suas partículas virais de uma planta infectada para outra sadia de forma natural e eficiente em um tipo de relação vírus-vetor circulativa e não propagativa, requerendo em média um período de latência de 6 a 12 horas para o início da transmissão e poucos minutos para a inoculação (Rosell, Torres-Jerez, Brown, 1999; Ghanim *et al.*, 2001). Ghanim e Czosnek (2000) e Ghanim *et al.* (1998) alertam para a importância de epidemias de TYLCV que podem ser ocasionadas pela passagem do vírus de uma população de moscas-brancas virulíferas para outra através da copulação e/ou passagem transovariana, embora existam informações contraditórias sobre a infecciosidade da progênie da mosca-branca após a transmissão transovariana (Bosco *et al.* 2004; Goldman e Czosnek, 2002; Moriones & Navas-Castillo, 2010). Outra característica peculiar é que apesar da convicção de muitos autores de que os begomovírus sejam não propagativos, trabalhos como os de Czosnek *et al.* (2001) e Mehta *et al.* (1994) evidenciam a ocorrência do vírus TYLCV em tecidos do seu vetor e demonstram que a quantidade de DNA de TYLCV aumenta após sua aquisição em plantas de tomate infectadas. Segundo os autores, tais características suportam a teoria de que TYLCV se replique no vetor *B. tabaci*.

Ghanim (2014), em revisão, descreve o caminho da transmissão circulativa dos begomovírus transmitidos pelas moscas-brancas, tendo como exemplo TYLCV, como possuindo uma íntima interação das proteínas do vetor como as partículas virais. O processo inicia com a retirada das partículas virais do floema da planta pela sucção da seiva pelo vetor e sua rápida dispersão no inseto. Uma vez no inseto, os vírus ultrapassam a barreira na câmara filtro do intestino médio, para a hemolinfa após a interação da HSP70 (heat shock protein 70) com TYLCV. Depois de circular no vetor, TYLCV interage com a proteína GroEL de simbiontes (*Hamiltonella defensa*) na hemolinfa e cruza a segunda barreira no vetor, a glândula salivar primária do inseto, via endocitose e assim os vírus são secretados dentro da planta hospedeira juntos com a saliva da mosca-branca.

Em meados de 1980, o biótipo B (MEAM-1), também conhecido como *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring, foi introduzido no Hemisfério Ocidental vinda do Mediterrâneo, possivelmente através do movimento de plantas ornamentais infestadas com o vetor (Perring *et al.*, 1993, 2001). Entretanto, devido à semelhança morfológica entre os biótipos, esse fato só foi observado após a expressão das diferenças biológicas existentes entre a espécie exótica e a indígena (Faria *et al.*, 2000). As principais diferenças que se destacam são a sua capacidade de alimentação em diferentes plantas cultiváveis ou não, a alta taxa de reprodução em tomateiro e o rápido desenvolvimento de populações com resistência a inseticidas. Na época, esta nova mosca-branca foi designada de biótipo B para se distinguir do biótipo A, o qual estava presente nas Américas (Schuster *et al.*, 1990; Brown, Frohlich, Rosell, 1995). *B. tabaci* está amplamente distribuída pelo mundo, nas regiões tropicais e subtropicais. Barbosa (2014) recentemente relatou a entrada do biótipo Q no estado do Rio Grande do Sul. Os níveis muito elevados de infestação de moscas-brancas no Brasil são a principal causa de surtos de begomoviroses nos anos recentes (Fernandes *et al.* 2008; Bergamin Filho *et al.*, 2016).

Moriones & Navas-Castillo (2010) destacam a importância dos avanços na caracterização e implementação de técnicas moleculares disponibilizadas aos cientistas de países em desenvolvimento. Porém, ressaltam que os virologistas têm estado mais preocupados com a detecção, caracterização – e principalmente – descoberta de “novas” espécies de begomovírus do que com o verdadeiro conceito de epidemiologia “etiologica” e “evolutiva”. No Brasil poucos trabalhos são relatados quanto a caracterização de padrões epidemiológicos das begomoviroses, e entre estes podem ser citados os de Santos *et al.* (2003) e Macedo *et al.* (2015) relacionados a transmissão e aqueles voltados aos estudos da dinâmica temporal e espacial de begomoviroses (Della Vecchia *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2015; Macedo, 2016).

Para entomologistas agrícolas, ecologistas ou biólogos evolucionários, a necessidade de investigação da interação entre begomovírus, moscas-brancas e plantas no campo é evidente, considerando que a interação tripartite é frequentemente um importante determinante da dinâmica populacional dos vetores e da epidemiologia de doenças de vírus (Colvin *et al.*, 2004, 2006).

1.5 EPIDEMIOLOGIA DE BEGOMOVIROSES

As doenças causadas por vírus da família *Geminiviridae* são frequentemente relatadas como fatores bióticos importantes e limitantes à produção de tomate nas Américas, reduzindo áreas de produção a 50% e ocasionando perdas significativas em campos com incidência por vezes superiores a 95% (Polston & Anderson, 1997).

O manejo das begomoviroses em tomateiro é difícil e dispendioso. Com frequência o manejo regional é recomendado, tendo como base a redução das fontes de moscas-brancas, e quando possível, a redução das fontes de inóculo viral. Estudos como o de Macedo *et al.* (2015) demonstram que o tomateiro ocupa um papel importante como fonte de vírus no

campo para novos cultivos. Com base nesta informação, recomenda-se a rápida remoção da cultura ao fim do ciclo e a eliminação de tigueras e plantas espontâneas (McGovern *et al.*, 1994; Macedo, 2016).

A interação begomovírus x moscas-brancas mediada pela planta exerce importante influência sobre a abundância das moscas-brancas e a epidemiologia das doenças de vírus (Colvin *et al.*, 2006; Jiu *et al.*, 2007). Essas viroses disseminadas principalmente por insetos vetores tem sua epidemiologia largamente determinada pela biologia do inseto e comportamento migratório (Briddon, 2015). O controle do vetor é um importante ponto na epidemiologia de begomoviroses e estratégias de controle são imprescindíveis devido a sua ampla gama de hospedeiros, alta fecundidade, e possivelmente a ampla capacidade de dispersão, como é observado para o biótipo B em relação a outros biótipos indígenas (Brown, Frohlich, Rosell, 1995; Bedford *et al.*, 1994; Bethke, Paine, Nuessly, 1991).

Segundo Polston & Anderson (1997), as táticas de manejo mais frequentemente empregadas em cultivos para o controle dos vírus transmitidos por insetos são o uso de inseticidas e o plantio de variedades resistentes. O uso de inseticidas pode reduzir satisfatoriamente a incidência de plantas infectadas na cultura, a depender do local e da estação de cultivo. Entretanto, segundo os mesmos autores, sob algumas circunstâncias como uma extensa fonte exógena de insetos virulíferos, os inseticidas têm sido pouco eficientes com a ocorrência de populações do vetor resistentes aos inseticidas e em casos onde os produtores são pequenos e os custos do manejo ficam muito elevados.

Quanto ao uso de cultivares resistentes, ainda é necessária a disponibilidade de mais opções para as diversas variedades de cultivo. Em todos os casos não há imunidade, ou seja, as plantas permitem a infecção do vírus. Cooper & Jones (1983) destacam que uma planta é imune a um vírus quando esta impossibilita a infecção da célula vegetal e após vários testes de detecção no tempo não é possível a detecção do vírus neste indivíduo. Seguindo ainda a

descrição destes autores, uma cultivar pode apresentar resistências qualitativas classificadas como resistência passiva (resistência por adsorção ou ligação, resistência ao vetor, resistência a multiplicação do vírus), hipersensibilidade e resistência de campo. Níveis de tolerância devem ser normalmente aplicados para situações onde a concentração viral é determinada, e está associada à redução destas concentrações virais em uma hospedeira. Antônimo do termo latência, sinônimo de tolerância, a palavra sensível deve ser usada para plantas incapazes de impedir a infecção e invasão dos vírus.

As fontes de resistência presentes em cultivares de tomateiro são principalmente estabelecidas para o vírus TYLCV e são originárias de cruzamentos interespecíficos entre variedades comerciais e espécies selvagens resistentes, tais como *Solanum chilense* e *Solanum peruvianum* (Briddon, 2015; Caro *et al.*, 2015; Lapiot *et al.*, 2015), mas as progênes permanecem suscetíveis ou sensíveis (Cooper & Jones, 1983) à invasão e infecção pelo begomovírus. Alguns genes de resistência/tolerância a TYLCV já foram descritos, entre eles aqueles denominados *Ty-1* a *Ty-6* (Zamir *et al.* 1994; Hanson *et al.* 2006; Ji *et al.* 2007; Anbinder *et al.*, 2009; Ji *et al.* 2009; Hutton *et al.* 2012; Hutton & Scott 2013). Estes genes de resistência são aqueles originados de acessos de *S. chilense* localizados em diferentes cromossomos, sendo *Ty-1* e *Ty-3* no cromossomo 6 (Verlaan *et al.*, 2011), *Ty-4* no cromossomo 3 (Ji *et al.*, 2009) e *Ty-6* no cromossomo 10 (Hutton & Scott, 2013); *Ty-2* foi introgridido de *S. habrochaites* f. *glabratum* e está localizado no cromossomo 11 (Yang *et al.* 2014); *ty-5* provavelmente de *S. peruvianum* no cromossomo 4; e *Ty-6* é derivado de LA2779 e recentemente mapeado no cromossomo 10 (Hutton & Scott 2013).

Os genes de resistência a TYLCV *Ty-1* e *Ty-3* foram caracterizados como os primeiros genes de resistência a begomovírus, e acredita-se que são as fontes de resistência mais empregadas hoje (Briddon, 2015). Entretanto, o mecanismo preciso pelo qual a resistência a TYLCV é mediada em plantas com *Ty-1/Ty-3* é pouco conhecido. Recentemente, estes genes

foram identificados e demonstrados por codificarem uma polimerase de RNA dependente de RNA ou RdRp (Verlaan *et al.*, 2013) que atua no processo de ativação do mecanismo de resistência. Os trabalhos de Butterbach *et al.* (2014) demonstram que *Ty-1/Ty-3* conferem resistência a TYLCV pelo aumento da metilação da cistosina do genoma viral, indicativo que a resistência conferida por este locus atua através do TGS.

Acredita-se que os genes *Ty-1/Ty-3* são os mais utilizados no desenvolvimento de plantas com resistência para o Brasil. Uma ampla oferta de híbridos denominados "TY" estão disponíveis no mercado e muito provavelmente contêm um ou mais genes de resistência já descritos. Em tomateiros de crescimento determinado, a oferta de híbridos com resistência a begomovírus ainda não é grande. O híbrido que ocupa a maior área plantada de tomateiro rasteiro é a cultivar Heinz-9553, que não apresenta resistência. Recentemente, foi lançado pela Embrapa um híbrido com resistência à infecção por begomovírus, a cultivar BRS Sena (QUEZADO-DUVAL *et al.*, 2014).

Epidemiologicamente, todas as cultivares desempenham em maior ou menor grau um papel como fonte de vírus na cultura devido à ausência de imunidade dos materiais disponíveis. Polston & Anderson (1997) relatam que, em geral, a resistência destas cultivares comerciais pode ser superadas quando submetida a moderadas ou altas populações de moscas-brancas virulíferas presentes no campo, e também quando a inoculação destas cultivares ocorre nas primeiras semanas da cultura no campo. Assim, o manejo adequando do vetor é um componente essencial para o uso de cultivares resistentes neste período.

Várias táticas culturais e legais referentes à remoção da cultura e períodos livres de cultivo têm diminuído satisfatoriamente a incidência de plantas infectadas por begomovirose. Períodos livres de moscas-brancas reduzem sua população e, em alguns casos, diminuem o número de vetores virulíferos (McGlashan *et al.*, 1994; Polston *et al.*, 1993). Um vazão sanitário do tomateiro foi estabelecido no Brasil em 2003 para contribuir para o controle das

epidemias de begomovirose. Atualmente, um período livre da cultura do tomateiro vem sendo realizado para todo o estado de Goiás desde 2007 entre os meses de dezembro a janeiro (60 dias), em tomateiros para processamento e em tomateiro estaqueado em poucas regiões onde o cultivo de tomateiro para indústria é importante (Agrodefesa, 2017; Bergamin Filho *et al.*, 2016; Macedo *et al.*, 2016). A implementação de um período livre de tomateiro é altamente recomendado para todas as regiões e para qualquer sistema de cultivo que deseje aumentar a eficiência deste método, mas as inspeções para fiscalizar sua implantação são difíceis em cultivos de tomate para mesa (Bergamin Filho *et al.*, 2016).

Estas práticas, entretanto, não parecem ser suficientemente eficazes a menos que utilizadas em combinação com inseticidas e cultivares resistentes. Polston & Anderson (1997) destacam também outros pontos a serem observados no manejo que são a produção de mudas de tomateiro, que devem ser realizadas em áreas distantes das áreas de cultivo de tomateiros e evitar a implantação de áreas novas de cultivo próximas a áreas velhas, ou no sentido favorável do vento em relação a essas áreas velhas, entre outras.

A indisponibilidade de estratégias de manejo mais eficientes para as begomoviroses está em parte relacionada à carência de conhecimento em relação à epidemiologia e à ecologia destas complexas doenças e estas estratégias de manejo irão basear-se em multicomponentes da natureza e compreensão básica dos elementos envolvidos nestes patossistemas (Polston & Anderson *et al.*, 1997; Moriones & Navas-Castillo, 2010).

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE INICIAL DE INÓCULO DE *TOMATO SEVERE RUGOSE VIRUS* NA TAXA DE INFECÇÃO E SEVERIDADE DE SINTOMAS EM TOMATE

INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE INICIAL DE INÓCULO DE *TOMATO SEVERE RUGOSE VIRUS* NA TAXA DE INFECÇÃO E SEVERIDADE DE SINTOMAS EM TOMATE

RESUMO

O tomateiro é prejudicado pela alta incidência de viroses, particularmente o mosaico dourado causado por espécies de begomovírus (Fam. *Geminiviridae*, gen. *Begomovirus*) em todo o mundo. No Brasil, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) é a espécie mais importante, sendo transmitida pela mosca-branca *Bemisia tabaci*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da quantidade de moscas-brancas virulíferas utilizadas para inoculação de ToSRV em tomateiro na taxa de infecção, velocidade de aparecimento de sintomas e na expressão de sintomas da virose em cultivares resistente (BRS Sena) e suscetível (Heinz-9553) de tomateiro. Os tratamentos consistiram da inoculação de cada planta com zero, um, cinco, 10, 15, 30 e 60 insetos (*B. tabaci* MEAM1 - biótipo B) virulíferos com seis plantas por tratamento e um controle negativo, com quatro repetições realizadas no tempo. As avaliações foram realizadas visualmente durante o período de 30 dias após a inoculação com intervalos médios de dois dias entre as avaliações. Concluiu-se que a taxa de infecção viral foi crescente com o aumento do número de insetos nas duas cultivares. Em Heinz-9553, a porcentagem de incidência de plantas infectadas com 60 insetos virulíferos variou entre 83 e 100% e aquelas infectadas com um inseto variaram a porcentagem entre 33 a 83%. Os valores para cinco, 10, 15 e 30 insetos foram intermediários, em média, respectivamente, de 61%, 78%, 74% e 88%. Na cultivar BRS Sena, os valores de incidência foram sempre menores que os observados para a cultivar suscetível, sendo estes em média de 14% a 57% para os tratamentos com cinco moscas-brancas à 60. Não houve plantas infectadas quando um inseto foi utilizado na inoculação. Os sintomas em plantas infectadas de BRS Sena foram tardios e leves ou sem sintomas. Os sintomas nas plantas de Heinz-9553 apresentaram-se fracos a moderados com um e cinco insetos e moderados a fortes com 10 a 60 insetos. Os dados sugerem que a quantidade de moscas-brancas virulíferas presentes na lavoura influencia a evolução da doença e a taxa de plantas infectadas.

Palavras-chave: Begomovírus, *Solanum lycopersicum*, transmissão.

INFLUENCE OF INITIAL QUANTITY INOCULUM OF *TOMATO SEVERE RUGOSE VIRUS* BY INOCULATION WITH WHITEFLIES IN THE INFECTION RATE AND SYMPTOM SEVERITY

ABSTRACT

World widely, the cultivation of tomato plants is impaired by a high incidence of virus diseases, particularly the golden mosaic caused by begomovirus species (fam. *Geminiviridae*, genus *Begomovirus*). In Brazil, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) is the most important species, being transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci*. The objective of this study was to evaluate the effect of variable quantities of viruliferous whiteflies used for inoculation of ToSRV in tomato plants on the infection rate, time for symptom appearance, and symptom expression in resistant (BRS Sena) and susceptible (Heinz-9553) tomato cultivars. The treatments consisted on the inoculation with zero, one, five, 10, 15, 30 and 60 viruliferous insects (*B. tabaci* MEAM1 - biotype B) with six plants for each treatment, and a negative control, in four replicates performed in the time. Evaluations were performed by visual observation over the 30 day period after inoculation, on average in two day intervals. It was concluded that the rate of viral infection increased with an increase in the number of insects in both cultivars. In Heinz-9553, the percentage of infected plants when using 60 viruliferous insects ranged from 83 to 100%, and those inoculated with one insect ranged from 33 to 83%. Intermediate values for five, 10, 15 and 30 insects averaged, respectively 61%, 78%, 74%, and 88%. In the cultivar BRS Sena, the infection rate was always lower than those observed in the susceptible cultivar, with an average of 14 to 57% in the treatments with 5 to 60 whiteflies. No infected plant was observed when one insect was used for inoculation. The symptoms on infected BRS Sena plants appeared later, and milder or symptomless. The symptoms in Heinz-9553 plants were weak to moderate when inoculated with one to five insects, and moderate to strong with 10 to 60 insects. The data suggest that the amount of viruliferous whiteflies present in the crop influences the disease development and the rate of infected plants.

Keywords: Begomovirus, *Solanum lycopersicum*, transmission.

2.1 INTRODUÇÃO

A tomaticultura nacional ocupa uma área de 56.880 ha, com uma produção média superior a três milhões de toneladas (IBGE, 2016). Esta cultura é uma das mais importantes sócio-economicamente no Brasil, sendo uma das hortaliças mais cultivadas. O Brasil figura entre os dez maiores produtores mundiais. Produz-se tomate na maioria dos estados brasileiros, com destaque para os estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo, que juntos somam mais da metade da produção nacional (FAO, 2017; IBGE, 2016).

Dentre as inúmeras doenças que acometem o tomateiro, as viroses figuram entre as mais importantes e aquelas ocasionadas pelos begomovírus atualmente apresentam a maior relevância pela maior incidência, existindo relatos de perdas de até 100% em lavouras (Macedo *et al.*, 2014; Briddon, 2015). As espécies de vírus do gênero *Begomovirus*, classificadas na família *Geminiviridae*, possuem genoma de fita simples de DNA circular monopartido ou bipartido (Briddon & Stanley, 2006). Estas espécies virais são transmitidas pelo inseto vetor mosca-banca (*Bemisia tabaci*) em uma relação do tipo persistente (Ghanim, 2001, 2014).

No Brasil são relatadas mais de 17 espécies de begomovírus infectando o tomateiro, no entanto, duas são as predominantemente observadas, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) (Fernandes *et al.*, 2008). Entre os sintomas característicos da doença os mais comumente observados são mosaico, clareamento das nervuras, manchas cloróticas, clorose internerval, rugosidade, deformação foliar e nanismo (Polston & Anderson, 1997; Macedo *et al.*, 2014; Bergamin Filho *et al.*, 2016).

A seleção e desenvolvimento de cultivares resistentes a vírus é um dos principais esforços de virologistas e melhoristas de plantas (Morales & Bos, 1988; Morales, 2001). As pesquisas por fontes de resistência a begomovírus são frequentemente consideradas como experiências demoradas e frustrantes, principalmente pela raridade de imunidade para

begomovírus em *Solanum lycopersicum* L. (Mazyad *et al.*, 1982; Morales, 2001; Moriones & Navas-Castillo, 2010).

Várias estratégias de manejo são empregadas para o controle destas viroses, mas nenhuma é eficiente quando utilizada isoladamente. Os principais pontos a serem observados na aplicação do manejo são a redução das populações de moscas-brancas e a redução das fontes de inóculo nas áreas cultiváveis (Seal *et al.*, 2006; Moriones & Navas-Castillo, 2010; Luan *et al.*, 2014; Bergamin Filho *et al.*, 2016). Poucas estratégias estão disponíveis para o manejo de begomovirose com base no vetor, em parte, isso se deve à carência de conhecimento em relação à interação vírus-vetor-planta, à epidemiologia destas doenças e aos múltiplos elementos envolvidos nestes patossistemas (Polston & Anderson, 1997; Luan *et al.*, 2014; Mahatma *et al.*, 2016).

A relação das epidemias causadas por espécies de begomovírus com o número de vetores virulíferos e idade de infecção da planta hospedeira é pouco estudada. No entanto, a severidade e a evolução da doença podem estar intimamente relacionadas com diferentes níveis populacionais de mosca-branca virulíferas no campo. Sobre uma visão epidemiológica, a adequada compreensão do evento da inoculação do vírus apresenta importante papel no desenvolvimento de formas de manejo eficientes para o controle da doença.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes níveis de inóculo inicial de ToSRV sobre tomateiros resistente e suscetível no desenvolvimento de epidemias de ToSRV.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Isolado de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV)

O isolado viral utilizado no estudo foi um clone de *Tomato severe rugose virus* mantido na coleção de vírus do Laboratório de Virologia da Embrapa Hortaliças, no Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças (CNPH). Utilizou-se o isolado de ToSRV proveniente do clone infeccioso 1164-ToSRV (Macedo *et al.*, 2015).

2.2.2 Criação de moscas-brancas (*B. tabaci*) biótipo B

As populações de moscas-brancas biótipo B utilizadas no estudo foram oriundas da criação de *B. tabaci* biótipo B mantida na unidade da Embrapa Hortaliças (Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças - CNPH). Os insetos são mantidos em casa de vegetação em plantas de couve (*Brassica oleraceae* var. *acephala*) e pepino (*Cucumis sativus*), espécies sabidamente não hospedeiras de begomovírus de tomateiro.

2.2.3 Manutenção do clone 1164-TosRV em plantas fontes

O isolado de ToSRV é mantido *in planta* pela infecção sucessiva de plantas de tomate suscetível via transmissão por vetor e denominadas “plantas fontes”. Essas plantas são utilizadas para o período de acesso de aquisição do vírus pelas moscas-brancas que subsequentemente realizarão o período de acesso de inoculação do vírus em plantas saudáveis.

A produção de “plantas fontes” para montagem dos ensaios seguiu um cronograma de realização baseado no estágio fenológico do tomate, onde estes foram inoculados aos 20 a 25 dias após a germinação, com o objetivo de utilizar plantas jovens, recém-inoculadas e com expressiva expressão de sintomas da virose entre os 15 a 20 dias após a inoculação. As

plantas-fonte foram regularmente avaliadas via PCR para confirmar a infecção por ToSRV, como descrito abaixo.

2.2.4 Extração de DNA total e confirmação da presença de ToSRV por PCR

Para utilização do DNA total das amostras de plantas dos ensaios na reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram retirados aproximadamente 100 mg de tecido foliar das plantas fontes e extraídos usando o método CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide), conforme Doyle & Doyle (1991), com algumas adaptações. Esse material coletado foi macerado em tubos de microcentrífugas de 1,5 mL com pistilo plástico e adição de nitrogênio líquido para auxiliar na maceração, foram então adicionados 750 µL do tampão CTAB (2% CTAB, 100 mM de Tris-HCl/pH 8, 20 mM de EDTA e 50 mM de NaCl) mais 0,2% de β-mercaptoetanol para redução da oxidação do material durante o processo de extração. Posteriormente as amostras foram incubadas a 65°C por 15 min e em seguida adicionou-se 750 µL de clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico - 24:1) às mesmas. Os tubos foram vigorosamente agitados e centrifugados por 10 min a 10.000 rpm. Após a centrifugação uma fase sobrenadante de aproximadamente 600 µL foi formada e em seguida transferida para um novo microtubo de 1,5 mL onde foi adicionado o isopropanol no mesmo volume do sobrenadante coletado. Os tubos foram agitados levemente para homogeneização e mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos para precipitação do DNA e, então, centrifugados por 10 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* (DNA total condensado) foi lavado com 400 µL de etanol 70% gelado a 13.000 rpm por 5 min. Após as lavagens, o *pellet* foi seco em temperatura ambiente por 30 min e ressuspendido com 200 µL de água Milli-Q autoclavada. Os tubos, contendo o DNA total extraído, foram identificados e armazenados a -20°C para as análises posteriores.

Para confirmação das infecções por ToSRV das plantas fontes utilizadas na montagem dos ensaios, foram realizadas reações de PCR usando *primers* degenerados universais para begomovírus: pAL1v1978 e pAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993). A técnica consiste em amplificar

um fragmento do DNA alvo várias vezes, quando presente, em uma amostra de DNA total extraído de material vegetal, como descrito anteriormente, sob estudo. As etapas da reação compreendem a desnaturação, o anelamento e a amplificação. Sendo que cada reação de PCR foi realizada em um volume final de 10 μL , contendo 1 μL de DNA total, 1 μL de tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (10X, Invitrogen), 0,8 μL de MgCl_2 (50 mM, Invitrogen), 0,4 μL de dNTP's (2,5 mM cada, GE Healthcare), 0,1 μL de cada *primer* (10 μM), 0,1 μL da enzima *Taq* DNA polimerase (5 U/ μL , Invitrogen) e 6,5 μL de água. Em seguida essa solução é homogeneizada e colocada em termociclador com a programação específica para os *primers* utilizados, neste caso iniciando com uma temperatura de 94°C por 5 min e em seguida 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente correspondendo as condições de 94°C por 30 seg, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min e 30 seg, finalizando a reação com temperatura de 72°C por 5 min. Os produtos da amplificação do DNA-alvo pela PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% com solução de Tris-borato-EDTA (TBE, 0,5X). Para comparação dos tamanhos estimados dos fragmentos da amplificação foi usado o marcador molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

2.2.5 Produção de mudas de tomateiro para condução dos ensaios

O estudo realizado foi conduzido em cultivares de tomate suscetível e resistente, respectivamente, Heinz-9553 e BRS Sena. As mudas foram produzidas em casa de vegetação no CNPH e mantidas livres de moscas-brancas até o momento da montagem do experimento, entre os 20 a 25 dias após o semeio, quando as plantas apresentavam duas a três folhas verdadeiras. Neste período, as mudas foram transplantadas para vasos de 1,5 kg.

2.2.6 Aquisição e inoculação do isolado viral de ToSRV

O período de acesso de aquisição de ToSRV foi de 48 horas para todos os ensaios realizados. A aquisição consistiu do confinamento de moscas-brancas obtidas do criatório de *B. tabaci* biótipo B do CNPH em plantas saudáveis (sem a presença de vírus, avirulíferas) em tubos de polietileno de 50 mL, contendo um folíolo, proveniente das “plantas fontes” do vírus, em suporte de meio ágar-água (Fig. 1A). Em média foram transferidas para cada tubo uma quantidade de 200 insetos. As moscas-brancas foram coletadas com o auxílio de um sugador acoplado com uma ventoinha com pressão negativa (Fig. 1B) para captura dos insetos do criatório e, posteriormente, os mesmos foram transferidos para os tubos onde passaram pelo período de acesso de aquisição. Decorrido esse período, as moscas-brancas foram coletadas com o auxílio de um sugador manual (Fig. 1C) e transferidas em número exato para as mudas de tomateiro e confinadas pelo período de 48 horas para o acesso à inoculação (Fig. 1E). O confinamento foi realizado em copos plásticos de 500 mL com o fundo cortado e substituído por tecido organza e colocados de forma invertida sobre os vasos (Fig. 1D).

Após o período de acesso à inoculação, as moscas-brancas e suas possíveis ninfas e ovos foram eliminadas das plantas com a aplicação de inseticida sistêmico (Thiamethoxam – neonicotinóide - Actara 250 WG) e de contato (Piriproxifem – Éter piridiloxipropílico – Tiger 100 EC) e com eliminação mecânica. As plantas foram então mantidas em câmara de crescimento (25°C +/- 2 e 12 horas de luz e escuro) por um período de 7 a 10 dias e posteriormente transportadas para estufa e distribuídas em compartimentos preparados com tecido de organza para cada tratamento composto por 6 repetições com uma planta cada.

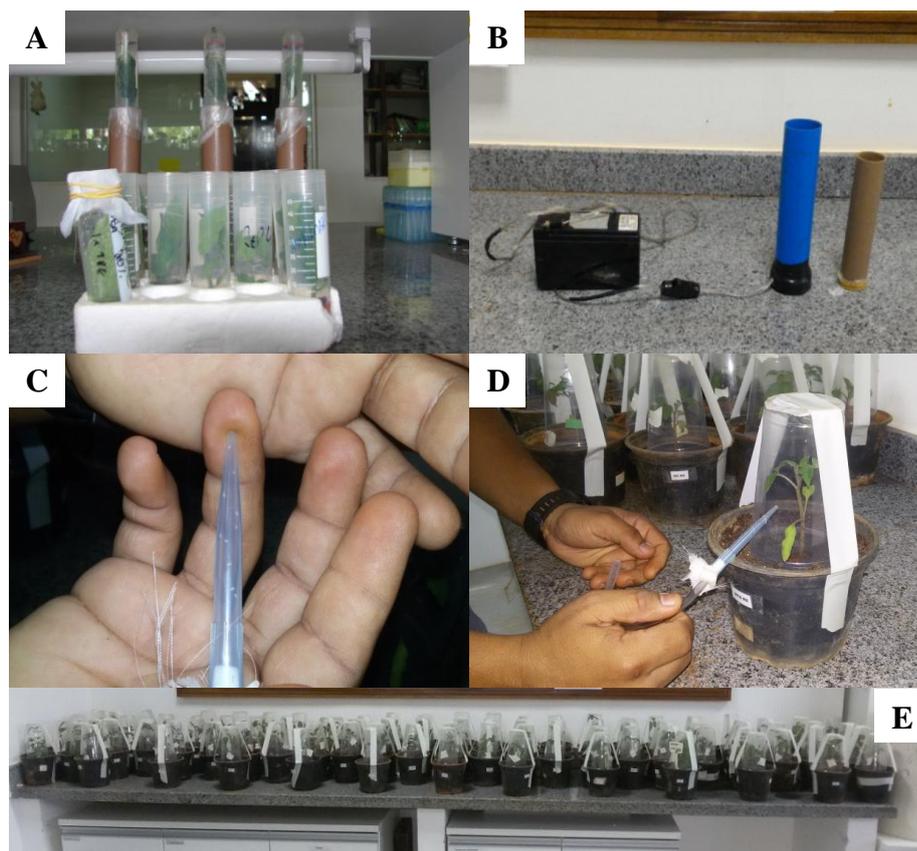


Figura 1. Modelo esquemático dos procedimentos realizados para realização das etapas de acesso a aquisição e inoculação do vírus ToSRV em cultivar suscetível (Heinz-9553) e resistente (BRS Sena). Inicialmente folíolos de “plantas fontes” de ToSRV foram fixados em meio ágar-água solidificado em tubos de polietileno de 50 mL e adicionada moscas-brancas para a aquisição viral (A); as moscas-brancas foram coletadas com auxílio de um sugador com pressão negativa de vento (B); após o período de aquisição, as moscas-brancas foram coletadas com sugador manual em número exato para cada tratamento (C) e transferidas para as plantas protegidas com copos plásticos em seus respectivos tratamentos, (D); após essa transferência as moscas-brancas foram deixadas pelo período de inoculação de 48 horas (E).

2.2.7 Validação da escala de notas dos sintomas de infecção por ToSRV em tomateiro

A avaliação dos sintomas foi realizada de modo visual em uma escala própria desenvolvida em ensaios preliminares. Essa escala consiste de notas de 0 a 3 (Fig. 2), sendo: 0 – plantas sem presença de sintomas; 1 - plantas com sintomas fracos e pouco visíveis de clareamento de nervuras, suaves manchas cloróticas internervais; 2 – plantas com sintomas moderados, onde mais de duas folhas verdadeiras apresentam sintomas claros da virose, como manchas cloróticas, clorose internerval e rugosidade; 3 – plantas com sintomas fortes da virose distribuídos por toda a planta, que apresenta nanismo.

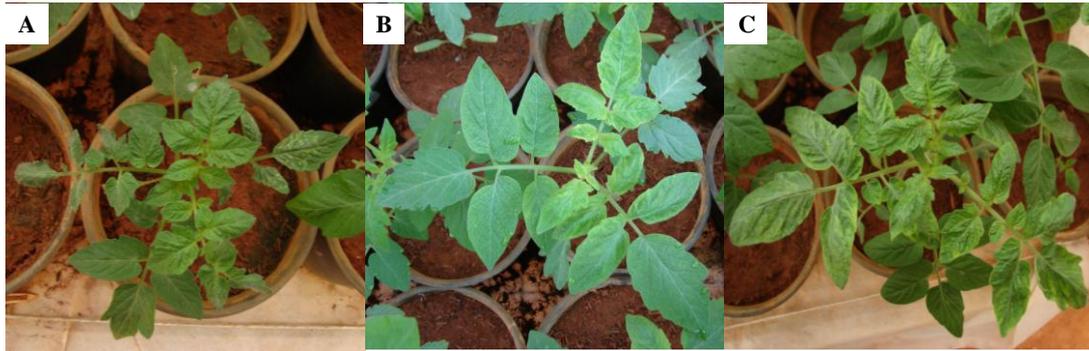


Figura 2. Representação visual das notas de severidade da infecção por ToSRV em tomateiro suscetível (Heinz-9553). Nota 1 (A): sintoma inicial nas plantas infectadas por ToSRV, caracterizado pelo clareamento das nervuras foliares em alguns folíolos das folhas mais velhas, seguido por clorose internerval suave em alguns folíolos, normalmente na mesma folha com sintoma inicial; Nota 2 (B): aparecimento de clorose internerval suave em folíolos de outras folhas e maior intensidade da clorose em folhas já sintomáticas, acompanhado de início de enrugamento foliar, aparecimento de manchas cloróticas e deformação foliar. Nota 3 (C): sintomas característicos da virose espalhados por todas as folhas das plantas, do ápice a base, sendo observado maior intensidade de clorose nas folhas intermediárias, acompanhada de rugosidade e deformação foliar principalmente nas folhas mais jovens.

Esses estudos preliminares foram realizados para a calibração visual dos sintomas por infecção de ToSRV em tomateiros suscetíveis Heinz-9553 e resistente BRS Sena. Após a inoculação das plantas com o vírus, estas foram observadas diariamente e avaliadas inicialmente para os sintomas expressos gradativamente até 30 dias após a inoculação. Ao fim das avaliações preliminares as plantas foram submetidas a teste de detecção por PCR com *primers* específicos para begomovírus, confirmando em todos os casos a correlação entre a percepção dos sintomas da virose e a detecção do vírus.

2.2.8 Efeito da quantidade de inóculo inicial do ToSRV em função de diferentes quantidades de *Bemisia tabaci* virulíferas sobre plantas de tomateiro

Para avaliar o efeito da quantidade de inóculo inicial nas plantas de tomateiro, foram utilizadas diferentes quantidades de mosca-branca virulíferas, sendo os tratamentos constituídos de zero, uma, cinco, 10, 15, 30 e 60 moscas-brancas para cada uma das cultivares avaliadas, Heinz-9553 e BRS Sena. Como controles negativos foram utilizadas plantas sadias confinadas com moscas-brancas avirulíferas para ambas as cultivares com os mesmos tratamentos descritos anteriormente. Ao total, foram avaliados seis tratamentos e um controle

negativo, sendo uma planta para cada tratamento, em um total de 6 repetições. O delineamento experimental utilizado foi de blocos inteiramente casualizados. Após o período de acesso de inoculação as moscas-brancas foram eliminadas e as plantas mantidas como descrito anteriormente, para avaliação de sintomas.

2.2.9 Análise estatística

Para avaliação dos dados obtidos no ensaio com diferentes quantidades de inóculo inicial (0, 1, 5, 10, 15, 30 e 60) em cultivar suscetível e resistente foi adotado o delineamento experimental em blocos casualizados (DBC) com 6 (seis) repetições utilizando moscas-brancas virulíferas e 1 (uma) com moscas-brancas avirulíferas, um controle interno, a parcela experimental da repetição foi de uma planta. Foram avaliadas a incidência e a severidade dos sintomas da virose ocasionada por ToSRV após a inoculação do vírus. As avaliações foram realizadas dos 7 (sete) dias após a inoculação (DAI) até os 30 DAI. Para maior confiabilidade dos dados levantados quatro ensaios foram realizados em épocas diferentes nas datas: 29/02, 23/08, 11/09 e 31/10, que respectivamente correspondem aos ensaios 1, 2, 3 e 4, todos realizados no ano de 2016. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F (Fisher) a 5% ($p = 0,05$) de significância no programa SISVAR 5.3, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade de erro.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Validação da escala de notas dos sintomas de ToSRV em tomateiro

Durante o desenvolvimento dos ensaios preliminares realizados, um dos objetivos foi adquirir a habilidade visual necessária para avaliação dos sintomas da virose ocasionada por ToSRV em plantas de tomateiro suscetível e resistente. Foram observadas variações nos

sintomas diante de alguns fatores relacionados à quantidade de moscas-bancas virulíferas inoculando o vírus, a idade das plantas no momento da inoculação, a cultivar sendo inoculada com o vírus e o estado nutricional da planta no momento da inoculação e durante o desenvolvimento da doença.

Em geral, os sintomas iniciais foram caracterizados pela presença de clareamento das nervuras de folíolos em folhas mais velhas (Fig. 3A), observados nos primeiros 7 a 10 dias após a inoculação com ToSRV. Essa característica parece sofrer muito a influência da quantidade de inóculo inicial, quantidade de moscas-brancas virulíferas, e da idade das plantas inoculadas. Outro sintoma caracterizado como inicial foi o aparecimento de uma clorose internerval suave (Fig. 3C) nas folhas mais velhas (folhas novas no momento da inoculação), que evolui com o tempo para uma coloração mais visível das nervuras foliares que no geral se mesclam com a clorose internerval (Fig. 3B). Normalmente este sintoma se desenvolve posteriormente ao clareamento de nervuras. Entretanto, como é difícil a percepção deste primeiro sintoma em plantas recém-transplantadas, por vezes tem-se a impressão que essas características ocorrem simultaneamente. A esses sintomas descritos acima foi atribuído uma nota inicial de valor 1 na qual esses sintomas continuam a evoluir em intensidade. Quando o aumento dos sintomas ocorre em relação a sua dispersão na planta, ou seja, os sintomas difundem-se para outras folhas, passou-se a atribuir uma nota 2 (Fig. 3D-F). Essa segunda nota possui uma abrangência muito maior quanto aos sintomas que são observados durante o desenvolvimento da doença, sendo característica do estágio em que a doença ocasionada pelo ToSRV inicia a sua expressão sistêmica na planta. Uma clorose internerval mais intensa em vários folíolos de folhas diferentes da planta é detectável, sendo seguida pela presença de mosaico, rugosidade foliar e possível deformação foliar. A planta mesmo neste estágio de infecção ainda conserva seu meristema livre do vírus e assim as folhas mais novas sem expressão de sintomas da doença. O momento em que essa barreira entre o

desenvolvimento apical da planta e a multiplicação viral é quebrada, inicia-se a atribuição da nota 3 (Fig. 3G-I) aos sintomas observados. Estes são determinados pela presença de sintomas para nota 2 em toda ou grande parte da planta, caracterizados por rugosidade e clorose mais intensas, e a presença de mancha clorótica em folhas muito jovens, geralmente nas bordas das mesmas. Uma característica pouco observada neste ensaio, mas típica dessa nota, é a redução no desenvolvimento da planta, uma estagnação no seu crescimento, que caracteriza a situação de nanismo ou enfezamento.

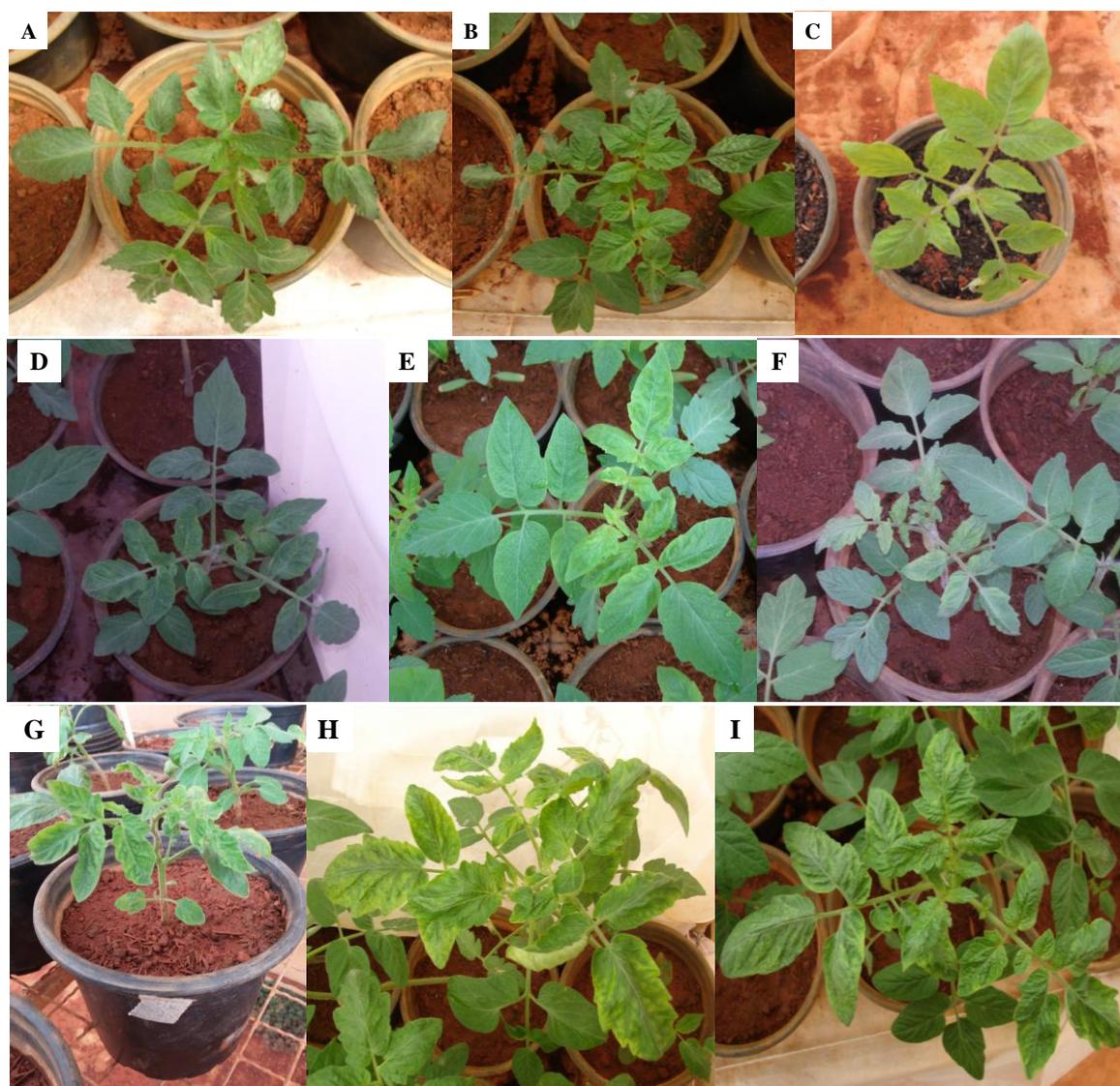


Figura 3. Sintomas característicos da escala de notas desenvolvida para avaliação das plantas de tomate infectadas com ToSRV nos ensaios desenvolvidos durante a realização dos trabalhos de efeito da pressão de inóculo e das idades de mudas na inoculação sobre a infecção por ToSRV. A-C: plantas em que foi atribuída nota 1, D-F: notas 2; e G-I: nota 3.

A baixa ocorrência desse sintoma nos ensaios é atribuída ao tempo curto das avaliações dos sintomas (30 DAI). Entretanto, sob alta pressão de moscas-brancas virulíferas algumas plantas reduziram fortemente seu crescimento (Fig. 4A e B).

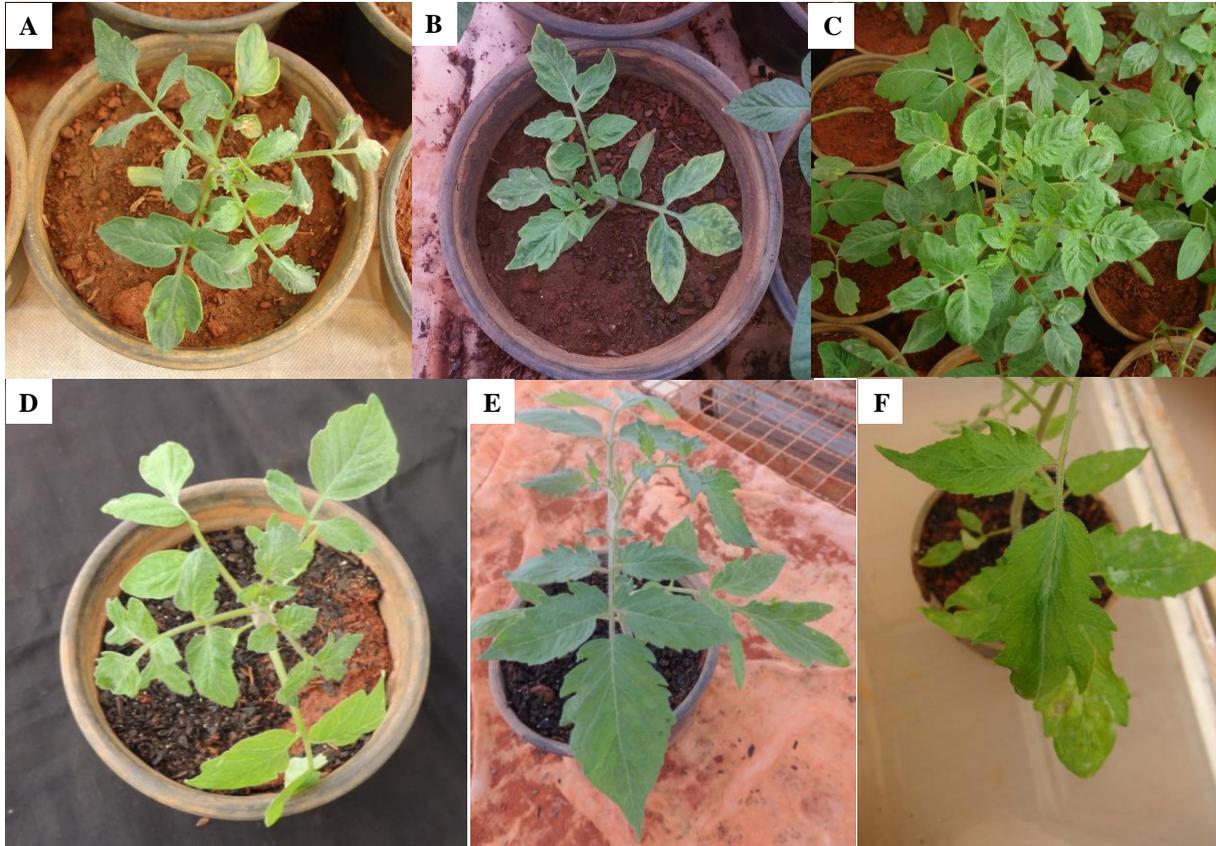


Figura 4. Alguns sintomas atípicos observados nas plantas inoculadas com ToSRV durante o desenvolvimento dos ensaios (A-D) e em cultivar resistente BRS Sena (E-F).

As observações de sintomas na cultivar resistente BRS Sena foram realizadas ao mesmo tempo em que na cultivar suscetível, mas todas as plantas sintomáticas nesta cultivar apresentaram nota 1 e em poucos casos nota 2 inicial (Fig. 4E e F). É importante destacar que a expressão dos sintomas na cultivar resistente aconteceu em sua maioria apenas sobre alta pressão de moscas-brancas virulíferas (≥ 30 insetos) e iniciaram entre o 11° e 20° DAI, sempre com a maior população de vetores virulíferos propiciando os primeiros sintomas.

2.3.2 Influência da quantidade de inóculo de ToSRV por moscas-brancas na incidência da virose

Nas avaliações do efeito de diferentes pressões de inóculo (0, 1, 5, 10, 15, 30 e 60 moscas-brancas por planta) de ToSRV sobre cultivar suscetível e resistente realizada nas quatro repetições do ensaio, foi observado que as maiores populações do vetor resultaram nos maiores valores de incidência (Fig. 5-8).

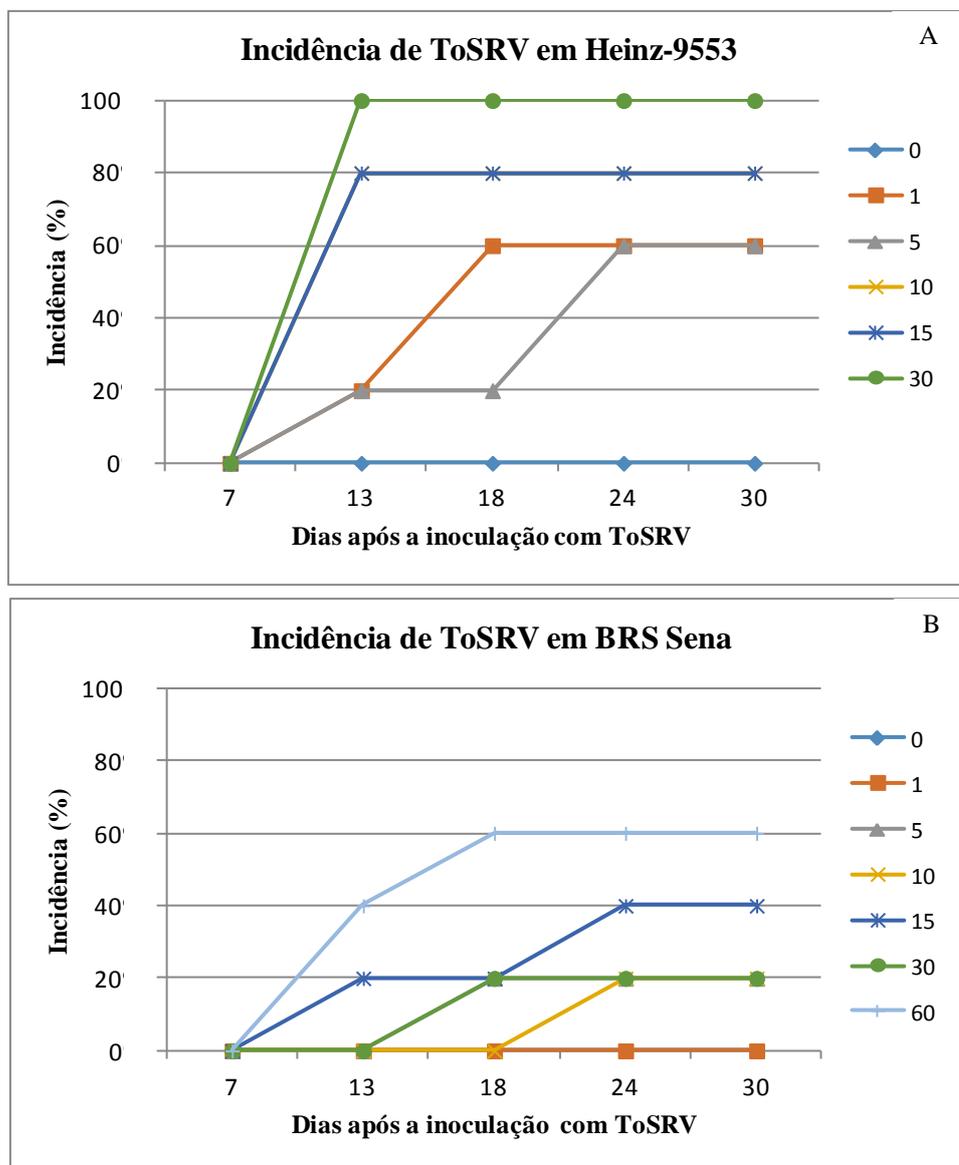


Figura 5. Incidência de ToSRV em cultivar suscetível (a) e resistente (b) no ensaio 1 com diferentes níveis de inóculo inicial.

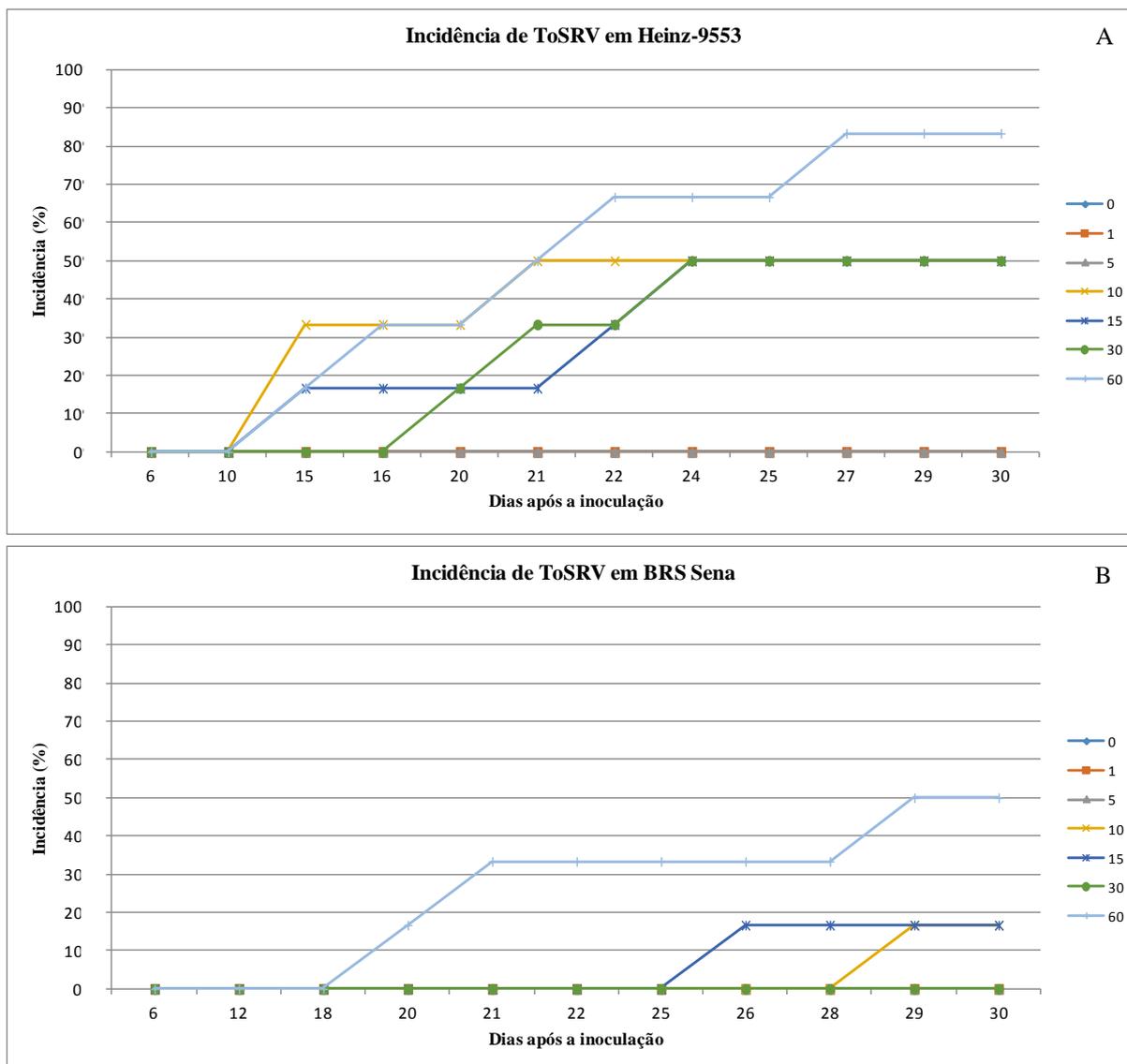
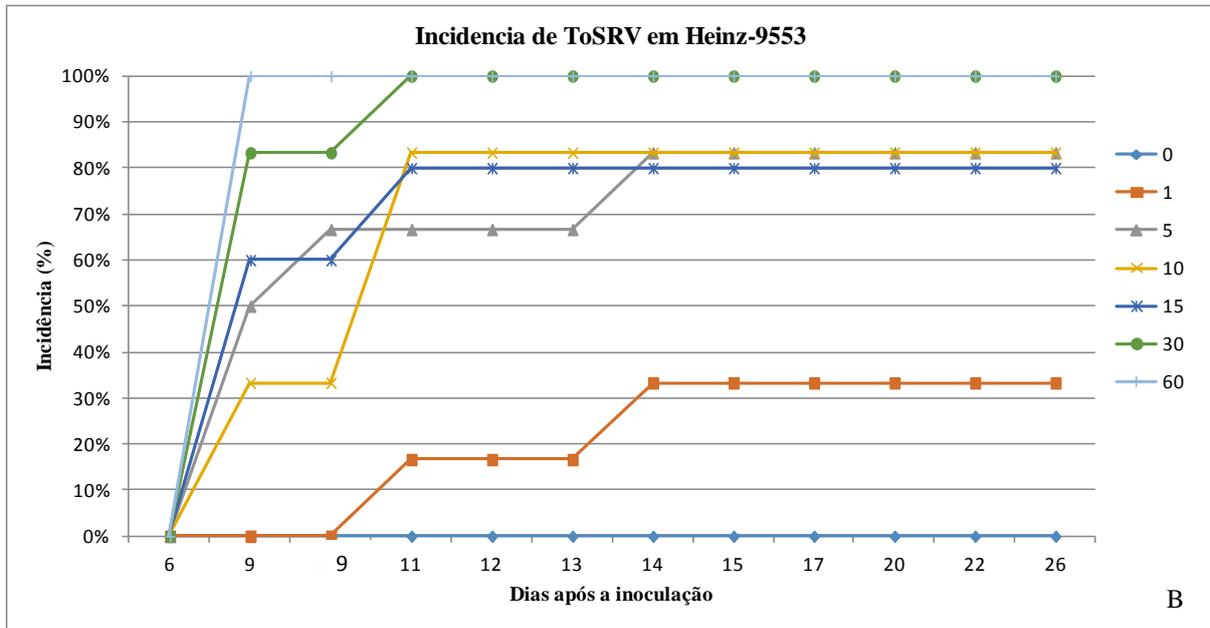


Figura 6. Incidência de ToSRV em cultivar suscetível (a) e resistente (b) no ensaio 2 com diferentes níveis de inóculo inicial.

A



B

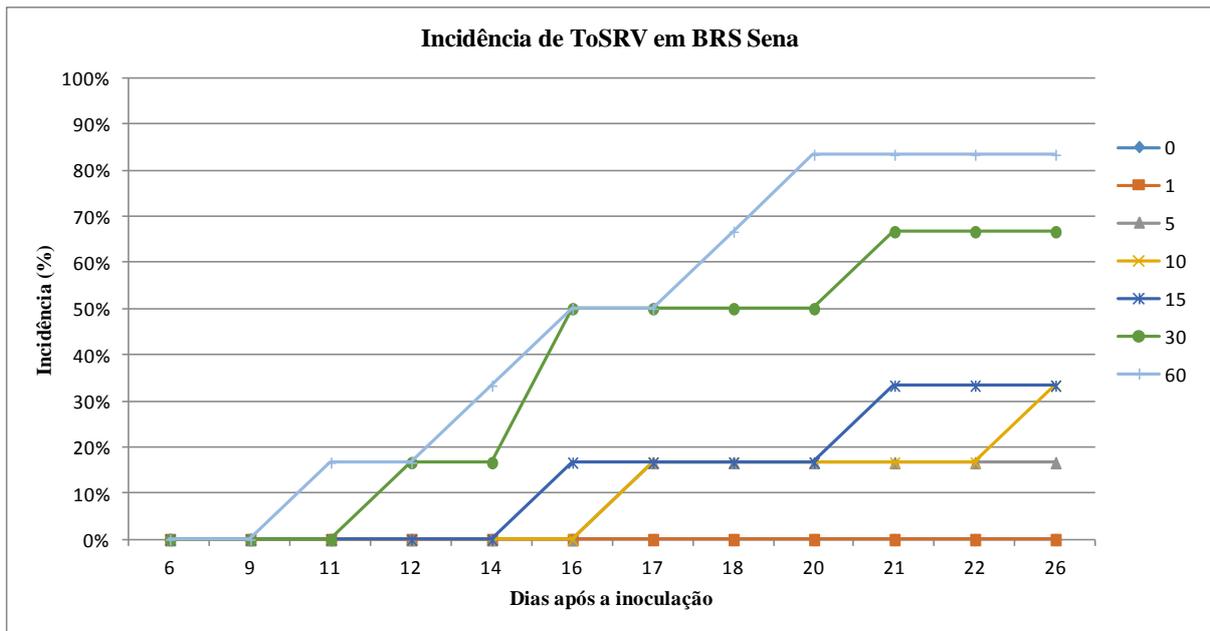


Figura 7. Incidência de ToSRV em cultivar suscetível (a) e resistente (b) no ensaio 3 com diferentes níveis de inóculo inicial.

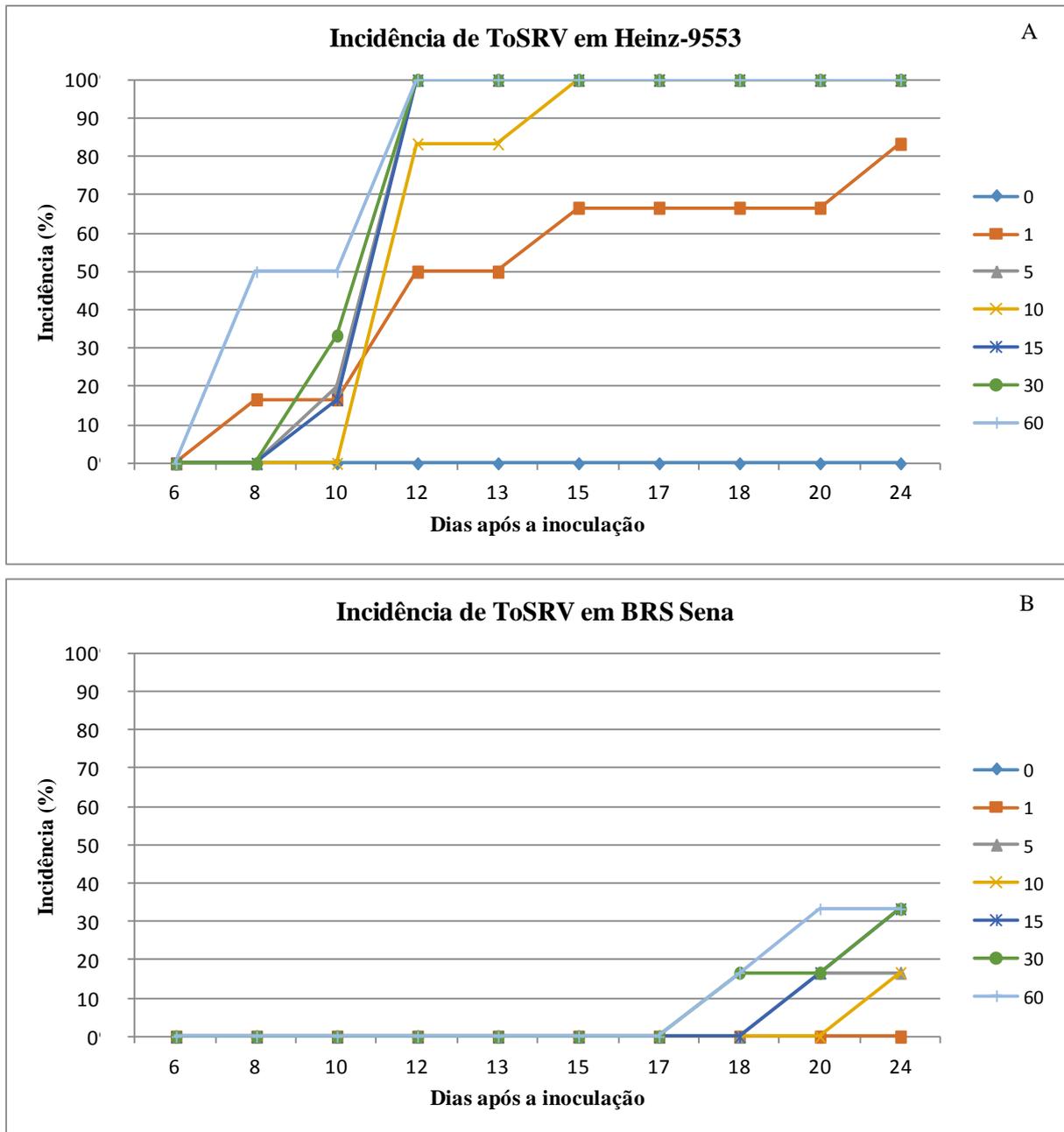


Figura 8. Incidência de ToSRV em cultivar suscetível (a) e resistente (b) no ensaio 4 com diferentes níveis de inóculo inicial.

Na repetição 3 do ensaio, a avaliação estatística dos tratamentos das cultivares suscetível e resistente agrupou os valores significativamente diferentes em dois grupos, sendo grupo I com um indivíduo por planta na cultivar suscetível e o grupo II, com 5 a 60 vetores, na cultivar resistente o grupo I foi composto pelos tratamentos com 1 a 15 e o grupo II pelos tratamentos com 30 e 60 insetos. Os valores de incidência médios foram de 33% para o grupo I e de 67% a 100% para o grupo II na cultivar Heinz-9553, e foram de 17% a 33% para o grupo I e de 67% e 83% para o grupo II na cultivar BRS Sena, todos os dados são valores das avaliações finais. Entretanto, no desdobramento dos tratamentos dentro das cultivares, aqueles com 5 a 60 moscas-brancas foram significativamente iguais entre eles na cultivar suscetível e não houve diferença significativa entre uma mosca-branca e o tratamento controle, mesmo sendo observados valores médios de 33% neste tratamento.

Na cultivar com resistência, foi observada nesta repetição uma diferença significativa entre os tratamentos com 30 e 60 moscas-brancas (67% a 83% de incidência), sendo os demais tratamentos significativamente iguais à testemunha. Entretanto, mesmo não havendo diferença significativa, os tratamentos 5, 10 e 15 apresentaram valores de 17%, 33% e 33%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de plantas de tomateiro infectadas com *Tomato severe rugose vírus* (ToSRV) em cultivar suscetível (S) e resistente (R) submetidas a diferentes quantidades de inóculo inicial em quatro repetições do ensaio no tempo.

Número de insetos	Rep 1		Rep 2		Rep 3		Rep 4		Valores médios	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
0	0Aa	0Aa	0Aa	0Aa	0Aa	0Aa	0Aa	0Aa	0	0
1	60Bb	0Aa	0Aa	0Aa	33Aa	0Aa	83Bb	0Aa	44	0
5	60Ba	20Aa	0Aa	0Aa	83Bb	17Aa	100Bb	17Aa	61	14
10	80Bb	0Aa	50Ba	17Aa	83Bb	33Aa	100Bb	17Aa	78	17
15	80Ba	40Aa	50Ba	17Aa	67Ba	33Aa	100Bb	33Aa	74	31
30	100Bb	20Aa	50Bb	0Aa	100Ba	67Bba	100Bb	33Aaa	88	25
60	100Ba	60Aa	83Bb	50Aa	100Ba	83Ba	100Bb	33Aa	96	57

*Médias seguidas por mesma letra diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) entre as quantidades de moscas-brancas (letras maiúsculas) e as cultivares (letras minúsculas).

O desdobramento dos tratamentos dentro das cultivares da repetição 4 do ensaio mostrou que todas as quantidades de moscas-brancas resultaram em valores de incidência

significativamente diferentes do controle, com valores médios finais de incidência iguais a 83% (1 vetor) e 100% (5, 10, 15, 30 e 60 vetores). Quanto à cultivar com resistência, mesmo sendo observado incidência com valores médios de 17% (5 e 10 vetores) e 33% (15, 30 e 60 vetores) não houve diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha.

Quanto aos valores de porcentagem de incidência, os tratamentos com as menores populações de vetor (1 e 5) corresponderam às menores médias de incidência nas quatro repetições do ensaio. Com valores variando entre 33% a 100% na cultivar suscetível e abaixo de 21% na resistente inoculada com 5 vetores. Nessa cultivar resistente, não houve ocorrência de planta com sintomas com um único vetor para nenhuma das repetições do ensaio. Na segunda repetição do ensaio nas menores populações de vetor (1 e 5) não houve presença de plantas com sintomas em nenhuma das cultivares suscetível e resistente.

As populações de 10, 15 e 30 vetores variaram as porcentagens de incidência entre 50,0 a 100,0% na cultivar suscetível e 0,0 a 67,0% na resistente nas quatro repetições do ensaio. Os tratamentos com 60 moscas-brancas alcançaram 100% de incidência na cultivar suscetível independente do valor inicial observado, com exceção da repetição dois do ensaio onde o valor máximo para 60 vetores foi de 83%. Da mesma forma, para a cultivar resistente as porcentagens de incidência com 60 vetores foram as maiores (Tabela 1).

Observando o progresso da doença para os distintos tratamentos no tempo, uma variação nas quatro repetições do ensaio foi verificada. Claramente, nas duas cultivares, o tratamento com 60 moscas-brancas estava entre os primeiros a apresentarem plantas sintomáticas (Fig. 5-8). Quanto aos demais tratamentos, aqueles com 10, 15 e 30 moscas-brancas foram os primeiros a apresentar os sintomas da doença em cultivares suscetível e resistente na primeira e terceira repetição. Na segunda repetição (Fig. 6A) os tratamentos com 10 e 15 vetores expressaram os sintomas ao mesmo tempo em que o com 60 vetores em Heinz-9553. Enquanto na quarta repetição (Fig. 8) as populações com 1 e 60 vetores

apresentaram sintomas ao mesmo tempo em cultivar suscetível e os tratamento com 30 (17,0%) e 60 (17,0%) moscas-brancas na resistente.

As quatro repetições do ensaio apresentaram variações em relação ao aparecimento dos primeiros sintomas. A terceira e quarta repetição (Fig. 7 e 8) apresentaram a mais rápida expressão de sintomas, respectivamente, aos 9 e 8 dias após a inoculação (DAI). Na terceira repetição os tratamentos com 5, 10, 15, 30 e 60 moscas-brancas foram os primeiros na cultivar suscetível e a partir do 11 DAI no tratamento com 60 moscas-brancas na cultivar resistente (Fig. 7A e B). Na repetição quatro do ensaio foi observado algo inesperado, as plantas inoculadas com um vetor expressaram sintomas ao mesmo tempo que aquelas plantas inoculadas com 60 vetores na cultivar suscetível (Fig. 8A), sendo estes tratamentos os que expressaram mais rapidamente os sintomas da doença. Na cultivar resistente desta repetição os sintomas só foram visíveis aos 18 DAI nos tratamentos com 30 e 60 vetores. As demais repetições do ensaio apresentaram a primeira expressão de sintomas da virose para o tratamento com 60 vetores entre o 13° a 15° DAI na cultivar suscetível e 17° a 20° DAI na cultivar resistente (Fig. 5-7). Em todos os casos, as plantas inoculadas com apenas um indivíduo não exibiram sintomas na cultivar resistente e foram as últimas a expressar a doença em plantas suscetíveis, quando esta foi expressa, apareceu entre o 11° e 13° DAI, com exceção para a repetição 4 do ensaio em que os sintomas foram observados aos 8 DAI.

2.3.3 Influência da quantidade de inóculo inicial de ToSRV na severidade da virose

Os dados de severidade da virose ocasionada por ToSRV com diferentes quantidades de moscas-brancas representando pressões de inóculo são apresentados a seguir (Tabela 2) e demonstram a mesma tendência observada para a incidência, quanto maior a população de vetores virulíferos maior a severidade dos sintomas expressos.

Tabela 2. Notas de severidade de sintomas em plantas de tomateiro infectadas com *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em cultivar suscetível (S) e resistente (R) submetidas a diferentes pressões de inóculos em quatro repetições do ensaio no tempo aos 30 dias após a inoculação.

Número de insetos	Rep 1		Rep 2		Rep 3		Rep 4		Valores médios	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
0	0,0Aa	0,0	0,0							
1	1,4Aa	0,0Aa	0,0Aa	0,0Aa	0,7Aa	0,0Aa	1,5Bb	0,0Aa	0,9	0,0
5	1,2Aa	0,0Aa	0,0Aa	0,0Aa	2,0Bb	0,2Aa	2,0Bb	0,2Aa	1,3	0,1
10	2,2Bb	0,0Aa	0,7Ba	0,2Aa	2,0Bb	0,3Aa	1,8Bb	0,2Aa	1,7	0,2
15	2,2Bb	0,2Aa	0,5Ba	0,2Aa	1,5Ba	0,5Aa	2,0Bb	0,3Aa	1,6	0,3
30	2,4Bb	0,6Aa	0,7Bb	0,0Aa	2,5Bb	0,7Aa	2,0Bb	0,3Aa	1,9	0,4
60	2,8Bb	0,8Aa	1,5Cb	0,8Aa	2,7Bb	1,3Ba	2,0Bb	0,3Aa	2,2	0,8

* As notas correspondem à média de seis plantas da escala de severidade de 0 a 3, sendo: 0 – plantas sem presença de sintomas; 1 - plantas com sintomas fracos e pouco visíveis de clareamento de nervuras, suaves manchas cloróticas internervais; 2 – plantas com sintomas moderados, onde mais de duas folhas verdadeiras apresentam sintomas claros da virose, como manchas cloróticas, clorose internerval e rugosidade; 3 – plantas com sintomas fortes da virose distribuídos por toda a planta com presença de nanismo.

**Médias seguidas por mesma letra diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) entre as quantidades de moscas-brancas (letras maiúsculas) e as cultivares (letras minúsculas).

Todos os tratamentos com 10 a 60 indivíduos de *B. tabaci* na cultivar suscetível foram significativamente diferentes da testemunha nas quatro repetições do ensaio (Tabela 2). Apenas na repetição quatro dos ensaios o tratamento com um vetor foi significativamente diferente da testemunha, e o tratamento com 5 vetores diferiu da testemunha nesta repetição e na terceira. Nas repetições 1 e 2 os tratamentos com 1 e 5 moscas-brancas não foram significativamente diferentes da testemunha sem mosca-branca, apesar de na primeira repetição do ensaio apresentar notas próximas a 1,5. Na cultivar resistente apenas na terceira repetição do ensaio houve diferença significativa no tratamento com 60 moscas-brancas. Para as outras repetições do ensaio nenhum dos tratamentos diferiu significativamente da testemunha, mas foram observadas notas próximas variando entre 0,3 a 1,3 para o tratamento com a maior população de vetor (Tabela 2).

O progresso da doença observado nas quatro repetições destacou o tratamento com 60 moscas-brancas como o mais favorável ao desenvolvimento dos primeiros sintomas da virose, ocorrendo entre 8° e 13° DAI na cultivar suscetível e alcançando as maiores notas ao final das avaliações (30 DAI) (Fig. 9A-12A). O mesmo tratamento na cultivar resistente foi também o

primeiro a expressar os sintomas entre o 11º DAI e o 18º DAI, alcançando os maiores valores ao final das avaliações (Fig. 9B-12B).

Assim como relatado anteriormente, um vetor virulífero foi incapaz de induzir o desenvolvimento de sintomas na cultivar resistente. Na cultivar suscetível, quando houve expressão da doença, o progresso da doença foi mais lento e as plantas demonstraram severidade de sintomas sempre menores que os demais tratamentos, com exceção da repetição 1 onde esse tratamento foi superior ao com 5 moscas-brancas.

Quanto aos demais tratamentos a evolução dos sintomas foi gradativamente aumentando com o tempo, sempre proporcionalmente à quantidade de moscas-brancas virulíferas.

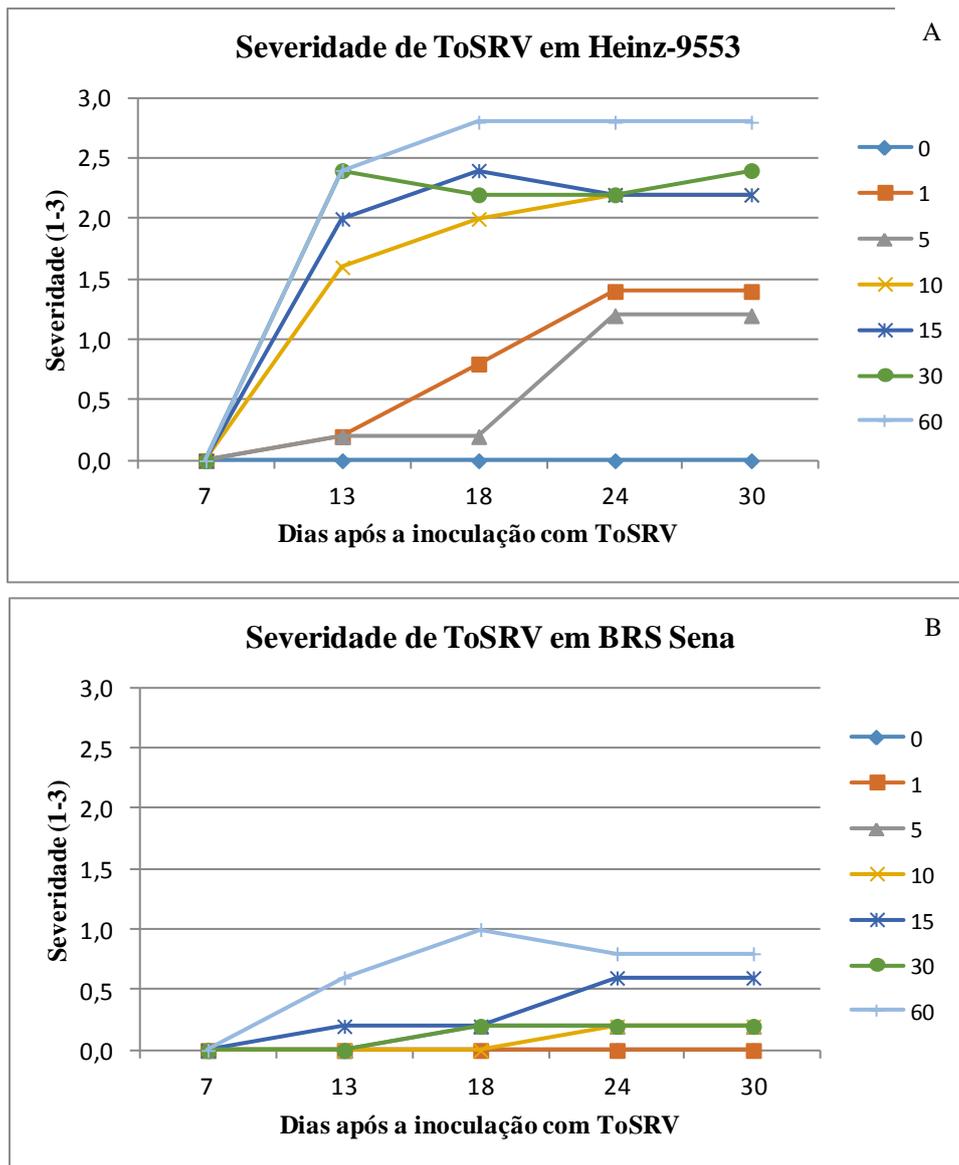


Figura 9. Severidade de ToSRV em cultivar suscetível (a) e resistente (b) no ensaio 1 com diferentes níveis de inóculo inicial.

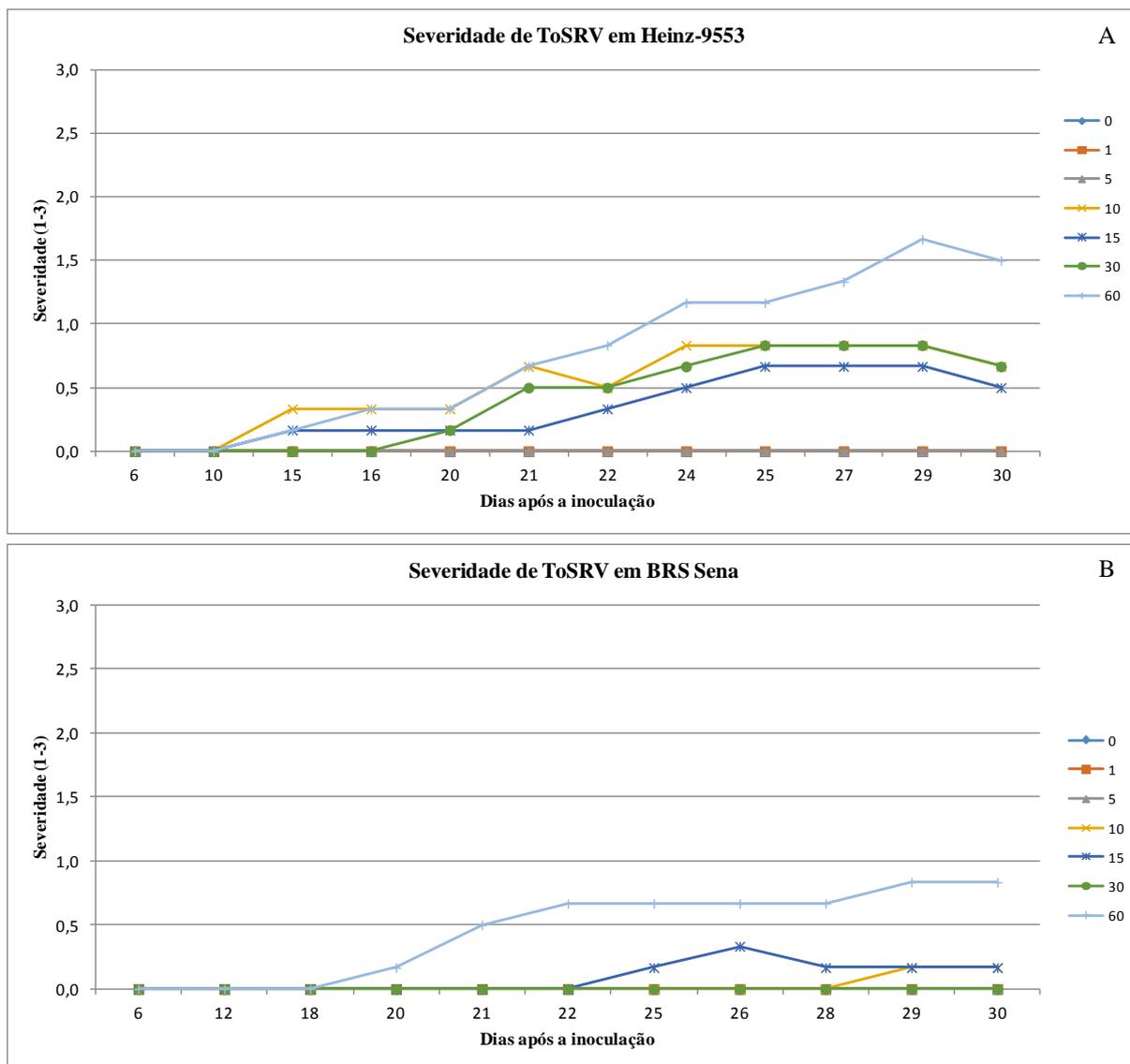


Figura 10. Severidade de ToSRV em cultivar suscetível (a) e resistente (b) no ensaio 2 com diferentes níveis de inóculo inicial.

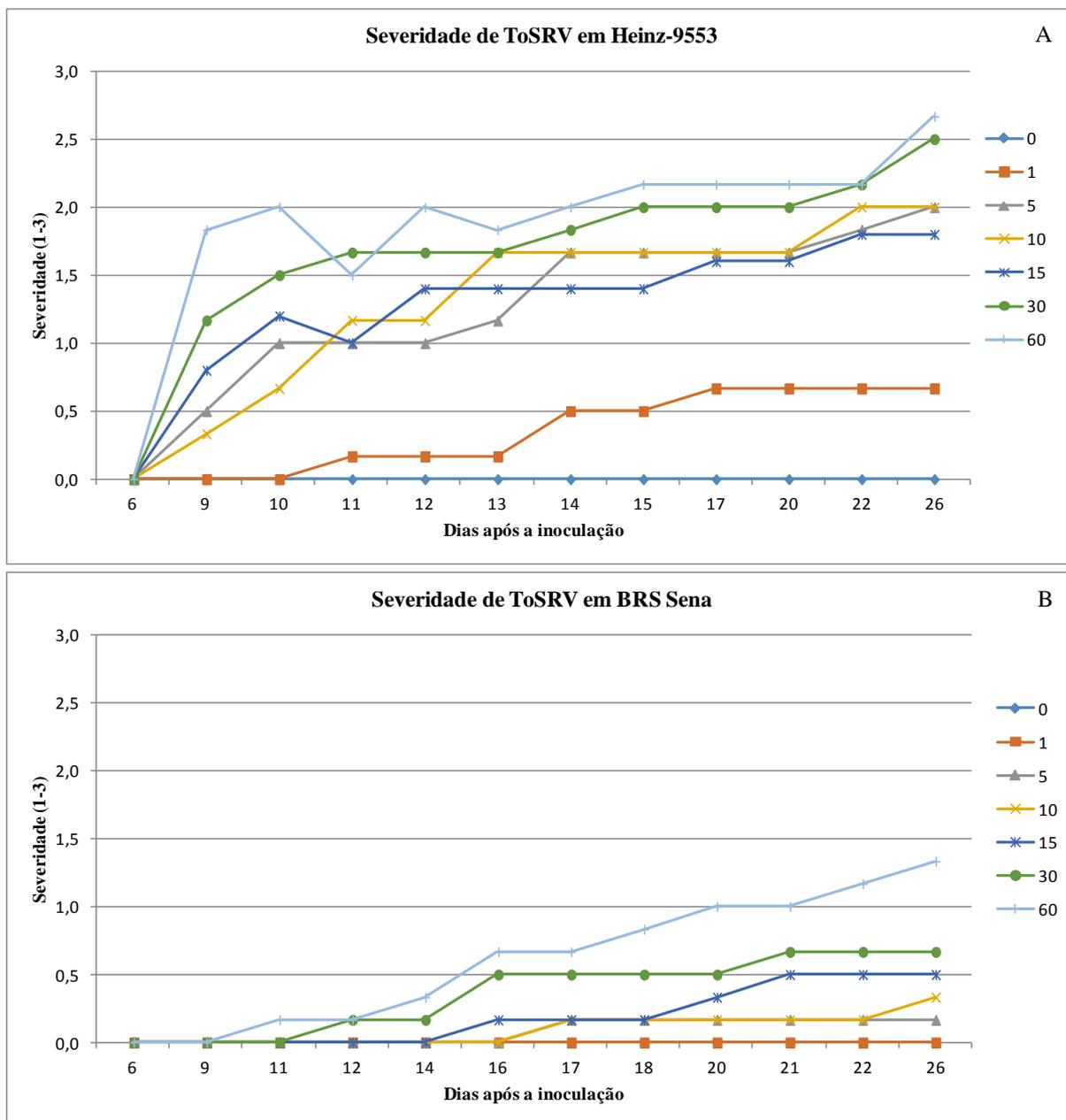


Figura 11. Severidade de ToSRV em cultivar suscetível (a) e resistente (b) no ensaio 3 com diferentes níveis de inóculo inicial.

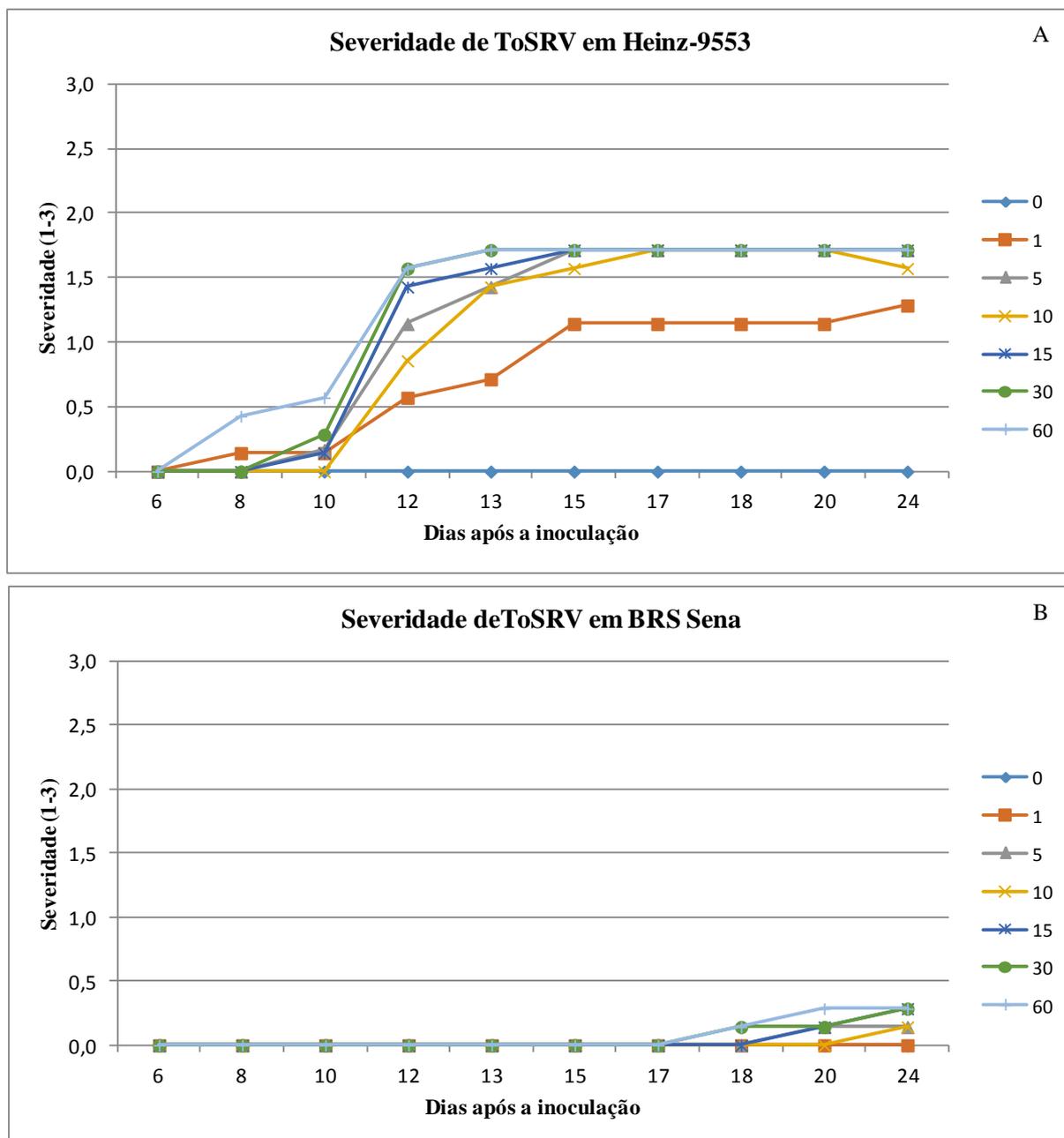


Figura 12. Severidade de ToSRV em cultivar suscetível (a) e resistente (b) no ensaio 4 com diferentes níveis de inóculo inicial.

A média das notas do tratamento com 60 moscas-brancas variou entre 1,4 a 2,8 na cultivar suscetível das quatro repetições do ensaio (Fig. 9A-12A). Na cultivar resistente, as maiores notas de severidade também se correlacionaram com a maior população de vetores, entretanto, não ultrapassaram a nota média de 1,3 para os sintomas ao final das avaliações, quando observados sintomas.

Apenas na segunda repetição do ensaio não se observou sintomas nas plantas inoculadas com os menores números de insetos (1 e 5). Nas demais repetições, as notas médias de severidade foram menores ou iguais a 1,4 e 2,0, respectivamente, com 1 e 5 indivíduos vetores na cultivar suscetível. Na cultivar com resistência, um indivíduo vetor não foi capaz de induzir sintomas da doença em nenhuma das repetições do ensaio. O tratamento com 5 indivíduos, bem com aqueles com 10, 15 e 30 indivíduos, apresentaram notas de severidade inferiores a 1,0 em todas as repetições do ensaio, quando estes expressaram sintomas.

As plantas inoculadas com 10, 15, 30 e 60 moscas-brancas por planta na cultivar suscetível apresentaram notas médias iguais ou superiores a 1,4, com exceção do observado para a segunda repetição do ensaio. O tratamento com plantas inoculadas por 60 moscas-brancas apresentou as maiores notas de severidade em todas as repetições do ensaio na cultivar suscetível e resistente, com os valores variando respectivamente entre 1,4 a 2,8 e 0,3 a 1,3.

A maior nota de severidade de sintomas da escala para virose ocasionada por ToSRV, nota 3,0, foi variável nas repetições do ensaio. Em geral, as quantidades de uma e cinco vetores não ocasionaram nota máxima, e 10, 15, 30 e 60 resultaram em notas iguais a 3 na cultivar suscetível. Entretanto, nas plantas inoculadas com 60 moscas-brancas maior número de plantas com nota máxima foi observada. Na cultivar resistente a maior nota observada foi igual a 2,0, quando ocorreu, foi principalmente com 15 e 60 insetos inoculando o vírus. Como exemplo, na repetição 3, plantas da cultivar suscetível inoculadas com 10 a 60 moscas-brancas apresentaram nota igual a 3,0 e com mais de 50% das plantas inoculadas com 60 insetos com essa nota, enquanto para as plantas com resistência a maior nota foi de 2,0 com 15 e 60 insetos utilizados para a inoculação.

2.4 DISCUSSÃO

Briddon (2015) e Mahatma *et al.* (2016) destacam que vários fatores afetam a epidemiologia das begomoviroses (variações no vetor, vírus e ambiente) e que a etapa de disseminação protagonizada pelo vetor é amplamente determinada pela sua biologia e comportamento migratório. A ecologia e a epidemiologia das doenças associadas a moscas-brancas são complexas, particularmente no Brasil, um país tropical de tamanho continental e com grande atividade agrícola.

Moriones & Navas-Castillo (2010) descrevem os dados de recentes estudos realizados por Cuellar e Morales (dados não publicados) no CIAT, Colombia, em que uma distinta eficiência de transmissão de um begomovírus de tomateiro foi observada entre os biótipos B e A. Eles concluíram que o biótipo A é mais eficiente como vetor que o biótipo B, baseado no fato de que um único inseto do biótipo B apresentou uma eficiência de transmissão de apenas 4,9% em média, enquanto o biótipo A apresentou média de 26,6%. Adicionalmente, eles relatam que a eficiência de transmissão dos insetos do biótipo B aumentou significativamente durante os três anos de estudo, sugerindo que pode existir uma gradual adaptação do vírus ao vetor presente na região. Isso implica que a co-existência do vírus e vetor em uma mesma área pode resultar em aumento da eficiência de transmissão ao longo do tempo. No estudo conduzido aqui com ToSRV e *B. tabaci* biótipo B, foi verificada que uma única mosca-branca foi capaz de transmitir o vírus em até 83% de plantas em cultivar suscetível (repetição 4, Tabela 1), mas falhando em causar doença em cultivar resistente. Isso indica que, se as condições são favoráveis, uma baixíssima ocorrência de moscas-brancas virulíferas pode ocasionar uma alta incidência de virose.

Em outro patossistema, Perveen (2003), realizando estudo de comparação de variedades de algodoeiro à infecção por *Cotton leaf curl virus* (CLCuV), verificou que 51 das 64 variedades estudadas apresentaram correlação significativa positiva entre altas populações de

moscas-brancas e o desenvolvimento de sintomas, mas esta correlação não foi observada em treze das variedades testadas, sendo que nestas variedades houve pouca infestação pelo vetor e a presença da doença. O autor relata que possivelmente estes poucos vetores estariam virulíferos, o que corrobora com os dados observados neste trabalho em que são necessárias poucas ou uma mosca-branca virulífera para o desenvolvimento da doença.

O progresso da doença no ensaio conduzido aqui representa os efeitos da virose na planta após o evento de inoculação, realizado em um momento anterior por uma quantidade de inóculo inicial (quantidade de moscas-brancas) fixa. Desta forma, as observações deste ensaio implicam que uma infecção por begomovírus em um tempo X qualquer pode ser expressa muitos dias após este evento, sendo este tempo variável conforme a quantidade de vetores capazes de inocular o vírus ou pela reação da cultivar. Nas repetições do ensaio existiu uma nítida distinção entre a data de aparecimento dos primeiros sintomas em cultivar suscetível, a qual ocorreu aos 8 DAI, e a cultivar resistente, em no mínimo 11 DAI, e sempre quando a inoculação foi realizada com muitos indivíduos (>60).

Os sintomas mais severos de infecção foram observados nas populações com 60 moscas-brancas nas quatro repetições, sendo essas as primeiras a expressarem sintomas da virose em ambas as cultivares testadas. E mesmos nos tratamentos em que a expressão dos primeiros sintomas foi concomitante ao da maior população de vetores, em sua maioria, nenhum apresentou valores de severidade maiores ou iguais ao desse tratamento. Como demonstram os dados da Tabela 2, a severidade da virose foi diretamente relacionada à quantidade de inóculo inicial, apesar de estatisticamente os valores serem iguais entre si na cultivar suscetível e iguais ao controle na resistente.

Neste trabalho, foi possível corroborar Perveen (2003) e Zhang *et al.* (2000), que demonstram correlação significativamente positiva entre o desenvolvimento de begomovirose e populações de moscas-brancas. Zhang *et al.* (2000) descreveram o progresso

da doença e os modelos dinâmicos que apresentaram uma taxa de infecção bilinear que é diretamente proporcional a ambas, a abundância de hospedeiro suscetível e a abundância de vetores virulíferos no caso de "Cassava mosaic virus disease" (CMVD - doença de mosaico em mandioca). Comparando às infecções observadas para ToSRV em tomateiro suscetível, a mesma tendência foi observada, na qual quanto maior a população de moscas-brancas virulíferas maior foi a incidência de plantas infectadas observadas em condições controladas e com número fixo de indivíduos vetores. Os dados obtidos neste estudo demonstraram que altas populações de moscas-brancas virulíferas resultaram em maiores incidências e maior severidade de sintomas da begomovirose nas condições estudadas. São resultados similares aos obtidos por Legg & Fauquet (2004) em que foi demonstrado que pandemias relacionadas à doença do mosaico da mandioca na África estão correlacionadas a altas populações de moscas-brancas sobre plantas de mandioca, associado ao uso de material vegetal infectado transportado pela migração de pessoas devido a instabilidade e guerras na África.

Macedo *et al.* (2014) verificaram que a incidência de begomovírus em diferentes regiões do Brasil é altamente dependente da população de moscas brancas presentes na área. Além disso, existe uma diferença na incidência de begomovirose em tomateiro para indústria e tomateiro para mesa. Em tomateiro de crescimento indeterminado (tomate mesa), cujos frutos são destinados ao consumo fresco, existe uma oferta maior de cultivares que apresentam bom nível de resistência e esses são mandatoriamente usados nas regiões de alta incidência. Por outro lado, para tomateiro de crescimento determinado, destinado principalmente à agroindústria, são poucos os híbridos com resistência e o uso dessas cultivares é reduzido, sendo que a incidência de begomovírus é problemática, podendo atingir 100%. Algumas vezes, perdas totais na lavoura são observadas. Nas condições de cultivo de tomateiro rasteiro existe uma grande dificuldade no controle de moscas brancas.

Neste trabalho foi observado que a variedade resistente BRS Sena (de crescimento determinado e destinado a processamento) apresentou um número maior de plantas não infectadas e, para aquelas plantas infectadas, sintomas mais amenos que nas suscetíveis. Em uma situação de alta população de insetos vetores virulíferos (por exemplo, maior que 60 por planta) muitas plantas foram infectadas, permitindo a multiplicação viral e expressão de sintomas. Exemplos de suplantação do gene *Ty-1* que confere resistência moderada a begomovírus foi descrita em condições de alta pressão de inóculo (Michelson *et al.*, 1994; Picó *et al.*, 1996). Caso semelhante também foi observado para o Cotton leaf curl disease (CLCuD) no Paquistão (Mahatma *et al.*, 2016). Entretanto, é inegável que o uso de variedades resistentes contribui para a redução do número de plantas infectadas no campo e conseqüentemente diminui a presença de plantas-fontes e provavelmente a taxa de moscas-bancas virulíferas.

Na cultivar resistente, os sintomas observados foram, em geral, tardios e mais brandos. A principal característica da virose na cultivar resistente testada são manchas cloróticas sem delimitação definida e observadas em folhas relativamente novas ou intermediárias, em alguns casos com restrição ao crescimento. Essas características foram observadas igualmente em todos os tratamentos que desenvolveram a doença nesta cultivar. Para Bergamin Filho *et al.* (2016), a baixa pressão de inóculo sobre cultivares com moderada resistência e variabilidade genética provavelmente suprimem a doença eficientemente; entretanto, altas cargas de inóculo podem conduzir a severas epidemias nestas cultivares.

Similarmente, Rêgo (2016) relata a observação de que no campo a maior severidade dos sintomas foi observado na cultivar suscetível (H-9553) e sendo estes menos destacados na cultivar resistente (BRS Sena). Estes resultados eram esperados, a resistência da BRS Sena foi confirmada, mas foi demonstrado que o maior número de moscas-brancas favorece a maior expressão de sintomas e a redução da eficiência de controle da doença.

A utilização de cultivares resistentes é altamente favorável aos cultivos de tomate no campo. Essa tecnologia, quando aplicada em parceria com eficientes formas de controle das populações de moscas-brancas na lavoura e a eliminação de plantas fontes presentes na lavoura proporciona uma redução da ocorrência de virose e aparecimento de sintomas. Assim, cria-se um ambiente menos propício ao desenvolvimento de epidemias. Trabalhos como os de Macedo *et al.* (2016) e Bergamin *et al.* (2016) destacam as plantas de tomate espontâneas ou em cultivos abandonados como as principais fontes de inóculo inicial do vírus no campo. Esta situação, aliada às altas populações de moscas-brancas observadas ao final das estações de cultivo de verão nas principais regiões produtoras do país, representa um risco para estas áreas agrícolas pelo contínuo desenvolvimento de epidemias de begomovirose associadas a maior presença de vetores virulíferos nas altas populações de moscas-brancas e também à possível emergência de novos begomovírus.

Na região central do Brasil são comumente observadas nuvens de moscas-brancas migrando de culturas velhas como tomate, soja, algodão e feijão. Entretanto, muitas destas moscas-brancas saindo de culturas que não sejam o tomateiro possivelmente não são transmissoras de begomovírus do tomate (Bergamin *et al.*, 2016). Esta observação demonstra que na natureza, altas populações de moscas-brancas não necessariamente significam alta população de vetores virulíferos, mas sim a possibilidade de algum ou alguns vetores virulíferos. Atualmente, é possível se detectar a presença dos begomovírus na mosca-branca com técnicas de detecção como a hibridização com sondas específicas, o PCR ou Print-capture PCR (Nagata *et al.*, 2004), porém estas são de alto custo.

A realização deste ensaio foi complexa e exigiu a montagem de um cronograma bem planejado, o desenvolvimento de habilidade para manuseio do vetor e cuidados com a qualidade das fontes de vírus e moscas-brancas para execução do ensaio. Mesmo com o controle desses fatores, entre as quatro repetições realizadas no tempo houve variação nos

resultados finais observados. Os principais pontos que influenciaram esta variação muito provavelmente estão relacionados com o manuseio inadequado do vetor nos primeiros ensaios, a dificuldade do controle do vetor com inseticidas após a inoculação e indução de fitotoxidez nas plantas e na ocorrência de condições ambientais diversas durante a montagem e condução do ensaio. Acredita-se que essas dificuldades relacionadas à multiplicação e manuseio de moscas-brancas são as principais razões do reduzido número de pesquisadores que trabalham com esse inseto. Entretanto, em vista da grande importância deste inseto tanto como praga como vetor é urgente que mais trabalhos sejam realizados no Brasil e no mundo. A realização de pesquisas nesta área produzirá avanços não apenas na compreensão da interação vetor-vírus-planta, mas também o desenvolvimento de novas estratégias urgentemente necessárias de manejo de moscas-brancas e begomoviroses (Luan *et al.*, 2014).

2.5 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO

A inoculação com o maior número de insetos virulíferos resultou em maiores valores de incidência e severidade na cultivar suscetível Heinz-9553 e com resistência BRS Sena.

Um único vetor virulífero é capaz de transmitir ToSRV em plantas suscetíveis e favorecer a expressão de sintomas fortes da virose. Entretanto, quando em cultivar resistente este vetor virulífero parece ser incapaz de expressar sintomas em planta resistente a begomovírus.

A presença de uma alta população de moscas-brancas virulíferas deve exercer papel importante no desenvolvimento da virose, acelerando a expressão e severidade dos sintomas em cultivar suscetível e resistente.

A importância da atuação de cultivares resistentes a begomovírus como fonte de vírus no campo necessita ser estudada, uma vez que altas populações de moscas-brancas são constantemente relatadas em cultivos de tomateiro.

CAPÍTULO 3.

INFLUÊNCIA DA IDADE DE MUDAS DE TOMATEIRO NA SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO POR *TOMATO SEVERE RUGOSE VIRUS*

INFLUÊNCIA DA IDADE DE MUDAS DE TOMATEIRO NA SUSCEPTIBILIDADE À INFECCÃO POR *TOMATO SEVERE RUGOSE VIRUS*

RESUMO

Altas incidências de viroses são relatadas em tomateiros, particularmente o mosaico dourado causado por espécies de begomovírus (Fam. *Geminiviridae*, gen. *Begomovirus*) em todo o mundo. No Brasil, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) é a espécie mais importante, transmitida por mosca-branca (*Bemisia tabaci*). O controle desta virose é complexo, sendo o uso de cultivares resistentes e a implantação do manejo integrado de pragas as táticas de maior emprego. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes idades de mudas de tomateiro suscetível (Heinz-9553) a ToSRV na taxa e velocidade de infecção e na expressão de sintomas da virose. Os tratamentos consistiram de mudas com 20, 30, 40, 50 e 60 dias de idade distribuídas em três blocos inteiramente casualizados com 10 plantas para cada tratamento, e inoculadas com *B. tabaci* biótipo B virulíferas para ToSRV. O ensaio foi repetido três vezes no tempo. Utilizou-se como controles plantas inoculadas com moscas-brancas avirulíferas e plantas sem a presença de moscas-brancas. As avaliações foram realizadas visualmente por uma escala de notas previamente desenvolvida para infecções por ToSRV em tomateiro. A análise estatística dos dados não demonstrou diferenças significativas entre os tratamentos para a incidência ou severidade da doença. Entretanto, houve uma clara variação entre a taxa de infecção e a severidade dos sintomas observados entre as distintas idades. O tratamento com 20 dias apresentou as maiores porcentagens de incidência (média de 81%), e os com 30, 40, 50 e 60 dias se concentraram na faixa entre 62 e 75% em média. Na avaliação da severidade de sintomas, a mesma tendência foi observada para os tratamentos, com as maiores notas para as mudas de 20 dias e as menores para as de 60 dias e valores intermediários para os demais tratamentos. O aparecimento de sintomas foi mais rápido nas mudas com 20 dias (12 a 14 dias após a inoculação) e evoluiu mais lentamente naquelas de 40 e 60 dias, chegando a notas muito próximas ao final das avaliações. Quanto aos parâmetros de altura e peso fresco das plantas, uma diferença estatisticamente significativa foi observada entre as mudas inoculadas e as não inoculadas com ToSRV. Em ambos os parâmetros as plantas inoculadas aos 20 dias apresentaram os menores valores (média 25,86 cm e 7,27 g), sendo estatisticamente diferente dos demais tratamentos inoculados com o vírus. As mudas com 60 dias foram as que apresentaram maior altura (média 35,69 cm) e peso fresco (média 12,61 g), neste caso, diferindo estatisticamente das demais idades. Os dados observados sugerem que a diferença na idade de mudas no momento da inoculação do ToSRV por moscas-brancas exerce alguma influência na taxa de infecção e na severidade da doença, além de afetar o desenvolvimento normal das plantas após a inoculação..

Palavras-chave: idade de transplantio, begomovirose, suscetibilidade.

INFLUENCE OF THE AGE OF TOMATOES IN THE SUSCEPTIBILITY TO *TOMATO SEVERE RUGOSE VIRUS* INFECTION

ABSTRACT

High incidence of viruses is reported in tomato plants, particularly the golden mosaic disease caused by begomovirus (Fam. *Geminiviridae*, gen. *Begomovirus*) species worldwide. In Brazil, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) is the most important species transmitted by whiteflies (*Bemisia tabaci*). The control of this virus is complex. The use of resistant cultivars and the implementation of an integrated pest management are the most popular strategies. The objective of this work was to evaluate the influence of different ages of transplants of susceptible tomato plants (Heinz-9553) to ToSRV on the rate and speed of infection on the expression of viral symptoms. Treatments consisted of 20, 30, 40, 50 and 60 day old transplants distributed in three completely randomized blocks with 10 plants for each treatment, and inoculated with ToSRV by *B. tabaci* biotype B. The experiment was repeated three times in time. The controls consisted of plants inoculated with aviruliferous whiteflies and plants without the presence of whiteflies. The evaluations were performed visually by a disease scale rating previously developed to infections of ToSRV in tomato. Statistical analysis of the data did not show significant differences between the treatments for the incidence or severity of the disease. However, there was a clear variation between the infection rate and the severity of the symptoms observed between the different ages. The treatment with 20 days presented the highest incidence rates (mean of 81%), and those with 30, 40, 50 and 60 days were concentrated in the range between 62 and 75% on average. For severity evaluation, the same tendency was observed for the treatments, with the highest values for the 20 day transplants and the lowest for the 60 day transplants and intermediate values for the other treatments. The symptom expression was faster on the transplants at 20 days (12 to 14 days after inoculation), while those inoculated at 40 and 60 days the symptoms evolved more slowly, but reaching similar level of severity at the end of the evaluation period. Regarding the height and fresh weight parameters of the plants, a statistically significant difference was observed between inoculated and non-inoculated transplants. In both parameters the plants inoculated at 20 days showed the lowest values (mean 25.86 cm and 7.27 g, respectively), being statistically different from the other treatments inoculated with the virus. The 60 day transplants presented the highest height (mean 35.69 cm) and fresh weight (mean 12.61 g), in this case, differing statistically from the other ages. The observed data suggest that the difference in the age of transplants at the time of inoculation of the ToSRV by whiteflies has an effect in the infection rate and severity of the disease, in addition to affecting the normal development of the plants after inoculation..

Keywords: transplanting age, begomoviruse, susceptibility.

3.1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pertence à família Solanaceae, é cultivado em várias regiões do mundo e os seus frutos são fontes de licopeno, compostos antioxidantes e vitaminas A e C (Naika *et al.*, 2006). A produção mundial em 2016 foi de aproximadamente 170 milhões de toneladas e o Brasil, com uma produção de 3,5 milhões de toneladas, se coloca entre os 10 maiores produtores mundiais, com os principais estados produtores sendo Goiás, Minas Gerais e São Paulo (IBGE, 2016; FAO, 2017). Trata-se da primeira hortaliza em importância econômica no país, produzidos para consumo *in natura* e para industrialização (IBGE, 2016).

Diversos problemas fitossanitários acometem o tomateiro, ocasionados por fungos, bactérias, nematoides e vírus. As viroses destacam-se entre as principais doenças para a cultura, sendo as begomoviroses as de maior incidência nas principais regiões produtoras. Os vírus do gênero *Begomovirus*, pertencentes à família *Geminiviridae*, são os agentes causadores destas doenças. Os membros desta família possuem DNA circular de fita simples (ssDNA) e partículas geminadas. Estes podem apresentar genoma monopartido ou bipartido, com aproximadamente 2,8 kb e 5,2 kb, respectivamente (Briddon, 2001).

A maioria dos begomovírus do Novo Mundo possui genoma bipartido, isto é, constituído por duas moléculas de DNA (DNA-A e DNA-B), cada uma com aproximadamente 2500 a 2600 nucleotídeos (Briddon, 2015). Segundo Mansoor *et al.* (2003), grande parte dos prejuízos na produtividade agrícola são ocasionados por begomovírus, principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo.

No Brasil são reconhecidos 17 espécies de begomovírus que infectam o tomateiro pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), entre estas os de maior ocorrência são *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), sendo a primeira predominante (Fernandes *et al.*, 2008; Inoue-Nagata, 2013, Bergamin Filho *et al.*,

2016). Os begomovírus são transmitidos de maneira persistente pelo inseto vetor mosca-branca (*Bemisia tabaci*), pertencente à família Aleyrodidae da ordem Hemiptera e classificado em biótipos ou espécies, sendo o biotipo B ou espécie Middle East Asian Mean-1 (*MEAM-1*) (Ghanim *et al.*, 2001; Perring, 2001; De Barro *et al.*, 2011) prevalente no Brasil.

Os sintomas de begomovirose normalmente observados em tomateiro são mosaico, clorose, redução de crescimento, enrolamento dos folíolos e rugosidade, mas podem variar com o estágio de desenvolvimento em que a planta foi infectada, variedade e fatores ambientais, além da ocorrência de infecção mista (Faria *et al.*, 2000).

Os tomateiros são agrupados em dois grupos principais segundo seu hábito de crescimento, determinado e indeterminado. Segundo essa divisão, as práticas culturais e o mercado final são distintamente aplicados. O primeiro, denominado comumente como tomateiro rasteiro, exige menor mão-de-obra para condução da cultura e é predominantemente destinado ao mercado de processamento industrial e representa as maiores áreas cultivadas com a cultura no mundo. A segunda, com crescimento indeterminado, tem uma alta demanda de mão-de-obra para a realização de práticas como desbrota, amarrio e colheitas sucessivas, visto que essas variedades apresentam maturação dos frutos desuniforme na mesma planta. São destinados ao mercado de consumo fresco dos frutos, cultivados em geral por pequenos produtores em áreas familiares ou potencialmente menores que as observadas para os tomateiros destinados a indústria (Filgueira, 2003; Naika *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2012; Nascimento *et al.*, 2012; Clemente *et al.*, 2013).

Em ambos os casos, os plantios comerciais de tomateiros são geralmente implantados com a utilização de mudas com 35 a 42 dias de idade que são produzidas sobre bandejas em estufas e posteriormente transplantadas no campo. Essa prática contribui para a antecipação das colheitas, implementação de tratamentos culturais, redução no estresse ao transplante, menor taxa de replante e também maior uniformidade do crescimento e produção (Kelley & Boyhan,

2014; Orzolek *et al.*, 2016). Além disso, há menor desperdício de sementes. Esse fator é importante, devido aos altos custos de sementes de tomateiro na atualidade. As sementes de tomateiros híbridos de crescimento indeterminado podem custar até mais de seiscentos reais uma quantidade de mil sementes.

Segundo Macedo *et al.* (2014), existe uma diferença na incidência de begomovirose em tomateiro para indústria e tomateiro para mesa. Em tomateiro produzido para consumo fresco, existem cultivares que apresentam bom nível de resistência e esses são amplamente usados nas regiões com alta taxa de incidência. Por outro lado, em tomateiros destinados a agroindústria a incidência de begomovírus é muito mais problemática, podendo atingir 100%, e por vezes sendo observadas perdas totais na lavoura. A oferta de híbridos de crescimento determinado com resistência é pequena e há uma grande dificuldade no controle de moscas brancas em grandes áreas.

A epidemiologia é o estudo de doenças em populações, e investiga os seus determinantes, a sua dinâmica e distribuição (Vanderplank, 1963), sendo essencial para o sucesso do controle. O emprego das medidas de controle de viroses deve visar a eliminação ou a redução das fontes dos vírus, da população de inseto vetor existente e, se possível, reduzir o nível de suscetibilidade da cultura (Polston & Anderson, 1997; Seal *et al.* 2006). Entretanto, nas viroses, as epidemias possuem comumente o fator vetor adicionado a interação entre hospedeiro, patógeno e ambiente, constituindo-se em um sistema complexo, com muitas interações e envolvendo múltiplos fatores (Jeger, 2004; Van den Bosch *et al.*, 2006; Moriones & Navas-Castillo, 2010). Entre estes fatores destacam-se as condições de cultivo, a variabilidade viral, a dispersão dos vetores, a fonte de infecção, a gama de hospedeiros, as condições climáticas e a intervenção do homem (BARBOSA *et al.*, 2008). Frente à dificuldade de manejo das begomovirose, práticas que visem reduzir a incidência e disseminação da doença devem ser investigadas e adotadas como parte de um manejo

integrado. Para isso, o conhecimento da epidemiologia desta virose necessita ser mais aprofundado (Colvin *et al.*, 2006; Moriones & Navas-Castillo, 2010; Luan *et al.*, 2014; Mahatma *et al.*, 2016).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar o efeito da idade de mudas de tomateiros à infecção pelo begomovírus *Tomato severe rugose vírus* (ToSRV) em inoculação por *Bemisia tabaci* quanto a incidência, severidade e características como peso e altura das plantas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Isolado de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV)

O isolado viral utilizado no estudo foi o mesmo clone 1164-ToSRV de *Tomato severe rugose virus* descrito no capítulo 2.

3.2.2 Criação de *Bemisia tabaci* biótipo B

Como descrito no capítulo 2, as populações de moscas-brancas biótipo B utilizadas no estudo foram oriundas da criação de *B. tabaci* biótipo B mantida na unidade da Embrapa Hortaliças (CNPq) sobre plantas de couve (*Brassica oleraceae* var. *acephala*) e pepino (*Cucumis sativus*), espécies sabidamente não hospedeiras de begomovírus de tomateiro.

3.2.3 Manutenção do isolado viral em plantas fontes

O isolado de ToSRV é mantido *in planta* pela infecção sucessiva de plantas de tomateiro suscetível via transmissão por vetor e denominadas “plantas fontes”. Essas plantas são utilizadas para no período de acesso de aquisição do vírus pelas moscas-brancas que posteriormente realizarão o período de acesso de inoculação do vírus em plantas sadias.

A produção de “plantas fontes” para a realização dos ensaios seguiu um cronograma baseado no estágio fenológico do tomate, onde estes foram inoculados aos 20 a 25 dias após a germinação, com o objetivo de utilizar plantas jovens, recém-inoculadas e com expressiva expressão de sintomas da virose entre os 40 a 45 dias. As plantas-fonte foram regularmente avaliadas via PCR para confirmar a infecção por ToSRV, como descrito no capítulo 2.

3.2.4 Aquisição e inoculação do isolado viral para condução dos ensaios

O período de acesso de aquisição do vírus ToSRV foi de 48 horas e seguiu os mesmos procedimentos descritos no capítulo 2. As mudas foram distribuídas aleatoriamente em mini-bandejas com 30 células cada, sendo um tratamento por bandeja, e mantidas em gaiolas confeccionadas com organza (Fig. 1A-C). Decorrido o período de acesso de aquisição, os tubos contendo moscas-brancas virulíferas foram transferidas para as gaiolas onde as mudas de tomateiro foram distribuídas para o período de acesso de inoculação. As moscas-brancas foram então espalhadas sobre as plantas nas gaiolas para garantir o contato entre as mesmas, e os tubos foram deixados abertos na gaiola. Foram utilizados em média cinco tubos por gaiola, totalizando uma relação média de 30 moscas-brancas por planta. O período de acesso de inoculação foi de 72 horas, ocorrendo simultaneamente para todas as diferentes idades de mudas, e após a inoculação as moscas-brancas e suas possíveis ninfas e ovos foram eliminados das plantas com a aplicação de inseticida sistêmico (Thiamethoxam – neonicotinóide - Actara 250 WG) e de contato (Piriproxifem – Éter piridiloxipropílico – Tiger 100 EC) e com eliminação mecânica. As plantas foram então mantidas em câmara de crescimento (25°C +/- 2 e fotoperíodo de 12 horas) por um período de 7 a 10 dias e posteriormente transportadas para estufa e distribuídas em compartimentos preparados com tecido de organza (Fig. 1D e E).

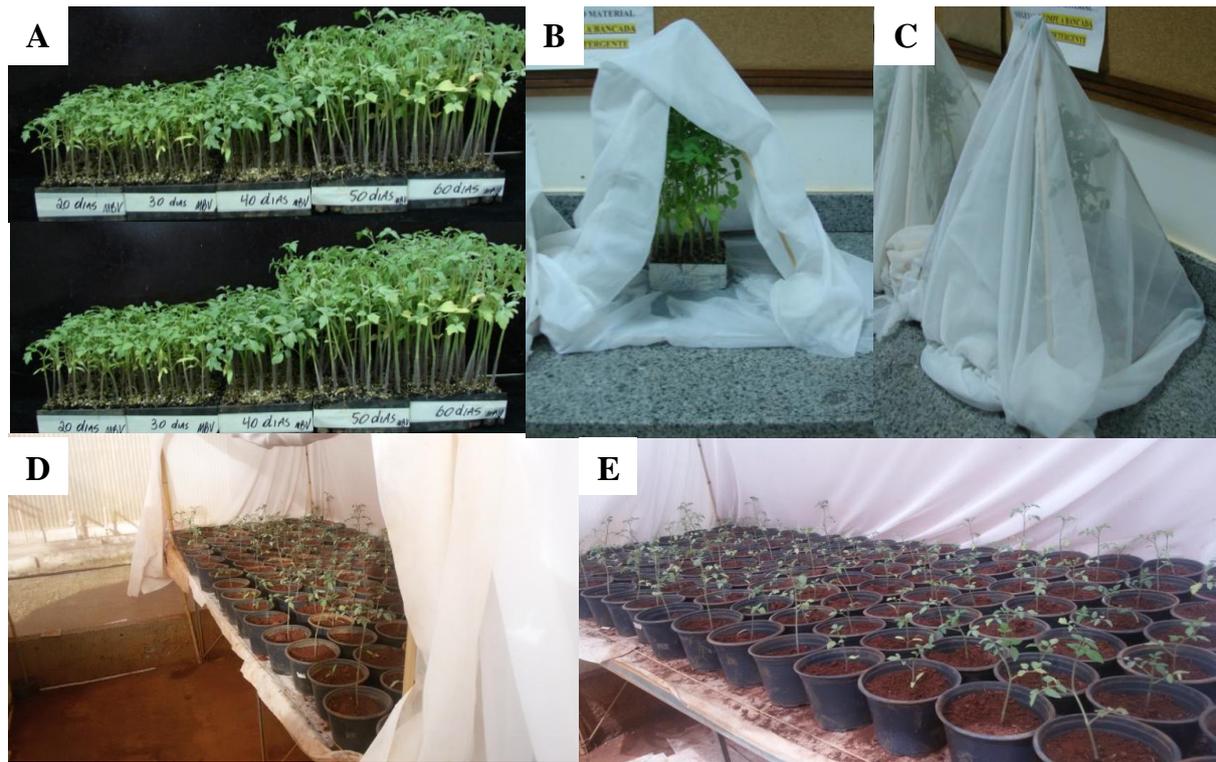


Figura 1. (A) Mini-bandejas utilizadas para disposição das mudas com diferentes idades na inoculação pelas moscas-brancas em gaiolas confeccionadas com organza (B-C) e posteriormente transplantadas e distribuídas aleatoriamente em compartimentos (D-E) preparados com tecido organza para cada bloco.

3.2.5 Efeito de diferentes idades de mudas de tomateiro sobre a taxa de infecção por ToSRV inoculado com moscas-brancas

As mudas utilizadas na realização dos ensaios foram produzidas no Viveiro Vivati, em Abadia de Goiás, Goiás, e entregues um dia antes da inoculação. Foram produzidas mudas em bandejas de polietileno de 400 células em substrato. Utilizou-se a cultivar Heinz-9553, suscetível à infecção pelo vírus ToSRV, em cinco diferentes idades, sendo estas 20, 30, 40, 50 e 60 dias de semeadura. As mudas foram produzidas em condições controladas e sob sistema de fertirrigação, sendo mantidas livres da presença de moscas-brancas, com plantios realizados em diferentes datas (Tabela 1).

Tabela 1. . Épocas de plantios dos tomateiros realizados pelo Viveiro Vivati para realização do ensaio com diferentes idades de mudas

Datas de plantio por repetição			
Idades	1^a	2^a	3^a
60	17/02/2016	03/08/2016	12/09/2016
50	27/02/2016	13/08/2016	22/09/2016
40	08/03/2016	23/08/2016	02/10/2016
30	18/03/2016	02/09/2016	12/10/2016
20	28/03/2016	12/09/2016	22/10/2016

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados com três repetições e um total de 10 plantas por repetição. Cada uma das idades 20, 30, 40, 50 e 60 dias no momento da inoculação constituiu um tratamento. Os controles negativos utilizados foram constituídos dos mesmos tratamentos na presença de moscas-brancas avirulíferas e sem a presença de moscas-brancas, respectivamente com um número de dez plantas e três plantas como repetições por tratamento por bloco. O ensaio foi repetido três vezes no tempo. Todos os tratamentos foram inoculados como descrito no item acima. Gaiolas foram confeccionadas para acomodar as mudas em suas diferentes idades, sendo utilizada uma gaiola para cada idade e para cada um dos controles negativos. Essas plantas foram mantidas na presença de moscas-brancas virulíferas, avirulíferas e na ausência de moscas-brancas durante o período de inoculação de 72 horas.

Concluído o período de inoculação, as mudas foram então transplantadas em vasos de 1,5 Kg com solo tratado com vapor quente e transferidas para estufa previamente preparada para a montagem do ensaio. Estas foram mantidas em casa de vegetação para condução do ensaio até o 30º dias após a inoculação (DAI). As avaliações de incidência e severidade dos sintomas da virose foram realizadas dos 7 (sete) dias após a inoculação (DAI) até o 30º DAI, como realizado para o ensaio do capítulo 2. Após o fim das avaliações de severidade a altura em centímetros (cm) e peso fresco em gramas (g) das plantas foram mensuradas para todas as plantas dos tratamentos e seus controles para comparação. Para maior confiabilidade dos

dados levantados três repetições do ensaio foram conduzidas em diferentes momentos no tempo no ano de 2016 (Tabela 1). Altura e peso fresco foram mensurados apenas nos dois últimos ensaios repetidos no tempo. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F (Fisher) a 5% ($p = 0,05$) de significância no programa SISVAR 5.3, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade de erro.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Efeito da idade de mudas de tomateiro sobre a incidência de ToSRV em cultivar suscetível Heinz-9553

Cinco idades de mudas foram avaliadas quanto à taxa de incidência de ToSRV em tomateiro em três repetições. Ao final das avaliações houve alta incidência de plantas infectadas com ToSRV inoculado pelas moscas-brancas virulíferas em todas as idades (média de 62-81%). As plantas controles, que tiveram contato com moscas-brancas avirulíferas não desenvolveram sintomas. Adicionalmente, todas as repetições do ensaio apresentaram maior incidência de sintomas para o tratamento com 20 dias que foram inoculadas com ToSRV em comparação com os demais tratamentos no início das avaliações. Nas avaliações finais, os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre eles, com valores superiores a 70% em todos os tratamentos (Fig. 2A-C). A única exceção observada foi na repetição 1 do ensaio, em que as idades de 40 e 60 dias foram significativamente diferentes das demais com valores de incidência variando entre 20 e 50% (Fig. 2A).

Os menores valores de incidência observados nas repetições do ensaio foram variáveis como demonstra a Tabela 2 e se concentraram entre 70 e 80% nas repetições 2 e 3 ou 30% na repetição 1. Apesar desta variação, não houve diferença significativa entre estes valores.

Tabela 2. Porcentagem de plantas de tomateiro (Heinz-9553) infectadas com *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) inoculadas por moscas-brancas virulíferas (MBV) e confinadas com moscas-brancas avirulíferas (MBA) em diferentes idades de mudas em três repetições do ensaio no tempo aos 30 dias após a inoculação.

Idades	Rep 1		Rep 2		Rep 3		Valores médios	
	MBA	MBV	MBA	MBV	MBA	MBV	MBA	MBV
20	0a	50b	0a	100a	0a	93a	0	81
30	0a	40b	0a	87a	0a	73a	0	67
40	0a	20a	0a	90a	0a	77a	0	62
50	0a	37b	0a	100a	0a	87a	0	75
60	0a	27a	0a	77a	0a	87a	0	64

*Médias seguidas por mesma letra diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) entre as idades de mudas no momento da inoculação.

Não houve uma diferença estatisticamente significativa para a incidência no efeito da resistência de planta madura para a virose ocasionada por ToSRV. Entretanto, todas as repetições do ensaio demonstraram que o tratamento com as mudas de 20 dias foram as que proporcionaram os maiores valores de incidência, seguido pelo tratamento com 50 dias nas repetições 2 e 3. Já os menores valores observados foram verificados para as mudas com 60 dias, com valores de 27%, 77% e 87% ao final das avaliações das repetições 1, 2 e 3, respectivamente.

O progresso da doença foi similar nas três repetições do ensaio, com as mudas mais novas (20 dias) apresentando os primeiros sintomas e o maior número de plantas infectadas mais precocemente, e as mudas mais velhas (60 dias) demonstrando sintomas mais tardios e com menor incidência nas plantas (Fig. 2A-C). Em todos os tratamentos o progresso da incidência da doença foi gradativo, aumentando com o tempo, e apresentando um progresso mais rápido no tratamento com mudas de 20 dias. Em geral, os valores de incidência superiores a 50% foram observados após 18° DAI nas mudas com 60 dias e antes dos 15° DAI nas mudas com 20 dias. Uma exceção foi observada na repetição três do ensaio, onde os valores acima de 50% de incidência na muda mais nova só foram observados após o 21° DAI (Fig. 2C).

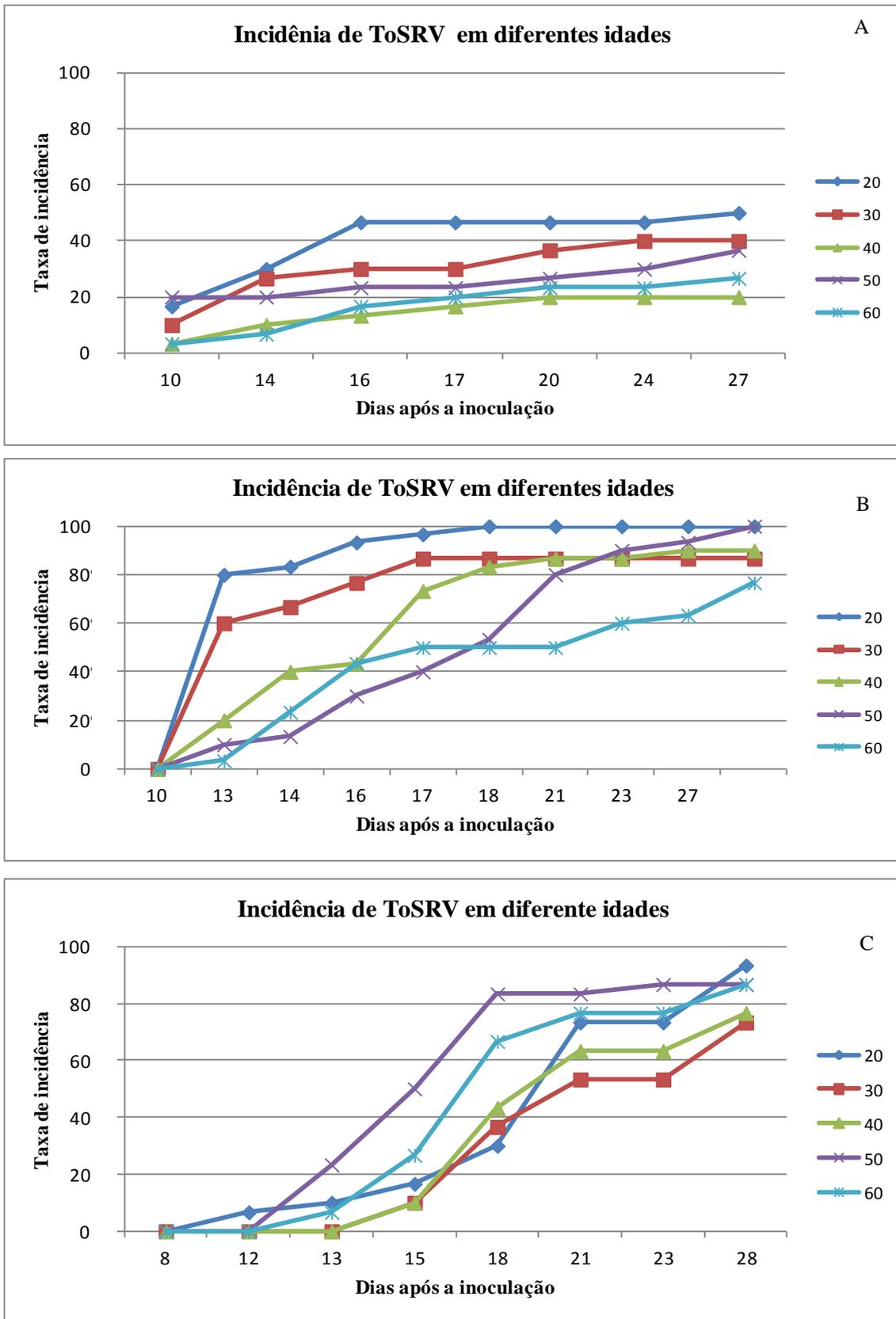


Figura 2. Porcentagem de plantas com sintomas de infecção por ToSRV em tomateiros da cultivar Heinz-9553 com diferentes idades de inoculação em três distintas épocas de realização do ensaio (inoculação em: 18/04/2016 – A, 22/09/2016 – B, 02/11/2016 – C).

3.3.2 Efeito da idade de mudas sobre a severidade de sintomas causados por ToSRV em cultivar suscetível Heinz-9553

Quanto à severidade da doença, as mesmas tendências foram observadas, sendo que as maiores notas de severidade foram observadas para a idade de 20 dias em todas as repetições do ensaio e as menores para o tratamento com 60 dias nas repetições 1 e 3, e 30 dias na repetição 4 (Tabela 3).

Tabela 3. Notas de severidade de sintomas em plantas de tomateiro (Heinz-9553) infectadas com *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) com diferentes idades de mudas na inoculação por moscas-brancas avirulíferas (MBA) e virulíferas (MBV) em três repetições do ensaio no tempo aos 30 dias após a inoculação.

\Idades	Rep 1		Rep 2		Rep 3		Valores médios	
	MBA	MBV	MBA	MBV	MBA	MBV	MBA	MBV
20	0,0a	1,4b	0,0a	2,8a	0,0a	1,6a	0,0	1,9
30	0,0a	1,1b	0,0a	2,2a	0,0a	1,3a	0,0	1,5
40	0,0a	0,6a	0,0a	2,5a	0,0a	1,4a	0,0	1,5
50	0,0a	1,0b	0,1a	2,4a	0,1a	1,5a	0,0	1,6
60	0,0a	0,6a	0,0a	1,7a	0,0a	1,5a	0,0	1,3

*Médias seguidas por mesma letra diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) entre as idades de mudas no momento da inoculação

Diferenças significativas não foram observadas nas avaliações finais das repetições 2 e 3, mesmo com as notas médias entre 1,3 e 2,8. As menores notas foram observadas na repetição 1, onde os valores não ultrapassaram a nota 2.

Os primeiros sintomas da doença foram expressos nas mudas com 20 dias em todas as repetições do ensaio, alcançando rapidamente notas superiores a 1. Em média, após o 15º DAI todos os tratamentos apresentaram aumento progressivo da severidade da doença, alcançando as maiores notas ao final das avaliações (Fig. 3A-C).

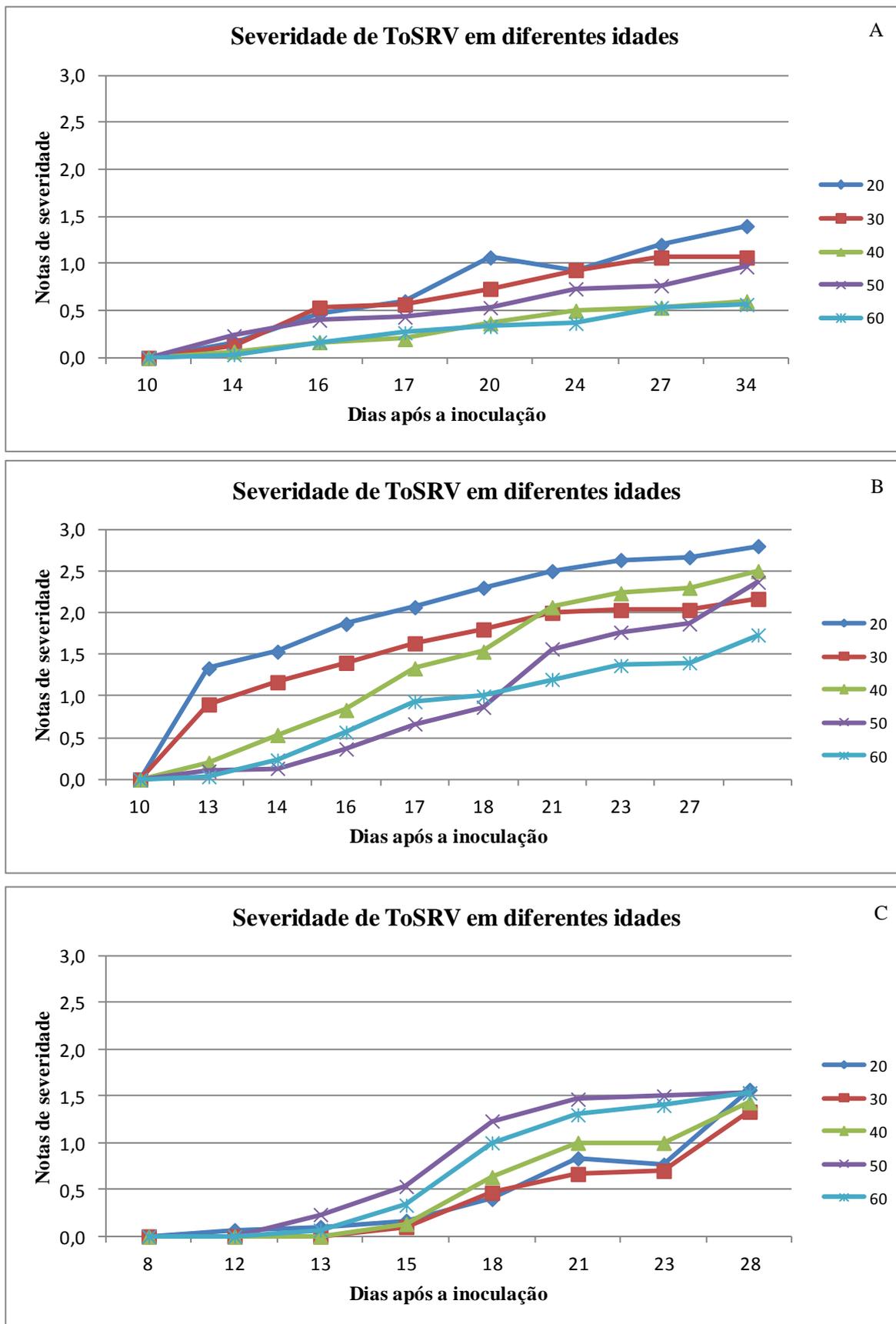


Figura 3. Média do índice de severidade de sintomas pela infecção de ToSRV em tomateiros da cultivar Heinz-9553 com diferentes idades de inoculação em três distintas épocas de realização do ensaio (inoculação em: 18/04/2016 – A, 22/09/2016 – B, 02/11/2016 – C).

3.3.3 Análise da altura e peso fresco das plantas com diferentes idades de mudas inoculadas com ToSRV em cultivar suscetível Heinz-9553

O peso e altura fresco das plantas foram medidos nas duas últimas repetições dos ensaios. Ao final das avaliações (30 DAI) as mudas inoculadas mais precocemente tenderam a apresentar menor peso e altura que as inoculadas mais tardiamente nas diferentes idades testadas. Os tratamentos com 20 dias foram diferentes dos demais tratamentos sem e com inoculação do vírus, apresentando respectivamente os menores valores de altura (30,67 e 25,14 cm) e peso (9,92 e 4,63 g) (Fig. 4 e 5).

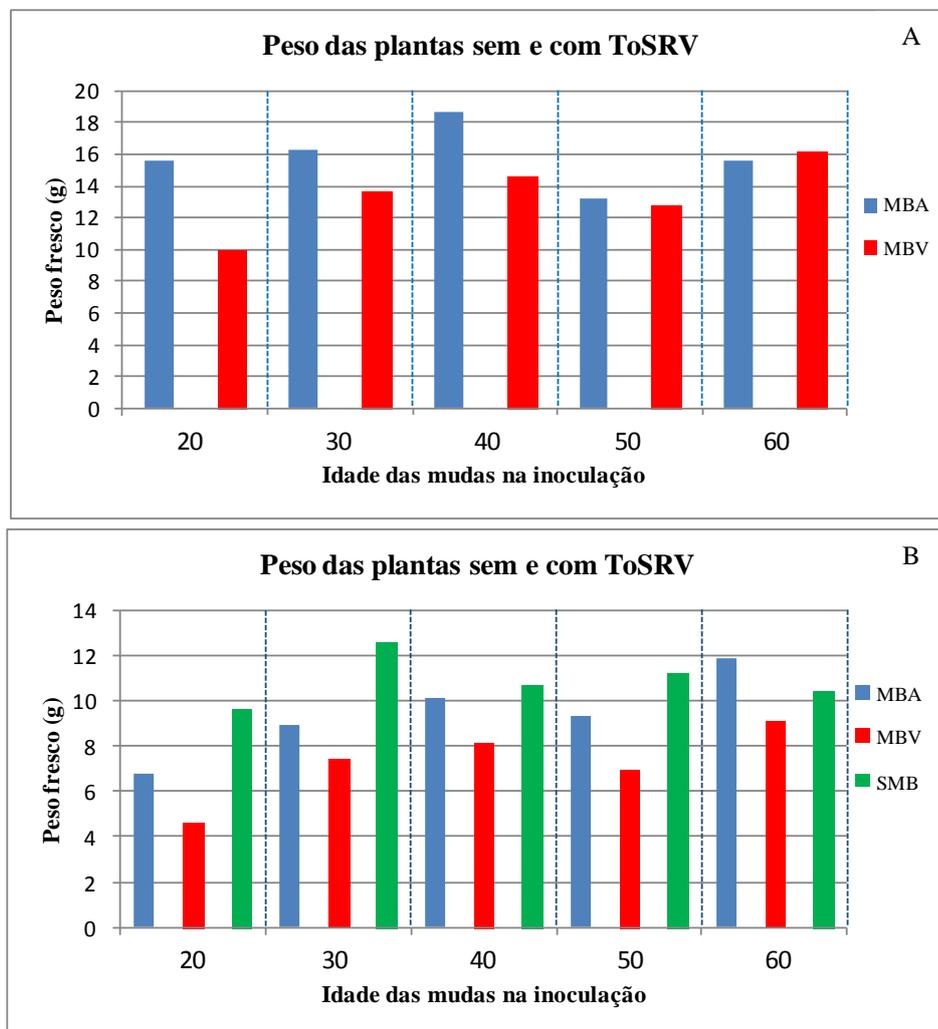


Figura 4. Valores médios do peso fresco das plantas de tomateiro Heinz-9553 com diferentes idades de inoculação com ToSRV, medido após 30 DAI em duas épocas de realização do ensaio (inoculação em: 22/09/2016 – A, 02/11/2016 – B). Os códigos distinguem os diferentes tratamentos com ou sem inoculação do vírus, sendo MBA as plantas confinadas com moscas-brancas avirulíferas, MBV as plantas inoculadas com moscas-brancas virulíferas e SMB as plantas que não tiveram contato com moscas-brancas durante o período de acesso de inoculação.

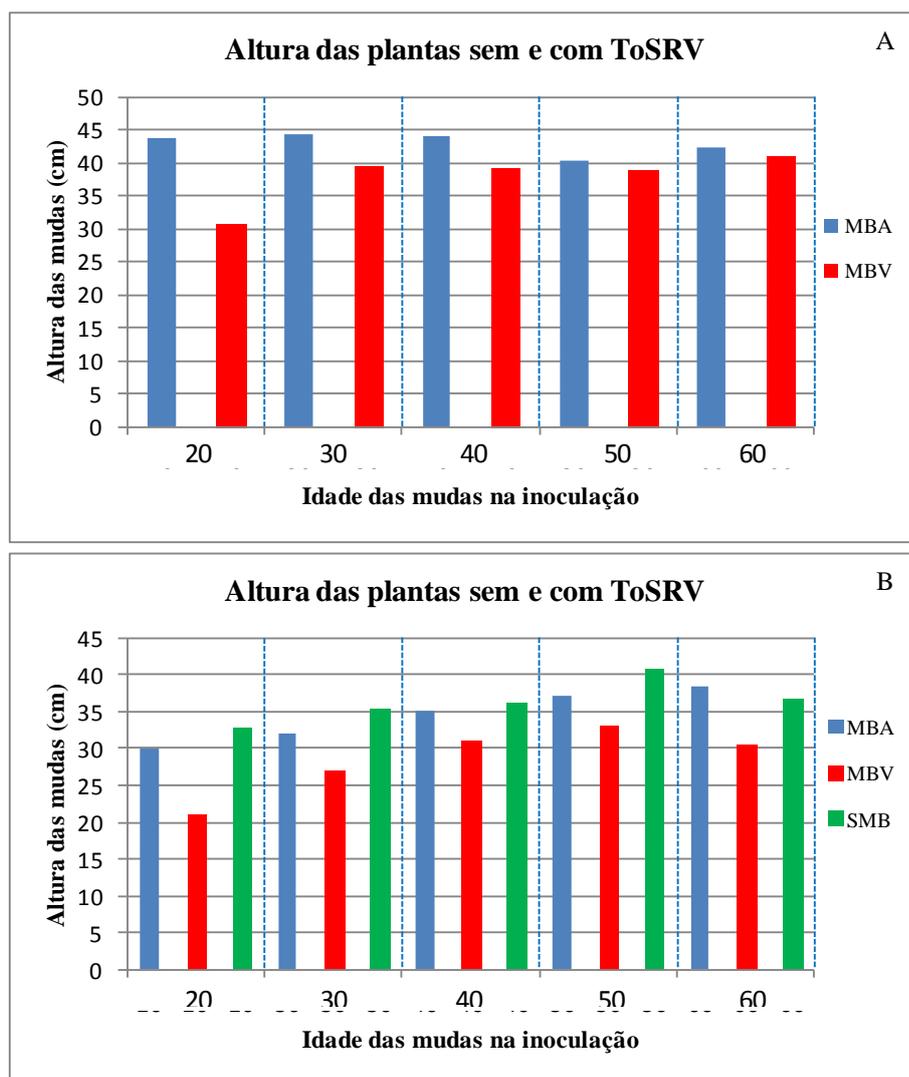


Figura 5. Valores médios da altura das plantas de tomateiro Heinz-9553 com diferentes idades de inoculação com ToSRV, medido após 30 DAI em duas épocas de realização do ensaio (inoculação em: 22/09/2016 – A, 02/11/2016 – B). Os códigos distinguem os diferentes tratamentos com ou sem inoculação do vírus, sendo MBA as plantas confinadas com moscas-brancas avirulíferas, MBV as plantas inoculadas com moscas-brancas virulíferas e SMB as plantas que não tiveram contato com moscas-brancas durante o período de acesso de inoculação.

Uma variação significativa entre o peso das plantas inoculadas e as não inoculadas com o vírus foi constatada nos tratamentos com 20, 30 e 40 dias da repetição 2 do ensaio e, em todos os tratamentos da repetição 3 (Tabela 4). Independente da presença do vírus nas diferentes mudas, todas as idades testadas apresentaram uma variação no seu peso ao final do

ensaio, sendo os menores pesos encontrados no tratamento com 20 dias inoculado com moscas-brancas virulíferas ou avirulíferas. Os maiores pesos das mudas inoculadas com moscas-brancas virulíferas e avirulíferas na repetição 3 foram observados no tratamento com 60 dias. Na repetição 2 do ensaio, o tratamento com 40 dias apresentou os maiores valores nas mudas confinadas com moscas-brancas avirulíferas e o com 60 dias nas plantas inoculadas com moscas-brancas virulíferas.

Tabela 4. Peso fresco em gramas das plantas de tomateiro (Heinz-9553) infectadas com *Tomato severe rugose vírus* (ToSRV) com diferentes idades de mudas na inoculação por moscas-brancas virulíferas (MBV) e confinamento com moscas-brancas avirulíferas (MBA) em duas repetições do ensaio no tempo aos 30 dias após a inoculação.

Idades	Rep 2		Rep 3		Valores médios	
	MBA	MBV	MBA	MBV	MBA	MBV
20	15,5aa	9,9ab	6,7aa	4,6ab	11,1	7,2
30	16,2aa	13,6bb	9,0ba	7,0bb	12,6	10,3
40	18,6ca	14,6bb	10,0ba	7,9bb	14,3	11,2
50	13,2ba	12,7ba	9,4ba	6,8bb	11,3	9,8
60	15,5aa	16,1ca	11,8ca	9,1cb	13,7	12,6

*Médias seguidas por mesma letra diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) entre as idades de mudas no momento da inoculação.

A análise estatística dos dados de altura mostrou uma diferença significativa entre os tratamentos com vírus e sem vírus para todas as idades testadas da repetição 3 e nos tratamentos com 20, 30 e 40 dias da repetição 2, enquanto as idades de 50 e 60 dias não diferiram dos controle sem vírus (Tabela 5). Não foi observada diferença estatística nos tratamentos inoculados com moscas-brancas avirulíferas na repetição 2 e uma diferença existiu entre os tratamentos com 20 e 30 dias e aqueles com 40, 50 e 60 dias da repetição 3. Nos tratamentos inoculados com mosca-brancas virulíferas, na repetição 2, apenas o tratamento com 20 dias diferiu estatisticamente dos demais, com um diferença média de 10,0 cm entre este tratamento e o com a maior altura nesta repetição (tratamento com 60 dias).

Tabela 5. Altura em centímetros das plantas de tomateiro (Heinz-9553) infectadas com *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) com diferentes idades de mudas na inoculação por moscas-brancas avirulíferas (MBA) e virulíferas (MBV) em duas repetições do ensaio no tempo 30 dias após a inoculação.

Idades	Rep 2		Rep 3		Valores Médios	
	MBA	MBV	MBA	MBV	MBA	MBV
20	43,6aa	30,6ab	29,2aa	21,0ab	36,4	25,8
30	44,3aa	39,5bb	31,9aa	26,9bb	38,1	33,2
40	44,0aa	39,1bb	35,1ba	30,9cb	39,5	35,0
50	40,4aa	38,9ba	37,0ba	31,8cb	38,7	35,4
60	42,2aa	40,8ba	38,4ba	30,5cb	40,3	35,6

*Médias seguidas por mesma letra diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) entre as idades de mudas no momento da inoculação

A repetição 3 apresentou diferenças estatísticas entre as idades de 20 dias (21,05 cm), 30 dias (26,94) e 40, 50 e 60 dias (30,5 a 31,8 cm), as quais não diferiram entre si. Os valores extremos encontrados nas repetições do ensaio foram 30,67 cm e 21,05 cm de mínima e 40,85 cm e 31,85 cm de máxima altura, respectivamente, para as plantas avirulíferas e virulíferas das repetições 2 e 3.

3.4 DISCUSSÃO

Na realização de trabalhos envolvendo vários fatores com a interrelação planta-vírus-vetor estudada neste ensaio, comumente se depara com diversas dificuldades relacionadas à uniformização de cada componente nas repetições e principalmente com obtenção de resultados padronizados ao final das avaliações dos tratamentos. Na situação estudada, os mesmos problemas foram observados quanto adequação das mudas nas diferentes idades no momento exato para montagem do ensaio, a uniformização da quantidade de moscas-brancas virulíferas na aquisição e na inoculação, devido à mortalidade natural do inseto e problemas de manuseio, a obtenção de igual controle das moscas-brancas após a inoculação com os inseticidas, a redução das variáveis ocasionadas pelo estresse do transplântio e do ambiente de condução do ensaio, assim como a casualização das repetições para amenizar o efeito diversificado do ambiente sobre as mudas. Todos esses fatores conduzem a possíveis erros e diminuem a confiabilidades dos dados quando não controlados e verificados antecipadamente. Apesar da ocorrência de muitas destas variáveis, o controle prévio das mesmas e a realização de ensaios completos feitos separadamente no tempo e concordando entre si, permitiu gerar dados estatisticamente analisáveis e gerar conclusões confiáveis para o efeito das idades de mudas na inoculação por ToSRV pela moscas-brancas.

Uma variação no peso e altura das mudas com diferentes idades na inoculação foi observada tanto nos tratamentos com a presença do vírus como naqueles sem o vírus, quando esses dados foram mensurados aos 30 dias após a inoculação. Essa característica parece estar associada principalmente ao estágio de desenvolvimento das plantas no momento do transplântio, sendo que empiricamente já se esperava que a muda de 60 dias fosse mais alta e pesada que a de 20 dias, o que de fato foi observado. No entanto, nas mudas onde houve a inoculação de ToSRV a diferença foi maior, principalmente nos tratamentos com plantas mais novas, quando quanto maior foi a idade das plantas menor diferença de peso e altura foram

observadas. Foi verificado que em média para as mudas de 20 e 30 dias a diferença de tamanho nos tratamentos com inoculação do begomovírus foi de 22,4% a 21,98% na altura e de 27,4% a 34,1% de gramas no peso fresco das duas repetições, respectivamente. Por outro lado, nas plantas não inoculadas com o vírus a variação média foi de no máximo 4,4% na altura e 12,0% no peso. Nas idades de 30 a 60 dias a variação no peso e altura para as mudas com vírus ou sem vírus foram iguais, sendo de em média de 1,0 a 2,0% na altura e 17,0 a 19,0% no peso, sendo que nas plantas com ToSRV os valores foram sempre menores. É interessante destacar que a simples presença das moscas-brancas avíruíficas nas plantas de tomate, quando comparadas aos controles sem moscas-brancas, apresentaram uma redução no tamanho e peso fresco destas plantas. Demonstrando o efeito prejudicial da colonização das plantas pelo inseto.

A diferença da altura e peso entre as plantas com e sem ToSRV diminui com as idades das mudas, sendo que essa diferença na idade de 20 dias foi em média de 10 cm para altura e 4 gramas para o peso. Não foi demonstrada uma diferença estatística para todos os tratamentos, os valores visivelmente tenderam a ser crescentes com as idades das plantas, tanto nas mudas com vírus como naquelas sem vírus. Essas informações sugerem que as mudas mais velhas desenvolvem-se melhor mesmo na presença do vírus, enquanto as mudas de 20 dias foram as menos favorecidas, ou seja, as que mais sofreram déficit de desenvolvimento na presença do vírus.

Essa diferença no desenvolvimento das plantas, entre outros fatores, possivelmente, influencia a atratividade da planta para as moscas-brancas. Nesse contexto, é necessário destacar que a forma de inoculação aplicada neste ensaio visou impedir o efeito seletivo das moscas-brancas quanto às mudas com diferentes idades, visto que plantas mais novas aparentam ser mais atrativas para o inseto. Assim, a inoculação das mudas com diferentes idades em uma mesma gaiola iria provavelmente mascarar os dados da taxa de infecção, e

conduzir a observação de que uma maior resistência ao vírus está presente em plantas mais velhas no momento da inoculação. Nesse caso, na realidade o que estaria acontecendo é que as moscas-brancas se concentrariam nas plantas mais novas em detrimento das mais velhas pela seletividade exercida pelo inseto sobre as mudas. Não há trabalhos que demonstrem essa seletividade quanto à idade da muda pelas moscas-brancas, mas esta situação é normalmente observada no campo.

Os processos de defesa natural das plantas têm um impacto direto sobre a adaptação e interação com insetos e patógenos (Huot *et al.*, 2013). Interações entre mosca-branca e begomovírus com as plantas podem sofrer influência dos processos de defesa de plantas (Belluire *et al.*, 2005; Colvin *et al.*, 2006). A observação de que plantas mais velhas são mais resistentes a determinadas doenças é relatada em campo por pesquisadores e produtores (Macedo *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2012). Neste trabalho, não foi possível comprovar a existência desta resistência de planta velha em tomateiros susceptíveis a ToSRV. Entretanto, dentre as idades de mudas avaliadas, naquelas mais velhas com 60 dias de semeadas, foi observado um atraso no desenvolvimento da doença em alguns dias e diminuição da severidade da virose.

Segundo Briddon (2015), a resposta da planta à infecção é manifestada pelo desenvolvimento de sintomas característicos de uma combinação particular de vírus-hospedeiro. Este sintoma típico é definido pelas complexas interações envolvendo as condições ambientais, a morfologia da planta e o estágio de desenvolvimento na época da infecção. O genótipo do vírus irá influenciar o tropismo e acumulação no tecido. Como resultado de sua diversidade genética e ampla gama de hospedeiros, begomoviroses são associadas com uma variedade de sintomas que incluem nanismo da planta, enrolamento foliar, clorose, clareamento de nervuras, produção de enação e outras anormalidades nos

tecidos. Sintomas semelhantes foram observados no presente estudo, como demonstrados na figura 6A-G.

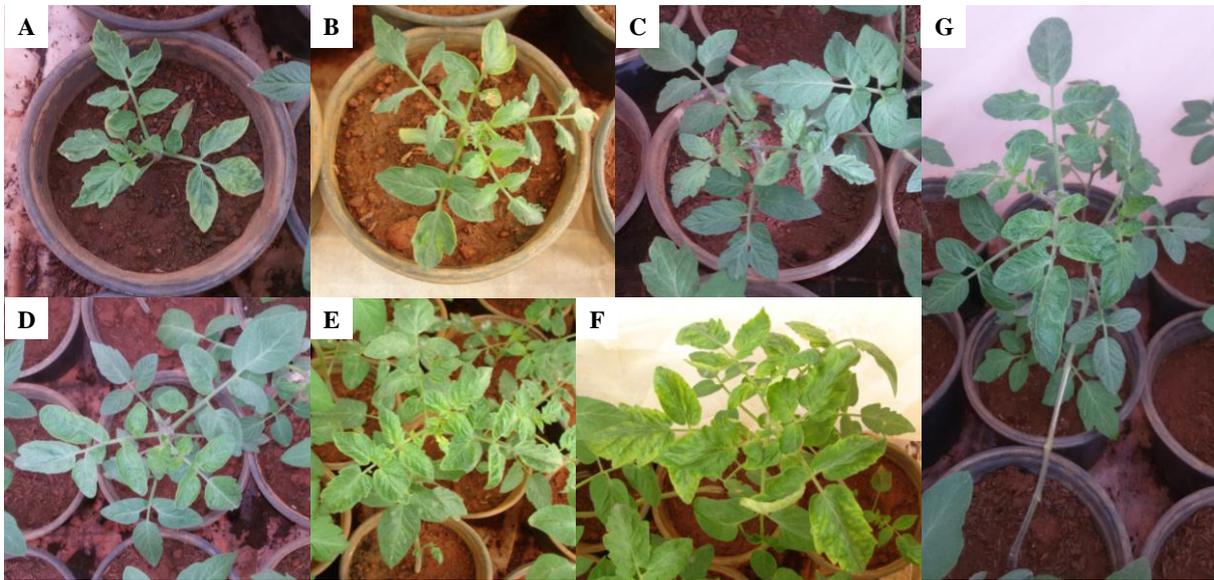


Figura 6. Sintomas observados nas mudas de tomateiro Heinz-9553 com diferentes idades na inoculação pela mosca-branca do vírus ToSRV. A- muda de 20 dias com nota 2 (presença de clorose internerval, resquícos do clareamento de nervuras e leve enrugamento e deformação foliar, início da estagnação no desenvolvimento); B- muda de 20 dias com nota 1 aos 18 DAI (acentuada deformação foliar e presença de clareamento de nervuras); C- muda de 30 dias com nota 1/2 (presença de suave deformação foliar, início de enrugamento e redução do tamanho das folhas, clareamento de nervuras e suave clorose internerval); D- muda de 40 dias com nota 2 (presença de clareamento de nervuras em várias folhas); E- muda de 50 dias com nota 2 aos 18 DAI (clorose internerval, enrugamento foliar e resquíco de clareamento de nervuras); F- muda de 30 dias com nota 3 aos 23 DAI (clorose internerval em praticamente todas as folhas, rugosidade foliar e aparente redução no crescimento); G- muda de 60 dias com nota 2 (clorose internerval, rugosidade foliar suave). *Observar na figura B que existem pontos cloróticos nas folhas mais velhas da planta que não são efeito da infecção pelo vírus, mas sim resposta a fitotoxicidade do inseticida utilizado na eliminação das moscas-brancas após a inoculação.

Distintos sintomas foram observados nas mudas inoculadas com ToSRV neste ensaio. Em todas as repetições foi constatado um maior efeito do vírus na redução do desenvolvimento inicial das mudas com 20 dias. Ocorreu uma redução significativa do tamanho e do peso destas em comparação com aquelas não inoculadas com o vírus, sendo também observada uma expressão mais forte dos sintomas nestas plantas. Com exceção do observado para a repetição 3 do ensaio, as mudas de 20 dias apresentaram um atraso mais forte no desenvolvimento da planta e conseqüentemente na expressão de sintomas típicos da virose. O que observarmos foram deformações foliares e leve clareamento de nervuras, acompanhado da estagnação no desenvolvimento das folhas. Entretanto, no 28º DAI os sintomas aumentaram rapidamente, coincidindo com o retorno do desenvolvimento foliar

mais abundante na planta. As mudas de 30 dias apresentaram um efeito semelhante com a presença do vírus, mas conseguiram retornar o seu desenvolvimento mais eficientemente. Quanto às mudas de 40, 50 e 60 dias, a variação na expressão de sintomas iniciais foi menos ampla. Em geral, a virose se expressou pelo clareamento de nervuras das folhas mais novas e progrediu nestas folhas para um clorose internerval. Possivelmente devido a maior quantidade de área foliar, essas mudas expressaram mais nitidamente área cloróticas nas folhas novas e velhas, seguindo por uma evolução na rugosidade destas folhas. O efeito do nanismo destacado nas mudas de 20 dias não foi nítido nas mudas de 40, 50 ou 60 dias, apesar de serem observadas variações significativas de tamanho e peso para plantas de alguns destes tratamentos e em alguns casos com a atribuição de nota 3. Cabe resaltar, que, em geral, não foram observadas variações significativas quanto à severidade de notas e a incidência para os tratamentos testados, mesmo os valores sendo inversamente proporcionais à idade das mudas, porém o efeito destes tratamentos ocorreu de forma significativa no desenvolvimento fenológico das plantas sob infecção com ToSRV.

Moriones & Navas-Castillo (2010) também descrevem que sintomas observados em tomateiros infectados variam amplamente dependendo da época da doença sobre as plantas, as condições ambientais e a cultivar de tomate. Em adição, nanismo e aborto floral, um proeminente enrolamento das margens foliares é observado, assim como uma redução do tamanho das folhas e amarelecimento das folhas jovens. A redução no tamanho pode também ocorrer em frutos de plantas afetadas sem sintomas óbvios, conduzindo a significativas reduções em produção. Plantas infectadas no estágio inicial de cultivo serão severamente estagnadas, com abortamento floral e não sustentando os frutos. Entretanto, quando infecções ocorrem em estádios tardios de crescimento, frutos presentes antes da doença parecem amadurecer quase normalmente. Em adição as perdas diretas causadas por infecções, perdas

indiretas podem também resultar de limitações de produção de tomate em áreas e períodos quando moderada a baixa pressão da doença ocorrem.

A observação de que plantas mais velhas são mais resistentes a determinadas doenças é relatada em campo por pesquisadores e produtores (Macedo *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2012). O plantio comercial de tomate no Brasil é geralmente implantado com a utilização de mudas com 30 a 40 dias de idade que são produzidas por viveiros certificados para esta atividade e posteriormente transplantadas no campo. Como relatado anteriormente por Kelley & Boyhan (2014) e Orzolek *et al.* (2016), várias vantagens são observadas com essa prática. Entretanto, quando surge a necessidade de utilização de mudas mais velhas, o viveiro e o próprio agricultor se deparam com dificuldades quanto à produção, manuseio e até mesmo condução. Na produção de mudas mais velhas o viveiro necessita controlar o desenvolvimento dos tomateiros, e para isso, frequentemente utiliza hormônios e estabelece um controle rigoroso da irrigação. Porém, ambas as práticas podem acarretar em prejuízos no desenvolvimento da planta após o transplantio no campo, devido principalmente à falta de conhecimento sobre as formas mais adequadas de reabilitar essa planta no campo e conduzir seu desenvolvimento. Em países como os Estados Unidos, a utilização de plantas mais velhas vem sendo utilizada eficientemente e manejada sem muitos problemas de desenvolvimento das mudas transplantadas. Cabe aqui ampliar as informações sobre o efeito benéfico de mudas mais velhas de tomateiro no campo e impulsionar o desenvolvimento de estratégias para produzir e manejar mais eficientemente este tipo de mudas.

A infecção causada pelos begomovírus em tomateiro pode provocar prejuízos graves, principalmente quando as plantas se infectam cedo, até três semanas do transplantio (Macedo *et al.*, 2014). Sendo o controle eficiente da begomovirose baseado no atraso da infecção das plantas. Assim, os primeiros 30 dias após o transplantio são determinantes para o sucesso do manejo da doença. Todavia, retardar o início da infecção não é uma tarefa fácil, por isso, o

controle da doença deve-se ser iniciado antes mesmo do transplante do tomateiro. Para o manejo da begomovirose, o primeiro ponto a ser considerado é definir a programação dos plantios ao longo da safra, evitando-se o plantio escalonado (sucessivo) de tomateiro em áreas vizinhas. Quando isso não for possível, a idade entre cultivos e de plantas dentro da mesma lavoura não deve ultrapassar 60 dias. O próximo passo é selecionar áreas de cultivo sem histórico de ocorrência de begomovírus, embora seja tarefa complexa hoje em dia. A época de plantio também é importante. Deve-se fugir dos períodos com altas populações de moscas brancas, multiplicados em outras culturas, como soja, algodão e feijão. Uma recomendação fundamental para um bom produtor de tomate é controlar as moscas brancas em culturas vizinhas, principalmente aquelas que atuam como multiplicadoras de moscas brancas (soja, algodoeiro, feijoeiro e cucurbitáceas) (Macedo *et al.*, 2014).

A completa erradicação de infecções virais é difícil a partir do momento em que a doença já se tornou estabelecida em uma determinada área, embora uma combinação de boas práticas de produção ajude a minimizar o impacto da doença. Estas medidas incluem seleção de datas de plantio que evitem períodos críticos quando altas populações de moscas-brancas estão presentes. O uso de telas de proteção para as culturas ajudam muito a excluir o vetor e infecções (Moriones & Navas-Castillo, 2010). Práticas de cultivo que reduzam a taxa de transmissão do vetor e/ou a densidade populacional podem também minimizar a dispersão das infecções (Seal *et al.* 2006).

Desta forma, a utilização do plantio de mudas mais velhas no campo como forma de escape de epidemias mais severas desta begomovirose irá atuar como uma estratégia de manejo a mais a ser implantada nos cultivos de tomateiros para redução da taxa de infecção.

3.5 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO

Não foi observado um efeito estatisticamente significativo da resistência de planta madura à virose ocasionada por ToSRV em relação à idade de mudas no momento da avaliação.

Mudas de 20 dias demonstram maior sensibilidade à virose, apresentando os maiores valores de incidência e severidade, enquanto que as mudas mais velhas (60 dias) apresentaram os menores valores para incidência e severidade.

O desenvolvimento da virose foi mais rápido nas mudas mais novas que nas mais velhas, porém após os 30 dias seguidos à inoculação, a taxa de infecção de tomateiros ao vírus ToSRV foi igual para os tratamentos testados.

Independente da idade da muda, o aumento da expressão/severidade da doença foi gradativo e se igualou estatisticamente ao final das avaliações.

A presença do vírus afetou significativamente a altura e o peso fresco das mudas utilizadas no ensaio.

CONCLUSÕES GERAIS

Ensaio de taxa de incidência e severidade de sintomas são complexos de serem realizados, com diversas variáveis que influenciam os resultados.

A presença de uma alta população de moscas-brancas virulíferas deve exercer papel importante no desenvolvimento da virose, acelerando a expressão e severidade dos sintomas em cultivar suscetível e resistente.

A inoculação de ToSRV com um alto número de insetos virulíferos (30-60) resulta em valores altos de incidência em cultivar suscetível Heinz-9553 e expressão de sintomas visíveis em cultivar resistência BRS Sena.

A presença de um único vetor virulífero em cultivar suscetíveis (Heinz-9553) é capaz de infectar a planta com ToSRV e favorecer a expressão de sintomas severos da virose. Enquanto na cultivar resistente apenas um vetor virulífero parece ser incapaz de infectar uma planta resistente ao begomovírus (BRS Sena).

A atuação de cultivares resistentes a begomovírus como fontes de vírus no campo necessita ser estudada, uma vez que altas populações de moscas-brancas são constantemente relatadas em cultivos de tomateiro.

Neste trabalho não foi possível observar um efeito estatisticamente significativo da resistência de planta madura à virose ocasionada por ToSRV nas idades de mudas avaliadas.

Plantas de tomate entre 20 e 30 dias de semeadura são mais sensíveis a virose por ToSRV que mudas de 60 dias. Mas para este trabalho, independente da idade o aumento da expressão/severidade da doença é gradativo e se igualou ao final das avaliações.

A presença do begomovírus ToSRV afeta significativamente a altura e peso fresco dos tomateiros quando inoculados com o vírus entre as idade de 20 a 60 dias depois da semeadura.

LITERATURA CITADA

AGRODEFESA. Instrução Normativa Estadual. 2011. Vazio sanitário do tomate no estado do Goiás. Disponível em:<<http://www.agrodefesa.go.gov.br/post/ver/184769/legislacao>>.

ALBUQUERQUE, L. C., VARSANI, A., FERNANDES, F. R., PINHEIRO, B., MARTIN, D. P., FERREIRA, P. T. O., LEMOS, T. O. & INOUE-NAGATA, A. K. 2012. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, 157:747–752.

ANBINDER, I.; REUVENI, M.; AZARI, R.; PARAN, I.; NAHON, S.; SHLOMO, H.; CHEN, L.; LAPIDOT, M. & LEVIN, I. 2009. Molecular dissection of *Tomato leaf curl virus* resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 519-530.

BARBOSA, J. C., REZENDE, J. A. M., AMORIM, L., & BERGAMIN FILHO, A. 2015. Temporal dynamics of *Tomato severe rugose virus* and *Bemisia tabaci* in tomato fields in São Paulo, Brazil. *Journal of Phytopathology*, 164:1-10.

BARBOSA, J. C., TEIXEIRA, A. P. M., MOREIRA, A. G., CAMARGO, L. E. A., BERGAMIN, A., KITAJIMA, E. W. & REZENDE, J. A. M. 2008. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Brazil. *Plant Disease*, 92:1709–1709.

BARBOSA, L. F. Diversidade de *Bemisia tabaci* na América Latina e detecção de seus endossimbiontes. Tese de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP. Botucatu, 2014.

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

BELLIURE, B., JANSSEN, A., MARIS, P.C., PETERS, D. & SABELIS, M.W. 2005. Herbivore arthropods benefit from vectoring plant viruses. *Ecology Letters*, 8:70–79.

BERGAMIN FILHO, A.; INOUE-NAGATA, A. K.; BASSANEZI, R. B.; BELASQUE JR, J.; AMORIM, L.; MACEDO, M. A.; BARBOSA, J. C.; WILLOCQUET, L. & SAVARY, S. 2016. The importance of primary inoculum and area-wide disease management to crop health and food security. *Food Security*, 8:221-238. <<https://doi.org/10.1007/s12571-015-0544-8>>.

- BETHKE, J. A., PAINE, T. D. & NUSSLY, G. S. 1991. Comparative biology, morphometrics, and development of two populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on cotton and poinsettia. *Annals of the Entomological Society of America*, 84:407-411.
- BOSCO, D.; MASON, G.; ACCOTTO, G.P. 2004. TYLCSV DNA, but not infectivity, can be transovarially inherited by the progeny of the whitefly vector *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Virology*, 323:276-283.
- BRIDDON, R. W. 2015. Geminiviridae. In: *Encyclopedia Life Sciences (eLS)*, John Wiley & Sons, 1–12, Ltd: Chichester. <<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000750.pub3>>.
- BRIDDON, R.W. & STANLEY, J. 2006. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology*, 344:198–210
- BRIDDON, R.W.; BULL S.E.; AMIN, I.; IDRIS, A.M.; MANSOOR, S.; BEDFORD, I.D.; DHAWAN, P.; RISHI, N.; SIWATCH, S.S.; ABDEL-SALAM, A.M.; BROWN, J.K.; ZAFAR, Y. & MARKHAMA, P.G. 2003. Diversity of DNA b, a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology*, 312:106–121
- BRIDDON, R.W.; MANSOOR, S.; BEDFORD, I.D.; PINNER, M.S.; SAUNDERS, K; STANLEY, J.; ZAFAR, Y.; MALIK, K.A. & MARKHAM, P.G. 2001. Identification of DNA components required for induction of Cotton Leaf Curl Disease. *Virology*, 285: 234-243.
- BROWN J.K., FAUQUET C.M., BRIDDON R.W., ZERBINI M., MORIONES E., NAVAS-CASTILLO J. *Geminiviridae*. In: KING A.M.Q., ADAMS M.J., CARSTENS E.B. & LEFKOWITZ E.J. (eds). 2012. *Virus Taxonomy - Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Associated Press, Elsevier Inc.; London, UK. pp. 351–373.
- BROWN, J. K. 1990. An update on the whitefly-transmitted geminiviruses in the Americas and the Caribbean basin. *FAO (Food Agric. Organ U.N.) Bull.* 39:5-23.
- BROWN, J. K., FROHLICH, D. R. & ROSELL, R. C. 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annual Review Entomology*, 40:511-534.
- BUTTERBACHA, P.; VERLAANB, M.G.; DULLEMANS, A.; LOHUISA, D.; VISSERB, R.G. F.; BAIB, Y. & KORMELINKA, R. 2014. *Tomato yellow leaf curl virus* resistance by *Ty-1* involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by *Cucumber mosaic virus* infection. *PNAS*, 111:12942–12947.

BYRNE, D. N.; BELLOWS JUNIOR., T. S. 1991. Whitefly biology. *Annual Review of Entomology*, Stanford, 36:431-457.

CARO, M., VERLAAN, M. G., JULIÁN, O., FINKERS, R., WOLTERS, A. M. A., HUTTON, S. F., SCOTT, J.W.; KORMELINK, R.; VISSER, R.G.F.; DÍEZ, M.J.; PÉREZ-DE-CASTRO, A. & BAI, Y. 2015. Assessing the genetic variation of *Ty-1* and *Ty-3* alleles conferring resistance to tomato yellow leaf curl virus in a broad tomato germplasm. *Molecular Breeding*, 35(6). <<https://doi.org/10.1007/s11032-015-0329-y>>.

CLEMENTE, F.M.V.T.; MENDONÇA, J.L. & ALVARENGA, M.A. 2013. *Tomate - Tratos culturais*. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tomate/arvore/CONT000fa2qor2r02wx5eo01xezshcwkfx5.html>>.

COLVIN, J.; OMONGO, C.A.; GOVINDAPPA, M.R.; STEVENSON, P. C.; MARUTHI, M.N.; GIBSON, G.; SEAL, S.E. & MUNIYAPPA, V. 2006. Host–plant viral infection effects on arthropod–vector population growth, development and behaviour: management and epidemiological implications. *In*: Karl Maramorosch, A.J.S. & Thresh, J.M. (eds). *Advances in Virus Research*. Academic Press, San Diego, p.419–452

COLVIN, J.; OMONGO, C.A.; MARUTHI, M.N.; OTIM-NAPE, G.W. & THRESH, J.M. 2004. Dual begomovirus infections and high *Bemisia tabaci* populations: two factors driving the spread of a cassava mosaic disease pandemic. *Plant Pathology*, 53:577–584.

COOPER, J.I. & JONES, A.T. 1983. Responses of plants to viruses: Proposals for the use of terms. *Phytopathology*, 73:127-128.

COSTA, H. S. & BROWN, J. K. 1991. Variation in biological characteristics and in esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci* (Genn.) and the association of one population with silverleaf symptom development. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 61:211-219.

CUI, X.; LI G.; WANG, D.; HU, D. & ZHOU, X. 2005. A begomovirus DNA β -encoded protein binds DNA, functions as a suppressor of RNA silencing, and targets the cell nucleus. *Journal of Virology*, 79:10764–10775.

CZOSNEK, H.; GHANIM, M.; MORIN, S.; RUBENSTEIN, G.; FRIDMAN, V. & ZEIDAN, M. 2001. Whiteflies: vectors and victims (?), of geminiviruses. *Advances in Virus Research*, San Diego, 57:291-322a.

DALTON, R. 2006. Whitefly infestations: the Christmas invasion. *Nature*, 443:898–900.

DE BARRO, P.J.; LIU, S.S.; BOYKIN, L.M. & DINSDALE, A.B. 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual Review of Entomology*, 56:1-19.

DELLA VECCHIA, M.G.S; ROSA, D.D.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. & RIBEIRO, A. 2007. Dinâmica temporal e espacial da begomovirose causada por *Tomato yellow vein streak virus* em tomateiro na região de Campinas-SP. *Summa Phytopathologica*, 33:388-395

DINSDALE, A.; COOK, L.; RIGINOS, C.; BUCKLEY, Y. M. & DE BARRO, P. 2010. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. *Annals of the Entomological Society of America*, 103:196-208.

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

FAOSAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics. <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>.

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.

FAUQUET, C. M. & STANLEY, J. 2003. Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems. *Annals of Applied Biology*, 142:165-189.

FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUE, L.C.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; ÁVILA, A.C. & INOUE-NAGATA, A.K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36: 251-258.

FILGUEIRA, F.A.R. 2003. Solanáceas II - Tomate: a hortaliça cosmopolita. In: Filgueira, F.A.R. (ed.). *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. 2ª ed. Editora UFV. Viçosa-MG. p.193-238.

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

FONTES, E.P.B.; GLADFELTER, H.J.; SCHAFFER, R.L.; PETTY, I.T.D. & HANLEY-BOWDOIN, L. 1994. Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell*, 6:405-416.

GHANIM, M. & CZOSNEK, H. 2000. *Tomato yellow leaf curl* geminivirus (TYLCV-Is) is transmitted among whiteflies (*Bemisia tabaci*) in a sex-related manner. *Journal of Virology*, 74:4738-4745.

GHANIM, M. (2014). A review of the mechanisms and components that determine the transmission efficiency of *Tomato yellow leaf curl virus* (*Geminiviridae; Begomovirus*) by its whitefly vector. *Virus Research*, 186:47–54. <<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.01.022>>.

GHANIM, M.; MORIN, S. & CZOSNEK, K. 2001. Rate of *Tomato yellow leaf curl virus* translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology*. 91:188-196.

GHANIM, M.; MORIN, S.; ZEIDAN, M. & CZOSNEK, H. 1998. Evidence for transovarial transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology*, 240:295-303.

GIORDANO, L.B.; DE ÁVILA, A.C.; CHARCHAR, J.M.; BOITEUX, L.S. & FERRAZ, E. 2000. Viradoro: A Tospovirus-resistant processing tomato cultivar adapted to tropical environments. *HortScience*,35:1368-1370.

GOLDMAN, V. & CZOSNEK, H. 2002. Whiteflies (*Bemisia tabaci*) issued from eggs bombarded with infectious DNA clones of *Tomato yellow leaf curl virus from Israel* (TYLCV) are able to infect tomato plants. *Archives Virology*, 147:787-801.

HANSON, P.; GREEN, S.K. & KUO, G. 2006. *Ty-2*, a gene in chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Tomato Genetic Cooperative Report*, 56:17-18.

HARRISON BD, BARKER H, BOCK KR, GUTHRIE, E. J., MEREDITH, G. & ATKINSON, M. 1977. Plant viruses with circular single-stranded DNA. *Nature*, 270:761-762.

HENNEBERRY, T.J.; JONES, W.A.; PERRING, T.M. & FAUST, R.M. 2000. Silverleaf whitefly: National research, action, and technology transfer plan (Formerly Sweetpotato whitefly, Strain B). Third Annual Review of the Second 5-Year Plan, US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, p. 209.

HUOT, O.B.; NACHAPPA, P. & TAMBORINDEGUY, C. 2013. The evolutionary strategies of plant defenses have a dynamic impact on the adaptations and interactions of vectors and pathogens. *Insect Science* 20:297–306.

HUTTON, S. F.; SCOTT, J. W. & SCHUSTER, D. J. 2012. Recessive resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from the tomato cultivar Tyking is located in the same region as *ty-5* on chromosome 4. *HortScience*, 47:324-327.

HUTTON, S.F. & SCOTT, J.W. 2013. Fine-mapping and cloning of *Ty-1* and *Ty-3*; and mapping of a new TYLCV resistance locus, *Ty-6*. <<http://tgc.ifas.ufl.edu/2013/abstracts/SamOrchardAbstract%20TBRT%202013.pdf>>.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2016. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro, v.29, n.11.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. <<http://www.ictvonline.org/>>.

INOUE-NAGATA, A. K. (2013). Doenças Viróticas. In M. A. R. Alvarenga (ed.), Tomate. Produção em campo, casa de vegetação e hidroponia. Editora Universitária de Lavras, Lavras, p. 327–344.

JACINTO, L.U.; SOARES, B.B.; RANGEL, R. & JACINTO, A.F.V.U. 2012. Transplântio e colheita mecanizada. In: Clemente, F.M.V.T & Boiteux, L.S. (eds.). Produção de tomate para processamento industrial. 1ª ed. Embrapa. Brasília-DF. p.315-327.

JEGER, M. J.; HOLT, J.; VAN DEN BOSCH, F. & MADDEN, L. V. 2004. Epidemiology of insect-transmitted plant viruses: Modelling disease dynamics and control interventions. *Physiological Entomology*, 29:291-304. <<https://doi.org/10.1111/j.0307-6962.2004.00394.x>>.

JI, Y., SCOTT, J. W., SCHUSTER, D. J. & MAXWELL, D. P. 2009. Molecular mapping of *Ty-4*, a new *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus on chromosome 3 of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134:281-288.

JI, Y.; SCOTT, J.W.; HANSON, P.; GRAHAM, E. & MAXWELL, D.P. 2007. Sources of resistance, inheritance, and location of genetic loci conferring resistance to members of the tomato-infecting begomoviruses. In: Czosnek, H. (ed.) *Tomato yellow leaf curl virus* disease: Management, molecular biology, Breeding for resistance. 1ª ed. Springer, Dordrecht, p.343-362.

JIU, M.; ZHOU, X.P.; TONG, L.; XU, J.; YANG, X.; WAN, F.H. & LIU, S. S. 2007. Vector-virus mutualism accelerates population increase of an invasive whitefly. *PLoS ONE* 2, e182. <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000182>>.

Kelley, W. T. & Boyhan, G. 2014. Commercial Tomato Production Handbook. UGA Extension, 1–48.

LAPIDOT, M.; KARNIEL, U.; GELBART, D.; FOGEL, D.; EVENOR, D.; KUTSHER, Y.; MAKHBASH, Z.; NAHON, S. *et al.* 2015. A novel route controlling Begomovirus resistance by the messenger RNA surveillance factor Pelota. *PLoS Genetics*, 11:1-19.

LEAL, M. A. de A. 2006. Produção de Tomate Orgânico: Sistema PESAGRO-RIO. Niterói: PESAGRO-RIO. Documento 97,p.39.

- LEGG, J.P. & FAUQUET, C.M. 2004. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. *Plant Molecular Biology*, 56:585–599.
- LIU, S.S.; COLVIN, J. & DE BARRO, P.J. 2012. Species concepts as applied to the whitefly *Bemisia tabaci* systematics: how many species are there?. *Journal of Integrative Agriculture*, 11:176–86.
- LOPES, C.A., REIS, A. 2011. Doenças do Tomateiro Cultivado em Ambiente Protegido. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, Circular Técnica 100, p.17.
- LOURENÇÃO, A. L. & NAGAI, H. 1994. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. *Bragantia*, 53:53-59.
- LUAN, J.B.; WANG, X.W.; COLVIN, J. & LIU, S.S. 2014. Plant-mediated whitefly-begomovirus interactions: research progress and future prospects. *Bulletin of Entomological Research*, 104:267-76. <<https://doi.org/10.1017/S000748531400011X>>.
- MACEDO, M.A. 2016. Progresso temporal e espacial de begomovirose e crinivirose em tomateiro. Tese de Doutorado em Fitopatologia. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- MACEDO, M.A.; BARRETO, S.S.; HALLWASS, M. & INOUE-NAGATA, A.K. 2014. High incidence of *Tomato chlorosis virus* alone and in mixed infection with begomoviruses in two tomato fields in the Federal District and Goiás state, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 39:449-452.
- MACEDO, M.A.; MICHEREFF FILHO, M. NAVAS-CASTILLO, J. & INOUE-NAGATA, A.K. 2015. Host range and whitefly transmission efficiency of *Tomato severe rugose virus* and *Tomato golden vein virus* in tomato plants. *Tropical Plant Pathology*, 40:405-409.
- MACEDO, M.A.; SOUZA, J.O.; MICHEREFF FILHO, M. & INOUE-NAGATA, A.K. 2014. Tomate: Manejo Racional. *Cultivar* 86, p.10-11.
- MAHATMA, L.; MAHATMA, M.K.; PANDYA, J.R.; SOLANKI, R.K.; SOLANKI, V.A. 2016. Epidemiology of Begomoviruses: A Global Perspective. In: GAUR, R.K.; PETROY, N.M.; PATIL, B.L. & STOYANOVA, M.I. *Plant Viruses: Evolution and Management*, Springer Science, 171-188. <<https://doi.org/10.1007/978-981-10-1406-2>>.
- MANSOOR, S.; AMIN, I.; IRAM, S.; HUSSAIN, M.; ZAFAR, Y.; MALIK, K.A. & BRIDDON, R.W. 2003. Breakdown of resistance in cotton to cotton leaf curl disease in Pakistan. *Plant Pathology*, 52:784.

MANSOOR, S.; BRIDDON, R.W.; ZAFAR, Y. & STANLEY, J. 2003. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends in Plant Science*, 8:128-134.

MANSOOR, S.; KHAN, S.H.; BASHIR, A. *et al.* 1999. Identification of a novel circular single-stranded DNA associated with cotton leaf curl disease in Pakistan. *Virology*, 259:190-199.

MÁRQUEZ-MARTÍN, B.; ARAGÓN-CABALLERO, L.; FIALLO-OLIVÉ, E.; NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. 2010. *Tomato leaf deformation virus*, a novel begomovirus associated with a severe disease of tomato in Peru. *European Journal of Plant Pathology*, 129:1-7.

MATTHEWS, R.E.F. 1979. The Classification and Nomenclature of Viruses. *Intervirology*, 11:133-135.

MAZYAD, H.M.; HASSAN, A.A.; NAKHLA, M.K. & MOUSTAGFA, S.E. 1982. Evaluation of some wild *Lycopersicon* species as sources of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Egyptian Journal of Horticultural*, 9:241-246.

MCGLASHAN, D.; POLSTON, J.E. & BOIS, D. 1994. Tomato yellow leaf curl geminivirus in Jamaica. *Plant Disease*, 78:1219.

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

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*, 87:1291-1297.

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

MORALES, F.J. & BOS, L. 1988. *Bean common mosaic virus*. AAB Descriptions of Plant Viruses, 337.

MORALES, F.J. 2001. Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. Tomato Breeders Roundtable. International Center for Tropical Agriculture (CIAT). Disponível em: <<https://www.oardc.ohio-state.edu/tomato/morales.pdf>>.

MORIONES & NAVAS-CASTILLO. 2010. Tomato Yellow Leaf Curl Disease Epidemics *In*: PHILIP A. STANSLY, STEVEN E. NARANJO (Eds.). *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*. 1ª ed. Springer Science, p.259-282.

NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A.K.; ÁVILA, A.C.; GIORDANO, L.B. 2004. Print-Capture PCR for detection of Tomato Begomoviruses from plants and whiteflies. *Fitopatologia Brasileira*, 29: 91-93.

NAIKA, S.; JEUDE, J.V.L.; GOFFAU, M.; MARTIN, H.; BARBARA V.D. 2006. *A Cultura do Tomate: Produção, Processamento e Comercialização*. Fundação Agromisa e CTA, Wageningen.

NASCIMENTO, W.M.; MELO, P.C.T & FREITAS, R.A. 2012. Produção de sementes. In: Clemente, F.M.V.T & Boiteux, L.S. (eds.). *Produção de Tomate para Processamento Industrial*. 1ª ed. Embrapa. Brasília-DF. p. 53-75.

OPEÑA, R.T.; CHEN, J.T.; KALB, T. & HANSON, P. 2001a. International Cooperators' Guide. Production, Seed Production of Open-Pollinated Tomato Lines. Asian Vegetable Research and Development Center, 1, n.4:1-4.
<http://203.64.245.61/web_crops/tomato/seed_op.pdf>.

OPEÑA, R.T.; CHEN, J.T.; KALB, T. & HANSON, P. 2001b. International Cooperators' Guide. Production Hybrid Seed Production in Tomato. Asian Vegetable Research and Development Center, 1, n.3:1-8.

ORZOLEK, M.D.; BOGASH, S.M.; COUNTY, F.; HARSH, R. M.; KIME, L.F. & HARPER, J.K. 2016. Agricultural alternatives: tomato production. PennState Extension. Disponível em: < http://extension.psu.edu/business/ag-alternatives/horticulture/vegetables/tomato-production/extension_publication_file>.

PATEL, V.D.; CHAUHAN, D.A.; MAHATMA, M. & MAHATMA, L. 2012. Estimation of losses in yield potential due to infection of MYMV in mungbean at the different stage of growth. Paper presented in the 3rd global conference of ISMPP on the theme "Plant pathology for food security" jointly organized by ISMPP and MPUA&T, Udaipur, January 10–13, p 50

PERRING, T.M. 2001. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection*, 20:725-737.

PERRING, T.M.; COOPER, A.D.; RODRIGUEZ, R.J.; FARRAR, C.A. & BELLOWS, T. S. 1993. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science*, 259:74-77.

PERVEEN, R. 2003. Some aspects of epidemiology of cotton leaf curl begomovirus (CLCuV) in Pakistan. Thesis in Doctor of Philosophy in Plant Pathology. Faculty of Agriculture. University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan.

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

PINTO, C.M.F.; CASALI, V.W.D. 1980. Tomate: tecnologia e produção. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 6, n.66:8.

POLSTON, J.E. & ANDERSON, P. K. 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease* v. 81 (12):1358-1369.

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

POLSTON, J.E.; SCHUSTER, D.J. & CHELLEMI, D.O. 1993. Advances in the management of tomato mottle geminivirus. *In: Vavrina, C. S. Ed. Proc. Fla. Tomato Inst. (1 ed.)* University of Florida, Vegetable Crops Special Series, p.69-76.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; NASCIMENTO, A.; PONTES, N.; MOITA, A.W.; ASSUNÇÃO, A.; GOLYNSKI, A.; INOUE-NAGATA, A. K.; OLIVEIRA, R. T.; CASTRO, Y. & MELO, B.J. 2014. Desempenho de híbridos de tomate para processamento industrial em presença de begomovirose e de mancha-bacteriana. *Horticultura Brasileira (Impresso)*, v. 32, p. 446-452.

RÊGO, C. M. 2016. Diversidade genômica de begomovírus em tomateiros resistente (BRS Sena) e suscetível (H-9553). Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.J.; RUSSEL, 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.

ROSELL, R.C.; TORRES-JEREZ, I. & BROWN J.K. 1999. Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph, and honeydew. *Phytopathology*, 89:239- 246.

SANTOS, C.D.G.; ÁVILA, A.C. & RESENDE, R.D.O. 2003. Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca. *Fitopatologia Brasileira*, 28:664–673.

SASAKI, J.L.S. & SENO, S. 1994. Importância na adubação de algumas olerícolas (alho, cebola, couve-flor, pimentão e tomate). In: SÁ, M.E.; BUZZETI, C. (Eds.). *Importância da Adubação na Qualidade dos Produtos Agrícolas*. São Paulo: Ícone, p. 331-343.

SAUNDERS, K., BEDFORD, I. D., YAHARA, T. & STANLEY, J. 2003. The earliest recorded plant virus disease. *Nature* 422, 831.

SAUNDERS, K.; BRIDDON, R.W. & STANLEY, J. 2008. Replication promiscuity of DNA b, satellites associated with monopartite begomoviruses; deletion mutagenesis of the *Ageratum yellow vein virus* DNA-[beta] satellite localizes sequences involved in replication. *Journal of General Virology*, 89:3165-3172.

SAUNDERS, K.; NORMAN, A.; GUCCIARDO, S. & STANLEY, J. 2004. The DNA b satellite component associated with *Ageratum yellow vein disease* encodes an essential pathogenicity protein (bC1). *Virology*, 324:37-47.

SCHUSTER, D.J., MUELLER, T.F., KRING, J.B. & PRICE, J.F. 1990. Relationship of the sweetpotato whitefly to a new tomato fruit disorder in Florida. *HortScience* 25:1618-1620.

SEAL, S.E.; VAN den BOSCH, F. & JEGER, M.J. 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25:23-46.

SILVA J.B.C. & GIORDANO, L.B. 2012. *Produção de Tomate para Processamento Industrial*. Brasília, Embrapa Hortaliças.

SONNENBERG, P.E.; SILVA, N.F. da. *As culturas de: Alface, Cenoura, Batata, Tomate, Cebola e Alho*. 8. ed. Goiânia, 2004. 127 p.

SPARKS, A.N. 2014. Insect Management. In: *Commercial Tomato Production Handbook*. UGA Extension, University of Georgia, 1312:31-38.
<<http://extension.uga.edu/publications/detail.cfm?number=B1312>>.

STANLEY, J.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P. & STENGER, D.C. 2005. Family *Geminiviridae*. In *Virus Taxonomy: Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier, London, p.301-326.

VAN den BOSCH, F.; AKUDIBILAH, G.; SEAL, S. & JEGER, M. 2006. Host resistance and the evolutionary response of plant viruses. *Journal of Applied Ecology*, 43:506-516.

VANDERPLANK, J.E. 1963. *Plant Diseases: Epidemics and Control*. Academic, New York, p 349.

VERLAAN, M.G.; HUTTON, S.F.; IBRAHEM, R.M.; KORMELINK, R.; VISSER, R.G.; SCOTT, J.W.; EDWARDS, J.D. & BAI, Y. 2013. The *Tomato yellow leaf curl virus* resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. *PLoS Genetics* 9: e1003399.

VERLAAN, M.G.; SZINAY, D.; HUTTON, S.F.; DE JONG, H.; KORMELINK, R.; VISSER, R.G.F.; SCOTT, J.W. & BAI, Y. 2011. Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping and breeding of the TYLCV resistance gene *Ty-1*. *The Plant Journal*, 68:1093-1103.

VU, S.; MELGAREJO, T.; CHEN, L.F.; SOUZA, J.O.; MACEDO, M.A.; INOUE-NAGATA, A.K. & GILBERTSON, R.L. 2015. Evidence that *Tomato mottle leaf curl virus* from Northeastern Brazil is an indigenous New World monopartite begomovirus. *In: Amecian Phytopathological Society Annual Meeting*. Pasadena.

YANG, X.; CARO, M.; HUTTON, S.F.; SCOTT, J.W.; GUO, Y.; WANG, X.; RASHID, M.H.; SZINAY, D. DE JONG, H.; VISSER, R.G.F.; BAI, Y. & DU, Y. 2014. Fine mapping of the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance gene *Ty-2* on chromosome 11 of tomato. *Molecular Breeding*, 34:749-760.

YANG, X.; XIE, Y. RAJA, P. *et al.* 2011. Suppression of methylation mediated transcriptional gene silencing by β C1-SAHH protein interaction during geminivirus-betasatellite infection. *PLoS Pathogens* 7: e1002329.

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

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

ZHANG, X. & SCHMIDT, R. E. 2000. Hormone-containing products' impact on antioxidant status of tall fescue and creeping bentgrass subjected to drought. *Crop Science*, 40:1344-1349.