



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

**Estudo dos fatores que influenciam a
predominância do begomovírus
Tomato severe rugose virus no Brasil**

MÔNICA ALVES DE MACÊDO

BRASÍLIA

2011

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**Estudo dos fatores que influenciam a
predominância do begomovírus
Tomato severe rugose virus no Brasil**

MÔNICA ALVES DE MACÊDO

ORIENTADORA: ALICE KAZUKO INOUE NAGATA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do grau de mestre em Fitopatologia.

Dissertação de mestrado realizada junto ao programa de pós-graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob orientação da Dr^a Alice Kazuko Inoue-Nagata. Apoio institucional da Embrapa Hortaliças e financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior.

Banca Examinadora:

Alice Kazuko Inoue-Nagata (Orientadora)

Universidade de Brasília (UnB)

Embrapa Hortaliças (CNPq)

Renato de Oliveira Resende

Universidade de Brasília (UnB)

Simone da Graça Ribeiro

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN)

DEDICATORIA

Aos meus pais, Severino Pereira de Macedo e

Maria de Jesus Alves de Macedo,

Por me mostrarem que a verdadeira prova de amor é se doar diariamente sem pedir nada em troca;

Por me transmitirem valores importantes, como o amor, a compreensão, a dignidade e o caráter;

Por me mostrarem que as dificuldades servem para nos fortalecer e nos tornar pessoas melhores;

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Alice Kazuko Inoue Nagata, pela oportunidade, paciência, ensinamentos, incentivo à permanência na pós-graduação e por ter acreditado em mim durante toda a realização deste trabalho.

Ao professor José Ricardo Peixoto, meu orientador da graduação, exemplo de profissionalismo, que me incentivou a entrar na pós-graduação.

Aos professores Rita de Cássia e Jean Kleber pela ajuda durante as disciplinas e aos pesquisadores da Embrapa Hortaliças Miguel Michereff, Ailton Reis e Mirtes Freitas pelas dicas e valiosos ensinamentos.

Ao Mikhail Leastro, pela amizade e paciência ao escutar minhas reclamações durante toda a realização deste trabalho; Ao Maciel Capistrano, pela ajuda e companheirismo em todos os momentos, sendo fundamental para a finalização deste trabalho, minha eterna gratidão.

A todos os colegas e amigos da fitopatologia da UnB pela força e amizade nos momentos difíceis durante as disciplinas, em especial à turma do 1º semestre de 2009, Cecília Rodrigues, Claudênia da Silva, Daniel Lajes, Jessica Monteiro, Justino Dias, Liamar dos Anjos, Mikhail Leastro, Nara Lúcia, Natália Lucinda e Nayara.

A todos os meus colegas e amigos da Virologia, Biologia Molecular, Fitopatologia e Entomologia da Embrapa Hortaliças, Athos Oliveira, Bruna Pinheiro, Fernanda Naito, Gabriela Gregolin, Leonardo Albuquerque, Mariana Martins, Mariana Halls, Mariana Fontenelle, Micaela Ferreira, Natália Alencar, Natália Nascimento, Paulo de Tarso, Raquel, Sara Barreto, Talita Gomes e Vinícius Nogueira pelos momentos de descontração e por me socorrer nos momentos de apuro.

Aos meus melhores amigos Bárbara de Alencar, Jessica Monteiro, Giselle Marques, Hugo Motta, Nayra Bonfim, Cecília Rodrigues, Lilian, Kim, Gabi, Labi e Carla Teles, agradeço pelos momentos de alegria e festa durante todos esses anos de convivência.

Agradeço aos meus familiares, em especial aos meus irmãos Lucélia, Thiago e Yamara, pela paciência e apoio.

Aos funcionários da Embrapa Hortaliças, em especial para Amilton, Jaiza, Lúcio Flávio e Oneilson Medeiros, por serem sempre prestativos e por facilitarem a execução do trabalho.

A todos os professores e funcionários da Fitopatologia da UnB, pelos ensinamentos científicos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília pela oportunidade.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Hortaliças por fornecer a infra-estrutura necessária à realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO -----	XII
ABSTRACT -----	XV
INTRODUÇÃO GERAL -----	1
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	4
1.1 O TOMATEIRO-----	4
1.1.1 TOMATE SEGMENTO PARA CONSUMO <i>IN NATURA</i> -----	4
1.1.2 TOMATE SEGMENTO PARA PROCESSAMENTO INDUSTRIAL -----	5
1.2 DOENÇAS DE ORIGEM VIRAL EM TOMATEIRO NO BRASIL -----	5
1.2.1 O GÊNERO <i>POTYVIRUS</i> -----	5
1.2.2 O GÊNERO <i>CUCUMOVIRUS</i> -----	6
1.2.3 O GÊNERO <i>TOBAMOVIRUS</i> -----	7
1.2.4 O GÊNERO <i>TOSPOVIRUS</i> -----	8
2.1 O GÊNERO <i>BEGOMOVIRUS</i> -----	9
3.MOSCA-BRANCA -----	13
3.1TRANSMISSÃO DE <i>BEGOMOVIRUS</i> POR VETOR-----	17
OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO-----	20
CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE MATERIAIS COMERCIAIS DE TOMATEIRO ÀS PRINCIPAIS VIROSES QUE AFETAM A CULTURA---	22
INTRODUÇÃO -----	22
MATERIAIS E MÉTODOS -----	24

RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
CAPÍTULO 3: DIVERSIDADE DE BEGOMOVÍRUS EM AMOSTRAS DE TOMATEIRO COLETADAS NOS ANOS DE 2009 A 2010	41
INTRODUÇÃO	41
MATERIAL E MÉTODOS	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
CAPÍTULO 4: FATORES QUE INFLUENCIAM A PREDOMINÂNCIA DE <i>TOMATO SEVERE RUGOSE VIRUS</i> EM TOMATEIRO EM CAMPO	52
INTRODUÇÃO	52
MATERIAL E MÉTODOS	54
RESULTADOS	63
DISCUSSÃO	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2 - Avaliação da resistência de materiais comerciais de tomateiro às principais viroses que afetam a cultura

Figura 1: Escala de notas atribuída ao grau de susceptibilidade de plantas de tomate à inoculação por ToSRV-----27

Figura 2: Porcentagem de plantas infectadas, quando inoculadas com ToSRV, GRSV, PVY, TGVV, PepYMV, TSWV, CMV e ToMV, detecção por Dot-Elisa e PCR-----31

Figura 3: A: Porcentagem de plantas infectadas com as duas espécies de *Begomovirus* avaliadas; **B:** Porcentagem de plantas infectadas com as duas espécies de *Tospovirus*; **C:** Porcentagem de plantas infectadas com as duas espécies de *Potyvirus*; **D:** Porcentagem de plantas infectadas com CMV e ToMV; **E:** Nota atribuída as cultivares quando inoculadas com ToSRV, Nota igual a 0, indica ausência de sintoma, nota igual a 3, indica grau máximo de sintoma ao vírus-----34

Figura 4: Sintomas apresentados após 4 semanas de inoculação; **A:** Sintoma de CMV na cultivar UG-8169; **B:** Sintoma de GRSV na cultivar Alambra; **C:** Sintoma de PepYMV na cultivar H-9992; **D:** Sintoma de TGVV na cultivar Miss Brasil.-----37

Figura 5: Sintomas apresentados após 4 semanas de inoculação; **A:** Sintoma de ToSRV na cultivar Serato; **B:** Sintoma de PVY na cultivar Miss Brasil; **C:** Sintoma de ToMV na cultivar Miss Brasil; **D:** Sintoma de TSWV na cultivar Carina TY -----38

Capítulo 3: Diversidade de begomovírus em amostras de tomateiro coletadas nos anos de 2009 a 2010

Figura 1: Porcentagem de espécies de begomovírus (identificação preliminar pela análise de sequência parcial) encontradas nas 246 amostras foliares de tomate.-----45

Figura 2: Porcentagem e distribuição de cada espécie de begomovírus entre os estados amostrados.----46

Figura 3: Distribuição e porcentagem de espécies de begomovírus em amostras foliares de tomateiro por região-----47

Figura 4: Árvore filogenética (construída pelo programa Mega 5.0) baseada em um alinhamento múltiplo das sequências selecionadas de 700 pares de bases de um segmento do DNA. Esta região corresponde a parte da CP, a região intergênica e parte da Rep. -----48

Capítulo 4: Fatores que influenciam a predominância de *Tomato severe rugose virus* em tomateiro em campo

Figura 1: **A:** Tubo de polietileno contendo insetos para a aquisição do vírus; **B:** Detalhe do tubo de polietileno utilizado para aquisição e da mini-gaiola utilizada para inoculação contendo insetos para a aquisição do vírus-----56

Figura 2: **A:** Copos plásticos utilizados para inoculação; **B** Detalhe de gaiolas presa ao folíolo da planta-teste. ----- 56

Figura3: **A:** Sintoma de ToSRV em tomateiro após 3 semanas de inoculação; **B:** Sintoma de TGVV em tomateiro após 3 semanas de inoculação-----57

Figura4: **A:** Sintoma de ToSRV, clorose internerval, em planta de *N. physaloides* após 3 semanas de inoculação; **B:** Sintoma de TGVV, clareamento de nervura, em planta de *N. physaloides* após 3 semanas de inoculação-----70

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 2 - Avaliação da resistência de materiais comerciais de tomateiro às principais viroses que afetam a cultura

Tabela 1: Cultivares utilizadas nos ensaios -----26

Tabela 2: Cultivares que apresentam resistência às viroses avaliadas neste trabalho, segundo informações das empresas de sementes-----35

Capítulo 4: Fatores que influenciam a predominância de *Tomato severe rugose virus* em tomateiro em campo

Tabela 1: Plantas utilizadas no círculo de hospedeiras alternativas aos vírus -----59

Tabela 2: Porcentagem de plantas infectadas com diferentes quantidades de insetos inoculados por planta, confinados em plantas por copos plásticos e em mini-gaiolas de PVC -----63

Tabela 3: Porcentagem de plantas inoculadas com diferentes quantidades de insetos que apresentavam pelo menos um inseto vivo após 48h de inoculação-----64

Tabela 4: Porcentagem de plantas infectadas análise visual (sintoma) e detecção por PCR -----65

Tabela 5: Porcentagem de plantas sintomáticas em ensaios de transmissão com infecção simples e em mistura ----- 66

Tabela 6: Porcentagem de plantas infectadas (PCR) em ensaios de transmissão com infecção simples e mista -----66

Tabela 7 Porcentagem de moscas-brancas que adquiriram TGVV e ToSRV em folhas infectadas (PAA de 48h)-----67

Tabela 8: Porcentagem de plantas agro-inoculadas com TGVV e ToSRV (em infecção simples e mista) que apresentaram sintomas típicos de infecção por begomovírus após 14, 21 e 32 dias da inoculação----68

Tabela 9 Porcentagem de plantas infectadas por agro-inoculação (infecção mista) após 3, 6, 9, 12, 15, 18, 25, 32 e 34 dias após a inoculação (detecção por PCR) -----69

Tabela 10: Grupos de espécies de plantas inoculadas em uma mesma gaiola-----71

Tabela 11: Porcentagem de plantas hospedeiras infectadas por ToSRV e TGVV-----71

RESUMO

O tomateiro é uma das principais hortaliças cultivadas no país, sendo também uma das culturas que mais sofre danos pelo ataque de diversos patógenos. Dentre os patógenos de origem viral que infectam o tomateiro as principais espécies são *Tomato severe rugose virus* – ToSRV e *Tomato golden vein virus* – TGVV (*Begomovirus*); *Tomato spotted wilt virus* – TSWV e *Grounut ringspot virus* - GRSV (*Tospovirus*); *Cucumber mosaic virus* – CMV (*Cucumovirus*); *Peper yellow mosaic virus* - PepYMV e *Potato virus Y* - PVY (*Potyvirus*) e; *Tomato mosaic virus* – ToMV (*Tobamovirus*); e mais recentemente *Tomato chlorosis virus* - ToCV (*Crinivirus*). Os begomovírus se destacam, na atualidade, devido à diversidade de espécies e pela maior incidência na cultura. Esses vírus pertencem à família *Geminiviridae*, podem apresentar um ou dois (DNA-A e DNA-B) componentes genômicos e são transmitidos por moscas-brancas, insetos sugadores de seiva. O objetivo deste trabalho foi avaliar o grau de susceptibilidade de materiais de tomate plantados no país a oito dos principais vírus que afetam a cultura; determinar as espécies de begomovírus predominantes no país nos anos de 2009-2010, e estudar os fatores que influenciam na predominância de ToSRV nas regiões produtoras de tomate do Brasil. Inicialmente, foi feita uma avaliação da resistência de materiais de tomate comumente plantados no país a oito dos principais vírus que afetam a cultura. A avaliação da resistência dos materiais de tomate foi determinada a partir da inoculação de isolados de CMV, PVY, PepYMV, TSWV, GRSV e ToMV (inoculação mecânica) e de ToSRV e TGVV (inoculação por mosca-branca). Como resultado, não foi verificado materiais com resistência do tipo imunidade para cinco das oito espécies de vírus avaliadas. Foram verificados materiais resistentes apenas para isolados das espécies TSWV, ToMV e PVY, sendo que para os demais vírus todas as cultivares apresentaram-se como susceptíveis. Apenas algumas cultivares (somente para o segmento mesa) mostraram níveis diferentes de resistência para o isolado de begomovírus ToSRV avaliado. A partir de então, os estudos foram direcionados para os begomovírus visando determinar as espécies atualmente predominantes no país (coletas nos anos 2009-2010) e estudar os fatores que influenciam na predominância de ToSRV nas regiões produtoras de tomate do Brasil. Para o estudo de prevalência das espécies de begomovírus, as amostras isoladas de tomateiro foram coletadas nas principais regiões produtoras de tomate do país. O DNA

total foi extraído e os begomovírus foram detectados por PCR. As amostras positivas foram selecionadas e essas foram amplificadas por RCA (amplificação por círculo rolante) seguido pela caracterização a partir da digestão com enzima de corte freqüente MspI. A análise da diversidade foi realizada por eletroforese com a separação em padrões de migração de fragmentos de DNA. Ao todo foram analisadas 600 amostras positivas e 36 padrões de digestão foram selecionados. Uma amostra de cada padrão foi selecionada aleatoriamente e o DNA-A dos begomovírus presentes nas amostras foram seqüenciados parcialmente (sequenciamento direto do RCA) e apenas as espécies distintas estão sendo clonadas e seqüenciadas completamente. Como resultado houve predominância de ToSRV, seguido de Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV). Em paralelo, isolados de ToSRV e TGVV, espécies mais relatadas como predominantes no país, sendo que TGVV vem aparentemente reduzindo sua incidência, foram selecionados para a avaliação do processo de infecção e o estudo de transmissão por moscas-brancas. O círculo de hospedeiras de plantas cultivadas e daninhas para os vírus TGVV e ToSRV foi determinado, indicando um círculo de hospedeiros semelhante entre eles. Adicionalmente, a cinética de infecção foi avaliada em agroinoculação com TGVV e ToSRV em infecção simples e mista. O monitoramento consistiu na observação de sintomas e coleta de amostras foliares para posterior detecção por PCR a cada três dias, para determinar a velocidade de infecção e a porcentagem de plantas infectadas com cada vírus. Para os ensaios de transmissão, inicialmente foram aperfeiçoados os protocolos de inoculação por mosca-branca, avaliando a forma de aquisição, inoculação, a quantidade de insetos por planta e a cultivar de tomate utilizada como planta-teste. Como metodologia-padrão foi adotado o uso da cultivar Viradoro, a aquisição a partir de folhas destacadas de tomateiro infectado em tubos de polietileno e três insetos/planta confinados em copos plásticos para a inoculação. Os períodos de aquisição e inoculação do inseto-vetor foram padronizados em 48h. Para a determinação da eficiência de transmissão foram realizados ensaios com infecção simples e mista. Foi determinada também a porcentagem de aquisição dos vírus pelo inseto-vetor após 48h de inoculação em insetos alimentados em folhas com infecção simples e mista. Como resultado, não houve diferença significativa entre as taxa de aquisição de ToSRV e TGVV em insetos alimentados em folhas com infecção simples e mista. Mas, a porcentagem de infecção por ToSRV em plantas inoculadas por vetor e por agroinoculação (inoculação simples ou mista) foi invariavelmente superior à taxa de infecção por TGVV em todos os ensaios realizados. Verificou-se que a infecção de

tomateiro pelo isolado de ToSRV é mais eficiente quando comparado com a infecção por TGVV. Em infecções simples e mistas, a taxa de plantas infectadas com ToSRV foi maior em todos os ensaios. Em conclusão, muito provavelmente a predominância de ToSRV em campo está relacionada com a maior eficiência de colonização e infecção do ToSRV em tomateiro e também com a maior eficiência de transmissão pela mosca-branca de ToSRV, sugerindo a excelente adaptação dessa espécie em tomateiro em condições de cultivo no Brasil.

ABSTRACT

The tomato plant is one of the major vegetable grown in the country and is also the crop most damaged by numerous pathogens. Among the main viral diseases that affect this crop, the following viruses are specially important: *Tomato severe rugose virus* - ToSRV and *Tomato golden vein virus* (*Begomovirus*), *Tomato spotted wild virus* - TSWV and *Groundnut ringspot virus* - GRSV (*Tospovirus*), *Cucumber mosaic virus* - CMV (*Cucumovirus*); *Pepper yellow mosaic virus* - PepYMV and *Potato virus Y* - PVY (*Potyvirus*), and *Tomato mosaic virus* - ToMV (*Tobamovirus*), and more recently *Tomato chlorosis virus* - ToCV (*Crinivirus*). At present, begomoviruses are considered the most important viruses, given the species diversity and high incidence. These viruses belong to the family *Geminiviridae*, have one or two (DNA-A and DNA-B) genomic components, and are transmitted by sap-sucking whiteflies. The main objective of the present work was to evaluate the susceptibility of tomato materials cultivated in the country to the eight major viruses affecting the crop, to determine the begomovirus species prevalence in the country within 2009-2010, and to study the factors that influence the prevalence of ToSRV in tomato producing areas of Brazil. Initially, the resistance of tomato materials commonly planted in the country was evaluated to eight of the major viruses affecting this crop. Resistance was evaluated against inoculation of CMV, PVY, PepYMV, TSWV, ToMV and GRSV (mechanical inoculation), and ToSRV and TGVV (inoculation by whitefly). As a result, no immune-like resistance was observed against five out of eight tested virus species. Resistant materials were only found for TSWV, ToMV and PVY, whereas for the other viruses all cultivars were classified as susceptible. Only for begomoviruses, some cultivars (only for fresh market) showed different levels of resistance to isolates of begomoviruses. Then, the studies were focused on begomoviruses, and aimed to determine the current prevalent species in the country (collected within years 2009-2010) and to study the factors that influence the prevalence of ToSRV on tomatoes in Brazil. For the study on the prevalent begomovirus species, tomato isolates were sampled in the main growing regions of the country. Total DNA was extracted and the begomoviruses were detected using PCR. The positive samples were selected and they were amplified by RCA (rolling circle amplification) followed by genotyping by digestion with the frequent cutting enzyme, MspI. The diversity analysis was performed by comparison of

migration patterns of digested DNA fragments in an agarose gel. A total of 600 positive samples were analyzed and 36 migration patterns were detected. One sample from each pattern was randomly selected, the DNA-A of each begomovirus present in the sample was partially sequenced (direct sequencing of RCA), and only the different species are being cloned and sequenced completely. As a result ToSRV was the predominant species, followed by Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV). In parallel, isolates of ToSRV and TGVV, species reported as more prevalent in the country, being TGVV apparently reducing in its incidence, were selected for the studies on the infection process and transmission by whiteflies. TGVV and ToSRV host range, including weeds and crops, was determined. Additionally, the infection kinetics was evaluated by agroinoculation of TGVV and ToSRV in single and mixed infections. Infection was monitored by symptom observation and virus detection by PCR from leaf samples collected every three days to determine the infection rate and percentage of plants infected with each virus. For the transmission tests, the whitefly inoculation protocols were initially optimized, by evaluating the procedure of acquisition, of inoculation, the number of insects per plant and the tomato cultivar used as the test plant. The standard methodology was defined by using the Viradoro cultivar, acquisition from infected detached tomato leaves in polyethylene tubes, and three insects per plant confined in plastic cups for inoculation. The acquisition and inoculation access periods were standardized in 48 hours. The transmission efficiency tests were performed with single and mixed infections. Additionally, the percentage of whiteflies that had acquired the virus 48h after inoculation was determined in single and mixed infections. As a result, no significant difference was found between the acquisition rate of ToSRV and TGVV in insects fed on leaves with single and mixed infections. However, the infection percentage of plants agro or vector-inoculated with ToSRV (single or mixed inoculation) was invariably higher than the rate of infection of TGVV in all tests. Infection of tomato plants by the ToSRV isolate was more efficient than infection with TGVV. In single and mixed infections, the rate of infected plants by ToSRV was higher in all tests. In conclusion, most probably the predominance of ToSRV in the field is related to the efficiency of colonization and infection of ToSRV in tomato plants and also to the higher efficiency of whitefly transmission, suggesting the excellent adaptation of this species in tomato under growing conditions in Brazil.

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma hortaliça cultivada em regiões tropicais e subtropicais durante todas as estações do ano. No Brasil esta hortaliça possui elevada importância sócio-econômica devido à grande demanda de mão-de-obra e à extensão da área cultivada. No Brasil 65,7 mil hectares são destinados à tomaticultura, sendo que nessa área são produzidas anualmente 4,2 milhões de toneladas de frutos e aproximadamente 65% são destinados ao consumo *in natura* e 35% são destinados à indústria (IBGE, 2011). As principais áreas de cultivo de tomate encontram-se nos estados de Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Bahia (IBGE, 2011).

O cultivo ininterrupto do tomateiro favorece o aparecimento de diversas doenças que diminuem a produção e afetam a qualidade do fruto. Essas doenças são causadas por diversos patógenos e aquelas de origem viral são as que apresentam maior dificuldade de controle. No Brasil, as principais doenças de origem viral são causadas por espécies de vírus dos gêneros *Begomovirus*, *Tospovirus*, *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus* e mais recentemente por espécies de *Crinivirus* (BARBOSA *et al.* 2010). Dentre elas, as causadas por *Begomovirus* são as que ocorrem em maior incidência na cultura, devido principalmente à forma de disseminação, à falta de materiais resistentes principalmente no segmento rasteiro e o rápido surgimento de novas espécies e variantes.

Os begomovírus pertencem à família *Geminiviridae*, possuem DNA circular fita simples e podem apresentar um (monopartidos) ou dois componentes genômicos (bipartidos), denominados DNA-A e DNA-B (STANLEY 2005). Esses vírus são transmitidos naturalmente por moscas-brancas (*Bemisia tabaci*) a diversas hospedeiras em diferentes famílias botânicas (MORALES and ANDERSON 2001). As moscas-brancas são insetos que sugam a seiva do floema das plantas hospedeiras, podendo causar danos diretos e indiretos (transmissão de vírus) (BYRNE and BELLOWSJR 1991).

Surtos populacionais de mosca-branca foram observados a partir da década de 70, com o avanço do cultivo de soja (COSTA *et al.* 1973). A planta de soja é excelente hospedeira do inseto-vetor e não sofre grandes danos com o ataque da praga. Na época,

vários vírus transmitidos por mosca-branca já haviam sido relatados, mas todos eram considerados como secundários, sem muita importância econômica em razão da baixa incidência em que ocorriam nas culturas (COSTA *et al.* 1975) e também porque até o momento predominava o biótipo A de *Bemisia tabaci*, biótipo que não colonizava bem determinadas hospedeiras (BEDFORD *et al.* 1994). Mas, no início da década de 90, com a introdução de um novo biótipo de *B. tabaci*, o biótipo B, houve um aumento significativo da incidência e da gama de hospedeiras naturais das begomoviroses no Brasil (LOURENÇÃO and NAGAI 1994). Até então, o biótipo A era o único relatado no país, mas populações distintas foram observadas na época, com características biológicas mais agressivas, como maior adaptação a diferentes hospedeiras e maior taxa de ovoposição, dentre outros aspectos (COSTA and BROWN 1991). Com isso, o biótipo B foi-se disseminando rapidamente e hoje é o biótipo predominante no país (LIMA *et al.* 2002; RABELO *et al.* 2005). Em consequência, diversas culturas que até então não sofriam limitações na produção por begomoviroses passaram a ser severamente afetadas, como a cultura do tomateiro.

Atualmente já foram relatadas no Brasil 17 espécies de begomovirus em tomateiro, três dessas espécies são consideradas como predominantes: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato golden vein virus* (TGVV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV) (FERNANDES *et al.* 2008). Diversos fatores podem estar relacionados com a predominância dessas espécies na cultura do tomate, mas não se sabe ao certo quais fatores estão realmente envolvidos.

Muitos trabalhos têm sido realizados sobre a diversidade de begomovírus em tomateiro, relatando o surgimento de novas espécies e a predominância de determinadas espécies nas regiões produtoras do país (ALBUQUERQUE *et al.* 2010; AMBROZEVICIUS *et al.* 2002; FERNANDES *et al.* 2008; FERNANDES *et al.* 2006a; RIBEIRO *et al.* 2003; RIBEIRO *et al.* 2007). Esses trabalhos são importantes e devem ser realizados periodicamente, pois o relato de novas espécies em begomovírus é freqüente e pode estar relacionado a uma flutuação constante na composição das espécies de begomovírus em campo. Mas, a maioria desses trabalhos não trata do estudo da transmissão desses vírus pelo inseto-vetor, provavelmente devido à dificuldade de realização desses trabalhos. Na literatura, são escassos os trabalhos que enfocam esse tema, e mais ainda com begomovírus bipartidos, os presentes no Brasil, o que torna esse tema, extremamente importante, carente de informações. Para tentar diminuir essa

deficiência, iniciou-se este trabalho com objetivo de estudar os fatores que contribuem para a predominância de determinadas espécies de begomovírus com enfoque na eficiência de transmissão de begomovírus por moscas-brancas. Além disso, foi também avaliado a susceptibilidade de materiais comerciais de tomate às principais doenças de origem viral; e um estudo de diversidade de begomovírus em tomateiro nos principais estados produtores nos anos de 2009-2010 foi iniciado.

Capítulo 1: Revisão Bibliográfica

1.1 O Tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pertence à família *Solanaceae* e é originário do Peru, Chile, Bolívia, Equador e Colômbia (ESQUINAS-ALCÁZAR and NUEZ 1995; FONTES and SILVA 2002; RICK and HOLLE 1990). A partir dessa região foi sendo introduzido em quase todos os países, e, em pouco, tempo a tomaticultura foi amplamente disseminada em todos os continentes. Essa cultura possui atualmente relevante importância econômica no mundo inteiro, sendo que o Brasil ocupa a 8ª posição no ranking dos maiores produtores de tomate do mundo (FAO 2010).

No Brasil 65,7 mil hectares são destinados à tomaticultura, sendo que nessa área são produzidas anualmente 4,2 milhões de toneladas de frutos e aproximadamente 65% são destinados ao consumo *in natura* e 35% são destinados à indústria (IBGE, 2011). A produtividade do tomateiro é muito variada de acordo com o tipo de produção, tipo de tomate e a região onde é cultivado. A região Centro-Oeste é a região com maior produtividade atingindo uma média de 88,704 ton/ha, em seguida está a região sudeste com média 67,672 ton/ha, sendo que essas duas regiões concentram os principais estados produtores (IBGE, 2010).

1.1.1 Tomate segmento para consumo *in natura*

No Brasil, a cultura do tomateiro para mesa ou para consumo *in natura* tem sido uma importante fonte de emprego ao longo de toda a cadeia produtiva (ABCSEM 2009). O cultivo do tomate para esse segmento é normalmente conduzido em sistemas estaqueados ou tutorados, gerando intensa mão-de-obra (BOITEUX *et al.* 2008).

A produção de tomate para mesa distribui-se entre as regiões Sudeste (59,3%), Centro-Oeste (7,1), Sul (18,2%), Nordeste (15,1%) e Norte (0,3%). Os principais estados produtores nesse segmento são: Minas Gerais (20%), São Paulo (19,1%), Rio de Janeiro (9,7%), Bahia (9%), Paraná (8,2%), Goiás (6,3%), Santa Catarina (6%) e Rio Grande do Sul (4%) (ABCSEM 2009; BOITEUX *et al.* 2008).

O Brasil apresenta uma grande diversidade de sistemas de cultivo de tomate para consumo *in natura* ocupando de 38 a 42 mil hectares (ABCSEM 2009; TAVARES

2002). Atualmente, cerca de 84% dessa área é cultivada com híbridos F1, sendo essas sementes de alto valor de revenda (ABCSEM 2009).

Os tomates para consumo *in natura* podem ser divididos em diferentes grupos varietais de acordo com o formato de seus frutos e sua finalidade de uso. Os segmentos varietais de maior importância no país são: Salada indeterminado e determinado; Santa Cruz, Italiano/saladete e cereja (ABCSEM 2009).

1.1.2 Tomate segmento para processamento industrial

Atualmente, a cadeia agro-industrial brasileira de tomate para processamento industrial é eficiente e produtiva (Melo e Vieira, 2005). A incorporação vigorosa de avanços tecnológicos fez a produtividade aumentar de 35t/ha na década de 90 para uma média atual próxima a 80t/ha (IBGE, 2011).

Desde o início da década de 90 a distribuição das áreas de cultivo do tomateiro para processamento industrial sofreu profunda modificação. Em 1990, o pólo de produção de Pernambuco, Bahia e Paraíba ocupava cerca de 12.000 hectares, enquanto que São Paulo ocupava 8.300 e Minas Gerais e Goiás representavam 6.400 hectares. Atualmente, a produção de tomateiro para processamento concentra-se nos estados de Goiás (62%), São Paulo (20%) e Minas Gerais (16%) (MELO *et al.* 2008).

1.2 Doenças de origem viral em tomateiro no Brasil

O ataque de patógenos é um dos fatores que mais contribuem para a diminuição da produção na cultura do tomateiro. Dentre as doenças de origem viral destacam-se as causadas por espécies de vírus dos gêneros *Tospovirus* e *Begomovirus* (KUROZAWA and PAVAN 2005), mas o tomateiro é também afetado por espécies pertencentes aos gêneros *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus* (Lopes 2005) e mais recentemente por espécies do gênero *Crinivirus* (BARBOSA *et al.* 2010).

1.2.1 O gênero *Potyvirus*

Os *Potyvirus* pertencem à família *Potyviridae*, possuem genoma do tipo RNA fita simples positiva encapsidados em partículas alongadas e flexuosas. Os vírus desse gênero são facilmente transmitidos mecanicamente e naturalmente transmitidos por diversas espécies de afídeos em campo (COSTA *et al.* 1960; COSTA 1998). A relação de

transmissão dos *Potyvirus* por afídeos é do tipo não circulativa. Esse tipo de transmissão pode ou não depender de um componente auxiliar ou HC (herper component) para que ocorra transmissão. Para potyvírus, assim como para os caulimovírus esse componente é necessário para o sucesso da transmissão (COSTA 1998).

A relação de transmissão do tipo não-circulativa dificulta o controle das potyviroses, tornando o controle químico ineficiente, pois a ação de diversos inseticidas leva os insetos a praticarem inúmeras picadas de prova e com isso inoculam o vírus de maneira mais eficiente. Além disso, há pouca especificidade entre o vírus e o inseto vetor, o que dificulta a seleção de inseticidas (Berger 2005).

O *Potato virus Y* (PVY), agente causal da risca do tomateiro, até o início da década passada era considerado o potyvírus de maior importância na cultura (ZERBINI and MACIEL-ZAMBOLIM 1999), mas com a introdução de materiais de tomate resistentes a PVY (LOURENÇÃO *et al.* 2005), esse vírus teve sua importância diminuída, dando lugar a um novo potyvírus, o *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), identificado em 2002 em plantas de pimentão (INOUE-NAGATA *et al.* 2002) sendo posteriormente identificado em plantas de tomate (ÁVILA *et al.* 2004). Até o momento não há relatos de cultivares apresentando resistência a PepYMV em tomateiro, mas pesquisadores da Universidade de Viçosa já identificaram um acesso de *Solanum* apresentando ausência de sintoma e de infecção latente quando inoculados por PepYMV, tornando-se, esse acesso, uma fonte promissora de resistência ao vírus (JUHÁSZ *et al.* 2006).

Espécies de *Potyvirus* causam diferentes sintomas dependendo da hospedeira, mas em geral os sintomas são mosaico, mosqueado, lesões necróticas, clareamento de nervuras, lesões cloróticas, epinastia, mosaico em formas de bolhas e redução da área foliar (SHUKLA *et al.* 1994). Em tomateiro, os potyvírus causam um conjunto de sintomas envolvendo clareamento de nervuras, pontuações, mosaico amarelo e redução dos folíolos (ZERBINI and MACIEL-ZAMBOLIM 1999).

1.2.2 O gênero *Cucumovirus*

Os cucumovírus pertencem à família *Bromoviridae*, são vírus de RNA fita simples positivo encapsulados em partículas de simetria icosaédrica. Esses apresentam um grande número de espécies hospedeiras (BOARI *et al.* 2000) e ampla distribuição mundial sendo encontrado em diversos países tanto em zonas temperadas como tropicais (GIBBS and HARRISON 1970; PALUKAITIS *et al.* 1992). A principal espécie do

gênero é *Cucumber mosaic virus* (CMV), espécie que causa a doença chamada mosaico do pepino (LOPES 2005). No Brasil, a primeira ocorrência do CMV foi descrita em São Paulo, ocasionando mosaico, necrose e morte da bananeira (SILBERSCHMIDT and NOBREGA 1941). Posteriormente, outros autores caracterizaram isolados de CMV tanto em bananeira como de outras espécies vegetais (ARAUJO *et al.*, 2001; COLARICCIO *et al.*, 1996; DUARTE *et al.*, 1994; EIRAS *et al.*, 2001; FRANGIONI *et al.*, 2001).

Espécies desse gênero são facilmente transmitidas mecanicamente e em campo são transmitidos por afídeos-vetores (COSTA 1998). A relação de transmissão é do tipo não circulativa e para espécies desse gênero apenas a capa protéica é necessária para que ocorra transmissão por vetor, não dependendo assim, de HC para a transmissão (CHEN and FRANCKI 1990).

1.2.3 O gênero *Tobamovirus*

As espécies de vírus desse gênero apresentam distribuição mundial em regiões de clima temperado e tropical (REGENMORTEL *et al.* 2000) possuem ampla gama de hospedeiras, tendo sido relatados em nove famílias botânicas (BRUNT *et al.* 1996). Os tobamovírus pertencem à família *Virgaviridae*, possuem partículas em forma de bastões rígidos, com simetria helicoidal e são constituídos de RNA fita simples.

Espécies desse gênero são transmitidas por contato mecânico, decorrentes das práticas culturais, são altamente estáveis, podendo permanecer em resíduos culturais, no solo e na água por longos períodos, não havendo até o momento vetores conhecidos (LOPES 2005). Também podem ser transmitidos por sementes, infestando a superfície do tegumento, mucilagem externa, testas e endosperma, não sendo transmitidos pelo pólen (JONES *et al.* 1991).

A espécie de vírus mais importante nesse gênero na cultura do tomate é a *Tomato mosaic virus* (ToMV) (LOPES 2005). As primeiras descrições dessa espécie no Brasil foram feitas por Costa e colaboradores (1971) (CANER *et al.* 1990; COSTA *et al.* 1971; FERNANDES *et al.* 1983).

O controle desse vírus é dificultado devido à grande estabilidade da partícula viral, alta infectividade e fácil disseminação por meios mecânicos, por isso a melhor forma de controle é evitar a introdução do vírus na área de cultivo e utilizar cultivares resistentes. Plantas infectadas com ToMV apresentam porte reduzido e nervuras

descoloridas, as folhas apresentam mosaico, enrugamento e ligeira curvatura, para cima, do limbo foliar (KUROZAWA and PAVAN 2005).

1.2.4 O gênero *Tospovirus*

O gênero *Tospovirus* pertence à família *Bunyaviridae*, são constituídos de vírus de RNA fita simples negativa e são os únicos vírus de plantas conhecidos que possuem partículas com morfologia aproximadamente esféricas envolvidas por um envelope lipídico (GERMAN *et al.* 1992). No Brasil, esses vírus causam a doença chamada vira-cabeça-do-tomateiro, assumindo maior importância nas épocas quentes do ano. A primeira ocorrência dessa doença em tomateiro foi feita em 1938 (COSTA and FOSTER 1938), e, por muito tempo, TSWV foi considerada a única espécie de vírus responsável por essa doença (LOURENÇÃO *et al.* 1999).

No Brasil, atualmente há ocorrência de seis espécies de *Tospovirus*, e quatro delas afetam a cultura do tomateiro (ÁVILA 1993; COLARICCIO *et al.* 2000; NAGATA *et al.* 1995). As quatro espécies que afetam a cultura são *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) (BEZERRA *et al.* 1999; RESENDE *et al.* 1996).

Os tospovírus são transmitidos facilmente por meios mecânicos (COSTA 1998) e são naturalmente transmitidos de maneira circulativa e propagativa por insetos da ordem Thysanoptera, conhecidos como tripes (COSTA 1998; PALIWAL 1974; SAKIMURA 1962). O inseto adquire o vírus durante a fase larval (WIJKAMP *et al.* 1993) e em condições de campo só inicia o processo de transmissão quando o inseto atinge a fase adulta (WIJKAMP *et al.* 1993; WIJKAMP and PETER 1993). O inseto na fase adulta não adquire o vírus devido a uma barreira histológica localizada no intestino, que aparentemente impede a fixação dos virions (MEDEIROS and GERMAN 2000; ULLMAN *et al.* 1992).

Os sintomas provocados por tospovírus variam muito de acordo com a espécie, o hospedeiro e das condições ambientais. Mas, de modo geral observa-se bronzeamento nas folhas, mosaico, deformação foliar, manchas em anéis sobre folhas e frutos, necrose do caule e das folhas, nanismo e até mesmo morte das plantas (GERMAN *et al.* 1992; NAGATA *et al.* 1995; POZZER *et al.* 1996).

Devido à grande gama de hospedeiros e da dificuldade de controle do vetor transmissor dos tospovirus, o uso da resistência torna-se um controle importante para essa doença (ROSELLÓ *et al.* 1999; STEVENS *et al.* 1992). O primeiro gene de resistência a TSWV identificado foi o *Sw-5*, que confere resistência de amplo espectro ao TSWV, GRSV e TCSV. Esse gene foi incorporado ao *S. esculentum* a partir de acessos de *S. peruvianum* (STEVENS *et al.* 1992; THOMPSON and ZIJL 1996). Vários estudos demonstraram que a resistência mediada por *Sw-5* é eficiente contra as espécies de *Tospovirus* que infectam o tomateiro e devido ao caráter não específico dessa resistência, esse gene tornou-se o mais utilizado em programas de melhoramento (ÁVILA 1993; BOITEUX and GIORDANO 1993; ROSELLÓ *et al.* 1999).

O gênero *Begomovirus* será tratado em um item à parte por se tratar do tema principal desse trabalho.

2.1 O gênero *Begomovirus*

➤ O genoma dos begomovírus

O gênero *Begomovirus* pertence à família *Geminiviridae*, família considerada mais numerosa dentre os vírus de plantas, possuindo atualmente 218 espécies, dessas 196 são espécies do gênero *Begomovirus* (ICTV 2009). A família *Geminiviridae* possui quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, assim divididos de acordo com a gama de hospedeiros, inseto vetor, organização genômica e relacionamento filogenético (FAUQUET *et al.* 2008; FAUQUET and STANLEY 2005). Os vírus dessa família possuem DNA circular de fita simples e são encapsidados em partículas com morfologia geminada, se replicam no núcleo da célula hospedeira a partir de um intermediário de DNA dupla fita através do mecanismo de círculo rolante (STANLEY 2005). Os gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus* e *Topocuvirus* possuem apenas um componente genômico e o gênero *Begomovirus* pode possuir um (monopartido) ou dois componentes (bipartido) (STANLEY 2005).

A maioria das espécies de *Begomovirus* é restrita ao tecido floemático da planta e são transmitidos naturalmente por insetos-vetores (STANLEY 2005). Nos *Begomovirus* bipartidos frequentemente os dois elementos genômicos são essenciais para o sucesso da infecção viral (SUNTER and BISARO 1992). O DNA-A possui cinco ORFs, quatro no

sentido complementar (Rep, TrAP, REN e a AC4) e uma no sentido Viral (CP) (STANLEY 2005). O DNA-B possui duas ORFs, uma no sentido viral (NSP) e a outra no sentido complementar (MP) (STANLEY 2005). O DNA-A codifica proteínas envolvidas na replicação e transcrição do DNA viral (Rep, TrAP, REN) e a capa protéica (CP) e o DNA-B é fundamental para o movimento célula-a-célula, via plasmodesmas (MP) e para o movimento intracelular do núcleo para o citoplasma e vice-versa (NSP) (ROJAS *et al.* 2005).

O DNA-A e o DNA-B não possuem homologia na sequência de nucleotídeos, exceto por uma região intergênica de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (RC), que é altamente conservada entre os dois componentes de uma determinada espécie viral (acima de 90% de homologia). A partir desta região os genes virais divergem nos sentidos viral e complementar (LAZAROWITZ 1992; STANLEY and GAY 1983).

A capa protéica (CP) é uma das proteínas mais importantes para a transmissão de vírus por vetores em begomovírus. A CP é uma proteína multifuncional, que além de proteger o DNA viral, desempenha funções durante a transmissão mecânica ou por vetor, sendo essencial na determinação da especificidade do inseto-vetor (UNSELD *et al.* 2004). Estudos demonstraram que ao realizar a troca do gene da capa protéica do *African cassava mosaic virus* (ACMV), um begomovírus transmitido por mosca-branca, pela CP do *Beet curly top virus* (BCTV), um curtovírus transmitido por cigarrinha, resultou na modificação da especificidade do inseto-vetor (BRIDDON *et al.* 1990).

A variabilidade gênica em begomovírus ocorre por meio de mutação, recombinação e pseudo-recombinação. As mutações são pouco frequentes em vírus com genoma de DNA, uma vez que estes possuem a capacidade de corrigir erros de leitura durante a replicação (“proof-reading”) da DNA polimerase (ROOSSINCK 1997). A existência de dois componentes genômicos na maioria dos begomovírus possibilita um mecanismo alternativo para a existência de variabilidade gênica. Este mecanismo de troca de elementos genômicos entre vírus distintos é chamado de pseudo-recombinação (“reassortment”) (STANLEY *et al.* 1985). A recombinação é considerada como o principal mecanismo de variabilidade gênica na família *Geminiviridae* (PADIDAM *et al.* 1995). A recombinação de DNA em geminivírus pode ocorrer não somente entre isolados de um mesmo vírus, mas também entre espécies de gêneros distintos, o que resulta no rápido surgimento de novas formas virais (SEAL *et al.* 2006).

Devido a essa alta taxa de recombinação nos begomovirus, pequenos fragmentos de genoma não podem ser usados como critérios para a definição de novas espécies. Em 2008 foi publicado um trabalho que fez uma revisão detalhada da demarcação de espécies, estirpes e isolados, além da descrição de 672 isolados de begomovirus (FAUQUET *et al.* 2008). Os critérios demarcados nesse trabalho para a classificação de novas espécies incluem dentre outros aspectos, o número de componentes genômicos (presença ou ausência do DNA-B), a organização do genoma (presença ou ausência da ORF AV2) e o sequenciamento completo do DNA-A. A porcentagem de identidade de nucleotídeos deve estar abaixo de 88% utilizando o programa Clustal V, para que o isolado seja considerado uma nova espécie. Se o isolado apresentar níveis de identidade entre 88 a 89%, o isolado pertence tentativamente à espécie mais relacionada. E se esse valor for superior a 89%, o isolado em questão pertence definitivamente à espécie usada para comparação. Para a definição de novos isolados e variantes, o critério usado também é a porcentagem de identidade de nucleotídeos, amostras que se encontram com valor abaixo de 93% de identidade são consideradas novas estirpes e as que se encontram acima de 94% são consideradas novas variantes (FAUQUET *et al.* 2008). Em consequência desses novos critérios, algumas espécies foram classificadas como isolados, enquanto outros, previamente classificados como isolados foram elevados ao nível de espécie (FAUQUET *et al.* 2008).

➤ Os begomovirus no Mundo

Entre os begomovirus de maior importância econômica mundial pode-se citar o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), o *African cassava mosaic virus* (ACMV) e o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (MORIONES and NAVAS-CASTILHO 2000; WERE and WINTER 2004). Desses vírus apenas o BGMV, um begomovirus bipartido, ocorre no Brasil, e ainda não há relatos da presença desses outros dois begomovirus no país.

A maioria dos trabalhos feitos com transmissão de begomovirus por mosca-branca foi realizada com o TYLCV (GHANIM *et al.* 2001; GHANIM *et al.* 1998; MORIN *et al.* 1999; RUBINSTEIN and CZOSNEK 1997; ZEIDAN and CZOSNEK 1991), o begomovirus mais importante em tomateiro no mundo (CZOSNEK and LATERROT 1997; NAVAS-CASTILHO *et al.* 1997; POLSTON *et al.* 1999). O TYLCV é proveniente do Oriente Médio e do sudoeste da Europa, possui um genoma monopartido (FAUQUET *et al.* 2003;

STANLEY 2005), enquanto os TYLCV encontrados na Tailândia apresentam um genoma bipartido (GAFNI 2003). Diversos temas já foram abordados com esse vírus: trabalhos relacionados com porcentagem de aquisição, inoculação, período latente, passagem transovariana e a relação da proteína GroEL com o vírus no corpo do inseto-vetor, sendo estes descritos a seguir.

➤ **Begomovírus no Brasil**

O primeiro relato de *Begomovirus* no Brasil foi feito em 1950 por Costa & Bennett, demonstraram que um *Begomovirus* identificado em plantas de *Euphorbia prunifolia* era transmitido por mosca-branca (COSTA and BENNETT 1950). Uma década mais tarde foi feito o primeiro relato de begomovírus em tomateiro (FLORES *et al.* 1960). E em 1965, foi relatada a primeira incidência de begomovírus afetando a cultura do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) (COSTA 1965).

O aumento da incidência de begomovirose no país é atribuído principalmente a dois eventos. O primeiro foi o aumento da área plantada com soja no país, observando-se um grande surto populacional do inseto vetor de *Begomovirus*, pois a soja é excelente hospedeira de mosca-branca e não sofre grandes danos com o ataque da praga. Como consequência, nos anos 70 essa doença tornou-se fator limitante para o cultivo de feijão no Brasil (FARIA 1994). Outras culturas passaram então, a ser afetadas por begomovírus e relatos de begomovirus em tomateiro passaram a ser mais frequentes (COSTA *et al.* 1975). No mesmo ano, o mosaico dourado do tomateiro foi purificado por Maytis *et al.* (1975) e o vírus foi então classificado como *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (MAYTIS *et al.* 1975). O segundo evento foi à introdução do biótipo B de *Bemisia tabaci* no país na década de 90, ocorrendo um grande surto de begomovirose em diversas culturas, mas principalmente em tomate (VALLE and LOURENÇÃO 2002).

Hoje, os bancos de dados públicos listam a ocorrência de 17 espécies de begomovírus isolados de tomateiro no Brasil, seis delas já são consideradas espécies definitivas pelo ICTV: *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV). Outras onze esperam por uma definição taxonômica: *Tomato chlorotic vein virus* (TCIVV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV), *Tomato crinkle leaf yellow virus* (ToCLYV), *Tomato crinkle virus* (ToCV), *Tomato golden vein virus* (TGVV),

Tomato infectious yellow virus (ToIYV), Tomato leaf distortion virus (ToLDV), Tomato mild mosaic virus (ToMIMV), Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV), Tomato severe mosaic virus (TSMV), Tomato yellow mosaic virus (ToYMV). Das dezessete espécies de begomovirus presentes no país, apenas três espécies são consideradas predominantes, ToSRV que está presente em todo o país, TGVV, que predomina no sudeste e TMoLCV que concentra-se no nordeste brasileiro (FERNANDES *et al.* 2008).

Todos os *Begomovirus* descritos até o momento possuem dois componentes genômicos e apresentam características distintas quanto ao círculo de hospedeiros e tropismo celular. Recentemente foi realizado um estudo da infecção de duas espécies de begomovirus relatados em Minas Gerais (*Tomato rugose mosaic virus* e *Tomato yellow spot virus*) o trabalho mostrou que a eficiência de infecção, multiplicação e tropismo celular varia dependendo do hospedeiro e do vírus inoculado (ALVES-JUNIOR *et al.* 2009).

Novas espécies de begomovirus afetando a cultura do tomateiro vêm sendo identificadas nas regiões produtoras do Brasil (CASTILLO-URQUIZA *et al.* 2008) e algumas espécies vêm sendo caracterizadas. Em 2006, um isolado de *Tomato rugose mosaic virus* foi caracterizado em plantas de tomate coletadas em Uberlândia-MG (FERNANDES *et al.* 2006). Em 2007, uma nova espécie identificada no nordeste brasileiro foi caracterizada molecular e biologicamente, o *Tomato chlorotic mottle virus* (RIBEIRO *et al.* 2007). No mesmo ano, foi caracterizado um isolado de *Tomato yellow spot virus*, identificado em campos de produção do estado de Minas Gerais. (CALEGÁRIO *et al.* 2007). Em 2010, um isolado de *Tomato yellow vein streak virus*, identificado em campos de tomate e batata do estado do Rio Grande do Sul, foi caracterizado (ALBUQUERQUE *et al.* 2010). Em 2011, Barbosa e colaboradores caracterização um isolado de *Tomato severe rugose virus* (Barbosa *et al.* 2011, aceito para publicação).

3. Mosca-branca

As moscas-brancas pertencem à ordem *Hemiptera*, família *Aleyrodidae*, apresentando cinco gêneros principais: *Bemisia*, *Aleurothrixus*, *Dialeurodes*, *Trialeurodes* e *Aleurodicus*. Embora existam cerca de 1200 espécies de moscas-brancas, menos de 40 espécies são consideradas pragas (MARTIN 1999), mesmo assim, a mosca-

branca se tornou um grande problema para a agricultura em áreas tropicais e subtropicais do mundo (OLIVEIRA *et al.* 2003). As espécies *Bemisia tabaci* e *Trialeurodes vaporariorum* causam os prejuízos mais graves (BYRNE *et al.* 1990).

As moscas-brancas são insetos que sugam a seiva do floema das plantas hospedeiras, tanto na fase imatura como na adulta, provocando alterações no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da planta (dano direto) podendo causar também danos indiretos, sendo a transmissão de vírus o dano mais sério causado pelas moscas-brancas (BYRNE and BELLOWS JR 1991). Além disso, esses insetos excretam substâncias açucaradas que cobrem as folhas das plantas e servem de substrato para fungos, resultando na formação de fumagina, reduzindo o processo de fotossíntese e o valor comercial das culturas (VILLAS-BOAS *et al.* 2002). Em tomate, ocorre também o efeito da injeção de toxinas pelas moscas-brancas que causam o amadurecimento irregular dos frutos, o que dificulta o reconhecimento do ponto de colheita, reduz a produção e a qualidade da pasta após o processamento (VILLAS-BOAS *et al.* 1997).

As ninfas como os adultos de mosca-branca possuem aparelho bucal do tipo sugador. Os adultos possuem dois pares de asas membranosas e medem entre 1-2mm, sendo a fêmea maior que o macho. As ninfas são translúcidas e têm a coloração amarela a amarelo-pálido e os adultos possuem o dorso de cor amarelo e as asas brancas (VILLAS-BOAS *et al.* 1997). Todos os estádios habitam a face inferior das folhas. Apenas o adulto é capaz de migrar até novas plantas e os estádios imaturos permanecem o tempo todo em uma mesma planta (VILLAS-BOAS *et al.* 1997).

A mosca-branca apresenta metamorfose incompleta, passando pelas fases de ovo, ninfa e adulto. A fase de ninfa apresenta quatro estádios. A reprodução pode ser sexual ou partenogenética. Na reprodução sexual, a prole será de machos e fêmeas e quando partenogenética, ela será constituída somente de machos. A fêmea coloca de 100 a 300 ovos durante toda a sua vida. Em média ocorrem entre 11 e 15 gerações por ano. O tempo que o inseto leva em média para emergir desde o ovo é de 20 dias, mas esse período varia de acordo com a temperatura (GHANIM *et al.* 1998). A longevidade do inseto depende da temperatura e da planta fonte de alimentação. Em tomate a longevidade de fêmeas foi igual a 19 dias (SALAS *et al.* 1995), em repolho a longevidade variou de 12 a 30 dias e em feijão o tempo de vida máximo foi igual a 40 dias (VILLAS-BOAS *et al.* 2002).

A mosca-branca *B. tabaci* se caracteriza por ser polífaga e explorar um grande número de plantas hospedeiras (BROWN *et al.* 1995b). Além de plantas cultivadas, muitas espécies de plantas daninhas são hospedeiras desse inseto. Mas pouco é conhecido sobre a interação da praga com suas plantas hospedeiras e os fatores que regulam o comportamento de seleção de novos hospedeiros, bem como seu potencial de adaptação para novas espécies. A *B. tabaci* é primeiramente atraída por plantas de cor amarela e é determinada pelo contato e picada de prova (BERLINGER 1986). Se o inseto pousar em um hospedeiro adequado permanecerá nele, para futura alimentação e ovoposição. Por outro lado, se o hospedeiro não foi adequado, o inseto deixará a planta (BERLINGER 1986). Para a ovoposição, a *B. tabaci* primeiramente perfura a cutícula da hospedeira com o estilete antes da ingestão da seiva (WALKER and PERRING 1994). Em um estudo de preferência de hospedeiras realizado por Villas Boas *et al.* (2001), eles verificaram que as plantas com maior número de adultos foram plantas de aboborinha, tomate, feijão, pepino, berinjela, repolho e soja em detrimento a mandioca, milho e pimentão (VILLAS-BÔAS *et al.* 2001).

A mosca-branca foi descrita pela primeira vez na Grécia, em 1889, como *Aleurodes tabaci* por Gennadius, em plantas de fumo (Lacerda & Carvalho, 2008). No Brasil, os primeiros relatos da ocorrência da mosca-branca datam de 1923. Entretanto, o primeiro registro oficial ocorreu em 1968, na cultura do algodão, no norte do Estado do Paraná. Em 1972/1973 foi constatada a sua presença no norte do Estado do Paraná e na região de Ourinhos, Estado de São Paulo, nas culturas de soja, algodão e feijão (ALBERGARIA and CIVIDANES 2002). E atualmente encontra-se em todas as regiões brasileiras.

Provavelmente a introdução do biótipo B de *Bemisia tabaci* no Brasil foi através da planta ornamental poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) tendo sido registrada em São Paulo em 1990 (LOURENÇÃO and NAGAI 1994; MELO 1992) e no Distrito Federal em 1993 (FRANÇA *et al.* 1996).

A existência de biótipos de *B. tabaci* foi proposta na década de 50, após a descoberta de populações morfológicamente semelhantes, que exibiam traços biológicos diferentes com relação à afinidade para a planta hospedeira, aos graus de sintoma de viroses, a resistência a inseticidas, a morfologia e ao comportamento dos insetos (BEDFORD *et al.* 1994; BROWN *et al.* 1995a; COSTA and BROWN 1991). Várias diferenças biológicas têm sido atribuídas aos biótipos de *Bemisia* (A e B): O biótipo B

coloca significativamente mais ovos (COSTA and BROWN 1991), ingere maior quantidade de seiva e excreta maior volume de *honeydew* (BYRNE and MILLER 1990), além de possuir maior gama de hospedeiros quando comparada ao biótipo A (BEDFORD *et al.* 1994).

Uma das técnicas aplicadas ao estudo da variabilidade de *B. tabaci* é feita por marcadores moleculares do tipo RAPD (DNA polimorfismo amplificado ao acaso), técnica que utiliza primers randômicos de 10 nucleotídeos de comprimento e de sequência aleatória em reações de PCR ajustadas para baixas condições de anelamento (Willian *et al.* 1990). O resultado consiste na amplificação de vários fragmentos de DNA em virtude do anelamento aleatório dos primers ao longo do genoma das amostras analisadas. Esses fragmentos são convertidos em dados binários (ausência ou presença de bandas) e posteriormente são usados para a determinação de perfis eletroforéticos (fingerprints genômicos) das amostras analisadas. Essa técnica foi utilizada por Gawel & Bartlett (1993) e Perring *et al.* (1993) usando o DNA de indivíduos de *B. tabaci* morfologicamente idênticos foi possível distinguir dois biótipos: A e B (Gawel & Bartlett, 1993 e Perring *et al.* 1993). Atualmente, ocorre predominância do biótipo B de *B. tabaci* em amostras de moscas-brancas coletadas em campo, já não há mais relatos da presença do biótipo A (LIMA *et al.* 2000). Em 2000, Lima *et al.* distinguiram os biótipos B e BR por perfis de amplificação de RAPD, no mesmo ano Martinez *et al.* usando um único primer de RAPD fizeram a distinção de três biótipos de *Bemisia tabaci* (Lima *et al.* 2000 e Martinez *et al.* 2000). Um método que permite a rápida diferenciação de biótipos se baseia na amplificação do gene mitocondrial para o citocromo oxidase I, seguido de digestão enzimática com a enzima Truq9I, que distingue alguns dos principais biótipos de *B. tabaci* existentes, ou com a digestão da enzima *Taq* I que distingui os biótipos B e Q, os mais importantes biótipos da agricultura mundial (BOSCO *et al.* 2006).

A adaptabilidade da *B. tabaci* resultou no aumento da distribuição geográfica em regiões tropicais e subtropicais e facilitou sua dispersão e estabelecimento em regiões de clima temperado. Ao longo do ano a produção vegetal tem favorecido a mosca-branca e provavelmente levou a sua sobrevivência durante as estações do ano e a adaptações a novos hospedeiros (BROWN 1994). Esta espécie está distribuída globalmente, sendo encontrada em todos os continentes, exceto na Antártida (DE BARRO and HART 2000).

Atualmente, a mosca-branca é considerada um grupo importantíssimo em âmbito mundial, veiculando mais de 40 vírus de plantas distintos (BROWN and BIRD 1992). A mosca-branca além de transmitir espécies de vírus do gênero *Begomovirus*, também pode transmitir espécies de vírus dos gêneros *Crinivirus*, *Carlavirus* e *Ipomovirus*. Porém, a grande maioria das espécies transmitidas por mosca-branca encontra-se no gênero *Begomovirus* (CANTO *et al.* 2007; JONES 2003).

3.1 Transmissão de *Begomovirus* por vetor

Os begomovírus não são transmitidos por sementes nem por contato entre plantas, eles são transmitidos naturalmente por moscas-brancas (COSTA 1976). A transmissão de *Begomovirus* por moscas-brancas é do tipo persistente-circulativa (COHEN and NITZANV 1966; GHANIM *et al.* 1998; MORIN *et al.* 1999; RUBINSTEIN and CZOSNEK 1997). Muitos pesquisadores tentaram demonstrar se os begomovírus se replicam no corpo do inseto. Mas até hoje nenhum trabalho conseguiu provar se essa relação vetor-vírus seria ou não propagativa.

O período de retenção ou persistência do vírus no vetor é relativamente longo, de algumas semanas ou por toda a vida do inseto (COSTA 1998). O caminho que o vírus percorre no corpo do inseto e os processos celulares e moleculares subsequente à transmissão de begomovírus por mosca-branca ainda é pouco compreendido, mas acredita-se que as partículas sejam ingeridas junto com o suco da planta infectada através do estilete, entre a câmara filtro e do esôfago (HARRIS *et al.* 1995). Provavelmente, como observado para os polerovírus transmitidos por afídeos, os vírions são transportados através do intestino para a hemolinfa. Os virions que atingem as glândulas salivares são translocados para o ducto salivar, a partir do qual são excretados com a saliva durante a alimentação (GILDOW and GRAY 1993; GRAY 1997). Estudos de imunolocalização têm sugerido que a câmara filtro e a porção anterior do intestino médio são os locais possíveis envolvidos no transporte de begomovírus do lúmen intestinal para a hemolinfa (HUNTER *et al.* 1998).

O DNA viral é detectável no corpo dos insetos após um pequeno período de acesso de alimentação, mas os insetos não são imediatamente capazes de transmitir os vírus para plantas sadias, devido ao longo caminho que as partículas virais necessitam percorrer no corpo do vetor para que possam estar disponíveis para serem inoculadas em plantas sadias. Assim, existe um período de tempo entre a alimentação na planta

infectada e inoculação na planta sadia, em que mesmo as partículas virais presentes no corpo do vetor, o inseto é incapaz de transmiti-las, este período é chamado de período de latência (COHEN and NITZANV 1966). O período de latência varia com a espécie de vírus e inseto-vetor. Em 1950, Costa e Bennett realizaram diversos testes para determinar o período de incubação do agente causal do Mosaico da euphorbia, um begomovírus bipartido extraído de plantas de *Euphorbia* sp. Neste trabalho, eles demonstraram que o período de latência desse vírus em *B. tabaci* é de no mínimo 5 horas e que o intervalo de tempo em que o inseto é capaz de transmitir o vírus para o maior número de plantas encontra-se entre 8 a 24h (COSTA and BENNETT 1950). O período de latência de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), um begomovírus monopartido, no vetor varia entre 12-24h (COHEN and NITZANV 1966).

Apesar dos begomovírus serem adquiridos pelos insetos por períodos muito curtos, de aproximadamente 10min, a probabilidade de transmissão aumenta com o aumento dos tempos de alimentação na fonte de vírus (COSTA 1998). O mesmo ocorre com o período de inoculação que aumenta com o tempo de alimentação na planta-sadia (COSTA 1998). Santos *et al.*, em 2003, demonstraram que para o *Tomato rugose mosaic virus*, o período mínimo de acesso de alimentação é de 15min, de inoculação é de pelo menos 30min, que o de latência é superior às 16h e que a capacidade do inseto transmitir o vírus aumenta com o aumento do período de alimentação (SANTOS *et al.* 2003).

Os begomovírus, na ausência de plantas cultivadas, perpetuam na natureza em plantas silvestres e daninhas, mas esses vírus podem também sobreviver no campo através da passagem transovariana, isto é, a passagem do vírus para a progênie dos insetos-vetores. Para begomovírus bipartidos há relato de passagem transovariana para ovos, ninfas, e adultos, provenientes de fêmeas virulíferas mantidas em plantas não hospedeiras do vírus (SANTOS *et al.* 2003). Mas o adulto mesmo virulífero não é capaz de transmitir o vírus para plantas sadias (SANTOS *et al.* 2003), sendo que provavelmente o adulto perde a capacidade de transmitir para novas plantas, devido à diminuição da carga viral no corpo do inseto, uma vez que provavelmente a relação de transmissão begomovírus-vetor é não propagativa. Para o TYLCV, já foi demonstrado que ocorre passagem transovariana, tanto para ovos, ninfas como para adultos, e nesse caso os adultos são capazes de transmitir o vírus para pelo menos duas gerações da progênie (GHANIM *et al.* 1998).

No final da década de 90 foi sugerido que um homólogo da proteína GroEL produzido por um endossimbionte primário (*Buchnera* sp.) de afídeos possuía papel importante na transmissão circulativa de vírus do gênero *Polerovirus* (FILICHKIN *et al.* 1997; VANDERHEUVEL *et al.* 1997; VANDERHEUVEL *et al.* 1994). Essa proteína apresenta elevada afinidade com a proteína do capsídeo dos polerovírus e embora a associação da GroEL com o vírus *in vivo* ainda não tenha sido determinada, é possível que ela forme um complexo com virions para facilitar a passagem do vírus pelo corpo do inseto-vetor, até que esse possa ser transmitido para o hospedeiro (MORIN *et al.* 1999). Trabalhos realizados com o homólogo da GroEL sintetizada por um endossimbionte de *Bemisia tabaci* verificaram que essa proteína possuía papel similar na transmissão de TYLCV (MORIN *et al.* 1999). Estudos realizados com o objetivo de verificar a relação da proteína GroEL com a transmissão de TYLCV observaram a redução da transmissão do vírus em aproximadamente 80%, ao alimentar moscas-brancas com anti-soro anti-GroEL.

Diferentes biótipos de *B. Tabaci* podem abrigar diferentes endossimbiontes primários e secundários e diferentes populações do mesmo biótipo de *B. tabaci* podem também diferir na taxa de infecção desses endossimbiontes. Em estudo realizado por Muhammmad *et al.* (2010), foi verificado que o endossimbionte primário *Portiera aleyrodidarum* e o secundário *Wolbachia* sp. foram encontrados em três diferentes biótipos de *B. tabaci* (os biótipos B, Q e CV, um biótipo nativo da China). O endossimbionte secundário *Arcenophonus* foi detectado apenas nos biótipos Q e Cv e não no B. As taxas de infecção dos endossimbiontes *Wolbachia* e *Arsenophonus* no biótipo Q de Israel foram respectivamente de 33 e 87%, enquanto que em biótipo B da China foram de 48 e 44%, respectivamente (MUHAMMAD *et al.* 2010). Até o momento não há estudos de diversidade relatando as espécies de endossimbiontes presentes nas populações de mosca-branca do país.

OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO

Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar a resistência dos principais materiais de tomate plantados atualmente no país a oito vírus que afetam a cultura, determinar a diversidade de begomovírus em tomateiro nos anos de 2009-2010, e estudar os fatores que influenciam a predominância de determinadas espécies de begomovírus nas regiões produtoras de tomate do Brasil.

Objetivo específico do Capítulo 2:

- Avaliar os principais materiais comerciais de tomate (tomate para consumo *in natura* e para indústria) utilizados nas regiões produtoras quanto à resistência a *Tomato severe rugose virus* e *Tomato golden vein virus* (*Begomovirus*), *Tomato spotted wild virus* e *Grounut ringspot virus* (*Tospovirus*), *Cucumber mosaic virus* (*Cucumovirus*), *Pepper yellow mosaic virus* e *Potato virus Y* (*Potyvirus*), vírus mais frequentes na cultura.

Objetivos específicos do Capítulo 3:

- Estudar a diversidade de begomovírus coletados em tomateiro nos anos de 2009-2010 nas principais regiões produtoras do Brasil e determinar as espécies predominantes.

Objetivos específicos do Capítulo 4:

- Otimizar o método de inoculação de begomovírus por moscas-brancas;
- Determinar a eficiência de transmissão de duas espécies de begomovírus (*Tomato severe rugose virus* e *Tomato golden vein virus*) em infecção simples e mista;
- Determinar a porcentagem de aquisição de ToSRV e TGVV em insetos alimentados em plantas com infecção simples e mista;

- Verificar se existe correlação entre a porcentagem de aquisição de cada vírus em insetos alimentados em fonte com infecção mista com a porcentagem de transmissão desse vírus para plantas sadias.

- Determinar o círculo de hospedeiras alternativas cultivadas e silvestres ou daninhas dos vírus estudados;

- Determinar a cinética de infecção de ToSRV e TGVV em plantas de tomate a partir de agroinoculação;

Capítulo 2: Avaliação da resistência de materiais comerciais de tomateiro aos principais viroses que afetam a cultura

INTRODUÇÃO

O tomateiro é cultivado o ano inteiro no país, sendo que a maior parte da área de cultivo é destinada ao consumo do fruto *in natura* e a outra parte é destinada à indústria de processamento. O tomateiro destinado ao cultivo para mesa e de crescimento indeterminado é cultivado durante todo o ano, aumentando as chances de infecção por patógenos vindos de lavouras vinhas. Esse tipo de cultivo necessita um manejo intenso e constante desde o início da lavoura, o que favorece o ataque de viroses transmitidas mecanicamente, devido ao frequente manuseio da parte aérea do tomateiro.

As principais espécies de vírus que infectam as plantas de tomateiro e ocorrem no Brasil pertencem a espécies dos gêneros *Tospovirus*, *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus* e *Begomovirus* (LOPES 2005). Os begomovírus são responsáveis por perdas frequentes na cultura e são alvo da maior preocupação dos produtores em geral. Recentemente, os crinivírus também têm sido relatados na cultura em locais isolados (BARBOSA *et al.* 2010). Dependendo da época do ano, da região e do tipo de manejo utilizado, algumas dessas viroses podem ocorrer em maior ou menor incidência na cultura. Entretanto, as doenças causadas por espécies de *Begomovirus* e *Tospovirus* são as mais frequentemente encontradas na cultura (KUROZAWA and PAVAN 2005).

Com exceção dos tobamovírus, todos esses vírus possuem vetor natural e são transmitidos eficientemente por insetos-vetores. Begomovírus e crinivírus são transmitidos por espécies de mosca-branca, tospovírus são transmitidos por espécies de trips, e os afídeos são os insetos-vetores de potyvírus e cucumovírus. Apenas espécies de tobamovírus são transmitidas por sementes. Todos esses vírus são transmitidos mecanicamente, com exceção de espécies de begomovírus que não são transmitidas de maneira eficiente por meios mecânicos.

As principais espécies de vírus em tomateiro são *Tomato mosaic virus* (*Tobamovirus*); *Cucumber mosaic virus* (*Cucumovirus*); *Potato virus Y*, *Pepper yellow*

mosaic virus (Potyvirus); Tomato spotted wilt virus, Groundnut ringspot virus (Tospovirus); e Tomato severe rugose virus (Begomovirus).

A identificação do agente causal dessas viroses a partir da sintomatologia é uma tarefa complicada. Essas viroses apresentam sintomas que são facilmente confundidos em plantas de tomate, o que dificulta a identificação do patógeno pelo produtor, dificultando a escolha do método de controle mais adequado para cada virose. A diagnose dessas doenças é feita mais freqüentemente por métodos sorológicos, como DAS-ELISA e Dot-ELISA. Espécies de *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus* e *Tospovirus* são facilmente detectadas por esses métodos. Para os begomovírus brasileiros ainda não há anti-soro disponível eficaz capaz de detectá-los, sendo que para detecção desses vírus é necessária a utilização de técnicas moleculares como PCR (NAGATA 2004; SANTANA 2001) e hibridização (SANTANA *et al.* 2007).

A escolha da cultivar a ser utilizada no cultivo é uma das tarefas mais importantes para a cultura do tomateiro e no mercado há inúmeras opções de cultivares de tomateiro com diferentes características tanto para o tomate mesa como para indústria. Mas nem todos os materiais trazem informações sobre o comportamento desses às principais doenças de origem viral, particularmente para os isolados brasileiros.

Visando contribuir para os produtores de tomate na tomada de decisão sobre a escolha da cultivar a ser utilizada em relação aos vírus presentes no Brasil, foram avaliados os principais materiais comerciais de tomate quanto à resistência a oito dos principais vírus que infectam o tomateiro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local

Os ensaios foram conduzidos no laboratório de virologia e em casa-de-vegetação da Embrapa Hortaliças, localizados no Distrito Federal.

Origem dos isolados de vírus e da população do vetor de *Bemisia tabaci* e plantas-teste

Todos os isolados virais utilizados foram provenientes da coleção de vírus da Embrapa Hortaliças. Foram utilizadas as seguintes espécies de vírus: *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tomato spotted wild virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Potato virus Y* (PVY), *Peper yellow mosaic virus* (PepYMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato golden vein virus* (TGVV).

Os híbridos ou cultivares comerciais utilizados nos ensaios encontram-se na tabela 1. Foram utilizadas mudas com aproximadamente três semanas após a semeadura, com dez repetições por cultivar para cada espécie de vírus. A variedade Miss Brasil foi utilizada como variedade susceptível para todos os vírus avaliados.

Métodos de inoculação

Para os isolados de ToMV, CMV, TSWV, GRSV, PVY e PepYMV as inoculações foram realizadas mecanicamente. Apenas as espécies de begomovírus (ToSRV e TGVV) foram inoculadas pelo inseto-vetor (*Bemisia tabaci* biótipo B).

- Inoculação mecânica

As plantas fontes foram inoculadas duas semanas antes da realização dos ensaios a partir de plantas infectadas ou folhas congeladas a -80°C. A confirmação da infecção para cada espécie foi realizada por Dot-Elisa, dois dias antes da inoculação.

Foram utilizados 10mL de tampão de fosfato de potássio 0,05M, pH 7,5, acrescido de 0,1% de sulfito de sódio, na proporção 1:2 (p/v) de inóculo nas inoculações mecânicas. Palinetes umedecidos com folhas infectadas maceradas em tampão de

inoculação foram friccionadas na porção adaxial das folhas das mudas de tomateiro, previamente polvilhadas com o abrasivo “Carborundum”. Após o aparecimento de sintomas, as plantas foram observadas diariamente. Após quatro semanas foi feita avaliação final da quantidade de plantas sintomáticas (figura 1) e as plantas que não apresentaram sintoma foram coletadas (uma folha não inoculada) e aplicadas em membrana de nitrocelulose para detecção sorológica. Uma amostra de planta sintomática de cada cultivar também foi coletada para confirmação da infecção.

- Inoculação de ToSRV e TGVV por inseto-vetor

A inoculação de ToSRV e de TGVV foi realizada por insetos de *Bemisia tabaci* biótipo B. A aquisição do vírus pelas moscas-brancas foi feito em tubos de polietileno de 50mL contendo um folíolo de tomateiro infectado, apresentando sintoma de clorose internerval. Os insetos permaneceram nos tubos por um período de aquisição igual a 48h. Após esse período, as mudas foram colocadas em gaiolas (1,2x0,8x0,5m) revestidas com tela anti-insetos e foram colocados dois tubos contendo aproximadamente 300 moscas virulíferas por gaiola por um período de 72 horas para inoculação. Após este período as moscas foram eliminadas com inseticida (Thiamethoxam) e as mudas permaneceram em telados por três semanas para observação dos sintomas. Plantas apresentando clorose internerval, enrolamento do limbo foliar e redução de tamanho foram consideradas positivas. Para todas as plantas assintomáticas foi realizada extração de DNA e posterior detecção por PCR. Foi utilizada uma escala de notas para avaliação do grau de expressão de sintomas das cultivares inoculadas com ToSRV. Foi atribuída nota zero para plantas assintomáticas (figura 1A), nota 1 para plantas que apresentaram leve sintoma de mosaico (figura 1B), nota 2 para as plantas que estavam com forte clorose intervernal (figura 1C) e nota 3 para as que apresentavam além de forte clorose intervernal, redução de crescimento e forte enrolamento do limbo foliar (figura 1D).

Tabela1: Cultivares utilizadas nos ensaios.

CULTIVAR	Tipo de crescimento	Tipo de tomate
MISS BRASIL*	Indeterminado	Santa Cruz
STA CLARA M	Indeterminado	Santa Cruz
FORTY	Indeterminado	Salada longa-vida
DOMINADOR	Indeterminado	Salada longa-vida
PARON	Indeterminado	Salada longa-vida
ELLEN	Indeterminado	Salada longa-vida
SERATO	Indeterminado	Salada longa-vida
CARINA TY	Indeterminado	Santa Cruz
ALAMBRA	Indeterminado	Salada longa-vida
AP-533	Determinado	Oblongo
H-9992	Determinado	Oblongo
DEBORA PLUS	Indeterminado	Salada longa-vida
H-9553	Determinado	Oblongo
UG-8169	Determinado	Oblongo
CALYPSO	Determinado	Saladete
TY2006	Determinado	Saladete

*Cultivar utilizada como cultivar susceptível a todos os vírus avaliados;



Figura 1 Escala de notas atribuída ao grau de susceptibilidade de plantas de tomate à inoculação por ToSRV: **A:** Nota 0 – atribuída a plantas assintomáticas; **B:** Nota 1- atribuída a plantas que apresentaram leve sintoma de mosaico; **C:** Nota 2- atribuída a plantas que estavam com forte clorose interveinal; **D:** Nota 3 - atribuída a plantas que apresentavam além de forte clorose interveinal, redução de crescimento e forte enrolamento do limbo foliar.

Método de detecção viral

–Dot-Elisa

As amostras foliares (folhas não inoculadas) foram maceradas em tampão ½ PBS (0,02M KH₂PO₄; 0,02M KCl, 1,4 M NaCl, 0,08M Na₂HPO₄.12H₂O, pH 7,4), e foram aplicados 4 µL do extrato sobre a membrana de nitrocelulose Millipore (0,45µ). A seguir, a membrana foi seca e processada imediatamente ou armazenada a – 4° C. A membrana foi mergulhada em solução bloqueadora (PBS, pH 7,4, acrescido de 2% de leite em pó desnatado-LPD), onde permaneceu por 1 hora, sob agitação lenta a temperatura ambiente. A membrana foi tratada com anti-soro policlonal, diluído em 1:1000 em ½ PBS com 2% de leite em pó, incubando-se durante a noite, sob agitação à temperatura ambiente. A membrana foi lavada três vezes em PBS-Tween 20 (0,05%), sob agitação (100 rpm) e incubada, por uma hora, com adição de anti-IgG comercial (anti-rabbit IgG Sigma), diluído 1:30000 em 1/2PBS com LPD a 2%. Em seguida, procedeu-se a nova lavagem da membrana, por três vezes com PBS (1x) - Tween (20). O complexo antígeno-anticorpo foi detectado pela adição do tampão de revelação (1 M tris-base; 0,1 M NaCl; 5 mM MgCl₂, pH 9,5), ao qual foi adicionado, na hora da revelação, 0,165 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) e 0,33 mg/mL de ‘nitroblue tetrazolium’ (NBT). A reação foi interrompida mergulhando-se a membrana em água destilada.

- Extração de DNA de plantas

Foi utilizado o método de extração desenvolvido por Doyle e Doyle (1983). Três disco foliares de 1cm de diâmetro foram macerados em tubos de microcentrífuga de 1,5ml, contendo 650µl de Tampão CTAB (2% de CATB; 100mM de Tris-HCl; pH 8,0, 50mM NaCl e 0,2% de 2-β-mercaptoetanol). A maceração foi realizada em dois ciclos de 30 seg a 2000 rpm em agitador (Precellys – Bertin Technologies) e a seguir os tubos foram incubados a temperatura de 65°C por 5 min. Em seguida foram adicionados 650 µl de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico) e agitados (vórtex) vigorosamente. Os tubos foram então centrifugados por 5 min a 12.000 rpm em microcentrífuga. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a este foi adicionado 300µl de isopropanol. Após agitação lenta dos tubos, os mesmos permaneceram a temperatura ambiente por 20 min para precipitação do DNA. Após este período os tubos foram

centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 400µl de etanol 70% gelado. A lavagem foi repetida duas vezes. Após as lavagens o sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 250µl de água pura.

- Detecção de begomovírus por PCR

O DNA total foi extraído de folhas não inoculadas e o DNA viral foi amplificado por PCR, com um par de primers específicos para ToSRV TSRV1f (AAG GCG ACG TCT TTG GAA GG) e TSRV2r (CTC AGC GGC CTT GTT ATA TTT) que amplifica um fragmento de aproximadamente 820 pares de bases e para TGVV foi utilizado o par de primers TGVV1f (AAG GCS TTG GAT AGA TTT TC) e TGVV6r (GAG CTA TCG GGT CTC ATC) que amplifica um fragmento de aproximadamente 435 pares de bases (Fernandes *et al.* 2008).

A reação de PCR consistiu de 1,0 µL do Tampão 10X da enzima *Taq* polymerase (100mM Tris-HCl, pH 8,3, e 500mM KCl, Invitrogen) 0,8µL de MgCl₂ (50mM, Invitrogen), 0,4 µL de dNTPs (2,5mM, GE Healthcare), 0,1 µL de cada primer (10uM), 0,1 µL da enzima *Taq* Polimerase (5U/µL, Invitrogen), 6,5 µL de água estéril e 1 µL de DNA. O regime da PCR utilizado foi 94°C por 5min, e 35 ciclos de 94°C por 30seg, 62°C por 30seg e 72°C por 90 seg, finalizando o processo com 5min a 72°C. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose corado por brometo de etídeo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dezesseis materiais de tomate do tipo determinado e indeterminado para os segmentos mesa e indústria foram avaliados para oito viroses de tomateiro. Duas espécies dos gêneros *Potyvirus*, *Tospovirus* e *Begomovirus* e uma dos gêneros *Cucumovirus* e *Tobamovirus* foram escolhidas para o ensaio. A cultivar Miss Brasil foi utilizada como variedade susceptível a todos os vírus avaliados. Apenas para GRSV, a cultivar utilizada como controle susceptível apresentou baixa taxa de infecção, igual a 30%. Para as demais espécies, Miss Brasil apresentou alta taxa de infecção, comprovando assim, a qualidade dos isolados utilizados e a eficiência do procedimento de inoculação desse ensaio. Os sintomas apresentados pelas plantas infectadas com os isolados dos vírus não foram suficientes para identificar as plantas infectadas para a maioria dos vírus assim, para a identificação de plantas positivas, foi necessário detecção por Dot-Elisa ou PCR (figura 2). Os materiais de tomate que não apresentaram nenhuma planta infectada foram considerados resistentes, sendo considerados susceptíveis os materiais que apresentaram pelo menos uma planta infectada. Esse critério foi adotado para TGVV, ToMV, CMV, GRSV, TSWV, PepYMV e PVY. Foi adotado um critério diferente apenas para as plantas inoculadas com o isolado de ToSRV, pois apenas para esse isolado as plantas apresentaram graus diferentes de resistência, sendo essas cultivares classificadas de acordo com a escala de notas proposta neste trabalho.

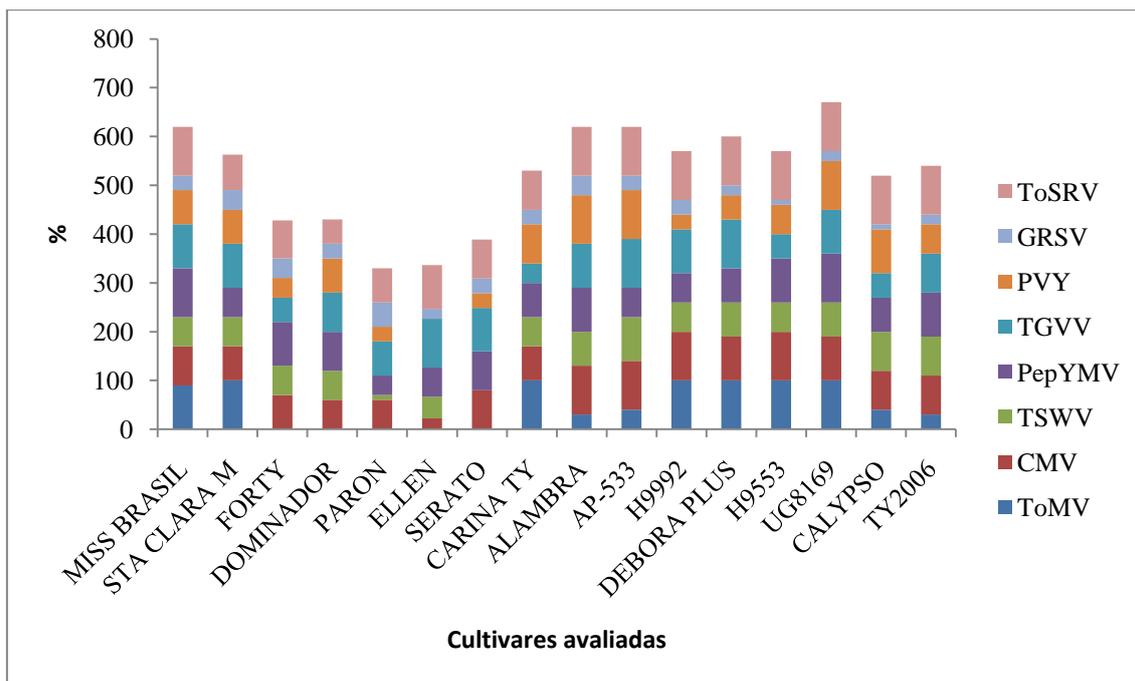


Figura 2: Porcentagem de plantas infectadas, quando inoculadas com ToSRV, GRSV, PVY, TGVV, PepYMV, TSWV, CMV e ToMV, detecção por Dot-Elisa e PCR.

Para os vírus CMV, GRSV, PepYMV, TGVV e ToSRV, todas as cultivares avaliadas apresentaram-se como susceptíveis (figura 2). Para o vírus CMV, a cultivar Ellen apresentou baixa taxa de infecção, sendo que apenas 22,2% das plantas inoculadas foram infectadas com o isolado. As demais cultivares apresentaram taxa de infecção entre 60 a 100%. Todas as plantas inoculadas das cultivares Alambra, AP-533, H-9992 e H-9553 apresentaram 100% de infecção por CMV, mostrando-se totalmente susceptíveis. Os sintomas apresentados foram uniformes para todas as cultivares avaliadas, mas nem todas as plantas infectadas apresentaram sintomas. A maioria das plantas infectadas com esse vírus apresentou moderado mosqueado nas folhas (figura 4A).

Em geral, a taxa de infecção por GRSV foi baixa em todas as cultivares avaliadas, inclusive para a variedade Miss Brasil, utilizada como variedade susceptível. Suspeita-se que existam RNA defectivos neste isolado e, por isso, a taxa de infecção tenha sido baixa. As cultivares Calypso TY e H-9553 foram as que apresentaram menor taxa de infecção, apresentando porcentagem de infecção igual a 10%. A cultivar Paron foi a que apresentou maior taxa de infecção, igual a 50%. As demais cultivares avaliadas apresentaram taxa de infecção entre 20 a 40%. Os sintomas apresentados por

plantas infectadas foram uniformes para todas as cultivares, apresentando inicialmente pontuações escuras tanto nas folhas como nas hastes das plantas e posteriormente fortes anéis necróticos (figura 4B).

A taxa de infecção por PepYMV foi alta para todas as cultivares inoculadas. A cultivar que apresentou a menor taxa de infecção foi a Paron, que teve 40% das plantas inoculadas infectadas com o isolado. A taxa de infecção para este vírus ficou entre 40 a 100%. Além da cultivar utilizada como controle susceptível, a UG-8169 também apresentou 100% de infecção para este isolado. Os sintomas apresentados foram uniformes em todas as cultivares inoculadas, sendo que as plantas infectadas apresentaram leve enrolamento do limbo foliar, clorose e mosaico leve nas folhas (figura 4C).

Nenhuma cultivar de tomate avaliada apresentou resistência do tipo imunidade para os isolados de begomovírus avaliados. No entanto, foi verificado desuniformidade na expressão de sintomas nas cultivares quando inoculadas com ToSRV, por essa razão foram atribuídas notas representativas dos sintomas apresentado pelas plantas, sendo assim correlacionado com o grau de resistência para ToSRV. Plantas que obtiveram notas iguais a zero apresentavam-se assintomáticas, e plantas que obtiveram nota máxima igual a 3, apresentaram máximo grau de sintoma. A cultivar Dominador apresentou maior grau de resistência ao vírus ToSRV, tendo apenas 50% das plantas avaliadas infectadas e com média de nota igual a 0,3. As cultivares mais susceptíveis atingiram 100% de infecção e nota igual a 3 (máximo do grau de sintoma), sendo as seguintes espécies: UG-8169, H-9553, Débora Plus, H-9992, AP-533, Alambra e Miss Brasil (controle susceptível). As cultivares Dominador, Forty e Ellen apresentaram as menores notas, representando menor intensidade de sintomas, com notas respectivamente iguais a 0,3, 0,7 e 0,7 (figura 3E). As demais cultivares apresentaram taxa de infecção entre 77-90% e nota variando de 1,30 a 2,44. Para o isolado de TGVV, a cultivar Carina TY foi a que apresentou menor taxa de infecção igual a 40%. As demais cultivares apresentaram taxa de infecção entre 50 a 100%. Em relação à nota atribuída à intensidade de sintomas para o isolado de ToSRV (figura 5 A), não foi possível fazer esse tipo de avaliação para TGVV, pois os sintomas apresentados pelas plantas inoculadas com este vírus foi inicialmente fácil de visualizar, mas com o tempo os sintomas tornaram-se suaves, chegando a desaparecer, o que inviabilizou a avaliação de sintomas (figura 4 D). De forma geral plantas inoculadas com TGVV apresentaram

forte clareamento de nervuras (figura 4D) e com ToSRV apresentaram redução de crescimento, forte enrolamento do limbo foliar, além de forte clorose internerval (figura 5A).

Para PVY, com exceção da cultivar Ellen, que apresentou resistência do tipo imunidade, todas as demais cultivares apresentaram-se como susceptíveis. A taxa de infecção para as cultivares inoculadas com esse vírus foi entre 30 a 100%. As cultivares mais susceptíveis a PVY foram Alambra, AP-533 e UG-8169, sendo que todas as plantas inoculadas dessas cultivares apresentaram infecção, detecção por dot-elisa. Os sintomas apresentados por plantas infectadas foram leve enrugamento do limbo foliar e clorose internerval (figura 5 B).

Cinco cultivares, Dominador, Paron, Ellen, Forty e Serato, apresentaram resistência do tipo imunidade ao isolado de ToMV. As demais cultivares apresentaram taxa de infecção entre 30 a 100%. As cultivares Santa Clara M, H-9992, Débora Plus, H-9553, UG-8169 apresentaram-se totalmente susceptíveis ao isolado, tendo todas as plantas infectadas com o isolado. Todas as plantas infectadas apresentaram forte embolhamento nas folhas e clorose internerval (figura 5 C).

Apenas a cultivar Serato apresentou resistência do tipo imunidade para o isolado de TSWV. A variedade AP-533 apresentou maior taxa de infecção sendo igual a 90%. As demais cultivares avaliadas apresentaram taxa de infecção entre 10 a 80%. Os sintomas apresentados por todas as cultivares inoculadas foram uniformes. Plantas infectadas apresentaram forte enrolamento do limbo foliar e drástica redução de crescimento (figura 5 D).

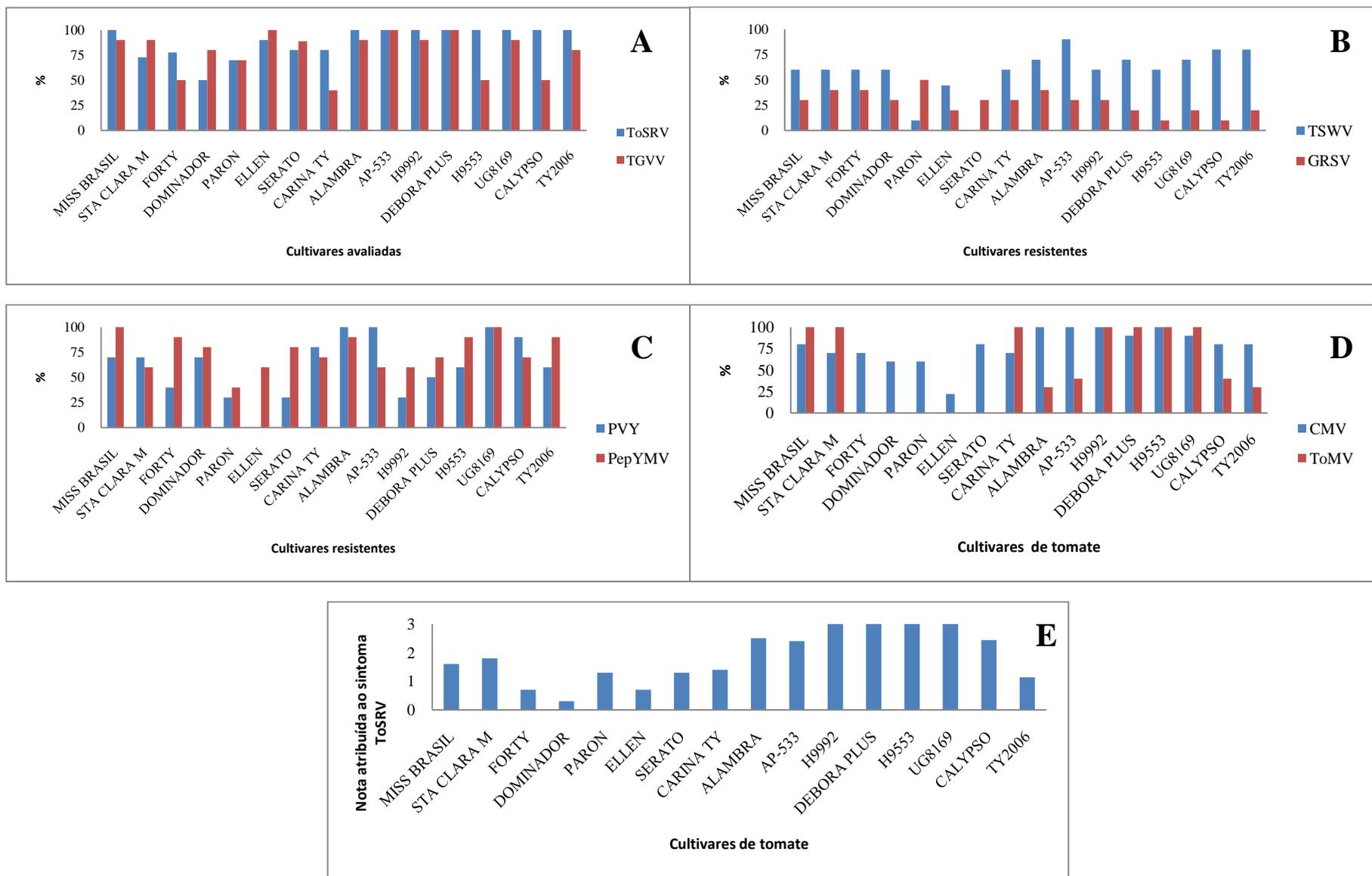


Figura 3: **A:** Porcentagem de plantas infectadas com as duas espécies de *Begomovirus* avaliadas; **B:** Porcentagem de plantas infectadas com as duas espécies de *Tospovirus*; **C:** Porcentagem de plantas infectadas com as duas espécies de *Potyvirus*; **D:** Porcentagem de plantas infectadas com CMV e ToMV; **E:** Nota atribuída as cultivares quando inoculadas com ToSRV, Nota igual a 0, indica ausência de sintoma, nota igual a 3, indica grau máximo de sintoma ao vírus.

Tabela 2: Materiais de tomate que possuem resistência aos vírus avaliados, segundo informações das empresas de sementes;

	CMV	GRSV	PepYMV	PVY	ToMV	Begomovírus	TSWV
MISS BRASIL	---	---	---	---	---	---	---
STA CLARA	---	---	---	---	---	---	---
FORTY	---	---	---	---	R	R	---
DOMINADOR	---	---	---	---	R	R	---
PARON	---	---	---	---	R	---	R
ELLEN	---	---	---	---	R	R	---
SERATO	---	---	---	---	R	---	R
CARINA TY	---	---	---	---	---	MR	---
ALAMBRA	---	---	---	---	R	---	---
AP-533	---	---	---	---	---	---	---
H-9992	---	---	---	---	---	---	---
DEBORA PLUS	---	---	---	---	---	---	---
H-9553	---	---	---	---	---	---	---
UG-8169	---	---	---	---	---	---	---
CALYPSO	---	---	---	---	---	R	---
TY-2006	---	---	---	---	---	R	---

R: Cultivar resistente;

MR: Cultivar moderadamente resistente;

---: Cultivares que não apresentam informações a respeito da resistência ou susceptibilidade;

*Para begomovírus, as cultivares consideradas como resistentes foram avaliadas apenas para o begomovírus monopartido *Tomato yellow leaf curl virus*. Apenas a cultivar Carina TY foi avaliada para um begomovírus bipartido, o *Tomato severe rugose virus*, espécie presente no país;

Apenas três espécies de vírus das oito avaliadas apresentaram cultivares com resistência do tipo imunidade, sendo elas: ToMV, TSWV e PVY. Segundo informações fornecidas pelas empresas comercializadoras de sementes sete cultivares: Forty, Dominador, Paron, Ellen, Serato e Alambra apresentam resistência a ToMV, mas apenas cinco dessas apresentaram essa resistência. As cultivares Alambra e Calypso

apresentaram taxa de infecção igual a 30 e 40% respectivamente, mostrando-se susceptíveis ao isolado. Para TSWV, duas cultivares deveriam apresentar resistência: Paron e Serato, mas apenas Serato apresentou todas as plantas sadias após a inoculação. A cultivar Paron apresentou taxa de infecção igual a 10%. Para PVY, segundo informações fornecidas nenhuma cultivar foi descrita como resistente a PVY, mas este trabalho mostrou que a cultivar Ellen foi resistente ao isolado de PVY inoculado.

De acordo as informações fornecidas pelas empresas de sementes, nenhuma das cultivares avaliadas apresenta algum tipo de resistência a CMV, GRSV, PepYMV e PVY (tabela 2). Para CMV, GRSV e PepYMV essas informações foram confirmadas com os resultados obtidos neste trabalho, mas a cultivar Ellen apresentou resistência do tipo imunidade para o isolado de PVY avaliado (figura 2).

Todas as cultivares apresentadas como resistentes ou tolerantes a begomovírus de acordo com as informações fornecidas pelas empresas (Forty, Dominador, Ellen, Carina TY, Calypso TY e TY-2006) não apresentaram resistência do tipo imunidade. Vale ressaltar que essas cultivares foram avaliadas experimentalmente para o begomovírus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), begomovírus, não presente no país. Neste trabalho, as cultivares foram avaliadas para dois begomovírus bipartidos brasileiros. Segundo informações das empresas, apenas a variedade Carina TY foi avaliada para o ToSRV, apresentando moderado nível de resistência, resultado confirmado por este trabalho, apresentando 80% de infecção e nota igual a 1,8.

Dentre as espécies de *Begomovirus* avaliadas, ToSRV mostrou-se mais agressivo e capaz de infectar um maior quantidade de plantas que TGVV em praticamente todas as cultivares avaliadas (figura 3A). Em relação às espécies de *Tospovirus* avaliadas, TSWV foi capaz de infectar a maior quantidade de plantas em praticamente todas as cultivares avaliadas (figura 3B). Em relação às espécies de *Potyvirus* avaliadas, dez das 16 cultivares avaliadas apresentaram maior taxa de infecção por PepYMV. Em relação às espécies CMV e ToMV, dez das 16 cultivares de tomate avaliadas apresentaram maior taxa de infecção por CMV (figura 3D).



Figura 4: Sintomas apresentados após 4 semanas de inoculação; **A:** Sintoma de CMV na cultivar UG-8169; **B:** Sintoma de GRSV na cultivar Alambra; **C:** Sintoma de PepYMV na cultivar H-9992; **D:** Sintoma de TGVV na cultivar Miss Brasil.

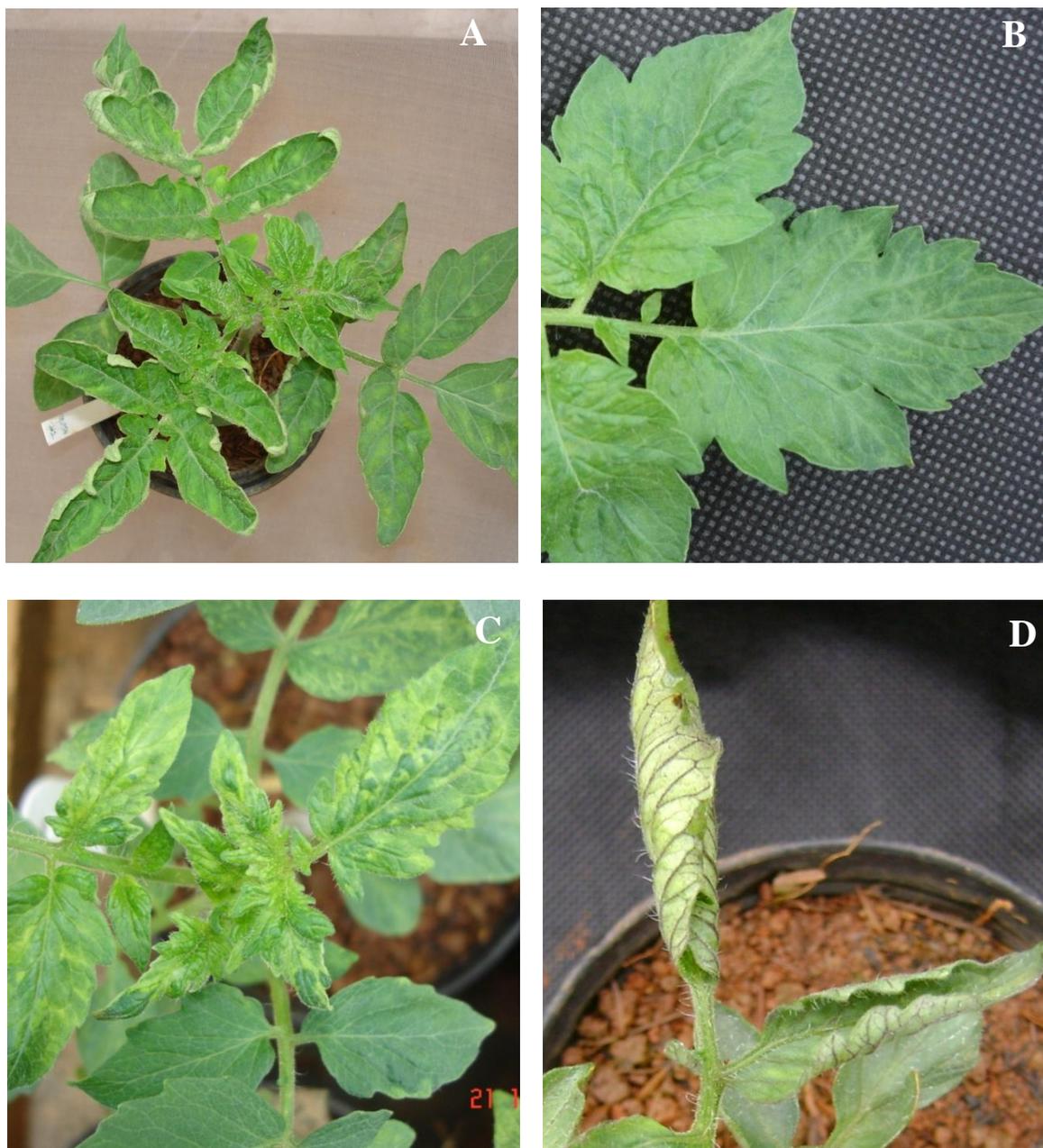


Figura 5: Sintomas apresentados após 4 semanas de inoculação; **A:** Sintoma de ToSRV na cultivar Serato; **B:** Sintoma de PVY na cultivar Miss Brasil; **C:** Sintoma de ToMV na cultivar Miss Brasil; **D:** Sintoma de TSWV na cultivar Carina TY

Diversos trabalhos foram realizados relatando a incidência das principais viroses em campos de tomate. Na maioria dos trabalhos as espécies dos gêneros *Tospovirus* e *Begomovirus* são apontadas como as principais espécies virais na cultura do tomateiro (KUROZAWA and PAVAN 2005). As espécies de *Tospovirus* são mais agressivas que as de begomovírus, podendo levar à morte da plantas, mas sua incidência é baixa se comparada a begomovírus. Isso se deve principalmente à forma de transmissão dessas viroses, realizada naturalmente por vetores. Nas condições atuais, o controle eficiente dos tripses, insetos vetores de tospovírus, é mais fácil de ser realizado do que o controle das moscas-brancas, insetos vetores de begomovírus. Além disso, os produtores têm o hábito de realizar o “roguing”, que é a retirada da lavoura as plantas doentes, o que reduz consideravelmente a fonte de inóculo da área. Por tudo isso e pela alta capacidade de recombinação e surgimento de novas espécies desse gênero, os begomovírus atualmente são os que possuem maior incidência e são os que mais preocupam os produtores.

Em relação aos tospovírus, nenhuma cultivar apresentou boa resistência para o isolado de GRSV, enquanto um material mostrou-se resistente ao isolado de TSWV. Esse resultado é curioso visto que o gene sw-5 aparentemente confere resistência tanto a TSWV como a GRSV. A repetição deste teste e a realização de avaliações adicionais são necessárias para a confirmação deste resultado.

Outro vírus que vem ganhando importância na cultura do tomateiro é o PepYMV. Um estudo de incidência de viroses em tomateiro realizado em 2008, no Distrito Federal, em dois campos de produção de tomate, relata uma alta incidência de PepYMV na cultura (DIANESE *et al.* 2008). Neste trabalho, 54 amostras foram avaliadas para PepYMV, CMV, GRSV, TCSV, CNSV, TSWV, PVY e para begomovírus. A espécie com maior incidência foi PepYMV, seguido por begomovírus, sendo que algumas amostras apresentaram infecção com ambos os vírus. Os demais vírus avaliados apresentaram baixa taxa de incidência (DIANESE *et al.* 2008). A flutuação da incidência de espécies virais na cultura do tomate, em geral, depende da época da avaliação, da variedade plantada, da região onde a cultura está instalada e dos tratos culturais realizados na lavoura.

Em vista disso, as duas espécies virais que parecem se destacar atualmente na cultura em relação à incidência são espécies de begomovírus e PepYMV. Apesar disso,

nenhum material comercial de tomate apresenta resistência do tipo imunidade para nenhum desses vírus. Para begomovírus, algumas cultivares de crescimento indeterminado apresentaram algum tipo de resistência, mas para cultivares de crescimento determinado nenhuma cultivar apresentou algum tipo de resistência. Portanto, é urgente o desenvolvimento de materiais resistentes para esse segmento. Em relação à PepYMV, os relatos de alta incidência preocupam, pois não foi verificada nenhuma cultivar comercial que apresentasse resistência a este vírus.

Capítulo 3: Diversidade de begomovírus em amostras de tomateiro coletadas nos anos de 2009 a 2010

INTRODUÇÃO

Os *Begomovirus* pertencem à família *Geminiviridae*, que são vírus de DNA circular fita simples, encapsidados em partículas geminadas. Espécies desse gênero possuem um (monopartidos) ou dois componentes genômicos (bipartidos), são transmitidas por mosca-branca e infetam uma grande quantidade de hospedeiros tanto plantas cultivadas como plantas não cultivadas. As principais culturas afetadas por espécies do gênero *Begomovirus* no Brasil são tomate e feijão (FARIA and MAXWELL 1999; ZERBINI *et al.* 2005) e outras culturas como pimentão, pimenta, batata-doce e algodão são afetadas em menor importância no país.

No Brasil, a partir da década de 90, com a introdução do biótipo B de *B. Tabaci*, culturas que até então não eram severamente afetadas por begomovirose passaram a sofrer perdas com o ataque desses vírus (LOURENÇÃO and NAGAI 1994). O biótipo B de *B. tabaci* possui maior capacidade de adaptação a condições ambientais diversas e a hospedeiros, diferentes que o biótipo A, anteriormente predominante (COSTA and BROWN 1991). A partir de então diversas espécies e variantes de begomovírus isolados de tomateiro vêm sendo identificados em vários estados brasileiros.

Já foram identificadas no Brasil 17 espécies de begomovírus em tomateiro, seis dessas já foram aceitas como espécies definitivas de acordo com o ICTV e as outras onze esperam por definição taxonômica. Três dessas espécies são consideradas como predominantes no país: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato golden vein virus* (TGVV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV), (FERNANDES *et al.* 2008). Apenas cinco espécies já foram estudadas e caracterizadas: *Tomato rugose mosaic virus* (FERNANDES *et al.* 2006), *Tomato chlorotic mottle virus* (RIBEIRO *et al.* 2007), *Tomato yellow spot virus* (CALEGÁRIO *et al.* 2007), *Tomato yellow vein streak virus* (ALBUQUERQUE *et al.* 2010) e *Tomato severe rugose virus* (Barbosa *et al.* 2011, aceite para publicação). Recentemente três novas espécies foram relatadas em tomateiro no ano de 2008 (CASTILLO-URQUIZA *et al.* 2008). Acredita-se que a grande diversidade

encontrada em begomovírus está relacionada à introdução na década de 1990 no Brasil de um novo biótipo de mosca-branca (mais polífaga), à maior frequência de ocorrências de mecanismos de mutação e recombinação dos begomovírus e um longo período de co-evolução entre os begomovírus e espécies de plantas silvestres, daninhas e cultivadas. Além da mutação e recombinação, existe um elemento extra de variabilidade desses vírus, a pseudo-recombinação, presente em begomovírus bipartidos, onde ocorre troca de componentes genômicos.

Devido à elevada taxa de recombinação e a facilidade atual de seqüenciamento desses vírus, os critérios de classificação de novas espécies para begomovírus são mais rígidos que para espécies de gêneros em outras famílias. O seqüenciamento parcial não é aceito como critério para novas espécies em begomovírus, sendo necessário o seqüenciamento completo do genoma do DNA-A. Amostras de vírus que apresentam identidade de nucleotídeos inferior a 89% são consideradas espécies distintas, em índice abaixo de 93% são considerados diferentes estirpes e acima de 94% são novas variantes, utilizando o programa Clustal V (FAUQUET *et al.* 2008).

O estudo da diversidade genética e o conhecimento das espécies de begomovírus predominantes em campo contribuem para orientar os programas de melhoramento visando obter cultivares resistentes às espécies frequentemente encontradas nas regiões produtoras de tomate, bem como no estudo epidemiológico da doença. Buscando contribuir nesse aspecto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade genética de begomovírus em amostras de tomate coletas nos anos de 2009-2010.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados

Seiscentas amostras foliares de tomate sintomáticas ou assintomáticas foram coletadas entre 2009 a 2010 nos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Ceará, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do sul, Santa Catarina e no Distrito Federal.

Extração das amostras foliares

As amostras foliares foram processadas e analisadas no laboratório de Biologia molecular da Embrapa Hortaliças, localizado no Distrito Federal. O DNA total das folhas de tomateiro foi extraído baseando-se no método de extração desenvolvido por Doyle e Doyle (1983). O DNA total foi armazenado a -20°C para posterior uso na PCR.

Deteção de begomovírus por reação de PCR

O DNA total extraído de folhas de plantas coletadas foi amplificado por PCR, utilizando primers universais para a detecção de begomovírus (ROJAS *et al.* 1993). A reação consistiu de 1,0 µL do Tampão 10X da enzima *Taq* polymerase (Tris-HCL 100mM, pH 8,3 e KCl 500mM, Invitrogen), 0,8µL de MgCl₂ (50mM, Invitrogen), 0,4 µL de dNTPs (2,5mM, GE Healthcare), 0,1 µL de cada primer (10µM), 0,1 µL da enzima *Taq* Polimerase (5U/µL, Invitrogen), 7,8 µL de água estéril e 1 µL de DNA total. O regime da PCR utilizado foi 94°C por 5min, e 35 ciclos de (94°C por 1 min, 62°C por 30 seg e 72°C por 90 seg), finalizando o processo com 5min a 72°C. Os pares de primers universais utilizados foram PARc496 (GGCTTYCTRTACATRGG) e PALv1978 (GCCACATYGTCTTYCCNGT). O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose corado por brometo de etídeo.

Amplificação do genoma dos begomovírus, digestão com enzima de restrição e seqüenciamento parcial do genoma viral

O DNA total das amostras positivas (detecção por PCR) foi submetido à amplificação do genoma viral circular (DNA-A e DNA-B) por amplificação por círculo rolante (RCA). Após a amplificação, foi realizada eletroforese em gel de agarose (1,0%) contendo 1 µL da reação para confirmação da amplificação. A seguir, o produto de RCA foi submetido à clivagem com enzima de restrição de corte freqüente MspI. Os produtos das reações foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Os produtos das digestões das amostras geraram 36 padrões enzimáticos distintos. O DNA total de uma amostra de cada padrão foi novamente amplificado por RCA e após confirmação da amplificação por eletroforese em gel de agarose, as amostras foram parcialmente seqüenciadas pelo primer PARc496 pela Macrogen, Inc. (Seul, Coréia do Sul). As amostras que continham vírus com menor grau de identidade com as demais espécies de begomovírus presentes no GenBank estão sendo clonadas para sequenciamento completo.

As seqüências de nucleotídeos das amostras foram comparadas utilizando-se o algoritmo BLASTn disponível *on line* (ALTSCHUL *et al.* 1990). Com base nas seqüências de nucleotídeos, alinhamentos múltiplos foram obtidos com o programa Clustal W (THOMPSON *et al.* 1994) de uma região de aproximadamente 700 nucleotídeos, correspondente à região entre os nucleotídeos 1-275 e 1953-2593 do DNA-A de ToSRV (DQ207749) e contendo parte da CP, a região intergênica e parte da Rep, e uma árvore filogenética foi montada utilizando o programa MEGA 5.0 pelo método neighbor joining em análise bootstrap com 1000 repetições (KUMAR *et al.* 2004). Todos os espaços (“gaps”) gerados no alinhamento foram considerados na construção das árvores. Os alinhamentos e as árvores filogenéticas incluíram a maioria das espécies de begomovírus já relatadas no país.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas 600 amostras foliares de tomateiro em 12 estados brasileiros, nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Destas, 246 já foram parcialmente ou completamente sequenciadas e as demais se encontram em fase de sequenciamento. A partir do sequenciamento parcial do genoma viral, deduziu-se preliminarmente que seis espécies de begomovírus estavam presentes nas 246 amostras analisadas: *Tomato sereve rugose virus*, Tomato mottle leaf curl virus, Tomato golden vein virus, Tomato common mosaic virus, Euphorbia yellow mosaic virus e *Sida micrantha mosaic virus*. As espécies predominantes considerando o total de amostras analisadas foram ToSRV, que estava presente em quase 70% das amostras e TMoLCV que estava presente em 25,61% (figura 1). As demais espécies foram encontradas em menos de 2% das amostras coletadas (figura 1).

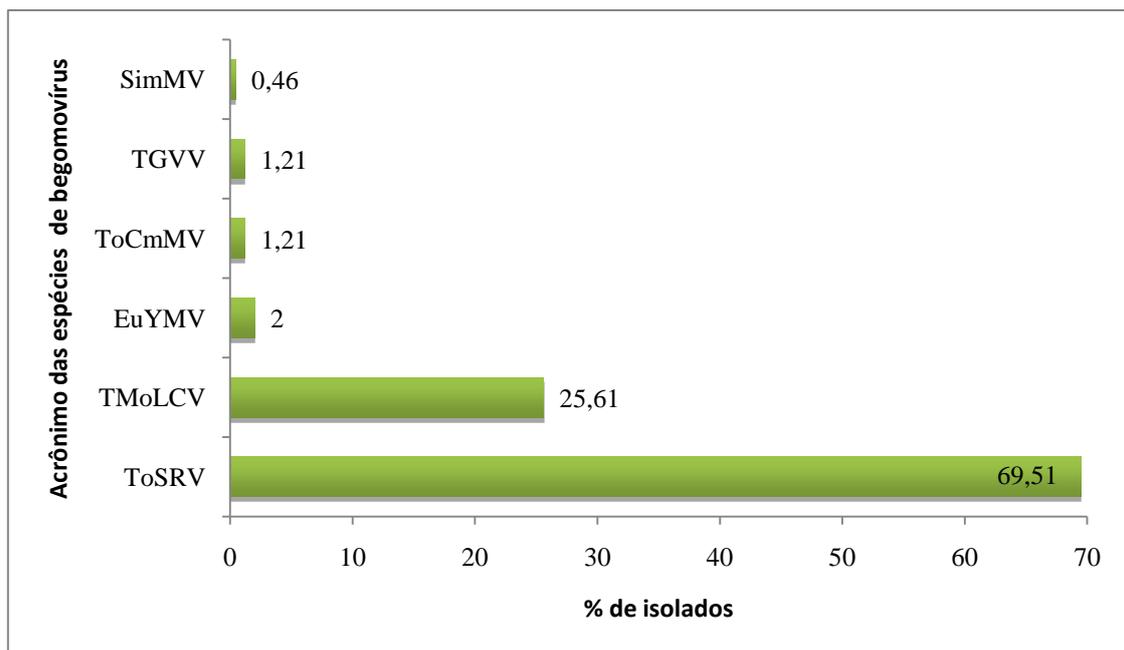


Figura 1: Porcentagem de espécies de begomovírus (identificação preliminar pela análise de sequência parcial) encontradas nas 246 amostras foliares de tomate.

Os vírus com maior distribuição foram o ToSRV e TMoLCV. Isolados desses vírus foram encontrados em cinco dos sete estados onde foram coletadas as amostras. Apenas Espírito Santo e Rio de Janeiro não continham amostras infectadas com ToSRV e TMoLCV (figura 2). Isolados de TGVV foram encontrados apenas no DF e no RJ. Isolados de ToCmMV foram encontrados em MG e ES (figura 2). Amostras com EuYMV foram encontrados apenas no estado de Goiás e SimMV foi encontrado apenas no estado de São Paulo (figura 2).

Nas amostras coletadas nos estados da região Centro-Oeste (DF e GO) houve predominância de ToSRV com 79,7% e TMoLCV com 17,2% das 186 amostras analisadas (figura 3). Na região Sudeste (MG, RJ e ES), houve predominância de TMoLCV em 57,4% das amostras, seguido de ToSRV com 31,5% em 54 amostras coletadas (figura 3). Na região Nordeste (CE), houve predominância de ToSRV 66,7% e TMoLCV em 33,3% das 5 amostras coletadas (figura 3).

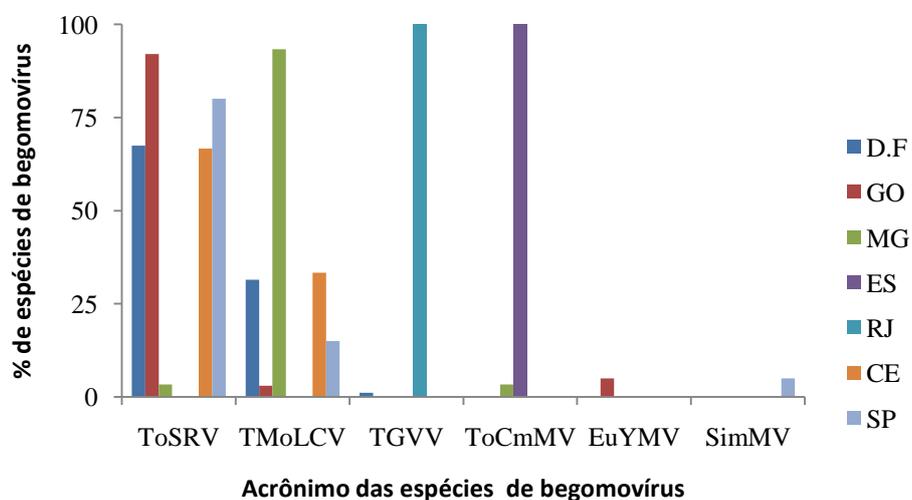


Figura 2: Porcentagem e distribuição de cada espécie de begomovírus entre os estados amostrados.

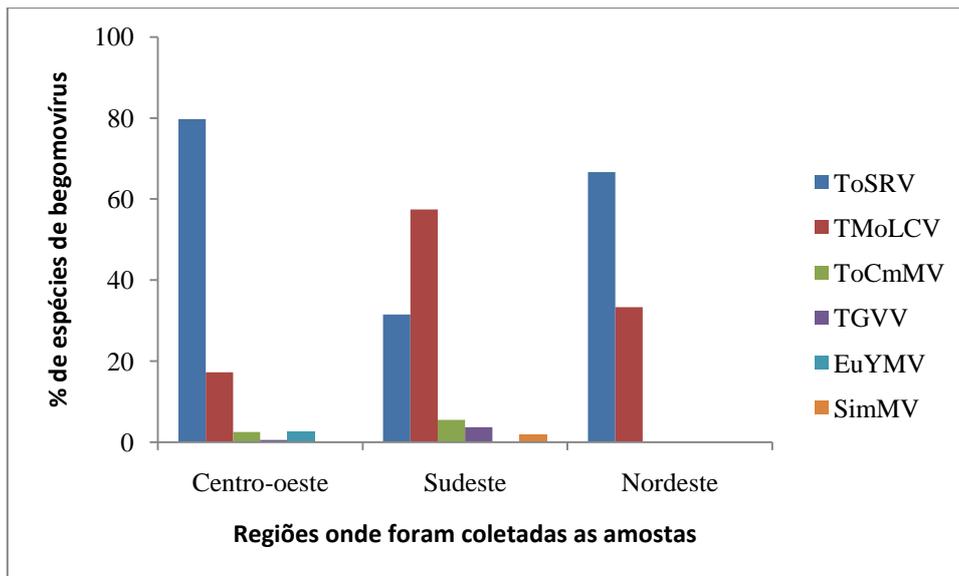


Figura 3: Distribuição e porcentagem de espécies de begomovírus em amostras foliares de tomateiro por região.

A espécie TMoLCV foi a que apresentou maior variabilidade entre os isolados coletados (figura 4). Os isolados de TMoLCV 9386 e 12092 foram os isolados dessa espécie que mais se distanciaram do restante dos isolados (figura 4). Alguns isolados de ToSRV, 11511, 8472, 9752 e 11514 mostraram-se um pouco mais distintos em relação aos demais isolados de ToSRV (figura 4). As demais espécies virais apresentaram baixa variabilidade entre os isolados (figura 4).

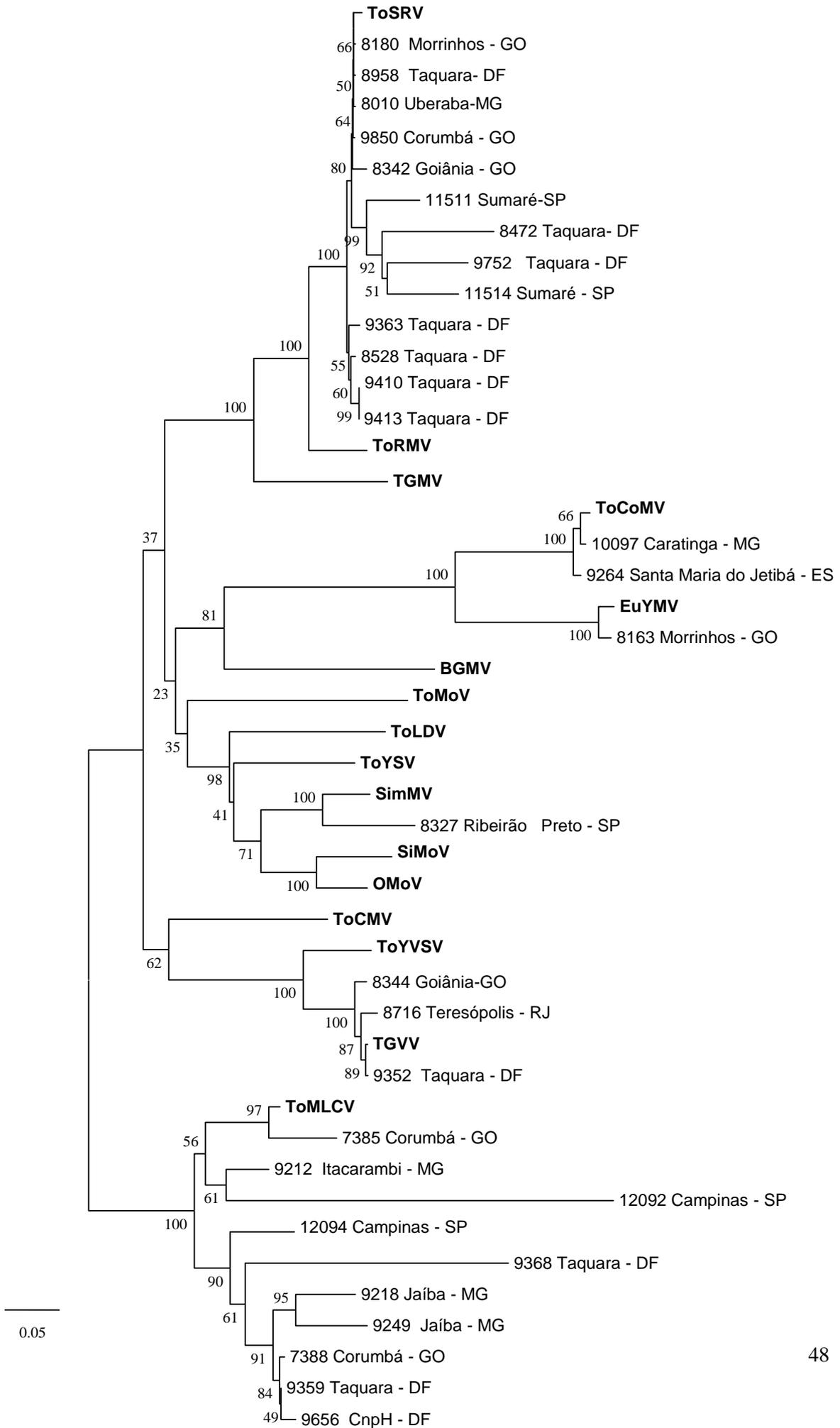


Figura 4: Árvore filogenética (construída pelo programa Mega 5.0) baseada em um alinhamento múltiplo das sequências selecionadas de 700 pares de bases de um segmento do DNA. Esta região corresponde a parte da CP, a região intergênica e parte da Rep.

Grande parte dos trabalhos realizados com diversidade de begomovírus em tomateiro no Brasil utilizou a combinação de técnicas de PCR (com primers universais para begomovírus) com seqüenciamento parcial do genoma desses vírus (AMBROZEVICIUS *et al.* 2002; FERNANDES *et al.* 2008; RIBEIRO *et al.* 2003). No entanto estudos recentes têm mostrado que o sequenciamento completo do genoma é cada vez mais necessário para uma definição mais precisa da diversidade de espécies do gênero *Begomovirus*, devido à intensa recombinação dos segmentos genômicos que ocorrem neste grupo (FAUQUET and STANLEY 2005). Apesar dessa limitação, a análise da sequência parcial pode contribuir com uma valiosa informação acerca da variabilidade apresentada pelas amostras, facilitando e direcionando o estudo de diversidade com a seleção dos vírus que merecem ser detalhadamente caracterizados.

Das dezessete espécies de begomovírus já relatadas no país, apenas quatro foram encontradas no presente trabalho ToSRV, TMoLCV, TGVV e ToCmMV e duas espécies encontradas são espécies primeiramente relatadas em plantas invasoras, o SimMV e EuYMV. O primeiro relato de EuYMV infectando plantas de tomate foi feito por Fernandes (2010) e isolados de SimMV já foram relatados em Minas Gerais e São Paulo (CALEGARIO *et al.* 2004; COTRIM *et al.* 2007).

Ribeiro *et al.* (2003) realizam estudo de diversidade de begomovírus em seis estados Brasileiros (Bahia, Minas Gerais, Pernambuco, Paraíba, Rio grande do Norte e Rio de Janeiro) e no Distrito Federal. Os resultados encontrados mostraram uma tendência de regionalização das espécies, onde algumas espécies foram registradas exclusivamente no Nordeste e outras no Sudeste. Resultado semelhante foi obtido por Fernandes (2008), verificando também certa regionalização das espécies. Fernandes e colaboradores nos anos de 2002 a 2004 coletaram amostras principalmente na região central do Brasil (DF, GO, MG, SP, BA e PE). Como resultado desse levantamento quatro espécies infectando tomateiro foram identificadas TGVV, ToSRV, TMoLCV, ToYVSV e duas prováveis novas espécies, uma encontrada em três amostras coletados

em Pernambuco e a outra em uma amostra coletada em Goiás. Segundo o estudo houve predominância de três espécies ToSRV com 61% das amostras, TGVV com 28,1% e TMoLCV com 7,1%. Nos estados nordestinos TMoLCV foi predominante e as outras espécies encontradas apresentaram muito baixa incidência e no Centro-Oeste foram predominantes as espécies TGVV e ToSRV e as demais espécies obtiveram baixa taxa de incidência. Em 2008 três novas espécies de begomovírus foram identificadas em tomateiro no estado de Minas Gerais e Rio de Janeiro, Tomato mild mosaic virus (ToMIMV), Tomato common mosaic virus (ToCmMV) e Tomato leaf distortion virus (ToLDV) (CASTILLO-URQUIZA *et al.* 2008). Recentemente, duas dessas espécies ToCmMV e ToLDV foram novamente encontradas infectando tomateiros, ToCmMV no RJ e ES, e ToLDV em diversos estados na região Norte, Nordeste e Sudeste (FERNANDES 2010). No presente trabalho a espécie ToCmMV foi encontrada em amostras coletadas em Minas Gerais e Espírito Santo. Isso demonstra a rapidez da distribuição e importância dessas espécies recentemente relatadas em tomateiro.

Todos os estudos de diversidade já realizados apresentam certa limitação no procedimento de amostragem, com a concentração de amostras em certas regiões específicas contrastando com regiões de poucos números de amostras em poucas lavouras. Essas diferenças na amostragem comprometem a análise dos dados, levando a conclusões que são na realidade preliminares a respeito da predominância das espécies de begomovírus em campos de tomate. É recomendável que o levantamento da diversidade viral seja realizado de modo sistematizado e programado, o que dificulta sobremaneira a realização do trabalho, considerando a dimensão continental do País, o alto custo de deslocamento e a necessidade de conhecimentos específicos do amostrador. Esses estudos são essenciais para orientar programas de melhoramento na busca de estabilidade e fontes de resistência durável.

Em conclusão, a espécie ToSRV parece ser absolutamente predominante no País, estando presente na maioria das amostras coletadas em todos os trabalhos de diversidade realizados onde as coletas são feitas em mais de uma região (CASTILLO-URQUIZA *et al.* 2008; FERNANDES *et al.* 2008; FERNANDES 2010; RIBEIRO *et al.* 2003), e as demais espécies de begomovírus parecem estar distribuídas de maneira um pouco mais regionalizada, até o momento. No entanto, a espécie TMoLCV, segundo resultados encontrados neste trabalho, parece estar sendo disseminada para localidades distantes da região onde aparentemente parece ser o centro de origem da espécie. A

flutuação da predominância e distribuição de espécies ainda não está bem compreendida para as espécies de begomovírus em tomateiro no país. No entanto, parece claro que a espécie ToSRV atualmente possui maior adaptação (“fitness”) em tomateiro que as demais espécies de begomovírus. Apesar disso, há carência de informações a respeito dessa espécie, sendo que o primeiro estudo de caracterização de um isolado de ToSRV foi recentemente aceito para publicação (Barbosa *et al* 2011, aceito para publicação). Verifica-se que existe uma grande necessidade de realização de estudos tanto de determinação de diversidade viral assim como na caracterização dos isolados virais nos aspectos biológico e molecular.

Capítulo 4: Fatores que influenciam a predominância de *Tomato severe rugose virus* em tomateiro em campo

INTRODUÇÃO

Os begomovírus constituem atualmente um dos principais problemas fitossanitários em diversas culturas agrícolas no mundo. Perdas significativas em decorrência da incidência de begomoviroses têm sido relatadas em plantios de tomate, feijão, caupi, pimentão e algodão (FARIA 2000; MORALES and ANDERSON 2001). Além das plantas cultivadas, muitas espécies de plantas daninhas têm sido relatadas como hospedeiras de begomovírus em vários países, inclusive no Brasil (MORALES and ANDERSON 2001). Os begomovírus são transmitidos naturalmente por moscas-brancas (*Bemisia tabaci*) (COSTA 1976). A relação de transmissão dos begomovírus com a mosca-branca é do tipo persistente-circulativa (GHANIM *et al.* 1998; MORIN *et al.* 1999; RUBINSTEIN and CZOSNEK 1997).

O primeiro relato de begomovírus no Brasil foi feito em 1950 por Costa & Bennett, demonstrando que um begomovírus identificado em plantas de *Euphorbia prunifolia* era transmitido por mosca-branca (COSTA and BENNETT 1950). E a partir das décadas seguintes foram feitos relatos em tomateiro, em 1960 (FLORES *et al.* 1960) e em 1975 (COSTA *et al.* 1975). Mas foi na década de 90 com a introdução do biótipo B de *Bemisia tabaci* que os begomovírus passaram a ser importantes à cultura (FRANÇA *et al.* 1996). As características de polifagia, alta taxa de multiplicação e excelente adaptação às condições climáticas brasileiras podem ter favorecido a rápida expansão geográfica deste biótipo e com ela a emergência de diversas espécies de begomovírus (FARIA 2000; FRANÇA *et al.* 1996; RIBEIRO *et al.* 2003) (CASTILLO-URQUIZA *et al.* 2008).

Atualmente, os bancos de dados listam dezessete espécies de begomovírus isolados de tomateiro do Brasil (ALBUQUERQUE *et al.* 2010; CALEGÁRIO *et al.* 2007; CASTILLO-URQUIZA *et al.* 2008; FERNANDES *et al.* 2006a; RIBEIRO *et al.* 2007). Três dessas espécies são consideradas predominantes no país: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), encontrado em todo o país; *Tomato golden vein virus* (TGVV), predominante no Sudeste e Centro-Oeste; *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMLCV), na região Nordeste (FERNANDES *et al.* 2008). A predominância de determinada espécie em

certas regiões pode está relacionada a diversos fatores, mas não se sabe ao certo quais destes fatores estão realmente envolvidos (ALBUQUERQUE *et al.* 2010).

O objetivo deste trabalho foi entender melhor o papel do vetor e das hospedeiras (tomateiro ou alternativas) na composição de espécies de begomovírus em tomateiro. Duas espécies foram selecionadas para este estudo, um isolado de ToSRV e um de TGVV. Determinou-se neste trabalho a eficiência de transmissão de duas espécies de begomovírus bipartidos pelo biótipo B de *Bemisia tabaci* em plantas de tomate rasteiro industrial, o círculo de hospedeiras cultivadas e daninhas de TGVV e ToSRV e a cinética de infecção dessas espécies virais em planta de tomateiro rasteiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

Os ensaios foram conduzidos no laboratório de virologia e biologia molecular e em casa-de-vegetação e telados da Embrapa Hortaliças, localizados no Distrito Federal.

Eficiência de transmissão de TGVV e ToSRV

Origem dos isolados de *begomovirus*, da população do vetor e plantas-teste

Foram utilizadas duas espécies de *begomovirus* pertencentes à coleção de *begomovirus* da Embrapa Hortaliças: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV-1164) e *Tomato golden vein virus* (TGVV-1799) proposto como nova espécie de *begomovirus* e que espera por definição taxonômica. Clones infecciosos foram produzidos das duas espécies virais e utilizados neste trabalho. Estes isolados foram mantidos em plantas de tomate da cultivar Viradoro em telados a prova de insetos.

A população de moscas-brancas utilizada no trabalho foi proveniente de insetos coletados em campos de tomate e mantidos por várias gerações em plantas de repolho (*Brassica oleracea*), espécie não hospedeira de *begomovirus*, em telados protegidos à prova de insetos. Os insetos foram analisados quanto à biotipagem utilizando o método que se baseia na amplificação do gene mitocondrial para o citocromo oxidase I, seguido de digestão enzimática e todos os insetos analisados pertencem ao biótipo B de *Bemisia tabaci*.

Nos ensaios de transmissão foram utilizadas mudas de tomate (*Solanum lycopersicum*) da cultivar Viradoro, uma variedade de crescimento determinado, resistente ao vira-cabeça do tomateiro, doença causada por tospovirus, porém susceptível a *begomovirus*.

Padronização da metodologia de inoculação de TGVV e ToSRV por mosca-branca

Testes preliminares foram realizados para padronizar a metodologia de inoculação. Foram avaliados a forma de aquisição e inoculação do vírus pelo inseto-vetor, a quantidade de insetos necessários para causar infecção e o efeito do hospedeiro na expressão de sintomas de begomovírus em tomate.

A aquisição do vírus foi feita por 48h com insetos mantidos em plantas infectadas ou confinados em tubos de polietileno de 50 mL contendo uma folha destacada de tomateiro infectado (figura 1 A). Foram avaliadas duas formas de inoculação : por mini-gaiolas de PVC de 2cm de diâmetro (figura 1B e 2B) e por copos plásticos de 300ml (figura 2 A). Para avaliação da quantidade de insetos foram utilizados 1, 3 e 5 insetos por planta em gaiolas e copos plásticos. Os testes para a seleção da melhor cultivar para os ensaios foram realizados com três cultivares de tomate: Viradoro (crescimento determinado), Santa Clara Miss Brasil (crescimento indeterminado) e H-9992 (crescimento determinado).



Figura 1: **A:** Tubo de polietileno contendo insetos para a aquisição do vírus; **B:** Detalhe do tubo de polietileno utilizado para aquisição e da mini-gaiola utilizada para inoculação contendo insetos para a aquisição do vírus.



Figura 2: **A:** Copos plásticos utilizados para inoculação nos ensaios de transmissão; **B** Detalhe da mini-gaiola presa ao folíolo da planta-teste.

Método de inoculação escolhido após a padronização para os ensaios de transmissão por mosca-branca

Os testes de transmissão foram realizados com insetos adultos mantidos em plantas de repolho. Para a inoculação, foram utilizadas mudas de tomate apresentando duas folhas verdadeiras expandidas produzidas em bandejas de polietileno. Essas mudas foram posteriormente transferidas para vasos contendo solo autoclavado.

As plantas fontes de vírus foram agro-inoculadas e utilizadas após 30 dias, quando as plantas apresentavam clareamento de nervura (TGVV – figura 3B) e clorose internerval e enrolamento foliar (ToSRV – figura 3A). Além da presença de sintoma a infecção foi também confirmada por PCR.

A aquisição do vírus pelo vetor foi realizada em folhas destacadas de tomateiro infectado dispostas em tubos de polietileno de 50mL (uma folha por tubo). Foram colocados aproximadamente 300 insetos avirulíferos por tubo que permaneceram por um período de 48h para aquisição do vírus (PAA). Os insetos foram coletados com auxílio de um sugador manual. A inoculação por copos plásticos foi feita com a transferência de três moscas-brancas por planta em período de acesso de inoculação (PAI) igual a 48h. As moscas foram mantidas nas plantas confinadas em copos plásticos de 300mL. Após este período as moscas foram manualmente eliminadas e as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação por 21 dias para avaliação dos sintomas e realização de testes de detecção viral por PCR. Como controle, foram utilizadas plantas saudias inoculadas com insetos avirulíferos.

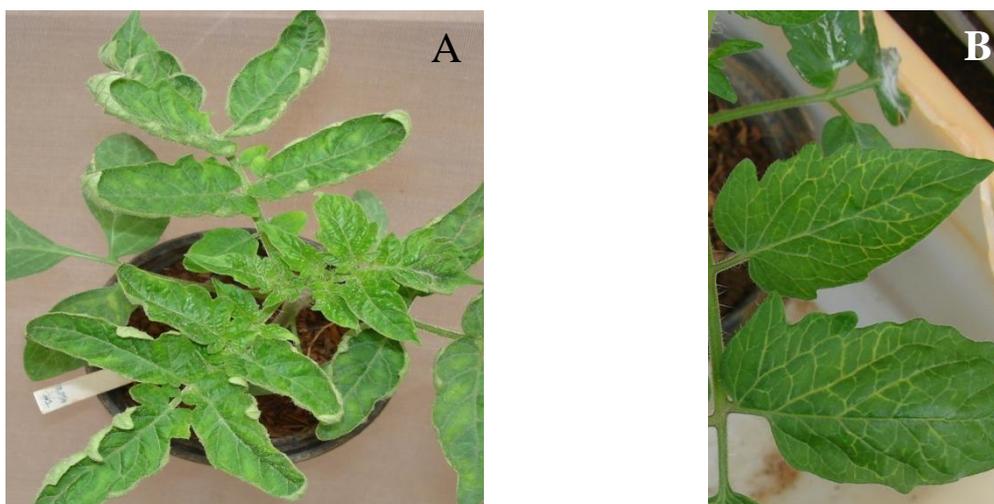


Figura3: **A:** Sintoma de ToSRV na cultivar viradoro após 3 semanas de inoculação; **B:** Sintoma de TGVV na cultivar viradoro após 3 semanas de inoculação;

Ensaio de transmissão dos isolados de begomovírus pelo vetor em infecção simples e mista

Os ensaios foram realizados por inoculação por copos plásticos (3 insetos/planta) e por gaiolas teladas (1,2x0,8x0,5m)

Inoculação em copos plásticos

Para determinar a eficiência de transmissão foram conduzidos ensaios com infecção simples e mista, foram realizados concomitantemente. Após o período de aquisição (PAA), três moscas-brancas foram transferidas por planta e estas foram mantidas em copos plásticos. Foram realizados dois ensaios de eficiência de transmissão, totalizando 84 plantas inoculadas em infecção simples com cada vírus e 96 plantas inoculadas com infecção mista.

Deteção da presença de vírus no inseto vetor

Após 48h de PAA, os insetos não utilizados nos ensaios de transmissão foram coletados e o DNA total foi extraído individualmente para avaliar a porcentagem de insetos que adquiriram ToSRV e TGVV (infecção simples e mista). Dez insetos por vírus foram coletados em cada ensaio.

Círculo de hospedeiras alternativas de ToSRV e TGVV

Foram utilizadas 26 espécies de plantas cultivadas, daninhas e/ou alternativas. O nome comum e científico das espécies utilizadas encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Plantas utilizadas no círculo de hospedeiras alternativas aos vírus

Plantas cultivadas		Plantas daninhas	
Nome científico	Nome comum	Nome científico	Nome comum
Curcubitaceae		Amaranthaceae	
<i>Cucurbita pepo</i> cv. Caserta	Abóbora Caserta	<i>Gomphrena globosa</i>	Perpétua
Fabaceae		Chenopodiaceae	
<i>Glycine max</i>	Soja	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Amarantiloco
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Feijão-comum	<i>C. quinoa</i>	Quinoa
Malvaceae		Convolvulaceae	
<i>Abelmoschus esculentus</i>	Quiabo	<i>Ipomoea setosa</i>	Corda-de-viola
<i>Gossypium hirsutum</i>	Algodão	Euphorbiaceae	
Solanaceae		<i>Euphorbia heterophylla</i>	Amendoium-bravo
<i>Capsicum annuum</i> cv Tico	Pimentão	Fabaceae	
<i>C. baccatum</i> cv Mari	Pimenta	<i>Crotalaria incana</i>	Guizo-de-cascavel
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Tabaco	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	----
<i>N. rustica</i>	Tabaco	<i>Senna obtusifolia</i>	Fedegoso
<i>N. tabacum</i> cv Samsun	Tabaco	Malvaceae	
<i>N. tabacum</i> cv. TNN	Tabaco	<i>Sida rhombifolia</i>	Vassoura
<i>Solanum lycopersicum</i> cv Viradoro	Tomate	Solanaceae	
		<i>Datura metel</i>	metel
		<i>Datura stramonium</i>	Figueira-do-inferno
		<i>Nicandra physaloides</i>	Joá-de-capote
		<i>Physalis floridana</i>	Fisalis
		<i>Solanum americanum</i>	Maria-pretinha

A inoculação foi feita por moscas-brancas em gaiolas teladas (1,2x0,8x0,5m) utilizando-se dez plantas por espécie e 50 plantas por gaiola. Em cada gaiola foram colocados três tubos contendo aproximadamente 300 moscas-brancas cada por PAI igual a sete dias. Após este período as moscas-brancas foram eliminadas com inseticida (Thiamethoxam) e as plantas mantidas em telado por três semanas para avaliação de sintoma e detecção viral.

Determinação da cinética de infecção viral de ToSRV e TGVV

Foram agroinoculadas 120 plantas de tomate cv. Viradoro com ToSRV, 96 com TGVV e 116 com os dois vírus. Clones infecciosos foram transformados em *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV 3101 e a técnica de PCR de colônia foi utilizada para confirmação da presença dos transformantes. As colônias positivas foram crescidas em meio LB líquido com canamicina (50mg/mL) e rifampicina (50mg/mL) e armazenados a -20°C em glicerol 50%. Um dia antes da agroinoculação 5µL de solução bacteriana de *A. tumefaciens* transformadas com clones A e B de TGVV e ToSRV foram colocados em 10mL de meio LB líquido sob agitação de 150rpm a 28°C. A OD da solução foi medida periodicamente até atingir 0,8. Após todas as preparações bacterianas atingirem OD desejada, procedeu-se a preparação do inóculo. Foram colocados 1,5mL de solução bacteriana por tubo de micro-centrifuga e estes centrifugados a 3000rpm por 5min, em seguida foi descartado o sobrenadante e o pellet foi lavado duas vezes com 1mL de água pura estéril por 5min a 3000rpm. Após as lavagens, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 100µL de água pura estéril por cada 1ml de meio. Ao final foram misturados o DNA-A com o DNA-B de cada vírus, para inoculação com infecção simples. Em infecção mista, foi misturado o DNA-A e DNA-B de TGVV e ToSRV no mesmo tubo. Os tubos foram mantidos em gelo até a agroinoculação. A agroinoculação foi feita, colocando uma gota de inóculo em duas axilas da planta.

Após a agroinoculação foram feitas coletas foliares e observada a presença de sintomas a cada três dias, nas duas primeiras semanas e após esse período as coletas foram realizadas semanalmente. Nas primeiras cinco coletas, oito plantas de cada grupo de plantas foram coletadas aleatoriamente (devido à ausência de sintomas). Nas coletas seguintes (6^a a 8^a) foram coletadas apenas plantas sintomáticas. Na última coleta, após

34 dias da agroinoculação plantas sintomáticas inoculadas com os dois vírus e anteriormente negativas por detecção por PCR foram re-coletadas para detecção por PCR.

O DNA total de duas folhas de cada planta foi extraído separadamente (das primeiras duas folhas verdadeiras mais novas) e o DNA total foi armazenado a -20°C e estes foram usados posteriormente em PCR.

Extração do DNA total das amostras de insetos e das plantas de tomate

Extração de DNA vegetal

O DNA total das folhas de tomateiro foi extraído baseando-se no método de extração desenvolvido por Doyle e Doyle (1983). Três disco foliares de 1cm de diâmetro foram macerados em microtubos de 2,0ml, contendo 650µl de Tampão CTAB (2% de CATB, 100mM de Tris-HCl, pH 8,0, 50mM NaCl e 0,2% de 2-β-mercaptoetanol) com micro-esferas e metal. Estes foram macerados por dois ciclos de 30 seg a 2000 rpm em agitador Precellys (Bertin Technologies) e incubados a temperatura de 65°C por 5 min. Em seguida foram adicionados 650 µl de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico) e agitados (vórtex) vigorosamente. Em seguida os tubos foram centrifugados por 5 min a 12.000 rpm em microcentrífuga. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a este foi adicionado 300µl de isopropanol. Após agitação lenta dos tubos, os mesmos permaneceram a temperatura ambiente por 20 min para precipitação do DNA. Após este período os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 400µl de etanol 70% gelado. A lavagem foi repetida duas vezes. Após as lavagens o sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 250µl de água pura.

Extração de DNA dos insetos

A extração do DNA de insetos foi feita individualmente seguindo o método de Cenis *et al.* (1993) com modificações (Gil-Salas *et al.*, 2007). Insetos individuais foram macerados com auxílio de pistilos plásticos em tubos de microcentrífuga de 1,5ml, contendo 50µl de Tampão CTAB (2% de CATB, 100mM de Tris-HCl, pH 8,0, 50mM

NaCl) e incubados a temperatura de 65°C por 5 min. Em seguida foram adicionados 50 µl de clorofil e os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a este foi adicionado 25µl de isopropanol. Após agitação lenta dos tubos, os mesmos permaneceram a temperatura ambiente por 30 min para precipitação do DNA. Após este período os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 60µl de etanol 70%. A lavagem foi repetida 2 vezes. Após as lavagens o sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 25µl de água Milli-Q.

O DNA total dos insetos e dos tecidos vegetais foi armazenado a -20°C para posterior uso na PCR.

Deteção de vírus por PCR das amostras de insetos e plantas de tomate

O DNA total extraído de folhas de plantas infectadas e dos insetos coletados de *B. tabaci* foram amplificados por PCR. Foram utilizados primers específicos para a detecção das duas espécies de vírus (FERNANDES *et al.* 2008). Para a espécie ToSRV foi utilizando o par de oligonucleotídeos TSRV1f (AAG GCG ACG TCT TTG GAA GG) e TSRV2r (CTC AGC GGC CTT GTT ATA TTT) que amplifica um fragmento de aproximadamente 820 pares de bases. Para a espécie TGVV foi utilizado o par de primers TGVV1f (AAG GCS TTG GAT AGA TTT TC) e TGVV6r (GAG CTA TCG GGT CTC ATC) que amplifica um fragmento de aproximadamente 435 pares de bases (Fernandes *et al.* 2010).

A reação consistiu de 1,0 µL do Tampão 10X da enzima *Taq* polymerase (Tris-HCL 100mM, pH 8,3 e KCl 500mM, Invitrogen) 0,8µL de MgCl₂ (50mM, Invitrogen), 0,4 µL de dNTPs (2,5mM, GE Healthcare), 0,1 µL de cada primer (10uM), 0,1 µL da enzima *Taq* Polimerase (5U/µL, Invitrogen), 7,8 µL de água estéril e 1 µL de DNA total. O regime da PCR utilizado foi 94°C por 5min, e 35 ciclos de (94°C por 1 min, 62°C por 30 seg e 72°C por 90seg), finalizando o processo com 5min a 72°C. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose corado por brometo de etídeo.

Em todas as amostras foi utilizado PCR duplex, utilizando os primers para ToSRV e TGVV na mesma reação.

RESULTADOS

Eficiência de transmissão de ToSRV e TGVV

Padronização do método de inoculação por vetor

Para a padronização do método de inoculação por vetores foi utilizado apenas o isolado de ToSRV. Para avaliar a quantidade de insetos necessária para a infecção viral foram utilizados de 1 a 5 insetos por planta confinados em mini-gaiolas ou copos plásticos. A porcentagem de infecção aumentou com o aumento do número de insetos inoculados por planta (tabela 2). Utilizando um inseto por planta a porcentagem de infecção quando inoculado por copos e gaiolas foi igual a 62,9 e 70%, respectivamente. Essa taxa atingiu um valor máximo igual a 100% quando cinco insetos são confinados por planta tanto em copos plásticos como em mini-gaiolas.

Tabela 2: Porcentagem de plantas infectadas com diferentes quantidades de insetos inoculados por planta, confinados em plantas por copos plásticos e em mini-gaiolas de PVC.

Quant. de moscas/planta	Copos plásticos (%)	Mini-gaiolas (%)
1	62,5	70
2	81,8	---
3	83,3	---
4	87,5	---
5	100	100

96 plantas foram inoculadas por copos plásticos e 80 por mini-gaiolas;
Inoculação apenas por insetos fêmeas;
Avaliação após 3 semanas da inoculação;

A sobrevivência dos insetos nos dois métodos de inoculação foi avaliada após PAI de 48h. Para tanto, foram colocados de 1 a 5 insetos e após o PAI foi avaliada a porcentagem de plantas que apresentavam pelo menos um inseto vivo (tabela 3). A taxa de mortalidade de insetos inoculadas em mini-gaiolas foi quase duas vezes maior que quando inoculados em copos plásticos. Utilizando apenas um inseto por planta, apenas 23,52% das plantas inoculadas apresentavam insetos vivos quando confinados em mini-gaiolas, quando confinados em copos a sobrevivência foi de 52,94. Utilizando 3 ou 5 insetos por plantas, a taxa de sobrevivência de pelo menos um inseto por planta foi superior a 94% em copos plásticos, em mini-gaiolas essa taxa foi inferior a 60%. Esse resultado demonstrou que o uso de copos plásticos pode oferecer maior facilidade, agilidade e repetibilidade nos ensaios de transmissão.

Tabela 3: Porcentagem de plantas inoculadas com diferentes quantidades de insetos que apresentavam pelo menos um inseto vivo após 48h de inoculação.

Quant. de moscas/planta	Copos plásticos (%)		Mini-gaiolas (%)	
1	9/17	52,94	4/17	23,52
3	16/17	94,11	9/17	52,94
5	16/17	94,11	10/17	58,82

Com o intuito de selecionar uma cultivar que facilitasse a identificação de plantas sintomáticas quando inoculadas com begomovírus após três semanas de inoculação, foram avaliadas três cultivares de tomateiro após inoculação com ToSRV. Foram colocados três insetos/planta confinados em copos plásticos por PAI de 48h. A taxa infecção (detecção por PCR) não foi diretamente proporcional à quantidade de plantas sintomáticas (tabela 4). A variedade Santa Clara foi a que obteve maior quantidade de plantas infectadas (100%), mas apresentou a menor taxa de plantas com sintoma (30%). A cultivar Viradoro apresentou a maior quantidade de plantas sintomáticas e quase 95%

das plantas inoculadas foram infectadas, detecção por PCR, sendo então selecionada para os demais ensaios.

Tabela 4: Porcentagem de plantas infectadas análise visual (sintoma) e detecção por PCR

Cultivar	Sintoma (%)	Detecção por PCR (%)
Santa Clara	30	100
H-9992	60	95
Viradoro	72	94,4

*Foram inoculadas 20 plantas de cada cultivar.

Ensaio de transmissão copos plásticos (infecção simples e em mistura)

A porcentagem de infecção por ToSRV comparada à TGVV em infecção simples e mista foi superior em ambos os ensaios (tabela 6). Em média, a porcentagem de plantas que apresentaram sintomas quando inoculadas com ToSRV foi superior a 37%, com TGVV foi inferior a 3% e em infecção mista foi superior a 39% (tabela 5). A identificação de plantas sintomáticas foi mais clara em plantas inoculadas com ToSRV e os sintomas foram mais evidentes e fortes após três semanas de inoculação. Plantas inoculadas com TGVV apesar de apresentaram forte clareamento de nervuras como sintoma inicial, após três semanas ocorria uma diminuição da expressão de sintomas, dificultando a identificação de plantas sintomáticas. Em média, a porcentagem de infecção em plantas inoculadas com ToSRV foi aproximadamente cinco vezes maior que em plantas inoculadas com TGVV. Em infecção mista essa diferença foi bem mais acentuada e o ToSRV foi capaz de infectar 24 vezes mais plantas que o TGVV. A porcentagem de plantas que foram infectadas apenas com ToSRV foi, em média, igual a 86,18 e com TGVV foi igual a 3,57 (tabela 6). Em média, plantas inoculadas com os dois vírus apresentaram porcentagem de infecção de apenas 8,09% (tabela 6).

Tabela 5: Porcentagem de plantas sintomáticas em ensaios de transmissão com infecção simples e em mistura

	1º ensaio		2º ensaio		Média (%)
	PT/TL	(%)	PT/TL	(%)	
ToSRV¹	7/27	25,92	9/16	56,25	37,20
TGVV²	1/22	4,54	0/14	0	2,77
Mista³	17/30	56,66	15/51	29,41	39,50

¹ Plantas inoculadas em infecção simples por ToSRV

² Plantas inoculadas em infecção simples por TGVV

³ Plantas inoculadas em infecção mista por ToSRV e TGVV

PT/TL: quantidade de plantas infectadas pelo total de plantas inoculadas

Tabela 6: Porcentagem de plantas infectadas (PCR) em ensaios de transmissão com infecção simples (S) e mista (M)

	1º ensaio			2º ensaio			Média
	PT/TL ¹	PPP ²	PT/TL ¹	PPP ²			
ToSRV – S³	8/27	29,66	-	10/16	62,5	-	41,86
TGVV- S⁴	2/22	9,09	-	1/14	7,14	-	8,33
ToSRV – M⁵	13/30	43,33	86,66	18/51	35,29	85,71	86,18
TGVV – M⁶	1/30	3,22	6,66	1/51	1,96	4,76	3,57
ToSRV + TGVV – M⁷	1/30	3,22	6,66	2/51	3,92	9,52	8,09

¹ Quantidade de plantas infectadas pelo total de plantas inoculadas

² Porcentagem de plantas infectadas com cada vírus em ensaio de infecção mista, considerando como total apenas as plantas positivas

³ Plantas inoculadas em infecção simples com ToSRV

⁴ Plantas inoculadas em infecção simples com TGVV

⁵ Plantas inoculadas com infecção mista e positivas para ToSRV

⁶ Plantas inoculadas com infecção mista e positivas para TGVV

⁷ Plantas inoculadas com infecção mista e positivas para TGVV e ToSRV

Porcentagem de moscas-brancas que adquiriram begomovírus em ensaios de transmissão

Para avaliar se a porcentagem de plantas infectadas quando inoculadas por vetor era diretamente proporcional à porcentagem de moscas-brancas que adquiriram eficientemente o vírus, moscas-brancas foram coletadas e avaliadas quanto à detecção de begomovírus nos dois ensaios realizados após o período de aquisição. Não houve diferença na porcentagem de moscas-brancas com detecção positiva nos testes, tanto em infecção simples como mista (Tabela 7). Quase 90% das moscas adquiriram TGVV e ToSRV em infecção simples e todos os insetos avaliados adquiriram os dois vírus quando alimentados em folhas com infecção mista. A porcentagem de aquisição de ToSRV e TGVV por moscas-brancas em infecções simples e mistas foi bastante similar.

Tabela 7 Porcentagem de moscas-brancas que adquiriram TGVV e ToSRV em folhas infectadas (PAA de 48h).

	1º ensaio	2º ensaio	
	IPT ¹	IPT ¹	Média em (%)
ToSRV - S ²	8/10	9/10	85
TGVV - S3	8/10	9/10	85
MISTA ToSRV - M ⁴	0/10	0/10	0
MISTA TGVV - M ⁵	0/10	0/10	0
ToSRV + TGVV - M ⁶	10/10	10/10	100

¹ Quantidade de insetos virulíferos (PCR) pelo total de insetos avaliados

² Insetos alimentados em folha de planta infectada com ToSRV

³ Insetos alimentados em folha infectada com TGVV

⁴ Insetos alimentados em folha infectadas com ToSRV e TGVV e virulíferos (PCR) para ToSRV

⁵ Insetos alimentados em folha infectadas com ToSRV e TGVV e virulíferos (PCR) para TGVV

⁶ Insetos alimentados em folha infectadas com ToSRV e TGVV e virulíferos (PCR) para ToSRV e TGVV

Cinética de infecção de TGVV e ToSRV por inoculação por *Agrobacterium tumefaciens*

Aproximadamente 100 plantas foram agroinoculadas com TGVV e ToSRV em infecções simples e mista para avaliar a velocidade de colonização e infecção por esses vírus. A porcentagem de plantas agroinoculadas que apresentaram sintomas após 32

dias da inoculação com ToSRV e TGVV em infecções simples foi respectivamente igual a 66,94 e 16,66 (tabela 8). Plantas inoculadas com os dois vírus apresentaram uma porcentagem de 50,86% de plantas sintomáticas (tabela 8). Com o objetivo de verificar se havia diferença de infecção sistêmica em diferentes folhas da plantas, foram coletados folíolos das duas primeiras folhas verdadeiras de tomate após diferentes dias de inoculação. A porcentagem de plantas infectadas (folha 1 e folha 2) com TGVV e ToSRV, quando inoculadas em infecção mista após diferentes períodos de inoculação encontra-se na tabela 9. Nas sete primeiras coletas realizadas no ensaio com inoculação mista 100% das plantas positivas coletadas estavam infectadas apenas com ToSRV, só a partir da oitava coleta TGVV passou a ser detectado, mas em porcentagem bem inferior (tabela 9). Após 34 dias da inoculação apenas 9,52% das plantas estavam infectadas com os dois vírus (tabela 9). A porcentagem de plantas infectadas no grupo de plantas agroinoculadas apenas com ToSRV foi superior ao grupo inoculado com ambos os vírus, isso sugere que a presença de TGVV pode ter ação inibitória da infecção de ToSRV.

Tabela 8: Porcentagem de plantas agroinoculadas com TGVV e ToSRV (em infecção simples e mista) que apresentaram sintomas típicos de infecção por begomovírus após 14, 21 e 32 dias da inoculação.

	14 dias ²		21 dias ²		32 dias ²	
	PPP ¹	(%)	PPP ¹	(%)	PPP ¹	(%)
ToSRV³	56/121	46,2	74/ 121	61,57	81/121	66,94
TGVV⁴	11/96	11,45	16/96	16,66	16/96	16,66
Mista⁵	41/116	35,34	50/116	43,10	59/116	50,86

¹ Quantidade de plantas sintomáticas pelo total de plantas inoculadas

² Dias após a inoculação

³ Porcentagem de plantas sintomáticas quando inoculadas em infecção simples por ToSRV

⁴ Porcentagem de plantas sintomáticas quando inoculadas em infecção simples por TGVV

⁵ Porcentagem de plantas sintomáticas quando inoculadas em infecção mista

Tabela 9 Porcentagem de plantas infectadas por agro-inoculação (infecção mista) após 3, 6, 9, 12, 15, 18, 25, 32 e 35 dias após a inoculação (detecção por PCR)

	1¹		2¹		3¹		4¹		5¹	
	3 dias²		6 dias²		9 dias²		12 dias²		15 dias²	
	F1³	F2⁴								
ToSRV⁵	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
TGVV⁶	100	50	0	0	0	0	0	0	0	0
ToSRV/TGVV⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6¹		7¹		8¹		9¹			
	18 dias²		25 dias²		32 dias²		34 dias²			
	F1³	F2⁴	F1³	F2⁴	F1³	F2⁴	Planta			
ToSRV⁵	100	100	100	100	50	50	90,47			
TGVV⁶	0	0	0	0	0	0	0			
ToSRV/TGVV⁷	0	0	0	0	50	50	9,52			

¹ Número das coletas realizadas

² Dias após a inoculação

³ Folha coletada – 1º folíolos da 1ª folha verdadeira bem desenvolvida

⁴ Folha coletada – 1º folíolos da 2ª folha verdadeira bem desenvolvida

⁵ Porcentagem de plantas positivas para ToSRV quando inoculadas em infecção mista

⁶ Porcentagem de plantas positivas para TGVV quando inoculadas em infecção mista

⁷ Porcentagem de plantas positivas para ToSRV e TGVV quando inoculadas em infecção mista

Gama de hospedeiras de ToSRV e TGVV

A mosca-branca (*B. tabaci*) apresenta forte preferência para determinados hospedeiros (ZALOM *et al.* 1995), por isso, é importante ressaltar que a determinação da gama de hospedeiros foi realizada em grupos de plantas determinados pela velocidade de crescimentos das espécies utilizadas (tabela 10). Assim, diferentes espécies de plantas foram colocadas em uma mesma gaiola, sempre com pelo menos três plantas de tomate da cv Viradoro, servindo como controles susceptíveis. Aproximadamente 900 insetos foram liberados por gaiola, com 24 plantas, com livre escolha para a sua alimentação. No primeiro grupo, as espécies que mais apresentaram insetos adultos após o período de inoculação foram plantas de *C. pepo* cv. Caserta, seguido de *S. lycopersicum* cv. Viradoro e *P. vulgaris*. No grupo dois, a preferência dos insetos-vetores foram para as espécies *N. physaloides*, *S. lycopersicum* cv. Viradoro e *D. stramonium*. No grupo três as espécies que mais apresentaram insetos foram *S.*

lycopersicum cv. Viradoro e as cultivares de *N. tabacum*. No grupo quatro não foi observado diferença na quantidade de insetos entre as plantas inoculadas.

As espécies de plantas avaliadas que apresentaram pelo menos uma planta infectada, detecção por PCR, foram consideradas como espécies hospedeiras e susceptíveis. Das 26 espécies de plantas inoculadas com ToSRV e TGVV por moscas-brancas apenas *N. physaloides*, *N. rustica*, *C. baccatum* cv. Mari foram susceptíveis aos dois isolados virais (tabela 11). Três espécies foram susceptíveis apenas a TGVV: *G. globosa*, *Solanum americanum* e *Physalis pubescens*, para ToSRV, foram susceptíveis *D. stramonium* e *N. tabacum* cv Samsun (tabela 11). A cultivar Viradoro utilizada como planta susceptível apresentou em todos os grupos de inoculação sintoma típico para cada espécie de vírus inoculado: plantas infectadas com TGVV apresentaram inicialmente forte clareamento de nervuras e posteriormente suave enrolamento do limbo foliar e clorose internerval; plantas infectadas com ToSRV apresentaram forte encarquilhamento, redução do porte da planta e intensa clorose internerval. Em relação às demais plantas, apenas plantas de *N. physaloides* (figuras 4 A e B) apresentaram sintomas visíveis neste ensaio.



Figura 4: **A:** Sintoma de ToSRV, clorose internerval, em planta de *N. physaloides* após 3 semanas de inoculação; **B:** Sintoma de TGVV, clareamento de nervura, em planta de *N. physaloides* após 3 semanas de inoculação;

Tabela 10: Grupos de espécies de plantas inoculadas em uma mesma gaiola

Espécies de plantas	
Grupo 1	<i>Crotalaria ochroleuca</i> , <i>C. pepo</i> cv. Caserta, <i>C. quinoa</i> , <i>D. metel</i> , <i>E. heterophylla</i> , <i>G. hirsutum</i> , <i>I. setosa</i> , <i>I. aristocrata</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. lycopersicum</i> cv. Viradoro (controle positivo) e <i>S. obtusifolia</i> .
Grupo 2	<i>A. esculentus</i> , <i>C. amaranticolor</i> , <i>C. incana</i> , <i>D. stramonium</i> , <i>G. globosa</i> , <i>P. pubescens</i> , <i>N. benthamiana</i> , <i>N. physaloides</i> , <i>N. rustica</i> , <i>S. santaromensis</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv. Viradoro (controle positivo).
Grupo 3	<i>C. annuum</i> cv. Tico, <i>C. baccatum</i> cv. Mari, <i>N. tabacum</i> cv. TNN, <i>N. tabacum</i> Samsun e <i>S. lycopersicum</i> cv. Viradoro (controle positivo).
Grupo 4	<i>G. max</i> , <i>S. americanum</i> e <i>S. lycopersicum</i> cv. Viradoro (controle positivo).

Tabela 11: Porcentagem de plantas hospedeiras infectadas por ToSRV e TGVV

Espécies hospedeiras	ToSRV		TGVV	
	PPT ¹	(%)	PPT ¹	(%)
<i>C. baccatum</i> cv. Mari	1/8	12,5	2/11	18,18
<i>D. stramonium</i>	1/10	10	0/10	0
<i>G. globosa</i>	0/5	0	3/5	60
<i>P. pubescens</i>	0/10	0	1/10	10
<i>N. physaloides</i>	10/10	100	10/10	100
<i>N. rustica</i>	2/10	20	1/10	10
<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	1/10	10	0/10	0
<i>S. americanum</i>	0/10	0	1/10	10
<i>S. lycopersicum</i> cv. Viradoro	36/36 ²	100	36/36 ²	100
(Controle positivo)				

1 Quantidade de plantas infectadas (detecção por PCR) pelo total de plantas inoculadas

2 Quantidade de plantas inoculadas por cada grupo de plantas avaliadas

DISCUSSÃO

Desde a década de 1960, espécies de begomovírus são relatadas infectando plantas de tomate no país. A primeira espécie relatada em tomateiro foi nomeada como *Tomato golden mosaic virus*, desde essa época novas espécies e isolados de begomovírus vem sendo relatados em todas as regiões do país. Estudos recentes mostraram que as espécies ToSRV e TGVV eram predominantes no país, junto com TMoLCV (Fernandes *et al.*, 2008). Isolados de ToSRV eram encontrados em praticamente todo o país infectando plantas de tomate, e TGVV era encontrada restrito principalmente ao Sudeste e Centro-Oeste brasileiro. Mas de acordo com o estudo de diversidade realizado neste trabalho esse cenário está mudando. A espécie TGVV já não é mais uma das espécies predominantes no país, mas ToSRV continua sendo a espécie mais presente nas regiões produtoras de tomate. Resultado semelhante foi encontrado por Fernandes em 2010 (FERNANDES 2010) em estudo de diversidade de begomovírus em tomateiro: a espécie TGVV não foi encontrada em nenhuma das 240 amostras foliares coletadas nas principais regiões de produção de tomate no país e ToSRV foi observado como o principal begomovírus em tomateiro no país. A dinâmica na composição das espécies de begomovírus em campo é constante, por isso, conhecer as razões que levam a predominância ou a extensão de determinadas espécies de begomovírus nas regiões produtoras de tomate é essencial para a predição da progressão da doença em campo e, portanto necessária para adoção de estratégias de controle desses vírus.

No início do trabalho acreditava-se que diferenças na transmissão dos vírus pelo vetor era o fator determinante na predominância de ToSRV em campo, sendo este aspecto o mais estudado neste trabalho. Apesar disso, outros aspectos da ecologia dessas espécies virais foram estudados, tais como a ocorrência dessas espécies em campo, as relações com o vetor natural (*B. tabaci*), a existência de vantagem adaptativa de alguma dessas espécies em plantas de tomate e o espectro de hospedeiras alternativas as espécies.

Para iniciar os estudos de transmissão foi necessário realizar a padronização do método de inoculação de begomovírus por mosca-branca. Assim, durante o ano de 2010 diversos ensaios de transmissão foram realizados preliminarmente aos ensaios finais,

realizados em 2011. A porcentagem de transmissão dos vírus pelo vetor foi uniforme em todos esses ensaios, sendo que o vírus ToSRV apresentou uma porcentagem de infecção superior ao TGVV, tanto em infecção simples quanto em mistura. A porcentagem de transmissão com ToSRV, utilizando apenas uma fêmea virulífera por planta, confinada em mini-gaiolas atingiu um valor máximo de infecção igual a 70%. Mas, devido a vários problemas enfrentados nos ensaios de transmissão a metodologia inicialmente considerada a melhor foi substituída por uma com maior facilidade de execução. Um dos motivos para a modificação da metodologia inicial foi a dificuldade de identificação do sexo do vetor, pois a identificação só era possível com a utilização de lupas de aumento que limitavam a quantidade de plantas inoculadas por dia devido à grande quantidade de tempo necessária para a identificação e seleção das fêmeas. Outra dificuldade encontrada foi a manipulação das mini-gaiolas, além disso, as mini-gaiolas muitas vezes provocavam danos na folha inoculada, e com frequência matavam os insetos devido ao impacto durante a introdução do inseto na parede da gaiola. Por isso, devido à alta mortalidade dos insetos inoculados em mini-gaiolas (76,48%), era necessária a utilização de uma grande quantidade de repetições nos ensaios, pois plantas que não continham insetos vivos eram eliminadas. Além disso, durante a inoculação alguns insetos escapavam e ficavam em contato com as plantas-teste. Para evitar esse problema, armadilhas adesivas eram colocadas entre as plantas, mas possivelmente algumas poderiam vir a se alimentar nas plantas avaliadas. Por todos esses motivos apresentados houve a necessidade de padronização do método de inoculação para facilitar a execução dos trabalhos.

Como metodologia de inoculação padrão, as mini-gaiolas foram substituídas por copos plásticos, o que diminuiu a mortalidade dos insetos (tabela 3), logo após a introdução dos mesmos, facilitando a manipulação no momento da inoculação e eliminando possíveis danos na folha inoculada. O uso desse tipo de confinamento eliminou também a possibilidade de escape de moscas-brancas e possibilidade de inoculação em plantas não-alvo, garantindo maior controle nos ensaios. Uma desvantagem do uso de copos foi a formação de um microclima que favorecia o desenvolvimento de patógenos que afetavam tanto as plantas como os insetos-vetores (crescimento de fungos parasitas). A quantidade de insetos utilizados por planta foi padronizada em três insetos, fêmeas ou machos, visando solucionar os problemas de mortalidade dos insetos e a dificuldade de identificação do sexo dos vetores. A

utilização de machos e fêmeas na inoculação explica a diminuição da taxa de infecção apresentadas nos ensaios de transmissão em comparação com os ensaios realizados para a padronização, onde apenas fêmeas foram utilizadas. Plantas que após a inoculação apresentavam pelo menos um inseto vivo foram consideradas para efeito de avaliação. As três cultivares de tomate avaliadas apresentaram alta taxa de infecção com detecção por PCR, variando de 94,4 a 100%. Mas, a Viradoro apresentou a maior quantidade de plantas sintomáticas após três semanas da inoculação, sendo assim, a cultivar escolhida como planta-teste para a realização dos ensaios de transmissão. A utilização dessa cultivar facilitou a identificação de plantas infectadas sem a necessidade de realização de detecção por PCR quando plantas foram inoculadas com apenas um vírus, e quando a inoculação foi com os dois isolados a detecção foi realizada por PCR em todas as plantas inoculadas. Devido à dificuldade de manutenção de duas colônias virulíferas com os dois isolados avaliados no trabalho, foi avaliado o método de aquisição do vírus pelo vetor. Foi avaliado a porcentagem de plantas inoculadas com ToSRV por insetos mantidos sob várias gerações em plantas de tomateiro infectado ou mantidos em folhas de tomateiro infectado por um período de inoculação igual a 48h. A porcentagem de infecção em plantas de tomateiro inoculadas com um inseto/planta confinado por copos plásticos provenientes de colônia virulífera ou alimentados por 48h em folhas de plantas de tomateiro infectados foi respectivamente igual a 47,05 e 45,00%. Constatou-se que na utilização de moscas-brancas mantidas em plantas infectadas ou alimentadas em folhas destacadas de tomateiro infectado por período de aquisição igual a 48h não havia diferença significativa na porcentagem de transmissão. Por isso, adotou-se o método de aquisição por uma folha destacada de tomateiro infectado por período de inoculação igual a 48h.

Diversos trabalhos têm sido relatados mostrando diferenças na porcentagem de transmissão de begomovírus por mosca-branca. A porcentagem de transmissão obtidos neste trabalho com o ToSRV foi semelhante a porcentagem relatada por Santos *et al.* (2003), onde foi avaliada a porcentagem de transmissão de um begomovírus bipartido, ToRMV, em plantas de tomate indústria cv Jumbo, quando insetos foram alimentados em folhas infectadas por 72h e permanecendo na planta sadia por período de inoculação igual a 24h. A porcentagem de transmissão foi igual a 66,7%, utilizando cinco moscas-brancas por plantas confinadas nas plantas por copos plásticos (SANTOS *et al.* 2003). Trabalho similar foi realizado por Firmino *et al* (2009), onde foi avaliada a porcentagem

de transmissão de um isolado de ToYVSV por inseto-vetor, após PAA e PAI de 24h. A porcentagem de transmissão do vírus foi aproximadamente igual a 75%, quando 15 insetos foram confinados em mini-gaiolas em planta sadia (FIRMINO *et al.* 2009). A porcentagem de transmissão encontrada por Firmino *et al.* foi muito superior ao encontrado neste trabalho para o isolado de TGVV avaliado. As diferenças na transmissão encontradas nestes trabalhos podem ser explicadas por diversos fatores. Um desses fatores é a diferença na quantidade de insetos inoculados por planta. Em cada trabalho a inoculação foi realizada com um número diferente de insetos/planta, mas a porcentagem de transmissão foi crescente com o aumento da quantidade de insetos utilizados por planta, isso demonstra a coerência nos resultados obtidos no presente trabalhos e nos demais citados. Outros fatores podem ter influenciado a taxa de transmissão, como o método de inoculação utilizado para confinamento dos insetos, ora realizado por mini-gaiolas, ora em copos plásticos. Outro fator que pode ter influenciado a utilização de diferentes espécies de vírus em cada trabalho realizado.

Mudanças na composição do vírus em uma determinada região, devido a uma mudança na população de vetores têm sido freqüentemente relatadas. Este é o caso do vírus *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV) na Califórnia e Arizona, que quase desapareceu com a mudança do vetor *B. tabaci* biótipo A por B, este último segundo o estudo transmite o LIYV de forma menos eficiente (DUFFUS 1995). Situação semelhante foi relatada com o vírus *Beet pseudoyellows virus* na Espanha que foi praticamente substituído por *Cucurbit yellows stunting disorder virus*, devido à introdução de *Trialeuroides vaporariorum* por *B. tabaci* (BERNAL *et al.* 1999). Em 2008, foi realizado um trabalho relatando diferenças na transmissão de espécies de vírus por vetor distintos ou pelo mesmo vetor (WINTERMANTEL *et al.* 2008). Nesse trabalho duas espécies de crinivírus *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) e *Tomato chlorosis virus* (ToCV) foram estudadas com duas espécies de vetor-transmissor (*Trialeurodes vaporariorum* e *Trialeurodes abutilonea.*), utilizando duas espécies hospedeiras *Physalis wrightii* e *Nicotiana benthamiana*. Em infecção mista ToCV foi transmitido de maneira mais eficiente que TICV com ambos os vetores e em ambas as hospedeiras. Mas a espécie TICV foi eficientemente transmitida apenas por *T. vaporariorum* em ambas as hospedeiras tanto em infecção simples como mista. Esses resultados são similares com os encontrados neste trabalho, uma vez que a espécie ToSRV foi capaz de ser transmitido de maneira mais eficiente tanto em infecção simples como em infecção mista por *B. tabaci*.

Como foram encontradas diferenças na transmissão das espécies virais por inoculação por vetor, realizou-se ensaio para verificar se essa diferença poderia estar relacionada com diferenças na aquisição das espécies virais. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas na porcentagem de aquisição dos dois isolados de vírus estudados por *B. tabaci* no presente trabalho. Resultado similar foi obtido em estudo realizado em Israel com isolados de TYLCV, não sendo verificadas diferenças na aquisição dos isolados TYLCV-IS e TYLCV-SR em dois biótipos presentes no país, B e Q (SÁNCHEZ-CAMPOS *et al.* 1999). No entanto, ensaios realizados utilizando detecção de TYLCV no vetor apenas informam sobre a presença do DNA viral dentro dos indivíduos de *B. tabaci*, independente se ele está disposto ou não em partículas virais, e não leva em consideração as diferenças possíveis na atividade específica de partículas como fontes de vírus (MCGRATH and HARRISON 1995). Neste contexto, a aquisição foi um fator pouco estudado neste trabalho, sendo ainda um ponto a ser melhor esclarecido em trabalhos futuros.

Para confirmar se as diferenças obtidas na transmissão eram realmente devido a diferenças na eficiência de transmissão e não por diferenças existentes entre os isolados virais estudados, como velocidade de infecção e colonização dos vírus na hospedeira, ensaios com inoculação com *Agrobacterium* foram realizados, para verificar a existência de possível vantagem adaptativa de alguma das espécies virais em plantas de tomateiro.

Vantagem adaptativa para a espécie ToSRV foi constatada quando as espécies foram inoculadas através de *Agrobacterium*. A espécie ToSRV foi capaz de infectar um número de planta bem superior que TGVV tanto em infecção simples como mista. Em infecção dupla, ToSRV esteve presente em todas as plantas infectadas, e a espécie TGVV foi somente detectado em infecção mista após 32 dias de inoculação. Trabalho semelhante foi realizado por Alves-Júnior em 2009, com dois begomovírus brasileiros distintos, o ToRMV e o ToYSV. Eles determinaram a porcentagem de infecção e quantificaram a presença de dois begomovírus em plantas de tomate e *N. benthamiana*, quando inoculados em infecção simples e mista. A porcentagem da infecção obtida por ToYSV foi sempre maior que ToRMV em todos os ensaios realizados, sendo capaz de estabelecer uma infecção sistêmica mais rápido e eficiente que o ToRMV em ambos os hospedeiros em infecção simples. Em infecção mista, foi verificado também a ocorrência de sinergismo negativo e positivo entre ToRMV e ToYSV. No início da

infecção o ToRMV teve efeito negativo sobre o ToYSV, diminuindo a taxa de infecção desse vírus, mas o oposto foi verificado em fases posteriores de infecção. A presença de ToYSV facilitou a infecção por ToRMV, uma vez que o ToRMV apresentou maiores taxas de infecção após 28 dias da inoculação. A quantidade de acumulação viral de ToYSV foi superior a ToRMV após 14 da inoculação, mas após 28 dias foi observado o inverso: ToRMV após este período apresentava maior quantidade de DNA viral que ToYSV e este último teve sua quantidade de DNA viral diminuída significativamente após 28 dias de inoculação quando os vírus foram inoculados em tomateiro. O período de latência de ToRMV e ToYSV foi de 10 e 14 dias respectivamente em tomateiro. Em *N. benthamiana* esse período foi de 4 a 14 dias respectivamente para ToYSV e ToRMV. Esses resultados são similares aos resultados encontrados neste trabalho já que ToSRV mostrou-se mais agressivo e capaz de infectar de forma sistêmica uma maior quantidade de plantas que o TGVV, assim como o ToYSV. Em relação ao sinergismo foi verificado que o ToSRV parece inibir a infecção do TGVV tanto no início quando em fases avançadas da infecção.

Por fim foi estudada a contribuição de plantas daninhas como fonte de vírus para o tomateiro. Diversas plantas daninhas são encontradas em campos de produção de tomateiro, as mais freqüentemente encontradas são Picão-preto, Maria pretinha, Sida, Amendoim-bravo e Joá-de-capote. Muitas dessas espécies já foram relatadas como plantas fontes de begomovírus em diversos trabalhos (ALBUQUERQUE *et al.* 2010; ASSUNÇÃO 2006; BARBOSA *et al.* 2009; LIMA 2002; SANTOS *et al.* 2003b).

Mas no presente trabalho, apenas Joá-de-capote foi susceptível aos dois vírus inoculados. Sabe-se que plantas daninhas são plantas hospedeiras tanto de begomovírus como de moscas-brancas, mas que em geral os vírus encontrados em plantas daninhas não infectam plantas cultivadas. Porém, recentemente trabalhos estão sendo realizados neste sentido e começam a surgir os primeiros relatos de vírus de tomateiro infectando naturalmente plantas daninhas (BARBOSA *et al.* 2009). Um dos primeiros trabalhos realizados no país foi feito por Barbosa e colaboradores em 2009, onde foi realizado o primeiro relato natural de ToSRV em plantas de *N. physaloides* em amostra coletada no estado de São Paulo. Esse trabalho demonstrou a importância de plantas daninhas como fonte de vírus para o tomateiro. Outros trabalhos têm demonstrado o sucesso da transmissão de begomovírus provenientes de tomateiros para plantas daninhas, bem como seu retorno de plantas daninhas para tomateiro por vetor e enxertia (SILVA *et al.*

2010). Mas trabalhos como estes sobre a interação begomovírus, tomate, planta daninha e vetor ainda são escassos, e devem ser realizados para facilitar a recomendação de manejo e eliminação de determinadas plantas daninhas em campo de produção de tomateiro no país. O primeiro passo para a realização desses trabalhos é determinar o espectro de hospedeiras para as espécies virais. Alguns trabalhos estão sendo realizados para determinação do círculo de hospedeiras das principais espécies de begomovírus. Firmino *et al.* (2009) avaliaram 36 espécies de plantas cultivadas e daninhas para um isolado de ToYVSV através de inoculação por vetor (20 insetos/planta confinados em copos plásticos), sete espécies foram susceptíveis ao vírus: *C. annuum*, *Datura stramonium*, *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *G. globosa*, *N. tabacum* cv TNN e *N. clevelandii* (FIRMINO *et al.* 2009). Lima *et al.* (2008) avaliaram a gama de hospedeiras para os vírus ToSRV e ToYVSV por biobalística, plantas em quatro famílias botânicas, *Solanaceae*, *Fabaceae*, *Amaranthaceae* e *Curcubitaceae*, foram avaliadas. Apenas espécies da família *Solanaceae* foram susceptíveis a ToSRV e ToYVSV. Para o isolado de ToSRV as seguintes espécies foram susceptíveis: *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. debney*, *N. glutinosa* e *N. tabacum* cv TNN e Xanthi. Para o isolado de ToYVSV apenas as seguintes espécies foram susceptíveis: *N. benthamiana*, *N. tabacum* cv. TNN e Xanthi (LIMA 2008). Albuquerque e colaboradores avaliaram 15 espécies de plantas para um isolado de ToYVSV por biobalística, e dessas 12 foram susceptíveis dentre elas: *N. benthamiana*, *N. physaloides*, *Datura stramonium*, *Sida santaromensis* e *Solanum tuberosum* (ALBUQUERQUE *et al.* 2010). Mas a mosca-branca (*B. tabaci*) apresenta forte preferência para determinados hospedeiros (ZALOM *et al.* 1995), por isso, a forma de inoculação utilizada em trabalhos de teste de inoculação em hospedeiros-teste nem sempre é a forma ideal para a determinação de plantas daninhas importantes como fonte de begomovírus em campo. Trabalhos realizados utilizando *Agrobacterium*, biobalística ou outra forma que não seja pelo vetor transmissor tem sua importância comprometida, uma vez que uma planta susceptível pode não ser boa hospedeira de mosca-branca (por exemplo *N. benthamiana*), tornando-se pouco importante na epidemiologia da doença em campo. Neste contexto, as diferentes formas de inoculação e pressão de seleção aplicadas nesses trabalhos podem explicar as diferenças na gama de espécies hospedeiras dos vírus avaliados no presente trabalho.

Plantas daninhas e cultivadas inoculadas e infectadas não foram necessariamente as mesmas que atraíram a maior quantidade de moscas-brancas. Plantas de *C. pepo* cv

Caserta, *P. vulgaris* e *N. tabacum* cv TNN foram algumas das plantas que mais atraíram moscas-brancas e nenhuma dessas plantas apresentaram infecção por nenhum dos dois isolados virais. Já as espécies *C. baccatum* cv. Mari, *G. globosa*, *P. pubescens* e *S. americanum*, apesar de não apresentaram grande quantidade de vetor ao final da inoculação foram infectadas por pelo menos uma espécie de vírus. Algumas espécies de plantas mostraram ser tanto boas hospedeiras de moscas-brancas como dos begomovírus: *D. stramonium*, *N. physaloides* e *N. tabacum* cv Samsun. Sugere-se que esse último grupo seja o mais importante como fonte de begomovírus para tomateiros em campo. Em conclusão, não foram verificadas diferenças significativas na quantidade de hospedeiras entre os vírus estudados, sendo este outro fator que não parece ser determinante na predominância de ToSRV em campo.

Informações importantes a respeito da ecologia das espécies virais foram obtidas neste trabalho. Mas os fatores estudados neste trabalho e outros complementares estão sendo realizados para dar continuidade a este estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

No Brasil, a cultura do tomateiro possui grande relevância econômica e a incidência de viroses é responsável por perdas significativas na cultura. Diversas espécies de vírus afetam o tomateiro, mas a incidência dessas viroses depende de vários fatores, como clima, cultivar plantada, tipo de produção, qualidade técnica do produtor, época e região. Atualmente dois grupos virais apresentam maior incidência em campo, *Peper yellow mosaic virus* (PepYMV) e espécies de begomovírus. O controle das viroses é dificultado por vários fatores, dentre eles, a dificuldade de controle dos vetores; a existência de diversas plantas hospedeiras alternativas; e a forma de transmissão das espécies em campo, que em geral se dá por inseto-vetor. Diante disso, a forma de controle mais eficiente para as viroses é a utilização de cultivares resistentes em conjunto com ações de manejo que visem à diminuição da fonte de inóculo.

Os resultados obtidos nesse estudo com a inoculação de oito espécies virais nos principais materiais de tomateiro plantados no país mostraram que há carência de cultivares resistentes aos principais vírus que afetam a cultura. Das oito espécies de vírus avaliadas em apenas três foi verificado cultivares com resistência. Para as espécies TSWV e PVY, somente uma cultivar foi considerada como resistente enquanto para ToMV uma maior disponibilidade de materiais resistentes foi encontrada (cinco das 17 cultivares avaliadas). Em relação às demais espécies, todas as cultivares apresentaram-se como susceptíveis. Para as duas espécies de vírus com maior incidência em tomateiro não foi verificada resistência para nenhuma das cultivares, apenas algumas cultivares de tomateiro do segmento para mesa apresentaram menor susceptibilidade aos begomovírus avaliados, sendo que as demais apresentaram-se totalmente susceptíveis.

Apesar dos recentes relatos de alta incidência de PepYMV em tomateiro, os begomovírus continuam sendo os vírus que mais preocupam os produtores de tomate, devido à diversidade de espécies e a maior incidência que PepYMV. A diversidade encontrada nos begomovírus deve-se possivelmente à alta capacidade de recombinação e à facilidade de surgimentos de novas espécies, estirpes e variantes nesse gênero. Os resultados obtidos com o estudo de diversidade de begomovírus nesse trabalho geraram dados relevantes a respeito da flutuação da predominância das espécies de begomovírus na cultura. As espécies de begomovírus ToSRV, TGVV e TMoLCV são relatadas como

predominantes em tomateiro (nesta ordem) em trabalhos de diversidade. No entanto, essa tendência não foi verificada no presente trabalho, pelo contrário, foi constatado que TGVV, já não é mais tão presente em campo como era relatado, embora ainda seja detectado em algumas amostras. Verificou-se também que o TMoLCV que era praticamente restrito ao Nordeste, hoje, segundo os resultados encontrados, encontra-se presente em vários estados brasileiros. Observou-se ainda que espécies recentemente relatadas, como o ToCmMV, encontram-se em expansão nas áreas de cultivo de tomate, e espécies primeiramente relatadas em plantas invasoras estão sendo transferidas para o tomateiro. Esses resultados mostram que o surgimento e desaparecimento de espécies desse gênero são frequentes, gerando a necessidade constante de estudos de diversidade e predominância de espécies de begomovírus em tomateiro.

A espécie *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) parece ser realmente a espécie mais predominante em tomateiro no país. Ela é encontrada em alta incidência em praticamente todos os estados brasileiros enquanto as demais espécies de begomovírus encontram-se distribuídas de forma mais regionalizada. Para entender melhor o motivo dessa predominância foram estudados diversos aspectos da ecologia de duas espécies de begomovírus: ToSRV e TGVV. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que provavelmente os fatores que mais parecem estar envolvidos nessa predominância são a velocidade e eficiência de colonização e infecção de ToSRV em plantas de tomate e a maior eficiência de transmissão de ToSRV pela mosca-branca. Os demais fatores avaliados, hospedeiras alternativas e a eficiência de aquisição do vírus por vetor, podem estar influenciando neste aspecto, mas não de forma relevante para a predominância de ToSRV. Outros fatores não estudados neste trabalho podem também estar relacionados com a predominância desse begomovírus em campo, por isso esses fatores deverão ser considerados em trabalhos futuros. Para dar continuidade a esse trabalho, sugere-se verificar a real importância de espécies daninhas frequentemente encontradas em campos de tomate com a realização de estudo sobre a interação dos begomovírus com plantas daninhas, o inseto-vetor e o tomateiro. Adicionalmente, será importante também realizar estudo dos fatores do vetor que estão relacionados com a eficiência de transmissão de begomovírus, como a presença de endossimbiontes, a existência de outros biótipos e a adaptação de populações de mosca-branca do mesmo biótipo para diferentes espécies de begomovírus. Considerando a variabilidade entre isolados e

espécies, é também importante repetir os estudos com distintos isolados dessas espécies e com espécies diferentes de begomovírus.

O fator limitante para a realização de trabalhos que estudam a inter-relação vírus-vetor reside na complexidade da criação e manipulação dos insetos. A primeira dificuldade encontrada é a infra-estrutura e mão-de-obra necessária para a realização desses trabalhos, pois a manutenção de colônias de mosca-branca é muito laboriosa e exige cuidados praticamente diários, uma vez que a incidência de patógenos tanto nos insetos como nas plantas que servem como fonte de alimento é alta, exigindo assim, a constante troca das plantas. Quando se necessita manter mais de uma colônia virulífera com distintas viroses, essa dificuldade é dobrada, pois esses vetores são insetos muito ágeis e difíceis de serem mantidos em confinamento, havendo necessidade de inúmeros cuidados para garantir esse isolamento, além da necessidade de longa distância entre as casas-de-vegetação de colônias distintas. A manipulação dos insetos exige paciência e destreza, características essenciais, porém não presentes em todos os virologistas. Por isso, trabalhos com esse tema são escassos, uma vez que a chance de ocorrer erros alheios à vontade do condutor é grande, tornando trabalhos com esse tema extremamente arriscado e muito propenso ao insucesso, exigindo assim muita paciência e persistência do condutor.

O papel da mosca-branca no cenário agrícola como vetora de viroses é real e preocupante em agricultores do mundo inteiro. O controle desses vetores é muito difícil, devido aos inúmeros hospedeiros alternativos encontrados em campo junto às culturas, aliado à grande facilidade de dispersão e rápida adaptação a regiões e hospedeiros diferentes. Vale lembrar que as moscas-brancas além de transmitirem begomovírus, são também vetoras de outras viroses em distintas famílias de vírus. Assim, o surgimento de novos vírus transmitidos por moscas-brancas é muito preocupante, a exemplo dos crinivírus, recentemente relatados no país. Esse fato alerta para a necessidade de entender melhor o papel da mosca-branca como vetora dessas viroses. Por isso, trabalhos nesse tema são realmente necessários e devem ser feitos para contribuir no controle das viroses em campo, buscando a melhoria das condições de cultivo de plantas consumidas pela população, cumprindo assim, a real finalidade dos trabalhos acadêmicos na área de fitopatologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCSEM, 2009 Tomate lidera crescimento e lucratividade no setor de hortaliças. [<http://www.abcsem.com.br/noticia.php?cod=284>].
- ALBERGARIA, N. M. M. S., and F. J. CIVIDANES, 2002 Exigências térmicas de *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotropical Entomology* 31 (3): 359-363.
- ALBUQUERQUE, L. C., D. P. MARTIN, A. C. AVILA and A. K. INOUE-NAGATA, 2010 Characterization of tomato yellow vein streak virus, a begomovirus from Brazil. *Virus Genes* 40: 140-147.
- ALTSCHUL, S. F., W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS and D. J. LIPMAN, 1990 Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- ALVES-JUNIOR, M., P. ALFENAS-ZERBINI, E. C. ANDRADE, D. A. ESPOSITO, F. N. SILVA et al., 2009 Synergism and negative interference during co-infection of tomato and *Nicotiana benthamiana* with two bipartite begomoviruses. *Virology* 387: 256-266.
- AMBROZEVICIUS, L. P., R. F. CALEGÁRIO, E. P. B. FONTES, M. G. CARVALHO and F. M. ZERBINI, 2002 Diversidade genética de begomovírus infetando o tomateiro e plantas daninhas no Sudeste do Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 27: 372-377.
- ASSUNÇÃO, I. P., 2006 Diversidade genética de begomovírus que infectam plantas invasoras na região nordeste. *Planta Daninha* 24 (2): 239-244.
- ÁVILA, A. C. D., 1993 Vírus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV): organização do genoma, taxonomia, diagnose e controle. *Horticultura Brasileira* 11: 179-183.
- ÁVILA, A. C., A. K. INOUE-NAGATA, H. COSTA, L. S. BOITEUX, L. O. Q. NEVES et al., 2004 Ocorrências de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. *Horticultura Brasileira* 22 (3): 655-658.
- BARBOSA, J. C., L. D. D. TEIXEIRA and J. A. M. REZENDE, 2010 First Report on the Susceptibility of Sweet Pepper Crops to Tomato chlorosis virus in Brazil. *Plant Disease* 94: 374.
- BARBOSA, J. C., S. S. BARRETO, A. K. INOUE-NAGATA, M. S. REIS, A. C. FIRMINO et al., 2009 Natural infection of *Nicandra physaloides* by Tomato severe rugose virus in Brazil. *J Gen Plant Pathol* 75 (6): 440-443.
- ABCSEM, 2009 Tomate lidera crescimento e lucratividade no setor de hortaliças. [<http://www.abcsem.com.br/noticia.php?cod=284>].
- BEDFORD, I. D., R. W. BRIDDON, J. K. BROWN, R. C. ROSELL and P. G. MARKHAM, 1994 Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia Tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology* 125: 311-325.
- BERLINGER, J. M., 1986 Host plant resistance to *Bemisia tabaci*. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 17: 69-82.
- BERNAL, B. B., J. J. SÁEZ, E. WOUTD, B. BEITIA and F. RODRÍGUEZ-CEREZO, 1999 Occurrence of cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) and beet pseudo-yellows virus in cucurbit crops in Spain and transmission of CYSDV by two biotypes of *Bemisia tabaci*. *Plant Pathol.* 105: 211-215.

- BEZERRA, I. C., R. O. RESENDE, L. POZZER, T. NAGATA, R. KORMELINK et al., 1999 Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from Chrysanthemum and one from zucchini. *Phytopathology* 89 (11): 823-830.
- BOARI, A. J., E. MACIEL-ZAMBOLIM, M. G. CARVALHO and F. M. ZERBINI, 2000 Caracterização biológica e molecular de isolados do Cucumber mosaic virus provenientes de oito espécies vegetais. *Fitopatologia Brasileira* 25 (1): 49-58.
- BOITEUX, L. S., and L. B. GIORDANO, 1993 Genetic basis of resistance against two Tospovirus species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Euphytica* 71: 151-154.
- BOITEUX, L. S., P. C. T. MELO and N. J. VILELA, 2008 Tomate para Consumo in natura . In: Albuquerque ACS, Silva AG, eds. *Desenvolvimento da Agricultura Tropical: Quatro Décadas de Inovações Tecnológicas, Institucionais e Políticas*. Brasília, DF: Embrapa 1: 557-567.
- BOSCO, D., A. LORIA, C. SARTO and J. L. CENIS, 2006 Phytoparasitica. PCR-RFLP identification of Bemisia tabaci biotypes in the Mediterranean Basin 34: 243-251.
- BRIDDON, R. W., M. S. PINNER, J. STANLEY and P. G. MARKHAM, 1990 Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177: 85-94.
- BROWN, J. K., 1994 Current status of Bemisia tabaci as a plant pest and virus vector in agroecosystems worldwide. *FAO Plant Prot.* 42: 3-32.
- BROWN, J. K., and J. BIRD, 1992 Whitefly transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Disease* 76(3): 220-225.
- BROWN, J. K., D. R. FROHLICH and R. C. ROSELL, 1995 The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of Bemisia tabaci or a species complex? *Annual Review of Entomology* 40: 511-534.
- BROWN, J. K., S. A. COATS, I. D. BEDFORD, P. G. MARKHAM, J. BIRD et al., 1995 Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly, Bemisia tabaci (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *Biochem Genet* 33: 205-214.
- BRUNT, A., K. CRABTREE, M. J. DALLWITZ, A. J. GIBBS and L. WATSON, 1996 *Viruses of Plants: Descriptions and lists from the vide data base*. CABI International, United Kingdom.
- BYRNE, D. N., and T. S. BELLOWSJR, 1991 Whitefly biology. *Annual Review of Entomology* 36: 431-457.
- BYRNE, D. N., and W. B. MILLER, 1990 Carbohydrate and amino acid composition of phloem SAP and honeydew produced by Bemisia tabaci. *J. Ins. Physiol* 36: 433-439.
- BYRNE, D. N., T. S. BELLOWS-JR and M. P. PARRELLA, 1990 Whiteflies in agricultural systems. In D. Gerling (ed.), *Whiteflies: their bionomics, pest status and management*; Andover, UK, Intercept: 227-261.
- CALEGARIO, R. F., S. S. FERREIRA, E. C. ANDRADE and F. M. ZERBINI, 2004 Caracterização de um isolado do Begomovirus Sida micrantha virus (SimMV) obtido de tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* 29: 150.
- CALEGÁRIO, R. F., S. S. FERREIRA, E. C. ANDRADE and F. M. ZERBINI, 2007 Characterization of Tomato yellow spot virus (ToYSV), a novel begomovirus infecting tomatoes in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 1335-1342.

- CANER, J., A. COLARICCIO, C. M. CHAGAS, A. P. C. ALBA and M. VICENTE, 1990 Identificação de um isolado do vírus do mosaico do tomateiro (ToMV) no Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 15: 347-350.
- CANTO, S. P., S. FAVERO, F. A. R. PEREIRA and G. O. ROSA, 2007 Distribuição geográfica, hospedeiros e agroquímicos utilizados no controle da mosca-branca no complexo Bemisia em Mato Grosso do Sul. *Ensaios e ci* 2: 47-49.
- CASTILLO-URQUIZA, G. P., J. E. A. BEZERRA JR, F. P. BRUCKNER, A. T. M. LIMA, A. VARSANI et al., 2008 Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology* 153: 1985-1989
- CHEN, B., and R. I. B. FRANCKI, 1990 Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *Journal of General Virology* 71 (4): 939-944.
- COHEN, S., and F. E. NITZANV, 1966 Transmission and host range of the tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology* 56: 1127-1131.
- COLARICCIO, A., M. EIRAS, A. L. R. CHAVES, A. L. LOURENÇÃO, A. M. T. MELO et al., 2000 Detecção do Chrysanthemum stem necrosis virus em tomateiro no estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* 26: 252-254.
- COSTA, A. S., 1965 Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. *FAO Plant Prot. Bull.* 13: 121-130.
- COSTA, A. S., 1976 Whitefly-transmitted plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 14: 429-440.
- COSTA, A. S., A. M. B. CARVALHO and E. W. KITAJIMA, 1960 Risca do tomateiro em São Paulo, causada por estirpe do vírus Y. *Bragantia* 19: 1111-1128.
- COSTA, A. S., A. R. OLIVEIRA and D. M. SILVA, 1975 Transmissão mecânica do Mosaico dourado do tomateiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia* 6: 147.
- COSTA, A. S., and C. W. BENNETT, 1950 White-fly-Transmitted Mosaic of *Euphorbia Prunifolia*. *Phytopathology* 40: 266-283.
- COSTA, A. S., and R. FOSTER, 1938 A transmissão mecânica de vira-cabeça por fricção com suco. *Revista de Agricultura, Piracicaba* 13: 249-262.
- COSTA, A. S., C. L. COSTA and H. F. G. SAUER, 1973 Surto de mosca-branca em culturas do Paraná e São Paulo. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 2 n:1: 20-30.
- COSTA, A. S., H. NAGAI and C. L. COSTA, 1971 Mancha parda interna do tomate associada à infecção pelo vírus do mosaico do fumo (Resumo). *Revista de Olericultura* 11: 77-78.
- COSTA, C. L., 1998 Vetores de vírus de plantas- 1 insetos. *RAPP* 6: 103-167.
- COSTA, H. C., and J. K. BROWN, 1991 Variation in biological characteristics and esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci*, and the association of one population with silverleaf symptom induction. *Entomol. Exp. Appl* 61: 211-219.
- COTRIM, A. A., R. KRAUSE-SAKATE, N. NARITA, F. M. ZERBINI and M. A. PAVAN, 2007 Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica* 33: 300-303.

CZOSNEK, H., and H. LATERROT, 1997 A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Archives of Virology* 142: 1391-1406.

DE BARRO, P. J., and P. J. HART, 2000 Mating interactions between two biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Australia. *Bull Entomol Res* 90: 103-112.

DIANESE, E. C., R. O. RESENDE and A. K. INOUE-NAGATA, 2008 Alta incidência de Pepper yellow mosaic virus em tomateiro em região produtora do Distrito Federal. *Tropical Plant Pathology* 33(1): 67-68.

DUFFUS, J. E., 1995 Whitefly transmitted yellowing viruses of the Cucurbitaceae.: 12-16.

ESQUINAS-ALCÁZAR, J., and F. NUEZ, 1995 Situación taxonomica, domesticación y difusión Del tomate In: Nuez F (Ed). *El cultivo Del tomate*. Ediciones Munidiprensa.

FAO, 2010: [www.fao.org/waicent/portal/statistics_en.asp].

FARIA, J. C., 1994 Mosaico dourado; in: Sartorato, A., and Rava, C. A., eds. *Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle*. EMBRAPA-CNPAP: 262-284.

FARIA, J. C., 2000 Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 25 (2): 125-137.

FARIA, J. C., and D. P. MAXWELL, 1999 Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathol* 89: 262-268.

FAUQUET, C. M., and T. L. STANLEY, 2005 Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Archives of Virology* 150: 2151-2179.

FAUQUET, C. M., D. M. BISARO, R. W. BRIDDON, J. K. BROWN, B. D. HARRISON et al., 2003 Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. *Arch Virol* 148: 405-421.

FAUQUET, C. M., R. BRIDDON, J. BROW, E. MORIONES, J. STANLEY et al., 2008 Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* 153: 783-821.

FERNANDES, F. R., L. C. DE ALBUQUERQUE, L. DE BRITTO GIORDANO, L. S. BOITEUX, A. C. DE AVILA et al., 2008 Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36: 251-258.

FERNANDES, J. J., M. G. CARVALHO and E. G. ALMEIDA, 1983 Distribuição do mosaico em tomates de duas regiões produtoras de Minas Gerais (Resumo). *Fitopatologia Brasileira* 8 625.

FERNANDES, J. J., M. G. CARVALHO, E. C. ANDRADE, S. H. BROMMONSCHENKEL, E. P. B. FONTES et al., 2006a Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology*, 55: 513-522.

FERNANDES, N. A. N., 2010 Variabilidade genômica e geográfica de espécies de Begomovirus em tomateiro e em dois gêneros de plantas daninhas no Brasil. *Dissertação de mestrado*: 1-118.

FILICHKIN, S. A., S. BRUMFIELD, T. P. FILICHKIN and M. J. YOUNG, 1997 In vitro interactions of the aphid endosymbiont symL chaperonin with barley yellow dwarf virus. *Journal Virology* 71: 569-577.

FIRMINO, A. C., V. A. YUKI, A. G. MOREIRA and J. A. M. RESENDE, 2009 Tomato yellow vein streak virus: interação com a Bemisia tabaci biótipo B e gama de hospedeiros. *Scientia Agricola* 66: 793-799.

FLORES, E., K. SILBERSCHMIDT and M. KRAMER, 1960 Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. *Biologico* 26: 65-69.

FONTES, P. C. R., and D. J. H. SILVA, 2002 Produção de tomate de mesa Viçosa: Aprenda fácil.: 196.

FRANÇA, F. H., G. L. V. BOAS and M. C. BRANCO, 1996 Ocorrência de Bemisia argentifolii Bellows & Perring (Homoptera:Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil* 25: 369-372.

GAFNI, Y., 2003 Tomato yellow leaf curl virus, the intracellular dynamics of a plant DNA virus. *Molecular Plant Pathology* 4 (1): 9-15.

GERMAN, T. L., D. E. ULLMAN and J. W. MOYER, 1992 Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annual Review of Phytopathology* 30: 315-348.

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

GIBBS, A. J., and B. D. HARRISON, 1970 Cucumber Mosaic Virus. *Descr. Plant Viruses*.

GILDOW, F. E., and S. M. GRAY, 1993 The aphid salivary gland basal lamina as a selective barrier associated with vector-specific transmission of barley yellow dwarf luteoviruses. *Phytopathology* 83: 1293-1302.

GRAY, S. M., 1997 Plant virus proteins involved in natural vector transmission. *Trends Microbiol* 4: 259-264.

HARRIS, K. F., Z. P.-V. E. Z and J. E. DUFFUS, 1995 Morphology of the sweet potato whitefly, Bemisia tabaci (Homoptera, Aleyrodidae), relative to virus transmission. *Zoomorphology* 116: 143-156.

HUNTER, W. B., E. HIEBERT, S. E. WEBB, J. H. TSAI and J. E. POLSTON, 1998 Location of geminiviruses in the whitefly Bemisia tabaci (Homoptera:Aleyroididae). *Plant Dis.* 82: 1147-1151.

IBGE, 2011 Levantamento Sistemático da Produção. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201104.pdf. Acessado em 3 de julho de 2011.

ICTV (2009) ICTV 2009 Master Species List. Disponível em http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/1231.aspx Acessado em 15 de maio de 2011.

INOUE-NAGATA, A. K., M. E. N. FONSECA, R. O. RESENDE, L. S. BOITEUX, D. C. MONTE et al., 2002 Peper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpeper, Capsicum annum. *Archives of Virology* 147: 849-855.

JONES, D. R., 2003 Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* 109: 195-219.

JONES, J. B., R. E. STALL and T. A. ZITTER, 1991 *Compendium of Tomato Diseases*. St. Paul, MN. American Phytopathological Society 75.

JUHÁSZ, A. C. P., D. J. H. D. SILVA, F. M. Z. JÚNIOR, B. O. SOARES and G. A. H. AGUILERA, 2006 SCREENING OF *Lycopersicon* sp. ACCESSIONS FOR RESISTANCE TO Pepper yellow mosaic virus. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)* 63 (5): 510-512.

KUMAR, S., K. TAMURA and M. NEI, 2004 MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.

KUROZAWA, C., and M. A. PAVAN, 2005 Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), pp. 607-626 in *Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*, edited by H. KIMATI, L. AMORIM, J. A. M. REZENDE, A. B. FILHO and L. E. A. CAMARGO, São Paulo.

LAZAROWITZ, S. G., 1992 Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11: 327-349.

LIMA, A. T. M., 2008 Caracterização de dois begomovirus (Tomato severe rugose virus e Tomato yellow vein streak virus) que infectam tomateiro e obtenção de clones infecciosos. *Dissertação de mestrado*: 1-86.

LIMA, G. S. A., 2002 Novas espécies de begomovirus associadas a plantas invasoras no Estado de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira* 27: 207.

LIMA, L. H. C., D. NÁVIA, P. W. INGLIS and M. R. V. OLIVEIRA, 2000 Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 23: 1-5.

LIMA, L. H. C., L. CAMPOS, M. C. MORETZSOHN, D. NÁVIA and M. R. V. D. OLIVEIRA, 2002 Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) Populations in Brazil revealed by RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 25 (2): 217-223.

LOPES, C. A., 2005 Doenças do Tomateiro.

LOURENÇÃO, A. L., and H. NAGAI, 1994 Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. *Bragantia* 53 (1): 53-59.

LOURENÇÃO, A. L., H. NAGAI, W. J. SIQUEIRA, A. M. T. MELO, J. A. U. FILHO et al., 1999 Seleção de tomateiros resistentes a tospovirus. *Bragantia, Campinas* 58(2): 293-303.

LOURENÇÃO, A. L., W. J. SIQUEIRA, A. M. T. MELO, S. R. L. PALAZZO, P. C. T. MELO et al., 2005 Resistência de cultivares e linhagens de tomateiro a Tomato Chlorotic spot virus e Potato virus Y. *Fitopatologia Brasileira* 30: 609-614.

MARTIN, J. H., 1999 The whitefly fauna of Australia (Sternorrhyncha: Aleyrodidae): a taxonomic account and identification guide. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization; CSIRO Entomology, Technical Paper 38: 197.

MAYTIS, J. C., D. M. SILVA, A. R. OLIVEIRA and A. S. COSTA, 1975 Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica* 1: 267-274.

MCGRATH, P. F., and B. D. HARRISON, 1995 Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci*: Effects of virus isolate and vector biotype. *Ann. Appl. Biol.* 126: 307-316.

MEDEIROS, R. B., and T. L. GERMAN, 2000 Identification of a plant virus putative receptor in the insect vector cells. *Virus Review & Research* 5: 191.

MELO, P. C. T., 1992 Mosca branca ameaça produção de hortaliças. ASGROW. Semente. Informe Técnico: 2.

MELO, P. C. T., L. S. BOITEUX, N. J. VILELA and E. FERRAZ, 2008 Tomate para Processamento Industrial. In: Albuquerque ACS, Silva, AG, eds. *Desenvolvimento da Agricultura Tropical: Quatro Décadas de Inovações Tecnológicas, Institucionais e Políticas*. Embrapa volume 1, Brasília, DF: 547-556.

MORALES, F. J., and P. K. ANDERSON, 2001 The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* 146(3): 415-441.

MORIN, S., M. GHANIM, M. ZEIDAN, H. CZOSNEK, M. VERBEEK et al., 1999 A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology* 256: 75-84.

MORIONES, E., and J. NAVAS-CASTILHO, 2000 Tomato yellow leaf curl virus an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research* 71: 123-134.

MUHAMMAD, Z. A., R. S.-X. REN, X. XIA, L. XIAO-XI, J. GUI-HUA et al., 2010 Prevalence of Endosymbionts in *Bemisia tabaci* Populations and Their In Vivo Sensitivity to Antibiotics. *Curr Microbiol* 61: 322-328.

NAGATA, T., 2004 Print-capture PCR for detection of tomato geminiviruses from plants and whiteflies. *Fitopatologia Brasileira* 29: 91-93.

NAGATA, T., A. C. D. ÁVILA, P. C. M. TAVARES, C. J. BARBOSA, F. C. JULIATTI et al., 1995 Occurrence of different tospoviruses species in six states of Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 20: 90-95.

NAVAS-CASTILHO, J., S. SÁNCHEZ-CAMPOS, J. A. DÍAZ, E. SÁEZ-ALONSO and E. MARIONES, 1997 First report of tomato yellow leaf curl virus-Is in Spain: coexistence of two different geminiviruses in the same epidemic outbreak. *Plant Disease* 81: 1461-.

OLIVEIRA, M. R. V. D., E. AMANCIO, R. A. LAUMANN and L. D. O. GOMES, 2003 Natural enemies of *Bemisia tabaci* (Gennadius) B biotype and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) in Brasília, Brazil. *Neotropical Entomology* 32.

PADIDAM, M., R. N. BEACHY and C. M. FOUQUET, 1995 Classification and identification of geminivirus using sequence comparisons. *Journal General Virology* 76: 249-263.

PALIWAL, Y. C., 1974 Some properties and thrips transmission of tomato spotted wilt virus in Canada. *Canadian Journal of Botany* 52: 1177-1182.

PALUKAITIS, P., M. J. ROOSSINCK, R. G. DIETZGEN and R. I. B. FRANCKI, 1992 Cucumber mosaic virus. *Adv. Virus Res* 41 (2): 281-341.

POLSTON, J. E., R. J. MCGOVERN and L. G. BROWN, 1999 Introduction of tomato yellow leaf curl virus in Florida and implications for the spread of this and other geminiviruses of tomato. *Plant Disease* 83: 984-988.

POZZER, L., R. O. RESENDE, M. F. LIMA, E. KITAJIMA, L. B. GIORDANO et al., 1996 Tospovirus: uma visão atualizada. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 4: 95-148.

RABELO, A. R., P. R. QUEIROZ, K. C. SIMÕES, C. O. HIRAGI, L. H. LIMA et al., 2005 Diferenciação de biótipos de *Bemisia tabaci* utilizando PCR_RFLP e sequenciamento da

região ITS1 rDNA, pp. <http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/bp095.pdf> in Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento - Embrapa, Brasília.

REGENMORTEL, M. H. V. V., C. M. FAUQUET, D. H. L. BISHOP, E. B. CARSTENS, M. K. ESTES et al., 2000 Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, California, USA.

RESENDE, R. O., L. POZZER, T. NAGATA, I. C. BEZERRA, M. I. LIMA et al., 1996 New Tospoviruses Found in Brazil. Proceedings of the International Symposium on Tospovirus and Thrips of Floral and Vegetable Crops. Acta Horti 431 (1): 78-89.

RIBEIRO, S. G., D. P. MARTIN, C. LACORTE, I. C. SIMÕES, D. R. S. ORLANDINI et al., 2007 Molecular and biological characterization of Tomato chlorotic mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. . Phytopathology 97: 702-711.

RIBEIRO, S. G., L. F. AMBROZEVICIUS, A. C. ÁVILA, I. C. BEZERRA, R. F. CALEGARIO et al., 2003 Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomovirus in Brasil. Archives of Virology 148: 281-295.

RICK, C. M., and M. HOLLE, 1990 Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: Genetic variation and its evolutionary significance. Economic Botany 44: 69-78.

ROJAS, M. R., C. HAGEN, W. J. LUCAS and R. L. GILBERTSON, 2005 Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminivirus. Annual Review of Phytopathology 43: 16:11-16:39.

ROJAS, M. R., R. L. GILBERTSON, D. R. RUSSEL and D. MAXWELL, 1993 Use of degenerated primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. Plant Disease 77: 340-347.

ROOSSINCK, M. J., 1997 Mechanisms of plant virus evolution. Annual review of phytopathology 35: 191-209.

ROSELLÓ, S., M. SOLER, M. J. DIEZ, J. L. RAMBLA, C. RICHARTE et al., 1999 New sources for high resistance of tomato to tomato spotted wilt virus from *Lycopersicon peruvianum*. Plant Breeding 118: 425-429.

RUBINSTEIN, G., and H. CZOSNEK, 1997 Long-term association of tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. Journal General Virology 78 (Pt 10): 2683-2689.

SAKIMURA, K., 1962 *Frankliniella fusca*, an additional vector of tomato spotted wilt virus, with notes on *Thrips tabaci*, another vector. Phytopathology 53: 412-415.

SALAS, J., J. MENDOZA and O. FLORIDA, 1995 Biology of the sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato. Entomologist 78: 154-160.

SÁNCHEZ-CAMPOS, S., J. NAVAS-CASTILLO, R. CAMERO, C. SORIA, J. A. DÍAZ et al., 1999 Displacement of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in Tomato Epidemics in Spain. PHYTOPATHOLOGY 89 (11): 1038-1043.

SANTANA, F. M., 2001 Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. Euphytica 122: 45-51.

SANTANA, F. M., A. K. INOUE-NAGATA, T. NAGATA, S. D. G. RIBEIRO, A. C. D. ÁVILA et al., 2007 Detecção de um begomovírus em amostras foliares de tomateiro com sondas não radioativas. *Ciência Rural*, Santa Maria 37: 269-272.

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

SANTOS, C. D. G., M. F. B. GONÇALVES and O. R. OLIVEIRA, 2003b Detecção, por ELISA, de begomovírus em plantas daninhas presentes em áreas produtoras de tomateiro no Estado do Ceará. *Fitopatologia Brasileira* 28: 252.

SEAL, S. E., F. VANDERBOSCH and M. J. JEGER, 2006 Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Science* 25: 23-46.

SHUKLA, D. D., C. W. WARD and A. A. BRUNT, 1994 *The Potyviridae*. CAB International: 516.

SILBERSCHMIDT, K. M., and N. R. NOBREGA, 1941 Sobre uma doença de vírus em bananeira. *Biológico*, São Paulo 7(2): 216-219.

SILVA, A. K. F., C. D. G. SANTOS and A. K. Q. NASCIMENTO, 2010 Transmissão de Begomovírus de plantas daninhas para tomateiro pela mosca-branca. *Planta Daninha*, Viçosa-MG 28 (3): 507-514.

STANLEY, J., and M. R. GAY, 1983 Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. *Nature* 301: 260-262.

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. *ICTV*.

STANLEY, J., R. TOWNSEND and S. J. CURSON, 1985 Pseudorecombinantes between cloned DNAs of two isolate of cassava latent virus. *Journal General Virology* 66: 1055-1061.

STEVENS, M. R., S. J. SCOTT and R. C. GERGERICH, 1992 Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt vírus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica* 59: 9-17.

SUNTER, G., and D. M. BISARO, 1992 Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *The Plant Cell* 4: 1321-1333.

TAVARES, C. A. M., 2002 Perspectivas econômicas da tomaticultura frente aos problemas causados pelos geminivírus. *O Biológico* 64: 157-158.

THOMPSON, G. J., and J. J. B. V. ZIJL, 1996 Control of Tomato Spotted Wilt Virus in Tomatoes in South Africa. *Acta Horticulture* 432: 379-384.

THOMPSON, J. D., D. G. HIGGING and T. J. GIBSON, 1994 Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.

ULLMAN, D. E., J. J. CHO, R. F. L. MAU, D. M. WESTCOT and D. M. CUSTER, 1992 A midgut barrier to tomato spotted wilt virus acquisition by adult western flowerthrips. *Phytopathology* 82: 1333-1342.

UNSELD, S., T. FRISCHMUTH and H. JESKE, 2004 Short deletions in nuclear targeting sequences of African cassava mosaic virus coat protein prevent geminivirus twinned particle formation. *Virology* 318: 90-101.

VALLE, G. E., and A. L. LOURENÇÃO, 2002 Resistance of Soybean Genotypes to *Bemisia tabaci* (Genn.) Biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotropical Entomology* 31 (2): 285-295.

VANDERHEUVEL, J. F. J. M., A. BRUYERE, S. A. HOGENHOUT, V. ZIEGLER-GRAFF, V. BRAULT et al., 1997 The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *Journal Virology* 71: 7258-7265.

VANDERHEUVEL, J. F. J. M., M. VERBEEK and F. V. D. WILK, 1994 Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *Journal General Virology* 75.

VILLAS-BOAS, G. L., F. H. FRANÇA and N. MACEDO, 2002 Potencial biótipo da mosca-branca *Bemisia argentifolii* a diferentes plantas hospedeiras. *Hortic. bras.* 20 (1): 71-79.

VILLAS-BOAS, G. L., F. H. FRANÇA, A. C. ÁVILA and I. C. BEZERRA, 1997 Manejo integrado da mosca-branca *Bemisia argentifolii*. Circular técnica da EMBRAPA Hortaliças: 9.

VILLAS-BÔAS, G. L., F. H. FRANÇA, N. MACEDO and A. W. MOITA, 2001 Avaliação da preferência de *Bemisia argentifolii* por diferentes espécies de plantas. *Horticultura Brasileira* 19 (2).

WALKER, G. P., and T. M. PERRING, 1994 Feeding and oviposition behavior of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) interpreted from AC electronic feeding monitor waveforms. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 363-374.

WERE, H. K., and S. WINTER, 2004 Viruses infecting cassava in Kenya. *Plant Disease* 88: 17-22.

WIJKAMP, I., and D. PETER, 1993 Determination of the median latent period of two tospoviruses in using a novel leaf disk assay. *Phytopathology* 83: 986-994.

WIJKAMP, I., J. V. LENT, R. KORMELINK and D. PETER, 1993 Multiplication of Tomato spotted wilt virus in its insect vector *Frankliniella occidentalis*. *Journal General Virology* 74: 341-349.

WINTERMANTEL, W. M., A. A. CORTEZ, A. G. ANCHIETA, A. GULATI-SAKHUJA and L. L. HLADKY, 2008 Co-Infection by Two Criniviruses Alters Accumulation of Each Virus in a Host-Specific Manner and Influences Efficiency of Virus Transmission. *PHYTOPATHOLOGY* 98 (12): 1340-1345.

ZALOM, F. G., C. CASTAÑÉ and R. GABARRA, 1995 Selection of some winter-spring vegetable crop hosts by *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* 88 n. 1: 70-76.

ZEIDAN, M., and H. CZOSNEK, 1991 Acquisition of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci*. *J Gen Virol* 72 (Pt 11): 2607-2614.

ZERBINI, F. M., and E. MACIEL-ZAMBOLIM, 1999 A família Potyviridae Revisão Anual de Patologia de Plantas 7: 1-66.

ZERBINI, F. M., E. C. ANDRADE, D. R. BARROS, S. S. FERREIRA, A. T. M. LIMA et al., 2005 Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. *Aust Plant Pathol* 34: 475-480.