Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Interferência do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) na transmissão do *Tomato chlorosis virus* (ToCV) por *Bemisia tabaci* em tomateiro e o efeito de inseticidas no controle da transmissão simultânea dos dois vírus por esse vetor

Vanessa Cícera dos Santos Ramos

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2018

Vanessa Cícera dos Santos Ramos
Engenheira Agrônoma

Interferência do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) na transmissão do *Tomato chlorosis virus* (ToCV) por *Bemisia tabaci* em tomateiro e o efeito de inseticidas no controle da transmissão simultânea dos dois vírus por esse vetor

Orientador:
Prof. Dr. **JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE**
Co-orientador:
Dr. **ANDRÉ LUIZ LOURENÇÃO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Ramos, Vanessa Cícera dos Santos

Interferência do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) na transmissão do *Tomato chlorosis virus* (ToCV) por *Bemisia tabaci* em tomateiro e o efeito de inseticidas no controle da transmissão simultânea dos dois vírus por esse vetor / Vanessa Cícera dos Santos Ramos. - - Piracicaba, 2018.

54 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Crinivírus 2. Begomovírus 3. *Solanum lycopersicum* 4. Infecção mista 5. Controle químico I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Angelo e Maria do Carmo, a minha irmã Larissa e ao meu esposo Bruno pela dedicação, auxílio, paciência e amor incondicional que me ajudaram em mais essa conquista,

DEDICO

As minhas amadas filhas Giovana, Isadora e Heloísa por serem a razão e o incentivo da minha vida,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À DEUS pelo dom da vida e pelo amor e zelo com que me conduziu;

À minha família que participou ativamente no desenvolvimento desse trabalho, compartilhando os momentos difíceis e as conquistas;

Ao professor Dr. Jorge Alberto Marques Rezende pela orientação, pelos valiosos ensinamentos acadêmicos, conselhos profissionais e por toda compreensão;

Ao Dr. André Luiz Lourenção por me receber e me coorientar nesse trabalho;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, especialmente ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia, e aos seus professores e funcionários;

Ao Centro de Fitossanidade do Instituto Agronômico de Campinas. Em especial aos funcionários Moacir e Antônio Carlos “Lambari” por toda ajuda;

Ao Dr. Carlos Colombo que disponibilizou toda a infraestrutura do laboratório de Genética Molecular do Instituto Agronômico de Campinas;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos; e a CAPES pela concessão da bolsa no início desse trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal: Arnaldo, Daiana, David, Gabriel, Heron, Rafael, Talita, Tatiana e Viviana, pelo carinho, incentivo e todo apoio; Ao Felipe do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos pela ajuda nas análises estatísticas;

A Dra Gabriela Teresani pela amizade e ajuda;

Aos colegas do laboratório de Genética Molecular: Barbara, Brenda, Manuela, Lizandra, Fernanda, Fernanda Maria, Elivelton, Marlon, Ruth e Iracema pela convivência. Em especial aos amigos Cícera e Jhonatan pela ajuda e carinho;

A todos, MUITO OBRIGADA !

EPÍGRAFE

*"O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas
dificuldades que superou no caminho. "*

Abraham Lincoln

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. DESENVOLVIMENTO	13
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1.1 Panorama da tomaticultura.....	13
2.1.2 <i>Tomato chlorosis vírus</i>	13
2.1.3 <i>Tomato severe rugose vírus</i>	15
2.1.4 <i>Bemisia tabaci</i>	17
2.1.5 Interações vírus-hospedeiro-vetor.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Condução dos experimentos	23
3.2 Colônia de <i>Bemisia tabaci</i> MEAM1	23
3.3 Isolados virais.....	24
3.4 Avaliação do efeito do ToSRV na eficiência de transmissão e no período de retenção do ToCV por <i>Bemisia tabaci</i> MEAM 1.....	24
3.5 Avaliação do efeito de três inseticidas no controle das transmissões primária e secundária do ToCV + ToSRV por <i>Bemisia tabaci</i> para tomateiros	26
3.6 Detecção dos vírus	28
3.6.1 Extração do DNA e RNA total	28
3.6.1.1 RT-PCR	28
3.6.1.2 RCA-PCR	29
4. RESULTADOS	31
4.1 Efeito do ToSRV na eficiência de transmissão e no período de retenção do ToCV por <i>Bemisia tabaci</i> MEAM1.....	31
4.2 Efeito de três inseticidas no controle das transmissões primária e secundária do ToCV + ToSRV por <i>Bemisia tabaci</i> para tomateiros.....	33
4.3 Identidade dos isolados de <i>Tomato chlorosis virus</i> e de <i>Tomato severe rugose virus</i> e da <i>Bemisia tabaci</i> MEAM1	34

5. DISCUSSÃO.....	37
5.1 Efeito do ToSRV na eficiência de transmissão e no tempo de retenção do ToCV por <i>Bemisia tabaci</i> MEAM1	37
5.2 Efeito de três inseticidas no controle das transmissões primária e secundária do ToCV+ ToSRV por <i>Bemisia tabaci</i> para tomateiros	39
6. CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS	45

RESUMO

Interferência do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) na transmissão do *Tomato chlorosis virus* (ToCV) por *Bemisia tabaci* em tomateiro e o efeito de inseticidas no controle da transmissão simultânea dos dois vírus por esse vetor

As viroses causadas pelo *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato chlorosis virus* (ToCV) têm sido relatadas com frequência em cultivos de tomateiro e outras solanáceas no Brasil. Por compartilharem o mesmo vetor, a mosca-branca *B. tabaci* MEAM1, hospedeiros comuns e estarem presentes nas principais regiões produtoras, infecções mistas desses dois vírus são comuns em tomateiros. Em uma infecção mista, as diferentes espécies de vírus podem interagir, resultando em sinergismo, antagonismo ou neutralismo. Estudos referentes às interações destes dois vírus quando em infecções mistas, ainda são escassos. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da prévia aquisição do ToSRV por *B. tabaci* MEAM1 na subsequente taxa de transmissão e no período de retenção do ToCV pelo inseto. Além disso, avaliou-se o efeito dos princípios ativos cloridrato de cartape, ciantranilprole e flupiradifurone no controle das transmissões primária e secundária desses vírus por *B. tabaci* para tomateiros. Para avaliar o efeito do begomovírus em parâmetros de transmissão do crinivírus por *B. tabaci* MEAM1 foram comparados os seguintes tratamentos: 1) plantas inoculadas com insetos que adquiriram apenas o ToSRV; 2) plantas inoculadas com insetos que adquiriram somente o ToCV; 3) plantas inoculadas com insetos que adquiriram inicialmente o ToSRV e em seguida o ToCV (ToSRV → ToCV); 4) plantas inoculadas com insetos que adquiriram os vírus simultaneamente de uma mesma planta fonte (ToSRV+ToCV) e 5) plantas inoculadas com insetos livres de vírus (controle). Quarenta dias após, as plantas foram avaliadas por RT-PCR e RCA-PCR para a detecção do ToCV e do ToSRV, respectivamente. Nos ensaios para avaliar a eficiência dos inseticidas no controle da simulação da transmissão primária dos vírus, insetos virulíferos foram liberados em gaiolas individuais contendo plantas de tomate sadias pulverizadas com os inseticidas de acordo com cada tratamento. A simulação da transmissão secundária foi feita através da liberação de adultos de *B. tabaci* MEAM1 livres de vírus, em gaiolas contendo tomateiros sadios e infectados por ToSRV+ToCV pulverizados com cada inseticida. Da mesma forma, aos 40 dias após a primeira liberação, amostras de todas as plantas foram coletadas e posteriormente avaliadas por RT-PCR e RCA-PCR para detecção do ToCV e ToSRV, respectivamente. O ToSRV previamente ou simultaneamente adquirido pela *B. tabaci* MEAM1 não interferiu significativamente na taxa de transmissão do ToCV para tomateiros, 24 h após a aquisição. No entanto, quando o vetor adquiriu os vírus simultaneamente, a taxa de transmissão do ToCV foi incrementada no 2º e 3º dias após a aquisição por *B. tabaci*. O período de retenção do crinivírus foi de três dias conforme relatado anteriormente. Nenhum dos inseticidas foi eficiente em controlar as simulações das transmissões primária e secundária do ToSRV+ToCV por *B. tabaci* MEAM1 para tomateiros. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a importância em conhecer as interações vírus-vetor-planta para que as estratégias de manejo sejam melhor delineadas e efetivas. Demonstram também que o uso de inseticidas deve fazer parte de um manejo integrado com outras medidas que devem ser adotadas em larga escala.

Palavras-chave: Crinivírus; Begomovírus; *Solanum lycopersicum*; Infecção mista; Controle químico

ABSTRACT

Interference of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) on the transmission of *Tomato chlorosis virus* (ToCV) by *Bemisia tabaci* in tomato plants and the effect of insecticides on the control of the simultaneous transmission of the two viruses by this vector

Virus diseases caused by *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) and *Tomato chlorosis virus* (ToCV) have been reported frequently in tomato and other solanaceous crops in Brazil. By sharing the same vector, the whitefly *B. tabaci* MEAM1, common hosts and present in the major producing regions, tomato plants infected with both viruses is common. In a mixed infection, different virus species may interact, resulting in synergism, antagonism or neutralism. Studies regarding the interactions between these two viruses when in mixed infections are still scarce. The objective of this work was to evaluate the effect of the previous acquisition of ToSRV by *B. tabaci* MEAM1 on the subsequent transmission rate and on the retention period of ToCV by the adult whitefly. In addition, the effect of the insecticides cartape chloridate, cyantraniliprole and flupiradifurone on the control of the simultaneous transmission of these viruses by *B. tabaci* to tomatoes was evaluated. To evaluate the effect of the begomovirus on the transmission parameters of the crinivirus by *B. tabaci*, the following treatments were compared: 1) plants inoculated with whiteflies that only acquired ToSRV; 2) plants inoculated with whiteflies that only acquired ToCV; 3) plants inoculated with whiteflies that acquired ToSRV followed by ToCV (ToSRV → ToCV); 4) plants inoculated with whiteflies that acquired both viruses simultaneously (ToSRV + ToCV) and 5) plants inoculated with virus-free whiteflies (control). Forty days after inoculation all plants were evaluated by RT-PCR and RCA-PCR for the detection of ToCV and ToSRV, respectively. In assays to evaluate the efficiency of insecticides in controlling the simulation of the primary transmission of ToSRV+ToCV, viruliferous insects were released into individual cages containing healthy tomato plants sprayed with the insecticides according to each treatment. Simulation of the secondary transmission was done by the release of virus free *B. tabaci* in cages containing ToSRV + ToCV infected and healthy tomato plants sprayed with each insecticide. In the same way, at 40 days after the first whiteflies release, samples from all plants were collected and evaluated by RT-PCR and RCA-PCR for the detection of ToCV and ToSRV, respectively. When *B. tabaci* MEAM1 acquired ToCV simultaneously or after ToSRV acquisition, the begomovirus did not interfere with the ToCV transmission rate in tomato plants 24 h after acquisition. When the vector acquired the virus simultaneously, the ToCV transmission rate was increased on the 2nd and 3rd days after *B. tabaci* virus acquisition. The retention period of the crinivirus was three days, as previously reported. None of the insecticides were efficient in controlling the simulations of the primary and secondary transmissions of ToSRV+ToCV by *B. tabaci* MEAM1 to tomato plants. The results obtained in this work demonstrate the importance of knowing the virus-vector-plant interactions, so that the management strategies are better delineated and effective. They also show that the use of insecticides should be part of integrated management with other measures that should be adopted on a large scale.

Keywords: Crinivírus; Begomovírus; *Solanum lycopersicum*; Mixed infection; Chemical control

1. INTRODUÇÃO

Devido a sua importância social e econômica mundial, o tomate, fruto do tomateiro (*Solanum lycopersicum*), ocupa lugar de destaque entre as solanáceas cultivadas. A produção mundial é de aproximadamente 180 milhões de toneladas. O Brasil produziu, no ano de 2017, cerca de 4 milhões de toneladas e ocupa o nono lugar no ranking mundial, estando nas regiões Sudeste e Centro-Oeste os maiores produtores nacionais de tomate (FAOSTAT, 2018; IBGE, 2018). Outra característica importante no cultivo do tomateiro é a geração de empregos, já que é uma das culturas mais exigentes em mão de obra, pois são necessárias cerca de cinco pessoas por hectare cultivado (Socoloski et al., 2017).

O cultivo do tomateiro é um desafio para os produtores, devido a diversos fatores, entre os quais ganham destaque os problemas fitossanitários, que podem afetar a cultura em diferentes graus de severidade, levando à perdas qualitativas e quantitativas do produto final. Entre as doenças que acometem o tomateiro, as viroses, devido à dificuldade de controle, estão entre as mais preocupantes. Aquelas causadas por *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato chlorosis virus* (ToCV) têm sido relatadas ocorrendo em altas incidências em cultivos de tomateiro e outras solanáceas no Brasil (Inoue-Nagata et al., 2016; Macedo et al., 2017b).

O ToSRV é uma espécie do gênero *Begomovirus*, somente relatada no Brasil e apontada como predominante nas regiões Sudeste e Centro-Oeste (Inoue-Nagata et al., 2016). O ToCV pertence ao gênero *Crinivirus* e está presente nas principais regiões produtoras de tomate do mundo, inclusive no Brasil (Barbosa et al., 2011; Navas-Castillo et al., 2014). Ambas são transmitidas pelo mesmo vetor, *Bemisia tabaci* MEAM1 (anteriormente biótipo B). O ToSRV possui uma relação vírus-vetor do tipo persistente circulativa e o ToCV do tipo semipersistente (Inoue-Nagata et al., 2016; Wintermantel e Wisler, 2006). A epidemiologia dessas viroses também é semelhante, sendo que o influxo contínuo do vetor virulífero é um fator importante no desenvolvimento das epidemias causadas por esses vírus (Bergamin Filho et al., 2016; Macedo, 2016). Sendo assim, as recomendações de manejo dessas duas viroses também se assemelham, e atualmente tem focado no uso de variedades/híbridos resistentes, quando disponíveis, e na aplicação intensiva de inseticidas para o controle do vetor. No entanto, estudos anteriores tem revelado que a aplicação de inseticidas, embora diminua a população do inseto, não é eficiente em impedir a transmissão dos vírus, como demonstrado experimentalmente nos trabalhos de Gouvêa (2017) e Silva (2018).

Por compartilharem o mesmo vetor, hospedeiros comuns e estarem presentes nas principais regiões produtoras, infecções mistas com esses dois vírus são comuns em

tomateiros. Estudos realizados nos Estado de Goiás e no Distrito Federal, em campos de tomateiro, mostraram que em 150 amostras analisadas prevaleceu a infecção mista, pois 48% estavam infectadas por esses dois vírus, enquanto que 32% estavam infectadas somente com o ToCV e 20% somente com ToSRV (Macedo et al., 2014).

Durante a co-infecção, os agentes patogênicos podem interagir diretamente entre eles (por contato ou interações químicas) ou indiretamente (usando os recursos de defesa do hospedeiro). Em uma infecção mista, as diferentes espécies de vírus podem interagir, resultando em sinergismo, antagonismo ou neutralismo. Interações sinérgicas são aquelas onde a cooperação entre as espécies é medida pelas diferenças na taxa de replicação, efeitos citopáticos, tropismo celular, movimento sistêmico no hospedeiro e taxa de transmissão pelo vetor, de uma ou de ambas as espécies. Já o decréscimo na replicação ou a inibição de uma ou mais funções acima citadas de uma espécie sob outra é denominada antagonismo. O neutralismo pressupõe que a coexistência das espécies não as afeta individualmente (Mascia e Gallitelli, 2016). A sequência de chegada das espécies, que pode envolver diferentes tipos de microrganismos, entre eles os vírus, também podem, por sua vez, afetar o resultado da infecção mista, conforme apontado por Tollenaere et al. (2016).

Estudos têm demonstrado interações em infecções mistas envolvendo crinivirose e estas com outros vírus (Garcia-Cano et al., 2006; Karyeija et al., 2000; Tzanetakis et al., 2013; Untiveros et al., 2007; Wintermantel et al., 2008). No Brasil, estudo realizado para avaliar a interação entre o ToSRV e o ToCV nos processos de aquisição e transmissão por *B. tabaci* MEAM1 não encontraram diferenças nas taxas de transmissão quando adquiridos isolada ou simultaneamente (Freitas 2012). Bampi et al. (2017), avaliando o efeito da infecção mista entre o ToSRV e o ToCV em tomateiro das cultivares Kada e Santa Clara, inoculadas aos 30 e 45 dias após a germinação, verificaram que o título do ToSRV aumentou em infecção mista, quando comparado com a infecção única, para ambos os genótipos e idades de inoculação. Para o ToCV, o título não foi significativamente alterado. O período de incubação do ToSRV também foi influenciado pela co-infecção com o ToCV (Favara, 2017). Diversos outros parâmetros das possíveis interações entre esses vírus e a relação deles com o vetor, *B. tabaci* MEAM1, ainda precisam ser estudados. Conhecer as interações entre os vírus pode ser crucial para a compreensão da patogênese e, como consequência, para o desenvolvimento de estratégias de controle estáveis (Syller, 2012).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da prévia aquisição do ToSRV por *B. tabaci* MEAM1 na subsequente taxa de transmissão e no período de retenção do ToCV no inseto. Além disso, avaliou-se o efeito de três inseticidas no controle da transmissão simultânea desses vírus por *B. tabaci* MEAM1 para tomateiros.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Panorama da tomaticultura

Da família das solanáceas, o tomate, fruto do tomateiro (*Solanum lycopersicum*), ocupa lugar de destaque entre as hortaliças. Devido a sua ampla aceitação pela população mundial, o tomate possui um alto consumo, seja o produto *in natura* ou industrializado. A consequência disso é que este produto apresenta uma grande importância econômica e social.

As regiões andinas são relatadas como o centro de origem das espécies selvagens e sua domesticação se deu no México, de onde foi levado para Europa no século XVI e a partir daí para a Ásia, a África e o Oriente Médio (Naika et al., 2006). Hoje, o tomateiro é amplamente cultivado no mundo todo. A FAO estimou que em 2016 a área plantada foi de 4.8 milhões de hectares (ha) com uma produção de cerca de 177 milhões de toneladas. A Ásia é o maior produtor mundial e o Brasil ocupa a nona posição do ranking (FAOSTAT, 2018). Segundo o levantamento do IBGE, em 2017 o Brasil produziu cerca de 4 milhões de toneladas em uma área de aproximadamente 64 mil ha, com um rendimento médio nacional de 67.835 kg/ha. Quase todos os estados brasileiros produzem tomate, mas os principais são: Goiás, maior produtor, com uma participação na produção de 28,1%, São Paulo com 21,4% e Minas Gerais com 15,4% na safra de 2017 (IBGE, 2018). Deve-se ressaltar também a importância do cultivo do tomateiro na geração de empregos. Estima-se que, no cultivo do tomateiro para a indústria, desde o preparo do solo até a colheita são utilizadas em média 4 a 5 pessoas por hectare, gerando em média 106 mil postos de trabalho (Socoloski et al., 2017).

O custo para o cultivo e a produção do tomateiro é bastante elevado. Dentre os itens que mais oneram a produção estão principalmente os gastos com a mão de obra (32%), fertilizantes (22%), defensivos (17%) e sementes (8,5%) segundo estimativa da Associação Brasileira do Comércio de Sementes e mudas no ano de 2012 (ABCSem, 2012).

2.1.2 *Tomato chlorosis virus*

Relatado pela primeira vez em 1996 em plantas de tomate na Florida (USA) (Wisler et al., 1998), induzindo sintomas de “desordens amarelas nas folhas”, o *Tomato chlorosis virus* (ToCV) já foi detectado em campos de tomateiro na África, Ásia, Europa e nas Américas (EPPO, 2018). No Brasil, o primeiro relato desse crinivírus foi em campos de

tomateiro na região de Sumaré, no Estado de São Paulo, em 2006 (Barbosa et al., 2008). Hoje, encontra-se amplamente distribuído no Brasil, pois já foi relatado nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e no Distrito Federal (EPPO, 2018).

O ToCV pertence à família *Closteroviridae*, gênero *Crinivirus* (ICTV on line, 2018). Possui um genoma bipartido, com duas moléculas de RNA, de fita simples senso positivo, encapsidadas em partículas alongadas e flexuosas, com comprimento de 800 a 850 nm (Liu et al., 2000). O RNA1 codifica duas proteínas responsáveis por diversas funções na replicação viral, e no RNA 2 são codificadas, além de outras, as proteínas que atuam no movimento e na transmissão pelo vetor (Wintermantel e Wisler, 2006). Os crinivírus possuem distribuição irregular nas plantas infectadas (Li et al., 1998). O ToCV está restrito ao floema nas plantas infectadas (Medina et al., 2006)

O ToCV pode ser transmitido pelas espécies de aleírodídeos (moscas-brancas) *Trialeurodes abutiloneus*, *T. vaporariorum* e pelas espécies do complexo *B. tabaci*: Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), Mediterranean (MED), New World 1 (NW1) e New World 2 (NW2) (Wintermantel e Wisler, 2006). As espécies MEAM1, MED e *T. abutiloneus* são as mais eficientes em transmitir o vírus, quando comparadas a *T. vaporariorum* e NW1 (Orfanidou et al., 2016; Wintermantel e Wisler, 2006). Até o momento *T. abutiloneus* não foi relatada no Brasil. *Bemisia tabaci* MEAM1 foi a espécie relatada no Brasil como a principal responsável pelas epidemias da doença nos últimos anos.

A transmissão pelo vetor é feita de maneira semipersistente. Em *B. tabaci* MEAM1 o período de retenção do vírus é de até três dias (Wintermantel e Wisler, 2006). Nesse trabalho, os autores observaram que um mesmo indivíduo possui uma eficiência de transmissão de 70% após 24 horas de aquisição do vírus; 36% de transmissão no segundo dia após a aquisição e de 5% três dias após adquirir o ToCV. Nas espécies *T. vaporariorum* e NW 1 o período de retenção é de um dia, em *T. abutiloneus* cinco dias e em *B. tabaci* MED de até seis dias (Orfanidou et al., 2016; Wintermantel e Wisler, 2006). Já que não possui período de latência, o ToCV pode ser transmitido logo após a aquisição pelo vetor. Freitas (2012) demonstrou que *B. tabaci* MEAM1 adquiriu e transmitiu o ToCV após períodos mínimos de acesso a aquisição (PAA) e de inoculação (PAI) de cinco minutos.

O sintoma típico do ToCV no tomateiro é uma clorose internerval que se desenvolve primeiramente nas folhas de baixo, seguida de um bronzeamento ou avermelhamento dessas folhas, que também podem ficar grossas e com os bordos voltados para cima. Estes sintomas evoluem pela planta, acentuando-se nas folhas mais baixas, mas raramente são vistos nas folhas novas. Estes sintomas afetam de forma significativa a produtividade, devido à diminuição da fotossíntese e redução no desenvolvimento da planta, com frutos menores que demoram mais para amadurecer (EPPO, 2013; Wintermantel e

Wisler, 2006). Os sintomas foliares podem ser confundidos com a deficiência de magnésio, o que dificulta a diagnose. Os sintomas não aparecem antes de três a quatro semanas após a infecção do vírus em tomateiro (Wintermantel e Wisler, 2006). O período de latência do ToCV em plantas de tomateiro é de 13 dias e o período de incubação é, de aproximadamente 17 dias após o período de latência (Favara, 2017). Sendo assim, uma planta de tomate infectada ainda no viveiro de mudas pode ser levada para o campo antes da manifestação dos sintomas, introduzindo o vírus nessa área (Tzanetakis et al., 2013; Wintermantel et al., 2008).

A gama de hospedeiros do ToCV é ampla. Além do tomateiro, foi detectado infectando naturalmente outras solanáceas de importância econômica o pimentão (*Capsicum annuum*) (Barbosa et al., 2010); a batateira (*Solanum tuberosum*) (Freitas et al., 2012), a berinjela (*Solanum melongena*) e o jiló (*S. aethiopicum*) (Fonseca et al., 2016). Além disso, mais de 36 espécies de plantas daninhas, dentro de 19 diferentes famílias também já foram relatadas como hospedeiras do ToCV (Orfanidou et al., 2016). No Brasil, há relatos de ToCV infectando naturalmente maria-pretinha (*S. americanum*), joá-de-capote (*Nicandra physaloides*), camapú (*Physalis angulata*), caruru (*Amaranthus viridis*), trapoeraba (*Commelina benghalensis*) e *Sida* spp. (Fonseca et al., 2013; Macedo, 2016). Outras 26 espécies de plantas foram infectadas experimentalmente (Esquivel, 2016; Morris et al., 2006; Wintermantel e Wisler, 2006; Wisler et al., 1998). Estudo recente identificou oito espécies de *Solanum* (subgênero *Leptostemonum*) como hospedeiras naturais do ToCV no Brasil (Boiteux et al., 2018).

Os danos na produção causados pelo ToCV podem ser significativos, Mansilha-Córdova et al. (2018), ao avaliarem a resistência/tolerância de diferentes genótipos de tomateiro à infecção pelo ToCV, relataram redução no peso dos frutos de até 52%, quando infectados precocemente, em comparação aos frutos colhidos de plantas sadias. Em estudos realizados em casa de vegetação, com diferentes variedades de pimentão, houve queda na produção que variou de 45% a 75% (Fortes et al., 2012).

2.1.3 Tomato severe rugose virus

Pertence à família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*. Este possui 322 espécies (ICTV on line, 2018), sendo o maior gênero em número de espécies de vírus de plantas. Muitas dessas espécies são responsáveis por diversas doenças, algumas devastadoras, nas regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo (Inoue-Nagata et al., 2016). Os begomovírus são classificados como monopartidos ou bipartidos, ou seja, podem possuir uma ou duas moléculas de DNA, denominadas DNA A e DNA B, respectivamente. Os

geminivírus possuem partículas icosaédricas geminadas. Cada uma possui uma única molécula de DNA de fita simples circular, que varia de 2,5 a 3,0 kilobases (kb). No DNA A estão os genes responsáveis pela replicação, montagem das partículas e supressão da defesa do hospedeiro. No DNA B são codificadas as proteínas relacionadas ao movimento célula a célula no hospedeiro. Para os begomovírus as duas moléculas (DNA-A e DNA-B) são necessárias para estabelecer a infecção (Brown et al., 2015; Inoue-Nagata et al., 2016; Navas-Castillo et al., 2011). Há uma correlação entre o tipo de begomovírus e sua distribuição mundial. Nos países da África, Ásia, Austrália e Europa (chamado velho mundo), a maioria dos begomovírus é monopartido. Já nas Américas (ou novo mundo), prevalecem os bipartidos (Brown et al., 2015).

Existem diversas espécies de begomovírus no Brasil. Atenção especial é dada àquelas que causam problemas em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e tomateiro. No entanto, há espécies que causam doenças também em outras culturas como batateira, batata-doce (*Ipomoea batatas*), pimentão e quiabeiro (*Abelmoschus esculentus*). Foram relatadas 14 espécies de begomovírus infectando o tomateiro (Inoue-Nagata et al., 2016) e sua emergência está associada à transferência horizontal de plantas daninhas para plantas cultivadas após a introdução da *B. tabaci* MEAM1 (Lourenção et al., 2015).

As begomoviroses representam um dos principais problemas na produção do tomate. Sob altas pressões de incidência da mosca-branca as perdas podem chegar a 100%. As principais espécies de begomovírus relatadas nos campos de tomateiro são *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), principalmente nos Estados do Ceará e Piauí e no norte de Minas Gerais, e o ToSRV, que predomina no Distrito Federal e nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Goiás (Inoue-Nagata et al., 2016). Os sintomas característicos causados por infecções por begomovírus em tomateiros são clareamento das nervuras, clorose foliar e entre as nervuras, mosaico, enrugamento e deformação foliar e redução no porte das plantas (Inoue-Nagata et al., 2016).

O ToSRV é transmitido de modo persistente e circulativo por *B. tabaci* MEAM1. Possui um período de latência na mosca-branca de 12 a 15 horas e um tempo de retenção de 25 dias (Toloy et al., 2017). O movimento sistêmico no tomateiro se inicia rapidamente, com apenas um dia após a inoculação, sendo o período de latência na planta de sete dias e o período de incubação de 11 dias após o período de latência (Favara, 2017). A eficiência de transmissão do ToSRV pela mosca-branca é alta, podendo chegar a 70 % (Marubayashi, 2009). Toloy et al. (2017) avaliaram o tempo mínimo de aquisição do ToSRV por *B. tabaci* MEAM1 e relataram que após um minuto de período de acesso a aquisição (PAA) o inseto foi capaz de adquirir o vírus e após cinco minutos de período de acesso a inoculação (PAI) ele foi capaz de transmiti-lo. Estes autores sugerem que este curto período de acesso a aquisição é um indicio de que o vírus pode estar localizado nas células do mesofilo. Outro

dado que reforça essa ideia foi relatado por Nozaki (2007) que transmitiu o ToSRV por inoculação mecânica de extrato vegetal tamponado de *Nicotiana benthamiana* infectada para pimentão e *N. physaloides*.

O ToSRV, até o momento, ocorre somente no Brasil e foi relatado pela primeira vez em 1999, em Minas Gerais, afetando cultivos de tomateiro (Fernandes et al., 2008). Atualmente encontra-se amplamente distribuído no país, sendo relatado também nos Estados de São Paulo, Goiás, Distrito Federal, Rio de Janeiro e Pernambuco (Castillo-Urquiza et al., 2008; Cotrim et al., 2007; Fernandes et al., 2008; Lima et al., 2006). Além do tomateiro, o ToSRV foi detectado em pimentão, pimenta “dedo de moça” (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*), soja (*Glycine max*), batata, feijão, *N. physaloides*, *Euphorbia heterophylla*, *Malva* spp., *Sida* spp., *Crotalaria* sp (Barbosa et al., 2009; Barreto et al., 2013; Bezerra-Agasie et al., 2006; Macedo, 2016; Macedo et al., 2017a; Nozaki et al., 2006; Souza-Dias et al., 2008). As hospedeiras experimentais já relatadas são: *Amaranthus spinosus*, *Emilia sonchifolia*, *Chenopodium album*, *C. ambrosioides*, *Datura stramonium*, *Nicotiana clevelandii*, *N. tabacum* cvs. TNN e Samsun, *N. rustica*, *Solanum americanum* e *Capsicum baccatum* cv. Mari (Barbosa et al., 2011; Macedo et al., 2015).

2.1.4 Bemisia tabaci

Foi descrita pela primeira vez em 1889 na Grécia, em plantas de fumo, por Gennadius. No Brasil, em 1928, foi relatada pela primeira vez em *Euphorbia hirtella* (Oliveira et al., 2001). Pertence à ordem Hemiptera e à família Aleyrodidae. Devido a sua capacidade de adaptar-se facilmente a novas plantas hospedeiras e regiões geográficas, já foi relatada em todos os continentes, exceto a Antártida. O transporte internacional de material vegetal e o trânsito facilitado das pessoas, nas últimas décadas, contribuíram para sua ampla disseminação geográfica. Mais de 600 espécies de plantas já foram relatadas como hospedeiras dessa mosca-branca e acredita-se que muitas outras, ainda não formalmente relatadas, devam existir. Esses são alguns dos motivos que fazem com que essa seja, há mais de 100 anos, uma das mais importantes pragas do mundo (Elfekih et al., 2018; Oliveira et al., 2001; Perring, 2001).

Bemisia tabaci é um complexo de 11 grupos bem definidos, contendo 43 espécies morfológicamente idênticas, mas biologicamente e geneticamente distintas (De Barro et al., 2011; Tay et al., 2017). Diferem em aspectos como a distribuição geográfica, a forma de adaptação à planta hospedeira, a eficiência de transmissão de vírus, a capacidade de induzir distúrbios fitotóxicos e a composição dos endossimbiontes (Barbosa, 2014; Perring, 2001). A *B. tabaci* provoca danos diretos durante a alimentação no floema, afetando

qualitativa e quantitativamente as culturas e danos indiretos como a formação de fumagina, trata-se de um fungo do gênero *Capnodium* que se desenvolve sobre a secreção açucarada que a mosca-branca excreta durante o processo de alimentação (Lourenção et al., 2015). A transmissão de vírus é outro importante dano causado indiretamente. Moscas-brancas do complexo *B. tabaci* são vetoras de aproximadamente 200 espécies de vírus, compreendidas em cinco gêneros: *Begomovirus*, *Crinivirus*, *Ipomovirus* (*Potyviridae*), *Carlavirus* (*Betaflexiviridae*) e *Torradovirus* (*Secoviridae*) (Navas-Castillo et al., 2011; Perring, 2001). Características das moscas brancas como elevadas taxas de reprodução e dispersão, extrema polifagia, assim como o desenvolvimento de resistência a inseticidas, somadas as atividades humanas, fazem desses insetos “supervetores” (Gilbertson et al., 2015).

No Brasil, são relatadas as espécies: Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), Mediterranean (MED), e as espécies nativas das Américas: New World 1 (NW1) e New World 2 (NW2) (Barbosa et al., 2014; Marubayashi et al., 2013).

São relatados surtos da espécie MEAM1 no Brasil desde o início da década de 1990, provavelmente trazidas para o país a partir do comércio internacional de plantas ornamentais (Lourenção e Nagai, 1994). Um enorme impacto na incidência das begomoviroses, principalmente em solanáceas, foi observado após a introdução dessa espécie no país (Inoue-Nagata et al., 2016). A MEAM1 é a espécie que prevalece no país (Barbosa et al., 2010).

A espécie Mediterranean (MED), também referida como biótipo Q, de ampla distribuição global, foi relatada pela primeira vez no Brasil em 2014, no Estado do Rio Grande do Sul (Barbosa et al., 2015). Estudos mais recentes relataram a introdução dessa espécie, através de plantas ornamentais, nos Estados de São Paulo e Paraná (Moraes et al., 2017). Esses autores sugerem que houve um novo fluxo da espécie, já que essas diferiram geneticamente das amostras encontradas no Rio Grande do Sul. Atenção especial deve ser dada a espécie MED, devido a sua rápida disseminação pelo mundo nos últimos anos, maior resistência aos inseticidas, alta taxa de eficiência de transmissão de vírus e a capacidade em deslocar outras espécies competidoras (Barbosa et al., 2015; Moraes et al., 2017; Orfanidou et al., 2016). Estudo recente realizado no Brasil demonstrou que essa espécie é excelente veta do ToSRV e do ToCV, sendo as taxas de transmissão desses vírus superiores a transmissão por MEAM1 (Bello, 2017).

2.1.5 Interações vírus-hospedeiro-vetor

Múltiplas infecções envolvendo dois ou mais vírus são mais comuns do que o esperado. Diversos fatores podem estar envolvidos nas interações que ocorrem durante

uma infecção mista, como os microrganismos envolvidos, o hospedeiro e no caso das viroses, os vetores.

Infecção mista de dois begomovírus, o *African cassava mosaic virus* (ACMV) e uma estirpe africana do *East African cassava mosaic virus* (EACMV-UG), é frequentemente encontrada no cultivo da mandioca na República Centro-Africana. Estudos indicaram que 58% das amostras de mandioca analisadas estavam duplamente infectadas por esses vírus e apresentavam sintomas significativamente mais severos. Os autores sugeriram que o sinergismo entre os vírus é um importante fator na redução da produção das plantas de mandioca nesse local (Zinga et al., 2013).

A batata-doce cv Tanzania é resistente ao potyvírus *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV). No entanto, quando previamente infectada com o crinivírus *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), há a quebra da resistência ao potyvírus com a manifestação de sintomas severos e aumento na concentração deste, enquanto o SPCSV mantém o mesmo título (Karyeija et al., 2000). Outro exemplo relatado onde a interação sinérgica resultou da quebra de resistência foi observado na interação entre o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e o ToCV; a pré-infecção do crinivírus resultou em suscetibilidade da cultivar de tomateiro portador do gene de resistência Sw-5 ao TSWV (Garcia-Cano et al., 2006).

Untiveros et al. (2007), estudando a interação do crinivírus *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) com outros vírus, incluindo membros dos gêneros *Potyvirus*, *Ipomovirus*, *Cucumovirus* e *Carlavirus* em plantas de batata-doce, observaram que ocorreram interações sinérgicas que incluíram incremento na expressão dos sintomas, na taxa de replicação e/ou no movimento dos vírus na planta. No entanto, o acúmulo do SPCSV não diferiu entre as plantas onde este estava sozinho, daquelas co-infectadas com os outros vírus.

A sequência de chegada das espécies, que pode envolver diferentes tipos de microrganismos, entre eles os vírus, também pode, por sua vez, afetar o resultado da infecção mista, conforme apontado por Tollenaere et al. (2016). Na literatura são encontrados dois termos que diferenciam a ordem de chegada dos vírus na planta. Na co-infecção, dois ou mais vírus invadem o hospedeiro simultaneamente ou em um curto intervalo de tempo e na superinfecção, diferentes vírus infectam o hospedeiro em momentos diferentes (Syller, 2012)

Infecções mistas envolvendo o potyvírus *Papaya ringspot virus* (PRSV) e o potexvirus *Papaya mosaic virus* (PapMV) são comuns em mamoeiro no México. No entanto, a ordem da infecção determina se a relação é de sinergismo ou antagonismo entre eles. Quando o PRSV é inoculado 30 dias antes ou coinfetado com o PapMV, observou-se sinergismo, resultando em sintomas mais severos e morte da planta aos 70 dias após a inoculação. Plantas com infecção simples do PapMV ou do PRSV apresentaram mosaico

leve e folhas distorcidas, respectivamente. Por outro lado, uma resposta antagônica ocorreu quando a infecção por PapMV ocorreu 30 dias antes da infecção por PRSV. Neste caso, as plantas mostraram sintomas de mosaico leve, a concentração do PapMV não foi afetada, e a do PRSV foi reduzida. Os autores sugeririam que a ativação da defesa da planta pelo PapMV foi a responsável pelo antagonismo ao PRSV (Chávez-Calvillo et al., 2016).

Em infecções mistas, os vírus compartilham o mesmo hospedeiro e, em algum momento, o mesmo tecido e células. Esta condição pode provocar efeitos imprevisíveis na patologia e nas relações vírus-vetor (Mascia e Gallitelli, 2016). O begomovírus *Abutilon mosaic virus* (AbMV) é restrito ao floema. No entanto, quando em infecção mista com o *Cucumber mosaic virus* (CMV) houve aumento no título do AbMV em *N. benthamiana*, tabaco e tomateiro. Ensaios de hibridação *in situ* revelaram que, nas folhas duplamente infectadas, o begomovírus deixou de ser limitado ao floema (Wege e Siegmund, 2007).

A ultraestrutura celular também pode ser alterada severamente. Em infecções mistas onde a morte celular não ocorre, os vírus presentes podem replicar na mesma célula, sem que haja interferências significativas. Por outro lado, alterações significantes na citopatologia de folhas de tomateiro co-infectadas foram observadas. Alfaro-Fernández et al (2010), ao investigarem a citopatologia induzida em folhas de tomate co-infectadas por *Tomato torrado virus* (ToTV) e outros vírus, observaram que as folhas de tomateiro infectadas somente com o ToTV não demonstraram fortes alterações celulares; no entanto, tecidos co-infectados com o ToTV+ToCV ou ToTV+*Pepino mosaic virus* (PepMV) apresentaram alterações celulares severas, como um incremento no tamanho do plasmodesma conectado ao floema e um atrofiamento nos cloroplastos e mitocôndrias.

Interações do vírus alterando características do hospedeiro para favorecer a transmissão pelo vetor também já foram relatadas. O mesmo pode acontecer em infecções mistas, onde uma melhor distribuição ou uma nova localização de um ou de ambos os vírus nos tecidos do hospedeiro pode modificar a atração e o comportamento de alimentação dos insetos vetores (Mascia e Gallitelli, 2016). Os potyvírus *Watermelon mosaic virus* (WMV) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), transmitidos por afídeos, frequentemente ocorrem em infecção mista em cucurbitáceas. O ZYMV é capaz de manipular o fenótipo do hospedeiro, induzindo mudanças na cor da folha e na emissão de voláteis, que melhoram a atratividade do vetor para as plantas infectadas (Salvaudon et al., 2013). Esses autores relataram que durante a infecção mista, a taxa de replicação do ZYMV permaneceu similar à da infecção simples, mas a taxa de replicação do WMV foi inferior quando em infecção mista. No entanto, o WMV manteve-se facilmente transmitido pelo vetor. Eles concluíram que o WMV, mesmo não demonstrando capacidade em manipular o hospedeiro, pode se beneficiar durante a infecção mista, devido à maior atratividade do vetor exercida pela presença do ZYMV.

Os efeitos das interações sinérgicas durante as infecções mistas na transmissão de vírus por vetores merecem atenção, pois o aumento da concentração de um ou de ambos os vírus ou a melhor distribuição de um ou dos dois vírus no hospedeiro podem resultar em aumento na disponibilidade dos vírus durante a alimentação do vetor e assim aumentar a taxa de transmissão (Froissart et al., 2010; Mascia et al., 2010).

As interações vírus-vírus, vírus-hospedeiro e vírus-vetor podem ser cruciais para a compreensão da patogênese e, consequentemente, para o desenvolvimento de estratégias de controle estáveis (Syller, 2012).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Condução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação do Centro de Fitossanidade, no Centro Experimental do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), São Paulo. Foram utilizadas plantas de tomateiro do grupo Santa Cruz, cultivar Kada. As mudas foram produzidas a partir de sementeiras feitas em bandejas de isopor contendo substrato comercial (Tropstrato HT Hortaliças ®). As plântulas foram transplantadas após o desenvolvimento das primeiras folhas verdadeiras para vasos esterilizados, contendo o mesmo substrato. Foram transplantadas duas plantas-teste por vaso. A irrigação foi diária e a adubação das plantas feita periodicamente, com uma formulação de N-P-K (4-14-8). Quando necessário, pulverizações com inseticidas foram realizadas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. O número de repetições, assim como os tratamentos, foi definido de acordo com cada objetivo do trabalho. Os resultados foram convertidos em porcentagem de detecção dos vírus e comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, usando o programa Sisvar (Ferreira, 2011).

3.2. Colônia de *Bemisia tabaci* MEAM1

Colônias de *B. tabaci* MEAM1 livre de vírus foram mantidas em plantas de couve (*Brassica oleraceae* var. *acephala*), a partir de adultos provenientes de colônias pré-existentes no IAC. As plantas foram mantidas em casa de vegetação diferente e distante daquela onde os ensaios foram conduzidos. Periodicamente, as plantas de couve eram renovadas para que o inseto se mantivesse em altas populações. A identidade da espécie foi periodicamente verificada. Para isso, o DNA total do inseto adulto foi extraído usando o protocolo Chelex 100 (Walsh et al., 1991 adaptado). Em seguida, usando os primers Bem23F (5'-CGGAGCTTGCGCCTTAGTC-3') e Bem23R (5'-CGGCTTTATCATAGCTCTCGT-3'), uma reação de PCR foi feita para diferenciar as espécies MEAM1 e MED (De Barro et al., 2003). Alguns amplicons, selecionados ao acaso, foram submetidos à nova reação de PCR, agora com os primers C1-J-2195 (5'-TTGATTTTTTGGTC ATCCAGAAGT-3') e L2-N-3014 (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3') que amplificam parte do gene mitocondrial citocromo oxidase 1 (Simon et al., 1994). Os amplicons obtidos foram purificados usando o Kit de purificação Wizard® SV Gel e PCR Clean-up System (Promega) de acordo com o fabricante. Esses amplicons foram então quantificados em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) e enviados para sequenciamento de nucleotídeos pela empresa

Macrogen. As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências de genes correspondentes de moscas-brancas depositadas no Genbank, usando o programa Blastn (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

3.3 Isolados virais

Os isolados utilizados pertencem às fontes de inóculo mantidas pelo laboratório de Virologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ)/USP. Esses isolados do ToCV e do ToSRV foram originalmente obtidos de tomateiros infectados coletados no município de Sumaré-SP. Ambos foram mantidos em plantas de tomate, em casa de vegetação e renovados a cada experimento.

Com o intuito de confirmar a identidade das espécies dos vírus que foram detectados através das análises moleculares (descritas nos itens 3.6.1.1 e 3.6.1.2) nos experimentos realizados, alguns amplicons foram aleatoriamente escolhidos e enviados para sequenciamento dos nucleotídeos. Os amplicons de RCA-PCR e RT-PCR selecionados foram purificados usando o Kit de purificação Wizard® SV Gel e PCR Clean-up System (Promega) de acordo com o fabricante. Esses amplicons foram então quantificados em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) e enviados para sequenciamento pela empresa Macrogen. As sequências obtidas foram comparadas com sequências existentes no banco de dados Genbank, usando o programa Blastn (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

3.4 Avaliação do efeito do ToSRV na eficiência de transmissão e no período de retenção do ToCV por *Bemisia tabaci* MEAM1

Neste ensaio foram comparados os seguintes tratamentos: 1) plantas inoculadas com insetos que adquiriram apenas o ToSRV; 2) plantas inoculadas com insetos que adquiriram somente o ToCV; 3) plantas inoculadas com insetos que adquiriram previamente o ToSRV e em seguida o ToCV (ToSRV → ToCV); 4) plantas inoculadas com insetos que adquiriram os vírus simultaneamente de uma mesma planta co-infectada (ToSRV + ToCV) e 5) plantas inoculadas com insetos livres de vírus (controle).

Grande quantidade de adultos de *B. tabaci* MEAM1 livres de vírus foi coletada com auxílio de um sugador bucal e transferida para potes de vidro transparentes (com aproximadamente 6 cm de diâmetro e 12 cm de altura) contendo folhas de tomateiro infectado (de acordo com cada tratamento), com exceção do controle, onde as moscas-brancas foram mantidas em uma folha de couve, que é imune aos dois vírus. Esses potes foram fechados usando tecido de *voil*. Os períodos de acesso a aquisição (PAA) do ToSRV

e do ToCV foram de, no mínimo, 24 horas e de 12 horas, respectivamente. Passados esses períodos, um grupo de 10 insetos por planta foram transferidos para tomateiros sadios e mantidos por cerca de 24 horas para o período de acesso a inoculação (PAI). Esses insetos foram confinados às plantas em tubos de polipropileno de 50 ml (Figura 1A). Passado esse tempo, o tubo foi retirado e qualquer adulto remanescente, foi manualmente eliminado.

Os insetos virulíferos remanescentes foram transferidos para plantas de couve, mantidas isoladas, de acordo com cada tratamento. Após 24 horas, grupos de 10 insetos foram transferidos para as plantas de tomate sadias, de acordo com cada tratamento. Este processo foi repetido a cada 24 horas, durante quatro dias, contados a partir do momento em que os insetos foram colocados nas plantas de couve. Da mesma forma que descrito acima, foram mantidos por 24 horas de PAI, confinados em tubos de polipropileno. Após esse período, o tubo foi retirado e os adultos remanescentes retirados manualmente.

Uma semana depois, em todos os tratamentos, um dos ingredientes ativos espiromesifeno (Oberon 1ml/L) ou acetamiprido (Mospilan 0,4g/L) foi pulverizado em todas as plantas. Para evitar novas infestações, as plantas foram mantidas em gaiolas de voil individuais (Figura 1B) e monitoradas frequentemente.

Figura 1: A) Tubos de polipropileno usados para confinar os adultos de *B. tabaci* MEAM1 nas plantas de tomate no processo de transmissão dos vírus;

B) Gaiolas de voil para manter as plantas individualizadas e protegidas de infestações de outros insetos.

Essas plantas foram mantidas em casa de vegetação por aproximadamente 40 dias, quando então, amostras das folhas foram coletadas para posterior avaliação por RCA-PCR e RT-PCR para detecção dos vírus.

3.5 Avaliação do efeito de três inseticidas no controle das transmissões primária e secundária do ToCV+ToSRV por *Bemisia tabaci* MEAM1 para tomateiros

Os ingredientes ativos testados foram: cloridrato de cartape (Cartap), ciantraniliprole foliar (Benevia®) e flupiradifurone (Sivanto™). Os ensaios foram conduzidos em gaiolas confeccionadas em madeira e revestidas por *voil* (Figura 2).

Para simular a transmissão primária (Figura 3), adultos de *B. tabaci* MEAM1 livres de vírus foram colocados dentro de potes de vidro transparente contendo folhas de tomateiro duplamente infectadas com o ToSRV e o ToCV. Esses insetos foram mantidos nas folhas por um PAA dos vírus de 24 horas. Dentro das gaiolas (uma para cada inseticida testado) foram colocadas 25 plantas saudáveis de tomate cv. Kada, previamente pulverizadas com flupiradifurone (1,5 ml/L); ciantraniliprole (1,5 ml/L) e cloridrato de cartape (2,5 g/L). Após 48 horas, os insetos virulíferos foram liberados nessas plantas, na proporção de 300 insetos por gaiola. A pulverização com os mesmos inseticidas e posterior liberação de insetos virulíferos foram repetidas mais duas vezes nessas gaiolas, com intervalo de uma semana após a liberação anterior. Nas mesmas condições descritas acima, uma gaiola representou o controle da transmissão primária, onde foi pulverizada água destilada nas plantas.

A simulação da transmissão secundária também ocorreu no interior de gaiolas (Figura 4). Neste caso, dentro das gaiolas foram colocadas 25 plantas de tomate saudáveis e mais três plantas de tomate cv. Kada infectadas com ToCV+ToSRV, distribuídas aleatoriamente. As mesmas doses dos inseticidas foram aplicadas nas plantas saudáveis e infectadas. Quarenta e oito horas após a pulverização dos inseticidas, aproximadamente 300 adultos livres de vírus foram coletados diretamente da colônia, acondicionados em potes de vidro e em seguida liberados em cada uma das gaiolas que representavam os tratamentos. Da mesma forma como descrito acima, estes procedimentos foram repetidos mais duas vezes, totalizando três pulverizações seguidas de três liberações dos insetos. As mesmas condições descritas anteriormente foram realizadas em uma gaiola onde as plantas foram pulverizadas com água para servirem de controle.

Figura 2: Gaiolas confeccionadas em estrutura de madeira, laterais e teto fechados com tela de nylon antiafídeo e fundo em aço galvanizado, nas dimensões de 1,20 m de comprimento, 0,80 m de altura e 0,80 m de largura

Figura 3: Simulação da transmissão primária: A) gaiola com tomateiros saudáveis previamente pulverizados; B) potes de vidro com folhas de tomateiro infectado (ToSRV+ToCV).

Figura 4: Simulação da transmissão secundária, plantas de tomate saudáveis e infectadas com ToSRV+ToCV (→).

Os ensaios para avaliação da eficiência dos inseticidas no controle das transmissões primária e secundária foram conduzidos simultaneamente. Após 40 dias da primeira liberação dos insetos, foram coletadas folhas de todas as plantas do experimento. As amostras foram em seguida avaliadas por meio de RT-PCR e RCA-PCR para a detecção do ToCV e do ToSRV, respectivamente. Foram conduzidos dois ensaios independentes, o primeiro entre os meses de agosto e setembro de 2017, e o segundo entre os meses de novembro e dezembro de 2017. A média dos dados foram convertidas em porcentagens e analisadas estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.6 Detecção dos vírus

3.6.1 Extração do DNA e RNA total

O DNA e o RNA total das plantas foram extraídos simultaneamente, usando o protocolo de extração descrito por Dellaporta et al. (1983) adaptado. Os ácidos nucleicos totais extraídos foram submetidos a reações de RT-PCR e RCA-PCR como segue:

3.6.1.1 RT-PCR

A partir do RNA total extraído uma reação de síntese da primeira fita do DNA complementar foi feita (Reverse Transcription). Para isso, foram utilizados 3 µL de RNA; 1 µL de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs a 2,5 mM); 1 µL do oligonucleotídeo iniciador específico (anti-senso) HS-12 (5'-CC(G/T)CCACCAA(A/G)TCGTA-3') a 20 mM (Dovas et al., 2002), e 9 µL de água livre de RNases. A mistura foi levada ao termociclador e mantida por 5 min a 70 °C e em seguida colocada no gelo por mais 5 minutos. Depois disso, 2,5 µL do tampão AMV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer e 0,5 µL da enzima transcriptase reversa AMV (Promega) foram adicionados. A mistura foi incubada a 42 °C por 60 min e 50 °C por 2 min. A reação de PCR foi feita com o kit de PCR Master Mix (Promega). Foram adicionados a 12,5 µL de tampão Master Mix; 0,8 µL dos oligonucleotídeos iniciadores específicos ToC-5 (5'-GGTTTGGATTTTGGTACTACATTCAGT-3') e ToC-6 (5'-AAACTGCCTGCATGAAAAGTCTC-3') a 20 mM (Dovas et al., 2002), que amplificam um fragmento de 463 pb, ou ToCV-F (5'-GACCGAAGTGACACCAACCC-3') e ToCV-R (5'-TGGGACCGAGTACATTCCAAC-3'), que amplificam um fragmento de 140 pb (Mansilla-Córdova et al., 2018), 3 µL de cDNA e 7,9 µL de água livre de RNases., resultando em 25 µL de volume final. A mistura foi levada ao termociclador por: 95 °C por 1 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 20 s, 58 °C por 15 s, 72 °C por 10 s e 72 °C por 10 min. Os amplicons obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com Gel Red ®

(Uniscience) e visualizados em transiluminador de luz UV. O marcador 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) foi utilizado para determinar o tamanho dos amplicons obtidos.

3.6.1.2 RCA-PCR

Após a extração do DNA total, as amostras foram submetidas a uma reação de amplificação inicial do tipo RCA ("rolling-circle amplification"). Foram misturados: 1 µL do DNA extraído, 1 µL do tampão da reação 10X, 1 µl BSA 10X, 1µl dntp (10mM), 0,5 primer Tioprotetido (100mM), 0,15µl da enzima phi29 DNA polimerase (Uniscience) e 5,8 µl de água. A reação foi incubada a 30 °C por 24 h e em seguida as amostras foram levadas a 65 °C por 10 min. A reação de PCR foi feita com o kit de PCR Master Mix (Promega), 12,5 µL de tampão Master Mix; 8 µL de água livre de DNases, 2 µL do produto de RCA e 1,25 µL dos oligonucleotídeos iniciadores específicos ToSRV1f (AAG GCG ACG TCT TTG GAA GG) e ToSRV2r (CTC AGC GGC CTT GTT ATA TTT) (Fernandes et al., 2010), na concentração de 20 mM, que amplificam um fragmento de 820 pb. As condições do termociclador foram: 94 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 60 s, 62 °C por 60 s, 72 °C por 60 s e uma extensão final de 72 °C por 5 min. Os amplicons obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com Gel Red (Uniscience) e visualizados em um transiluminador de luz UV. O marcador de peso 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) foi utilizado para determinar o tamanho dos amplicons obtidos.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito do ToSRV na eficiência de transmissão e no tempo de retenção do ToCV por *Bemisia tabaci* MEAM1

Os resultados de três experimentos independentes que avaliaram a interferência do ToSRV na taxa de transmissão e no tempo de retenção do ToCV por *B. tabaci* MEAM1 estão apresentados na Tabela 1.

Os resultados mostram que a taxa de transmissão do ToCV no primeiro dia após a aquisição, quando a *B. tabaci* MEAM1 adquiriu-o juntamente com o ToSRV, foi de 58%. Quando o ToSRV foi adquirido previamente ao ToCV, este foi detectado 73% das plantas inoculadas. Esses valores não diferiram daquele da transmissão somente do ToCV (61%) por *B. tabaci* MEAM1.

No segundo dia após o período de acesso a aquisição, as taxas de transmissão do ToCV, quando adquirido posteriormente ao ToSRV ou isoladamente por *B. tabaci* MEAM1, foram 41% e 33% respectivamente. Quando o crinivírus foi adquirido pelo vetor simultaneamente com o ToSRV, a taxa de transmissão do ToCV foi de 90%, sendo 57% superior à taxa de transmissão quando ele foi adquirido isoladamente. No 3º dia após o período de acesso a aquisição, a taxa de transmissão do ToCV quando adquirido simultaneamente ao ToSRV foi de 40%. Este valor foi 22% superior à taxa de transmissão do ToCV quando este foi adquirido isoladamente (8%).

Os resultados obtidos nesses experimentos indicaram que o período de retenção do ToCV na *B. tabaci* MEAM1 não foi influenciado pela presença do ToSRV, independente de este ter sido adquirido previamente ou simultaneamente com o begomovírus. O ToCV somente foi transmitido para plantas de tomate até o 3º dia após ter sido adquirido por *B. tabaci* MEAM1. Em nenhuma das plantas inoculadas o vírus foi detectado no quarto dia após o período de acesso a aquisição pelo vetor.

As plantas inoculadas com insetos sadios não foram infectadas por nenhum dos vírus testados. Não houve contaminações acidentais das plantas, já que aquelas inoculadas com o ToCV foram negativas quando testadas por RCA-PCR para detecção do ToSRV, enquanto aquelas inoculadas com o ToSRV foram negativas quando analisadas por RT-PCR para detecção do ToCV.

Tabela 1: Taxas de transmissão do ToCV, por *Bemisia tabaci* MEAM1, quando adquirido isoladamente, em mistura ou em sequência ao ToSRV, para tomateiros em diferentes intervalos de tempo após o período de acesso à aquisição (PAA) dos vírus.

Fontes de inóculo	Vírus detectado	N° pl. infectadas /n° pl. inoculadas				% Infecção
		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Total	
1° dia após PAA						
ToCV	ToCV	2 / 4	3 / 5	3 / 4	8/13	61 a*
ToSRV	ToSRV	3 / 4	5 / 5	3 / 3	11/12	91 a
ToSRV →ToCV	ToCV	3 / 4	3 / 3	2 / 4	8/11	73 a
	ToSRV	2 / 4	3 / 3	4 / 4	9/11	82 a
ToSRV + ToCV	ToCV	2 / 4	2 / 4	3 / 4	7/12	58 a
	ToSRV	2 / 4	3 / 4	4 / 4	9/12	75 a
2° dia após PAA						
ToCV	ToCV	1 / 3	1 / 3	1 / 3	3 / 9	33 b
ToSRV	ToSRV	2 / 4	3 / 4	5 / 6	10 / 14	71 a
ToSRV →ToCV	ToCV	3 / 4	2 / 4	0 / 4	5 / 12	41 b
	ToSRV	3 / 4	4 / 4	3 / 4	10 / 12	83 a
ToSRV + ToCV	ToCV	4 / 4	4 / 4	2 / 3	10 / 11	90 a
	ToSRV	3 / 4	4 / 4	1 / 3	8 / 11	72 a
3° dia após PAA						
ToCV	ToCV	0 / 4	1 / 4	0 / 4	1 / 12	8 a
ToSRV	ToSRV	3 / 4	2 / 3	2 / 3	7 / 10	70 b
ToSRV →ToCV	ToCV	0 / 3	0 / 2	0 / 4	0 / 9	0 a
	ToSRV	1 / 3	1 / 2	2 / 4	4 / 9	44 b
ToSRV + ToCV	ToCV	1 / 3	3 / 4	0 / 3	4 / 10	40 b
	ToSRV	2 / 3	3 / 4	0 / 3	5 / 10	50 b
4° dia após PAA						
ToCV	ToCV	0 / 2	0 / 2	NA**	0 / 4	0 a
ToSRV	ToSRV	0 / 2	1 / 2	NA	1 / 4	25 a
ToSRV →ToCV	ToCV	0 / 2	0 / 2	NA	0 / 4	0 a
	ToSRV	1 / 2	0 / 2	NA	1 / 4	25 a
ToSRV + ToCV	ToCV	0 / 2	0 / 2	NA	0 / 4	0 a
	ToSRV	1 / 2	1 / 2	NA	2 / 4	50 a

* Porcentagens médias de infecção seguidas pela mesma letra, dentro de cada dia após o PAA, não diferem pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade **Não avaliado

4.2 Efeito de três inseticidas no controle das transmissões primária e secundária do ToCV+ToSRV por *Bemisia tabaci* para tomateiros

Os resultados dos ensaios independentes conduzidos para avaliar a eficiência dos princípios ativos cloridrato de cartape (Cartap), ciantraniliprole foliar (Benevia®) e flupiradifurone (Sivanto™) no controle da transmissão do ToCV+ToSRV por *B. tabaci* MEAM1 são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Taxa de transmissão do ToCV e ToSRV adquiridos simultaneamente por *Bemisia tabaci* MEAM1, para tomateiros cv. Kada pulverizados com os princípios ativos cloridrato de cartape, ciantraniliprole foliar e flupiradifurone, nas simulações das transmissões primária (P) e secundária (S).

ENSAIO 1						
Tratamento	Tipo de transmissão	N° plantas infectadas / n° plantas avaliadas				Total de infecção (%)
		ToCV	ToSRV	Infecção mista	Inf. simples + Inf. mista	
Controle (água)	P	1 / 23	0 / 23	22 / 23	23 / 23	100
	S	0 / 20	4 / 20	15 / 20	19 / 20	95
Cloridrato de cartape	P	2 / 24	4 / 24	16 / 24	22 / 24	92
	S	0 / 25	11 / 25	11 / 25	22 / 25	88
Ciantraniliprole	P	3 / 24	9 / 24	11 / 24	23 / 24	96
	S	0 / 25	12 / 25	4 / 25	16 / 25	64
Flupiradifurone	P	2 / 23	5 / 23	5 / 23	12 / 23	52
	S	0 / 25	7 / 25	2 / 25	9 / 25	36

ENSAIO 2						
Tratamento	Tipo de transmissão	N° plantas infectadas / n° plantas avaliadas				Total de infecção (%)
		ToCV	ToSRV	Infecção mista	Inf. simples + Inf. mista	
Controle (água)	P	5 / 25	2 / 25	14 / 25	21 / 25	84
	S	2 / 25	8 / 25	13 / 25	23 / 25	92
Cloridrato de cartape	P	5 / 25	2 / 25	18 / 25	25 / 25	100
	S	9 / 25	6 / 25	10 / 25	25 / 25	100
Ciantraniliprole	P	3 / 25	5 / 25	15 / 25	23 / 25	92
	S	2 / 25	11 / 25	6 / 25	19 / 25	76
Flupiradifurone	P	1 / 25	3 / 25	18 / 25	22 / 25	88
	S	5 / 22	1 / 22	3 / 22	9 / 22	41

A Tabela 3 traz as médias das porcentagens de infecção dos tomateiros nos ensaios 1 e 2.

Tabela 3: Médias das taxas de transmissão do ToCV e do ToSRV, adquiridos simultaneamente por *Bemisia tabaci* MEAM1, para tomateiros cv. Kada pulverizados com os princípios ativos cloridrato de cartape, ciantraniliprole foliar e flupiradifurone, nas simulações das transmissões primária (P) e secundária (S).

Tratamento	Tipo de transmissão	% de plantas infectadas		
		Ensaio 1	Ensaio 2	Média
Controle (água)	P	100	84	92 A*
	S	95	92	93 a
Cloridrato de cartape	P	92	100	96 A
	S	88	100	94 a
Ciantraniliprole	P	96	92	94 A
	S	64	76	70 a
Flupiradifurone	P	52	88	70 A
	S	36	41	38 a

*Médias seguidas por letras iguais, maiúscula ou minúscula, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

As porcentagens médias de infecção das plantas na simulação da transmissão primária, variam de 70% a 96% quando pulverizados com os inseticidas. Quando pulverizadas com água (controle), 92% das plantas foram infectadas. Na simulação da transmissão secundária, as porcentagens das plantas variaram de 38% a 94%, sendo que a taxa média de infecção no tratamento controle foi de 93%.

4.3 Identidade dos isolados de *Tomato chlorosis virus* e de *Tomato severe rugose virus* e de *Bemisia tabaci* MEAM1

A comparação das sequências de nucleotídeos de dois amplicons do ToCV, obtidos a partir do RNA total de amostras de plantas de tomateiro com as sequências disponíveis no GenBan, indicaram 99% de identidade com os acessos EU868927 (Brasil) e KJ433490 (Arábia Saudita). As sequências de nucleotídeos de amplicons obtidos a partir do DNA total extraído de tomateiros usados como plantas teste neste trabalho apresentaram 98% de

identidade do ToSRV com o acesso EU600238 (Brasil). As sequências de nucleotídeos dos amplicons obtidos a partir das amostras de *B. tabaci*, quando comparadas com as sequências depositadas no GenBank, indicaram 95% e 93% de identidade com os acessos HM597885 (China) e FN821800 (Caribe) de *B. tabaci* MEAM1.

5. DISCUSSÃO

5.1 Efeito do ToSRV na eficiência de transmissão e no tempo de retenção do ToCV por *Bemisia tabaci* MEAM1

Infecções mistas envolvendo o ToCV e o ToSRV são comuns em plantas de tomate no campo (Macedo et al., 2014). Em uma infecção mista, as diferentes espécies de vírus podem interagir, e certos parâmetros de um ou de ambos os vírus envolvidos podem ser influenciados. Neste trabalho, foi avaliada a influência do ToSRV na eficiência de transmissão e no tempo de retenção do ToCV por *B. tabaci* MEAM1.

A aquisição prévia do ToSRV não influenciou a taxa de transmissão do ToCV por *B. tabaci* MEAM1, a qual foi semelhante à taxa de transmissão deste vírus isoladamente (Tabela 1). A sequência de aquisição/transmissão dos vírus envolvidos na co-infecção pode afetar a taxa de transmissão pelo vetor (Mascia e Gallitelli, 2016; Tollenaere et al., 2016). Em ensaios envolvendo o *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV) e o *Lettuce chlorosis virus* (LCV), em diferentes concentrações e alterando a ordem de aquisição dos vírus por *B. tabaci* NW1, demonstrou-se que a transmissão do LCV foi negativamente afetada pela aquisição prévia do LIYV. No entanto, a pré-aquisição do LCV pelo vetor, mesmo quando este estava em altas concentrações, não interferiu na taxa de transmissão do LIYV pelo vetor (Ng e Chen, 2011). Os resultados observados no presente trabalho são semelhantes aos daqueles autores, já que a sequência de aquisição dos vírus não interferiu na taxa de transmissão do ToCV.

Quando *B. tabaci* MEAM1 adquiriu os vírus simultaneamente, após um PAA de 24 horas, a taxa de transmissão do ToCV não foi influenciada (Tabela 1). Freitas (2012) analisou a eficiência de um único adulto de *B. tabaci* MEAM1 em transmitir simultaneamente o ToSRV e o ToCV e constatou que, após o PAA de 24 horas, a taxa de transmissão dos vírus pelo vetor foi de 44,7%. Quando o vetor adquiriu somente o ToSRV, a taxa de transmissão foi de 47,4%, enquanto que para o ToCV isolado foi de 44,7%. Estes resultados se assemelham aos encontrados neste trabalho, já que após um PAA de 24 horas, a taxa de transmissão dos vírus quando adquiridos simultaneamente pelo vetor foi similar a taxa de transmissão do ToCV quando adquirido isoladamente por *B. tabaci* MEAM1, 58% e 61% respectivamente.

Incremento na eficiência de transmissão do ToCV por *B. tabaci* MEAM1 foi observado 48 e 72 horas após o acesso à aquisição em tomateiros simultaneamente infectadas com o ToSRV e ToCV (Tabela 1). Wintermantel e Wisler (2006) avaliando parâmetros relacionados ao ToCV, relataram que a eficiência de transmissão por *B. tabaci* MEAM1 foi de 70% após 24 horas de aquisição do vírus, de 36% no segundo dia após a

aquisição e de apenas 5% três dias após o inseto adquirir o vírus. Os resultados encontrados no presente trabalho, quando o ToCV foi adquirido isoladamente por *B. tabaci* MEAM1, foram semelhantes ao relatado por aqueles autores. As taxas de transmissões foram de 61% 24 horas após a aquisição do vírus, 33% no segundo dia e 8% no terceiro dia após a aquisição do ToCV. Quando o ToSRV foi previamente adquirido por *B. tabaci* MEAM1, as taxas de transmissão do ToCV também foram decrescentes ao longo dos intervalos de tempo após a aquisição, sendo 73% no primeiro dia, 41% no segundo e 0 no terceiro dia após a aquisição. No entanto, um incremento foi observado na taxa de transmissão do ToCV por *B. tabaci* MEAM1 quando este foi adquirido simultaneamente ao ToSRV, sendo que as taxas de transmissão foram 58% 24 horas após PAA, 90% no segundo dia após a aquisição e 40% no terceiro dia após o PAA.

Nos ensaios para avaliação da influência do ToSRV no período de retenção do ToCV, não foi possível observar transmissão do crinivírus por *B. tabaci* MEAM1 depois do terceiro dia após o PAA. Estes resultados demonstram que não houve interferência na persistência do ToCV em adultos de *B. tabaci* MEAM1, que foi anteriormente relatada por Wintermantel e Wisler (2006) como sendo de três dias.

Durante uma infecção mista, fatores como espaço de tempo entre a inoculação dos vírus, a concentração e a distribuição desses no hospedeiro podem influenciar a taxa de transmissão dos vírus pelo vetor (Mascia e Gallitelli, 2016; Syller, 2012; Tollenaere et al., 2016). Wintermantel et al. (2008), estudando a interação do ToCV com o *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) em *Physalis wright* e *N. benthamiana*, observaram que, em infecção mista, enquanto a concentração do ToCV decresceu em ambos os hospedeiros, a concentração do TICV foi incrementada em *N. benthamiana*, porém decresceu em *P. wright*. Os autores relataram que, quando o vetor *T. vaporariorum* adquiriu os vírus simultaneamente em *P. wright*, ele foi mais eficiente em transmitir o ToCV do que o TICV.

Macedo et al. (2015), avaliando a eficiência de transmissão do ToSRV e do *Tomato golden vein virus* (TGVV) por *B. tabaci* MEAM1, verificaram que a taxa de transmissão do ToSRV foi superior a do TGVV, tanto quando este foi adquirido isoladamente como em mistura. Para avaliar se a maior eficiência de transmissão do ToSRV foi devida a taxa de aquisição diferencial de cada vírus, os autores coletaram moscas-branca a partir de plantas de tomate infectadas, após 48 horas de período de acesso a aquisição e testaram por PCR a presença dos dois begomivírus. A taxa de infecção dos vírus quando o inseto adquiriu isoladamente cada um deles foi de 85%, enquanto que os insetos que se alimentaram de uma fonte com infecção mista, ambos os vírus puderam ser detectados em 100% das amostras avaliadas. Os autores sugeriram que a diferença na eficiência de transmissão dos vírus aparentemente estava relacionada a taxa de inoculação dos vírus pelo vetor, já que ambos os vírus foram adquiridos a uma taxa similar.

Estudos de interação entre o *Potato virus Y* (PVY) e o CMV, quando em infecção mista em plantas de tomate, indicaram que o acúmulo de RNA do CMV permaneceu inalterado mesmo 60 dias após a inoculação, quando era esperado que o título desse vírus fosse reduzido (Mascia et al., 2010). Esses autores também relataram que ocorreu maior uniformidade na distribuição dos vírus nos tecidos do hospedeiro, quando comparada aos tecidos de plantas onde os vírus foram inoculados isoladamente. Zeng et al. (2007), estudando os efeitos da infecção mista do CMV e do ZYMV em plantas de pepino e cabaça (*Lagenaria siceraria*), demonstraram que a concentração do CMV foi maior quando as plantas estavam co-infectadas, do que quando em infecção simples, enquanto que para o ZYMV o inverso foi observado. Os autores também observaram que houve um atraso no declínio dos níveis de acúmulo dos vírus quando em infecção mista.

As análises feitas no presente trabalho não permitem elucidar os fatores envolvidos no incremento da taxa de transmissão do ToCV no 2º e 3º dias após o PAA. Estudos mais detalhados são necessários.

5.2 Efeito de três inseticidas no controle das transmissões primária e secundária do ToCV+ToSRV por *Bemisia tabaci* MEAM1 para tomateiros

As doenças provocadas pelo ToSRV e ToCV em tomateiro apresentam características epidemiológicas semelhantes, mesmo o vetor apresentando modos de transmissão diferentes (Macedo, 2016). Um estudo realizado no município de Sumaré/SP demonstrou a importância da infecção primária na epidemiologia do ToSRV, tendo a curva de progresso da doença se ajustado melhor ao modelo monomolecular (Barbosa et al., 2016). Macedo et al. (2017b) realizaram estudo na região central do Brasil e, de forma semelhante, relataram a importância da transmissão primária do ToSRV no desenvolvimento dessa doença. Calaça (2011), estudando a dinâmica espacial e temporal do ToCV em tomateiro, observou comportamento linear de crescimento, devido principalmente a um influxo contínuo de insetos virulíferos externos. O progresso temporal e espacial do ToSRV e do ToCV são muito similares e para ambos a infecção primária é contínua e a principal responsável pela ocorrência das epidemias (Macedo, 2016). A autora demonstrou, em estudo feito em áreas de produção de tomate em Goiás e no Distrito Federal, que as curvas de progresso da doença para essas viroses foram paralelas, sendo a curva de progresso do ToCV defasada no tempo em relação ao ToSRV, provavelmente devido ao maior período de incubação do crinivírus (Favara, 2017). Em epidemias causadas por esses vírus são observados elementos que caracterizam as doenças monocíclicas e

policíclicas, contribuindo para o desenvolvimento da doença, sendo este novo padrão denominado como “policíclico com infecção primária contínua” (Bergamin Filho et al., 2016).

O manejo recomendado para o controle das doenças causadas pelo ToSRV e o ToCV são semelhantes e envolvem, entre outras medidas, o controle do vetor, feito intensivamente através do uso de inseticidas. Embora possam reduzir drasticamente a população da mosca-branca, os inseticidas não têm apresentado eficiência no controle da transmissão de vírus por *B. tabaci*, uma vez que esses insetos podem transmitir o vírus mesmo antes de serem eliminados pelo inseticida (Tzanetakis et al., 2013). Esse fato foi demonstrado em estudo realizado para avaliar a eficiência dos princípios ativos ciantraniliprole solo, flupiradifurone, cloridrato de cartape, pimetrozina e acetamipride no controle das transmissões primária e secundária do ToCV em plantas de tomateiro. Nesses ensaios, nenhum dos inseticidas foi eficiente em controlar a transmissão do vírus em nenhum dos tratamentos (Silva, 2018). Gouvêa et al. (2017), ao avaliarem a eficiência do ciantraniliprole foliar, ciantraniliprole solo, espiromesifeno, tiamethoxam e cloridrato de cartape no controle das transmissões primária e secundária do ToSRV, também verificaram que nenhum dos inseticidas foi efetivo em controlar a transmissão primária do ToSRV por *B. tabaci* MEAM1.

Os resultados do presente trabalho indicam que o cloridrato de cartape, o ciantraniliprole foliar e o flupiradifurone também não foram eficientes em controlar as transmissões primária e secundária do ToSRV+ToCV por *B. tabaci* MEAM1, comparado ao controle. Em termos numéricos, o flupiradifurone foi o inseticida que proporcionou a maior redução da taxa de transmissão secundária dos vírus (Tabela 3).

O ingrediente ativo flupiradifurone pertence a uma nova classe química, butenolida, e atua interagindo com os receptores da acetilcolina como um agonista. A molécula atua nos receptores induzindo uma corrente iônica despolarizada que excita a célula nervosa. Ao contrário da acetilcolina, não pode ser inativado pela acetilcolinesterase e isso resulta em desordem do sistema nervoso e leva o inseto à morte (Nauen et al., 2015).

Ciantraniliprole é um ingrediente ativo que pertence ao grupo das diamidas antranílicas, atuando na ativação dos receptores da rianodina e provocando liberação descontrolada de cálcio. Isso altera e paralisa a musculatura dos insetos, resultando em um rápido bloqueio da alimentação (Hannig et al., 2009).

O ingrediente ativo cloridrato de cartape apresenta efeito de choque, agindo por contato. Atua bloqueando os canais iônicos do receptor nicotínico da acetilcolina, desorganizando o sistema nervoso central, paralisando o inseto e levando-o à morte em poucas horas (Lee et al., 2004).

Em estudo que avaliou o efeito do flupiradifurone na transmissão do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) por *B. tabaci* MED, demonstrou-se que esse inseticida reduziu a

transmissão do vírus por *B. tabaci* em 85%, quando comparado ao tiamethoxam, que apresentou redução de 25% na taxa de transmissão do vírus, e também ao controle, onde 100% das plantas foram infectadas pelo begomovírus (Roditakis et al., 2017). Os autores atribuem ao forte efeito de choque inicial e a inibição prolongada da alimentação do vetor como os fatores responsáveis pela capacidade de inibir a transmissão do vírus pelo vetor.

Castle et al. (2017) avaliaram o efeito de oito ingredientes ativos, foliar e solo, em casa de vegetação e campo, no controle da transmissão do *Cucumber yellow stunting disorder virus* (CYSDV) por *B. tabaci*. Os autores observaram que o flupiradifurone, o acetamiprido e o ciantraniliprole foliar reduziram significativamente a transmissão do vírus pelo vetor, sendo que a porcentagem de plantas infectadas foi menor que 10%, em casa de vegetação, mesmo sob alta pressão de inóculo (30 insetos por planta). Nos ensaios em campo, os mesmos ingredientes ativos foram eficientes no controle da transmissão do CYSDV por *B. tabaci*.

O efeito dos ingredientes ativos ciantraniliprole, flupiradifurone, pirifluquinazon, sulfoxaflor, pimetozina e zeta-cypermethrina+bifentrina foi avaliado no controle da transmissão do TYLCV por *B. tabaci* MEAM1 (três insetos virulíferos por planta) para plantas de tomate inoculadas aos 3, 7 e 14 dias após a pulverização (DAT) (Smith e Giurcanu, 2014). Os autores observaram os melhores resultados para o ingrediente ativo flupiradifurone, onde a porcentagem de infecção das plantas foi de no máximo 5% aos 14 DAT. O ciantraniliprole foi capaz de inibir a transmissão do vírus a taxas que variaram de 13% a 42% aos 3 e 14 DAT, respectivamente.

Smith e Nagle (2014) estudaram, em ensaios de campo, diferentes combinações dos ingredientes ativos flupiradifurone, ciantraniliprole e pirifluquinazon, durante as primeiras cinco semanas após o transplante dos tomateiros. Verificou-se que os produtos testados não foram significativamente eficientes em prevenir a transmissão do TYLCV por *B. tabaci* na Flórida.

Gouvêa et al (2017) relataram que os ingredientes ativos ciantraniliprole foliar ciantraniliprole solo e cloridrato de cartape foram eficientes em controlar a transmissão secundária do ToSRV por *B. tabaci* MEAM1 em tomateiro. Esses resultados não foram observados no presente trabalho, em que o ciantraniliprole foliar e o cloridrato de cartape não foram eficientes em controlar as transmissões primária e secundária do ToSRV+ToCV. Essa divergência poderia ser explicada pelo fato de que, quando o ToSRV e o ToCV co-infectam uma planta de tomate, a concentração do begomovirus é aumentada (Bampi et al., 2017). Assim, esse fator pode ter favorecido a aquisição e posterior transmissão do ToSRV, anulando a eficiência dos produtos em reduzir a transmissão secundária do ToSRV, como foi observado por Gouvêa et al. (2017).

Apesar da possibilidade de se controlar certos parâmetros em ensaios realizados em casa de vegetação, deve-se considerar que alguns deles são mais difíceis de serem controlados como, por exemplo, o gênero e a idade dos insetos usados na transmissão. Isto porque, caso um maior número de machos ou fêmeas mais velhas seja aleatoriamente coletado, poderá resultar em menores taxas de transmissão do vírus (Smith e Giurcanu, 2014). Esses autores também ressaltam que, embora um grande número de insetos vírúíferos seja usado nos ensaios, estes podem ficar agregados em somente algumas plantas. Deve-se considerar também o estresse causado durante a manipulação dos insetos para aquisição dos vírus em confinamentos, dentro de potes de vidro pequenos, que poderia interferir no comportamento e na mortalidade. Estes fatores poderiam em parte, explicar algumas diferenças encontradas entre os ensaios 1 e 2 realizados no presente trabalho.

Os resultados do presente trabalho vêm reforçar a impossibilidade em se adotar o controle químico como única alternativa no controle das transmissões do ToSRV e do ToCV por *B. tabaci* MEAM1. Além do controle do vetor, são medidas importantes a eliminação de fontes externas de inóculo, o transplante de mudas sabidamente sadias, vazio sanitário, evitar plantios escalonados e o uso de cultivares resistentes/tolerantes (no caso do ToSRV já disponíveis no mercado) (Inoue-Nagata et al., 2016; Tzanetakis et al., 2013). No entanto, essas medidas devem ser tomadas em nível regional, envolvendo um manejo integrado, onde diversas práticas são adotadas pelos vários produtores envolvidos (Bergamin Filho et al., 2016; Macedo et al., 2017b).

6. CONCLUSÕES

- A aquisição prévia do ToSRV não influenciou a taxa de transmissão do ToCV por *B. tabaci* MEAM1;
- A taxa de transmissão do ToCV por *B. tabaci* MEAM1 foi incrementada no 2° e 3° dias após o período de acesso à aquisição em tomateiro simultaneamente infectado com o ToSRV ;
- O ToSRV não interferiu no tempo de retenção do ToCV no vetor, que foi de três dias;
- Nenhum dos inseticidas avaliados foi eficiente em controlar as transmissões primária e secundária do ToSRV+ToCV por *B. tabaci* MEAM1 para tomateiros.

REFERÊNCIAS

- ABCSem, 2012. 2º LEVANTAMENTO DE DADOS SOCIOECONÔMICOS DA CADEIA PRODUTIVA DE HORTALIÇAS NO BRASIL [WWW Document]. Assoc. Bras. do Comércio Sementes e Mudas. URL [http://www.abcsem.com.br/imagens_noticias/Apresentação completa dos dados da cadeia produtiva de hortaliças - 29MAIO2014.pdf](http://www.abcsem.com.br/imagens_noticias/Apresentação%20completa%20dos%20dados%20da%20cadeia%20produtiva%20de%20hortaliças%20-%2029MAIO2014.pdf) (acesso em 6/02/2018).
- Alfaro-Fernández, A., Medina, V., Córdoba-Sellés, M., Font, M.I., Jornet, J., Cebrián, M., Jordá, C., 2010. Ultrastructural aspects of tomato leaves infected by *Tomato torrado virus* (ToTV) and co-infected by other viruses. *Plant Pathol.* 59, 231–239.
- Bampi, D., Favara, G., Rezende, J.A.M., 2017. Effect of single and mixed infections of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) and *Tomato chlorosis virus* (ToCV) on plant development and virus titer. *Phytopathology* 107, 138.
- Barbosa, J.C., Barreto, S. da S., Inoue-Nagata, A.K., Rezende, J.A.M., 2011. Characterization and Experimental Host Range of a Brazilian Tomato Isolate of *Tomato severe rugose virus*. *J. Phytopathol.* 159, 644–646. doi:10.1111/j.1439-0434.2011.01817.x.
- Barbosa, J.C., Barreto, S.S., Inoue-Nagata, A.K., Reis, M.S., Firmino, A.C., Bergamin Filho, A., Rezende, J.A.M., 2009. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. *J. Gen. Plant Pathol.* 75, 440.
- Barbosa, J.C., Costa, H., Gioria, R., Rezende, J.A.M., 2011. Occurrence of *Tomato chlorosis virus* in tomato crops in five Brazilian states. *Trop. Plant Pathol.* 36, 256–258.
- Barbosa, J.C., Rezende, J.A.M., Amorim, L., Filho, A.B., 2016. Temporal Dynamics of *Tomato severe rugose virus* and *Bemisia tabaci* in Tomato Fields in São Paulo, Brazil. *J. Phytopathol.* 164, 1–10. doi:10.1111/jph.12402.
- Barbosa, J.C., Teixeira, A.P.M., Moreira, A.G., Camargo, L.E.A., Filho, A.B., Kitajima, E.W., Rezende, J.A.M., 2008. First Report of *Tomato chlorosis virus* Infecting Tomato Crops in Brazil. *Plant Dis.* 92, 1709. doi:10.1094/PDIS-92-12-1709C.
- Barbosa, J.C., Teixeira, L.D.D., Rezende, J.A.M., 2010. First Report on the Susceptibility of Sweet Pepper Crops to *Tomato chlorosis virus* in Brazil. *Plant Dis.* 94, 374. doi:10.1094/PDIS-94-3-0374C.
- Barbosa, L. da F., 2014. Diversidade de *Bemisia tabaci* na América Latina e detecção de seus endossimbiontes. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, Botucatu.

- Barbosa, L. da F., Marubayashi, J.M., De Marchi, B.R., Yuki, V.A., Pavan, M.A., Moriones, E., Navas-Castillo, J., Krause-Sakate, R., 2014. Indigenous American species of the *Bemisia tabaci* complex are still widespread in the Americas. *Pest Manag. Sci.* 70, 1440–1445.
- Barbosa, L. da F., Yuki, V.A., Marubayashi, J.M., Marchi, B.R. de, Perini, F.L., Pavan, M.A., Barros, D.R. de, Ghanim, M., Moriones, E., Navas-Castillo, J., Krause-Sakate, R., 2015. First report of *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. *Pest Manag. Sci.* 71, 501–504. doi:10.1002/ps.3909.
- Barreto, S.S., Hallwass, M., Aquino, O.M., Inoue-Nagata, A.K., 2013. A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato-infecting begomovirus in central Brazil. *Phytopathology* 103, 436–444.
- Bello, V.H., 2017. Transmissão de vírus pelas espécies crípticas de *Bemisia tabaci* Mediterranean e Middle East-Asia Minor1. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu.
- Bergamin Filho, A., Inoue-Nagata, A.K., Bassanezi, R.B., Belasque Jr., J., Amorim, L., Macedo, M.A., Barbosa, J.C., Willocquet, L., Savary, S., 2016. The importance of primary inoculum and area-wide disease management to crop health and food security. *Food Secur.* 8, 221–238. doi:10.1007/s12571-015-0544-8.
- Bezerra-Agasie, I.C., Ferreira, G.B., de Avila, A.C., Inoue-Nagata, A.K., 2006. First report of *Tomato severe rugose virus* in chili pepper in Brazil. *Plant Dis.* 90, 114.
- Boiteux, L.S., Lima, M.F., Fonseca, M.E.N., Mendonça, J.L., Costa, A.F., Silva, J.G., Fontes, M.G., González-Arcos, M., 2018. Identification of Eight *Solanum* (subgenus *Leptostemonum*) Species as Novel Natural Hosts of *Tomato chlorosis virus* in Brazil. *Plant Dis.* doi:10.1094/PDIS-11-17-1718-PDN.
- Brown, J.K., Zerbini, F.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J.C.F., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R.W., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Malathi, V.G., Martin, D.P., Rivera-Bustamante, R., Ueda, S., Varsani, A., 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch. Virol.* 160, 1593–1619. doi:10.1007/s00705-015-2398-y.
- Calaça, H.A., 2011. Dinâmica temporal e espacial da virose causada por Tomato chlorosis em tomateiro. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Piracicaba.
- Castillo-Urquiza, G.P., Beserra, J.E.A., Bruckner, F.P., Lima, A.T.M., Varsani, A., Alfenas-Zerbini, P., Zerbini, F.M., 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Arch. Virol.* 153, 1985–1989.

- Castle, S., Palumbo, J., Merten, P., Cowden, C., Prabhaker, N., 2017. Effects of foliar and systemic insecticides on whitefly transmission and incidence of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. *Pest Manag. Sci.* 73, 1462–1472. doi:10.1002/ps.4478.
- Chávez-Calvillo, G., Contreras-Paredes, C.A., Mora-Macias, J., Noa-Carrazana, J.C., Serrano-Rubio, A.A., Dinkova, T.D., Carrillo-Tripp, M., Silva-Rosales, L., 2016. Antagonism or synergism between *papaya ringspot virus* and *papaya mosaic virus* in *Carica papaya* is determined by their order of infection. *Virology* 489, 179–191.
- Cotrim, M.A. de A., Krause-Sakate, R., Narita, N., Zerbini, F.M., Pavan, M.A., 2007. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathol.* 300–303.
- De Barro, P.J., Liu, S.-S., Boykin, L.M., Dinsdale, A.B., 2011. *Bemisia tabaci*: A Statement of Species Status. *Annu. Rev. Entomol.* 56, 1–19. doi:10.1146/annurev-ento-112408-085504.
- De Barro, P.J., Scott, K.D., Graham, G.C., Lange, C.L., Schutze, M.K., 2003. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bemisia tabaci*. *Mol. Ecol. Resour.* 3, 40–43.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Report.* 1, 19–21. doi:10.1007/BF02712670.
- Dovas, C. I., Katis, N. I., & Avgelis, A., 2002 Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. *Plant Disease.* 86, 1345-1349.
- Elfekih, S., Etter, P., Tay, W.T., Fumagalli, M., Gordon, K., Johnson, E., De Barro, P., 2018. Genome-wide analyses of the *Bemisia tabaci* species complex reveal contrasting patterns of admixture and complex demographic histories. *PLoS One* 13, e0190555.
- EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2013. PM 7/118 (1). *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus*. Bulletin OEPP/EPPO (3). doi:10.1111/epp.12062.
- EPPO, 2018 European and Mediterranean Plant Protection Organization. URL <https://gd.eppo.int/search?k=ToCV> (acesso em 30/01/2018).
- Esquivel, A.F., 2016. Identificação dos hospedeiros alternativos do *Tomato chlorosis virus*. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.
- FAOSTAT, 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualise> (acesso em 29/01/2018).

- Favara, G.M., 2017. Cinética da invasão sistêmica e períodos de latência e de incubação do *Tomato severe rugose virus* e do *Tomato chlorosis virus*, em infecções simples e mista em tomateiro. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.
- Fernandes, F.R., Albuquerque, L.C. de, Inoue-Nagata, A.K., 2010. Development of a species-specific detection method for three Brazilian tomato begomoviruses. *Trop. Plant Pathol.* 35, 43–47.
- Fernandes, F.R., de Albuquerque, L.C., de Britto Giordano, L., Boiteux, L.S., de Ávila, A.C., Inoue-Nagata, A.K., 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36, 251–258.
- Ferreira, D.F., 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência & Tecnologia* 35, 1039–1042.
- Fonseca, M.E.N., Boiteux, L.S., Abreu, H., Nogueira, I., Pereira-Carvalho, R.C., 2013. *Physalis angulata*: A New Natural Host of *Tomato chlorosis virus* in Brazil. *Plant Dis.* 97, 692. doi:10.1094/PDIS-06-12-0593-PDN.
- Fonseca, M.E.N., Boiteux, L.S., Lima, M.F., Mendonca, J.L., Costa, A.F., Fontes, M.G., Costa, H., Gonzalez-Arcos, M., 2016. First Report of *Tomato chlorosis virus* Infecting Eggplant and Scarlet Eggplant in Brazil. *Plant Dis.* 100, 867–868. doi:10.1094/PDIS-09-15-1087-PDN.
- Fortes, I.M., Moriones, E., Navas-Castillo, J., 2012. *Tomato chlorosis virus* in pepper: prevalence in commercial crops in southeastern Spain and symptomatology under experimental conditions. *Plant Pathol.* 61, 994–1001. doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02584.x.
- Freitas, D.M.S., 2012. *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato chlorosis virus* (ToCV): relações com a *Bemisia tabaci* biótipo B e eficiência de um inseticida no controle da transmissão do ToSRV. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.
- Freitas, D.M.S., Nardin, I., Shimoyama, N., Souza-Dias, J.A.C., Rezende, J.A.M., 2012. First Report of *Tomato chlorosis virus* in Potato in Brazil. *Plant Dis.* 96, 593–594. doi:10.1094/PDIS-12-11-1068-PDN.
- Froissart, R., Doumayrou, J., Vuillaume, F., Alizon, S., Michalakakis, Y., 2010. The virulence–transmission trade-off in vector-borne plant viruses: a review of (non-) existing studies. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 1907–1918.
- Garcia-Cano, E., Resende, R.O., Fernandez-Munoz, R., Moriones, E., 2006. Synergistic interaction between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* results in breakdown of resistance in tomato. *Phytopathology* 96, 1263–1269. doi:10.1094/PHYTO-96-1263.

- Gilbertson, R.L., Batuman, O., Webster, C.G., Adkins, S., 2015. Role of the Insect Supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the Emergence and Global Spread of Plant Viruses. *Annu. Rev. Virol.* 2, 67–93. doi:10.1146/annurev-virology-031413-085410.
- Gouvêa, M.M., Freitas, D.M.S., Rezende, J.A.M., Watanabe, L.F.M., Lourencao, A.L., 2017. Bioassay of insecticides on mortality of *Bemisia tabaci* biotype B and transmission of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) on tomatoes. *Phytoparasitica* 45, 95–101. doi:10.1007/s12600-017-0562-5.
- Hannig, G.T., Ziegler, M., Marcon, P.G., 2009. Feeding cessation effects of chlorantraniliprole, a new anthranilic diamide insecticide, in comparison with several insecticides in distinct chemical classes and mode-of-action groups. *PEST Manag. Sci.* 65, 969–974. doi:10.1002/ps.1781.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2018. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. URL <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil> (acesso em 29/01/2018).
- ICTV on line, 2018. International Committee on Taxonomy of Viruses. URL <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (acesso em 29/01/2018).
- Inoue-Nagata, A.K., Lima, M.F., Gilbertson, R.L., 2016. A review of geminivirus (begomovirus) diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Hortic. Bras.* 34, 8–18. doi:10.1590/S0102-053620160000100002.
- Karyeija, R.F., Kreuze, J.F., Gibson, R.W., Valkonen, J.P.T., 2000. Synergistic Interactions of a Potyvirus and a Phloem-Limited Crinivirus in *Sweet Potato Plants*. *Virology* 269, 26–36. doi:<https://doi.org/10.1006/viro.1999.0169>.
- Lee, S.-J., Caboni, P., Tomizawa, M., Casida, J.E., 2004. Cartap hydrolysis relative to its action at the insect nicotinic channel. *J. Agric. Food Chem.* 52, 95–98.
- Li, R.-H., C. Wisler, G., Liu, H.Y., E. Duffus, J., 1998. Comparison of Diagnostic Techniques for Detecting *Tomato Infectious Chlorosis Virus*, *Plant Disease - PLANT DIS.* doi:10.1094/PDIS.1998.82.1.84.
- Lima, A.T.M., Pereira, C. de O., Alfenas, P.F., Paula, M.B., Mello, R.N., Zerbini, F.M., 2006. Primeiro relato de infecção pelo geminivírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em tomateiro no estado de Santa Catarina. *Fitopatol. Bras.* 31, S224.
- Liu, H.-Y., Wisler, G.C., Duffus, J.E., 2000. Particle Lengths of Whitefly-Transmitted Criniviruses. *Plant Dis.* 84, 803–805. doi:10.1094/PDIS.2000.84.7.803.
- Lourenção, A.L., Nagai, H., 1994. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. *Bragantia* 53, 53–59.

- Lourenção, A.L., Sakate, R.K., Valle, G.E., 2015. Mosca-branca, *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B. Pragas introduzidas no Brasil insetos e ácaros. FEALQ, Piracicaba 664–689.
- Macedo, M.A., 2016. Progresso temporal e espacial de begomovirose e crinivirose em tomateiro. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília.
- Macedo, M.A., Barreto, S.S., Costa, T.M., Maliano, M.R., Rojas, M.R., Gilbertson, R.L., Inoue-Nagata, A.K., 2017a. First report of common beans as a non-symptomatic host of *Tomato severe rugose virus* in Brazil. *Plant Dis.* 101, 261.
- Macedo, M.A., Barreto, S.S., Hallwass, M., Inoue-Nagata, A.K., 2014. High incidence of *Tomato chlorosis virus* alone and in mixed infection with begomoviruses in two tomato fields in the Federal District and Goiás state, Brazil. *Trop. Plant Pathol.* 39, 449–452. doi:10.1590/S1982-56762014000600005.
- Macedo, M.A., Costa, T.M., Barbosa, J.C., Pereira, J.L., Michereff-Filho, M., Gilbertson, R.L., Inoue-Nagata, A.K., Filho, A.B., 2017b. Temporal and spatial dynamics of begomovirus disease in tomatoes in central Brazil. *Plant Pathol.* 66, 529–538. doi:10.1111/ppa.12632.
- Macedo, M.A., Michereff Filho, M., Navas-Castillo, J., Inoue-Nagata, A.K., 2015. Host range and whitefly transmission efficiency of *Tomato severe rugose virus* and *Tomato golden vein virus* in tomato plants. *Trop. Plant Pathol.* 40, 405–409. doi:10.1007/s40858-015-0055-3.
- Mansilla-Córdova, P.J., Bampi, D., Rondinel-Mendoza, N. V, Melo, P.C.T., Lourenção, A.L., Rezende, J.A.M., 2018. Screening tomato genotypes for resistance and tolerance to *Tomato chlorosis virus*. *Plant Pathol.* doi:10.1111/ppa.12826.
- Marubayashi, J.M., 2009. Interação de *Tomato severe rugose virus* com *Bemisia tabaci* biótipo B, a acessos de *Capsicum* spp. e ocorrência de espécies de mosca-branca no Estado de São Paulo. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu.
- Marubayashi, J.M., Yuki, V.A., Rocha, K.C.G., Mituti, T., Pelegriotti, F.M., Ferreira, F.Z., Moura, M.F., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Pavan, M.A., 2013. At least two indigenous species of the *Bemisia tabaci* complex are present in Brazil. *J. Appl. Entomol.* 137, 113–121.
- Mascia, T., Cillo, F., Fanelli, V., Finetti-Sialer, M.M., De Stradis, A., Palukaitis, P., Gallitelli, D., 2010. Characterization of the interactions between *Cucumber mosaic virus* and *Potato virus Y* in mixed infections in tomato. *Mol. plant-microbe Interact.* 23, 1514–1524.
- Mascia, T., Gallitelli, D., 2016. Synergies and antagonisms in virus interactions. *Plant Sci.* 252, 176–192. doi:https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.07.015.

- Medina, V., RODRIGO, G., Tian, T., Juárez, M., V DOLJA, V., Achon, M.A., W FALK, B., 2006. Comparative cytopathology of Crinivirus infections in different plant hosts, *Annals of Applied Biology*. doi:10.1111/j.1744-7348.2003.tb00274.x.
- Moraes, L.A., Marubayashi, J.M., Yuki, V.A., Ghanim, M., Bello, V.H., De Marchi, B.R., da Fonseca Barbosa, L., Boykin, L.M., Krause-Sakate, R., Pavan, M.A., 2017. New invasion of *Bemisia tabaci* Mediterranean species in Brazil associated to ornamental plants. *Phytoparasitica* 45, 517–525. doi:10.1007/s12600-017-0607-9.
- Morris, J., Steel, E., Smith, P., Boonham, N., Spence, N., Barker, I., 2006. Host Range Studies for *Tomato chlorosis virus*, and *Cucumber vein yellowing virus* Transmitted by *Bemisia tabaci* (Gennadius), *European Journal of Plant Pathology*. doi:10.1007/s10658-005-5767-7.
- Naika, S., Jeude, J.L.J., Goffau, M., Hilmi, M., Dam, B., 2006. A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização. Agromisa, Wageningen.
- Nauen, R., Jeschke, P., Velten, R., Beck, M.E., Ebbinghaus-Kintscher, U., Thielert, W., Woelfel, K., Haas, M., Kunz, K., Raupach, G., 2015. Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. *PEST Manag. Sci.* 71, 850–862. doi:10.1002/ps.3932.
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., Sánchez-Campos, S., 2011. Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 219–248. doi:10.1146/annurev-phyto-072910-095235.
- Navas-Castillo, J., López-Moya, J.J., Aranda, M.A., 2014. Whitefly-transmitted RNA viruses that affect intensive vegetable production. *Ann. Appl. Biol.* 165, 155–171. doi:10.1111/aab.12147.
- Ng, J.C.K., Chen, A.Y.S., 2011. Acquisition of *Lettuce infectious yellows virus* by *Bemisia tabaci* perturbs the transmission of *Lettuce chlorosis virus*. *Virus Res.* 156, 64–71. doi:http://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.12.019.
- Nozaki, D.N., 2007. Estudos biológicos e moleculares de begomovírus infectando pimentão (*Capsicum annuum*) no Estado de São Paulo. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu.
- Nozaki, D.N., Krause-Sakate, R., Hasegawa, J.M., Cezar, M.A., Dziuba, P.H., Pavan, M.A., 2006. First report of *Tomato severe rugose virus* infecting pepper plants in Brazil. *Fitopatol. Bras.* 31, 321.
- Oliveira, M.R. V, Henneberry, T.J., Anderson, P., 2001. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Prot.* 20, 709–723. doi:https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00108-9.

- Orfanidou, C.G., Pappi, P.G., Efthimiou, K.E., Katis, N.I., Maliogka, V.I., 2016. Transmission of *Tomato chlorosis virus* (ToCV) by *Bemisia tabaci* Biotype Q and Evaluation of Four Weed Species as Viral Sources. *Plant Dis.* 100, 2043–2049. doi:10.1094/PDIS-01-16-0054-RE.
- Perring, T.M., 2001. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Prot.* 20, 725–737. doi:https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00109-0.
- Roditakis, E., Stavrakaki, M., Grispou, M., Achimastou, A., Waetermeulen, X. Van, Nauen, R., Tsagkarakou, A., 2017. Flupyradifurone effectively manages whitefly *Bemisia tabaci* MED (Hemiptera: Aleyrodidae) and *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato. *Pest Manag. Sci.* 73, 1574–1584. doi:10.1002/ps.4577.
- Salvaudon, L., De Moraes, C.M., Mescher, M.C., 2013. Outcomes of co-infection by two potyviruses: implications for the evolution of manipulative strategies, in: *Proc. R. Soc. B. The Royal Society*, p. 20122959.
- Silva, T.N.Z., 2018. Efeito de inseticidas no controle das transmissões primária e secundária do *Tomato chlorosis virus* (ToCV) para tomateiro por *Bemisia tabaci* MEAM1. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651–701.
- Smith, H.A., Giurcanu, M.C., 2014. New Insecticides for Management of *Tomato Yellow Leaf Curl*, a Virus Vectored by the Silverleaf Whitefly, *Bemisia tabaci*. *J. Insect Sci.* 14, 183. doi:10.1093/jisesa/ieu045.
- Smith, H.A., Nagle, C.A., 2014. Combining Novel Modes of Action for Early-Season Management of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* in Tomato. *Florida Entomol.* 97, 1750–1765. doi:10.1653/024.097.0451.
- Socoloski, A., Grzebieluckas, C., dos Santos, J.S.C., Stieler, M.C., de Lima, A. de F.A., 2017. Economic analysis of vegetable crop production: a study with family farmers. *CUSTOS E AGRONEGOCIO LINE* 13, 389–407.
- Souza-Dias, J.A.C., Sawazaki, H.E., Pernambuco-Fo, P.C.A., Elias, L.M., Maluf, H., 2008. *Tomato severe rugose virus*: another begomovirus causing leaf deformation and mosaic symptoms on potato in Brazil. *Plant Dis.* 92, 487.
- Syller, J., 2012. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Mol. Plant Pathol.* 13, 204–216. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00734.x.

- Tay, W.T., Elfekih, S., Polaszek, A., Court, L.N., Evans, G.A., Gordon, K.H.J., De Barro, P.J., 2017. Novel molecular approach to define pest species status and tritrophic interactions from historical *Bemisia* specimens. *Sci. Rep.* 7, 429. doi:10.1038/s41598-017-00528-7.
- Tollenaere, C., Susi, H., Laine, A.-L., 2016. Evolutionary and Epidemiological Implications of Multiple Infection in Plants. *Trends Plant Sci.* 21, 80–90. doi:10.1016/j.tplants.2015.10.014.
- Toloy, R.S., Mituti, T., Freitas, D.M.S., Maluta, N.K.P., Silva, T.N.Z., Lopes, J.R.S., Fereres, A., Rezende, J.A.M., 2017. Features of the relationship between *Tomato severe rugose begomovirus* and *Bemisia tabaci* MEAM1 reveal that the virus is acquired during a probe lasting only one minute. *Eur. J. Plant Pathol.* doi:10.1007/s10658-017-1388-1.
- Tzanetakis, I.E., Martin, R.R., Wintermantel, W.M., 2013. Epidemiology of criniviruses: an emerging problem in world agriculture. *Front. Microbiol.* 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00119.
- Untiveros, M., Fuentes, S., Salazar, L.F., 2007. Synergistic interaction of *Sweet potato chlorotic stunt virus* (Crinivirus) with carla-, cucumo-, ipomo-, and potyviruses infecting sweet potato. *Plant Dis.* 91, 669–676. doi:10.1094/PDIS-91-6-0669.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R., 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10, 506–513.
- Wege, C., Siegmund, D., 2007. Synergism of a DNA and an RNA virus: enhanced tissue infiltration of the begomovirus *Abutilon mosaic virus* (AbMV) mediated by *Cucumber mosaic virus* (CMV). *Virology* 357, 10–28.
- Wintermantel, W.M., Cortez, A.A., Anchietta, A.G., Gulati-Sakhuja, A., Hladky, L.L., 2008. Co-Infection by Two Criniviruses Alters Accumulation of Each Virus in a Host-Specific Manner and Influences Efficiency of Virus Transmission. *Phytopathology* 98, 1340–1345. doi:10.1094/PHYTO-98-12-1340.
- Wintermantel, W.M., Wisler, G.C., 2006. Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Dis.* 90, 814–819. doi:10.1094/PD-90-0814.
- Wisler, G.C., Li, R.H., Liu, H.-Y., Lowry, D.S., Duffus, J.E., 1998. *Tomato Chlorosis Virus*: A New Whitefly-Transmitted, Phloem-Limited, Bipartite Closterovirus of Tomato. *Phytopathology* 88, 402–409. doi:10.1094/PHYTO.1998.88.5.402.
- Zeng, R., Liao, Q., Feng, J., Li, D., Chen, J., 2007. Synergy between *Cucumber Mosaic Virus* and *Zucchini Yellow Mosaic Virus* on Cucurbitaceae Hosts Tested by Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 39, 431–437.

Zinga, I., Chiroleu, F., Legg, J., Lefeuvre, P., Komba, E.K., Semballa, S., Yandia, S.P., Mandakombo, N.B., Reynaud, B., Lett, J.-M., 2013. Epidemiological assessment of cassava mosaic disease in Central African Republic reveals the importance of mixed viral infection and poor health of plant cuttings. *Crop Prot.* 44, 6–12.