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

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

Débora Maria Sansini Freitas

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

**Piracicaba
2012**

Débora Maria Sansini Freitas
Engenheira Agrônoma

***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***

Orientador:
Prof. Dr. **JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE**

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

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Freitas, Débora Maria Sansini

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 / Débora Maria Sansini Freitas. - Piracicaba, 2012.
74 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Clorose 2. Epidemiologia 3. Inseticidas 4. Insetos vetores 5. Mosca-branca
6. Tomate 7. Víruses 8. Vírus de plantas I. Título

CDD 635.642
F86t

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Aos meus pais, Ana e Adilson,
Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo;

Ao Prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende, pela ótima orientação, pelo exemplo profissional e pela confiança e paciência em todos os trabalhos desta Tese;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, por me fornecer sólidas bases desde o Bacharelado em Agronomia, durante o Mestrado com área de concentração em Fitopatologia e recentemente durante o Doutorado nesta mesma área do conhecimento;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento de minha bolsa de estudos durante o curso de Doutorado;

Ao Dr. André L. Lourenção, pesquisador do IAC, pela identificação de *Trialeurodes vaporariorum* e outras colaborações para o presente trabalho;

Aos professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia Agrícola e do Departamento de Entomologia e Acarologia Agrícola, pelos ensinamentos transmitidos durante as aulas;

Aos funcionários: José Edivaldo Buriolla, pela assistência laboratorial, Pedro Arthuso, pela assistência no campo experimental, Fabiana Wolak pela assistência acadêmica e Jeferson Brajão, pela assistência computacional;

Aos colegas do Laboratório de Biologia de Insetos, que auxiliaram na continuação da colônia de aleirodídeos;

Às bibliotecárias Eliana e Sílvia, pelos esclarecimentos prestados e pela correção desta Tese;

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Virologia Vegetal, pela ótima convivência profissional e amizade: Ana C. de Negreiros Alves, Pedro J. M. Córdoba, David Spadotti, Carla Pelizari, Viviana Camelo, Ana Mello, Júlio C. Barbosa, Adriana Jadão, Adriana Moreira, Ana Firmino, Rogério Pazin, Vanessa Cícera;

A todos os colegas e amigos do programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, especialmente os do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos e de Micologia: Bárbara, Thaís, Daniela, Pedro, Ticiane, Eliseu, Juliana, Paulo César, Hugo, Ananias, Wagner, Carlos, pela boa convivência durante estes últimos anos;

A todos os meus outros amigos, que me apoiaram inúmeras vezes durante o curso de doutorado, em especial Katherine, Solange, Armando, Everton, Ana Lúcia, Acácio, Maria Rosa e Danilo;

Por fim, agradeço à minha família, que sempre me apoiou, em especial à meus pais que me concederam as bases para buscar o conhecimento e às minhas irmãs Luciana e Adriana e meu irmão Flávio, por todo amor e carinho.

*'Foi pela sabedoria que o Senhor criou a terra, foi com inteligência que ele formou os céus.
Foi pela ciência que se fenderam os abismos, por ela as nuvens destilam o orvalho'.*

Provérbios 3:19-20

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Revisão Bibliográfica	17
2.1.1 O tomateiro no Brasil e no mundo.....	17
2.1.2 <i>Tomato severe rugose virus</i>	19
2.1.3 <i>Tomato chlorosis virus</i>	20
2.1.4 <i>Bemisia tabaci</i>	23
2.1.5 Manejo de begomoviroses e criniviroses com ênfase no controle químico do vetor	25
2.2 Material e Métodos	27
2.2.1 Condução dos experimentos.....	27
2.2.2 Isolados virais.....	28
2.2.3 Colônia de <i>B. tabaci</i> biótipo B	28
2.2.4 Transmissão dos vírus	28
2.2.5 Determinação das relações da <i>B. tabaci</i> biótipo B com o ToSRV e o ToCV	30
2.2.5.1 Período de Acesso à Aquisição (PAA) dos vírus.....	30
2.2.5.2 Período de Acesso à Inoculação (PAI) dos vírus	30
2.2.5.3 Período de retenção do ToSRV no inseto	31
2.2.5.4 Detecção do ToSRV no inseto	31
2.2.6 Interação do ToSRV e do ToCV na transmissão por <i>B. tabaci</i> biótipo B.....	32
2.2.7 Eficiência de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> na transmissão do ToCV.....	32
2.2.8 Avaliação do inseticida cloridrato de cartape para o controle da transmissão do ToSRV por <i>B. tabaci</i> biótipo B	33
2.2.9 Detecção dos vírus.....	34
2.2.9.1 Extração do DNA total para a detecção do ToSRV em aleirodódeos	34
2.2.9.2 RCA.....	34
2.2.9.3 Extração do DNA total para detecção do ToSRV em plantas	34
2.2.9.4 PCR.....	35
2.2.9.5 Extração de RNA total para a detecção do ToCV	35
2.2.9.6 Nested RT-PCR	36
2.2.9.7 Sequenciamento de nucleotídeos	37

2.3 Resultados.....	38
2.3.1 Relações de transmissão do ToSRV e do ToCV com <i>B. tabaci</i> biótipo B.....	38
2.3.1.1 Períodos de Acesso à Aquisição e à Inoculação do ToSRV.....	38
2.3.1.2 Períodos de Acesso à Aquisição e à Inoculação do ToCV.....	39
2.3.1.3 Detecção do ToSRV no inseto.....	41
2.3.1.4 Retenção do ToSRV em <i>B. tabaci</i>	42
2.3.2 Interação do ToSRV e ToCV na transmissão por <i>B. tabaci</i> biótipo B	43
2.3.3 Transmissão do ToCV por <i>T. vaporariorum</i>	45
2.3.4 Efeito do inseticida cloridrato de cartape no controle da transmissão do ToSRV	47
2.4 Discussão	48
2.4.1 Relação do ToSRV e <i>B. tabaci</i> biótipo B	48
2.4.2 Relação ToCV e <i>B. tabaci</i> biótipo B.....	52
2.4.3 Interação ToSRV e ToCV na transmissão por um adulto de <i>B. tabaci</i>	53
2.4.4 Transmissão do ToCV por <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	55
2.4.5 Controle químico da <i>B. tabaci</i> e o controle da begomovirose.....	55
3 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	61

RESUMO

***Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato chlorosis virus* (ToCV): relações com *Bemisia tabaci* biótipo B e eficiência de um inseticida no controle da transmissão do ToSRV**

A cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é importante mundialmente devido ao alto consumo de seus frutos. Nos últimos anos surgiram nesta cultura no Brasil alguns vírus emergentes com altas taxas de disseminação, como begomovírus e crinivírus, transmitidos pela *Bemisia tabaci* biótipo B, que podem causar danos à produção do tomateiro. A espécie de begomovírus atualmente mais encontrada no Brasil, em plantios de tomateiro, é o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). De 2002 a 2004, pesquisadores relataram incidências desse vírus em mais da metade das amostras com sintomas de geminivirose coletadas em vários estados brasileiros e sua presença continua sendo verificada frequentemente. No ano de 2006, um crinivírus, o *Tomato chlorosis virus* (ToCV), foi relatado no Brasil, infectando plantas de tomate no Estado de São Paulo e atualmente encontra-se presente em diversos estados brasileiros. Os objetivos desse trabalho foram: determinar os períodos mínimos de acesso à aquisição e à inoculação do ToSRV e do ToCV pela *B. tabaci* biótipo B; identificar o período de retenção do ToSRV no inseto e a interação do ToSRV e do ToCV na aquisição e na transmissão por esse aleirodídeo. Também foi avaliada a eficiência do inseticida cloridrato de cartape no controle da disseminação primária e secundária do ToSRV pela *B. tabaci* biótipo B em tomateiros em gaiolas em casa de vegetação. Finalmente avaliou-se a eficiência do aleirodídeo *Trialeurodes vaporariorum* na transmissão de um isolado brasileiro do ToCV. Os períodos mínimos de acesso à aquisição e à inoculação de ambos os vírus pela *B. tabaci* biótipo B foram de cinco minutos. O tempo de retenção do ToSRV em *B. tabaci* biótipo B foi de 25 dias. A eficiência de um único adulto de *B. tabaci* na transmissão simultânea do ToSRV e do ToCV para tomateiros foi de 44,7%, similar àquela da transmissão isolada do ToSRV (47,4%) e do ToCV (44,7%). A eficiência de *T. vaporariorum* na transmissão do ToCV foi inferior à da *B. tabaci* biótipo B. Usando 40 insetos por vaso com duas plantas as eficiências de transmissão foram 57,7% e 100%, respectivamente. O inseticida cloridrato de cartape reduziu a infecção secundária do ToSRV pela *B. tabaci* biótipo B, mas não foi eficiente para reduzir a infecção primária em tomateiros.

Palavras-chave: Crinivírus; Begomovírus; *Aleyrodidae*; Relações vírus-vetor; Transmissão; Controle de fitovírus

ABSTRACT

***Tomato severe rugose virus (ToSRV) and Tomato chlorosis virus (ToCV):
relationship with *Bemisia tabaci* biotype B and efficiency of an insecticide to
control the transmission of ToSRV***

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the leading vegetables grown and consumed in Brazil and in the world, after potato. The importance of tomato is related to its high consumption worldwide and also its nutritive value. Presently the most important virus diseases responsible for yield losses on tomato crops in Brazil are those caused by begomovirus and crinivirus, both transmitted by *Bemisia tabaci* biotype B. At the moment the prevalent species of begomovirus is *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). From 2002 to 2004, researchers reported incidence of this virus in more than half of the symptomatic tomato samples collected in several Brazilian states. In 2006, a crinivirus, *Tomato chlorosis virus* (ToCV), was reported for the first time in Brazil, infecting tomato plants in the State of São Paulo and at present the virus occurs in several Brazilian states. The objectives of this study were to determine the minimum acquisition and inoculation access periods of ToSRV and ToCV by *B. tabaci* biotype B; identify the retention period of ToSRV in the insect; and the interaction of ToSRV and ToCV on the transmission by this aleyrodidae. It was also evaluated the effectiveness of the insecticide cartap hydrochloride in controlling the primary and secondary spread of ToSRV by *B. tabaci* biotype B on tomato plants in a greenhouse. Finally, it was evaluated the efficiency of *Trialeurodes vaporariorum* in the transmission of a Brazilian isolate of ToCV. The minimum acquisition and inoculation access periods for both viruses by *B. tabaci* biotype B were five minutes. The maximum retention time of ToSRV in *B. tabaci* biotype B was 25 days. The efficiency of a single adult of *B. tabaci* to simultaneously transmit ToSRV and ToCV to tomato plants was 44.7%, similar to the transmission of ToRSV (47.4%), and ToCV (44.7%) separately. *T. vaporariorum* was less efficient than *B. tabaci* on the transmission of ToCV. Using 40 insects per pot with two plants, transmission efficiencies were 57.7% and 100%, respectively. The insecticide cartap hydrochloride reduced secondary infection of ToSRV transmitted by *B. tabaci* biotype B, but was not effective in reducing the primary infection in tomato.

Keywords: *Crinivirus*; *Begomovirus*; *Aleyrodidae*; Virus-vector relationships; Transmission; Control of viruses

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se encontra atualmente entre os dez maiores produtores de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) do mundo. Em 2011, a área total plantada com essa solanácea foi de 60.092 ha, o que rendeu uma produção de 3.753.961 toneladas, com um rendimento de 62.470 kg/ha (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2011). O tomateiro está sujeito a diversas doenças que causam danos à sua produção, como as causadas por fungos, bactérias e vírus. Dentre as doenças viróticas, as que mais têm sido relatadas causando problemas nos últimos anos no Brasil são as tospoviroses, as begomoviroses e uma crinivirose (BARBOSA et al., 2011a; KUROSAWA; PAVAN, 2005). As begomoviroses podem ser causadas por diversas espécies de begomovírus, mas a que tem sido relatada com maior frequência é a espécie *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (FERNANDES et al., 2008). A crinivirose que afeta o tomateiro no Brasil, conhecida como 'amarelão', é causada pelo *Tomato chlorosis virus* (ToCV), encontrado pela primeira vez no país em 2006 (BARBOSA et al., 2008). Tanto o ToSRV como o ToCV são transmitidos com eficiência por *B. tabaci* biótipo B, com relações vírus-vetor dos tipos persistente circulativa e semi-persistente, respectivamente. Apesar de ambos os vírus serem eficientemente transmitidos por esse aleirodídeo, os dados sobre as relações vírus-vetor ainda são fragmentados (WINTERMANTEL; WISLER, 2006; MARUBAYASHI, 2009). Também não há relato sobre a eficiência da *B. tabaci* na aquisição e na transmissão simultânea desses vírus.

O manejo das doenças causadas por begomovírus e crinivírus em tomateiros tem sido muito difícil. No caso de begomoviroses, de maneira geral, recomenda-se o uso de híbridos resistentes/tolerantes, quando disponíveis. Em adição, recomenda-se a adoção das seguintes práticas: (i) utilizar somente mudas sadias de alta qualidade produzidas em viveiros à prova de insetos; (ii) não realizar plantios escalonados; (iii) destruir os restos culturais imediatamente após o término da colheita; (iv) manter as imediações das plantações no limpo; (v) não efetuar plantios novos próximos a culturas como soja, feijoeiro e algodoeiro, por estas serem hospedeiras do aleirodídeo; (vi) efetuar o controle químico racional da *B. tabaci* biótipo B e (vii) adubar as plantas adequadamente (INOUE-NAGATA et al., 2009). Para o ToCV tem sido recomendado o controle químico do inseto vetor e a erradicação de plantas infectadas que podem servir como fonte de inóculo do vírus

(EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION – EPPO, 2005; WINTERMANTEL; WISLER, 2006). O controle químico do vetor, amplamente empregado pelos produtores, muitas vezes como única alternativa de controle da doença, muitas vezes não é eficaz provavelmente pelos seguintes motivos: (i) a gama de hospedeiros do aleirodídeo envolve mais de 500 espécies vegetais; (ii) a presença frequente de ninfas do inseto na face inferior das folhas das plantas; (iii) a extrema mobilidade dos insetos adultos e (iv) a rapidez com que o inseto desenvolve resistência à maioria das classes de inseticidas disponíveis no mercado (NAKHLA; MAXWELL, 1998). Acrescente-se a esses motivos o fato de os inseticidas geralmente não serem eficientemente rápidos para matar o inseto antes que ele efetue a inoculação do vírus na planta, durante os primeiros minutos de alimentação para reconhecimento do hospedeiro, conforme apontado há anos por Broadbent (1957) e posteriormente por Perring, Gruenhagen e Farrar (1999).

Diante desses fatos, os objetivos desse trabalho foram: determinar os períodos mínimos de acesso à aquisição e à inoculação do ToSRV e do ToCV pela *B. tabaci* biótipo B; identificar o período de retenção do ToSRV no inseto e a interação do ToSRV e do ToCV na aquisição e na transmissão por esse aleirodídeo. Também foi avaliada a eficiência do inseticida cloridrato de cartape no controle da disseminação primária e secundária do ToSRV pela *B. tabaci* biótipo B em tomateiros em gaiolas em casa de vegetação. Finalmente avaliou-se a eficiência do aleirodídeo *Trialeurodes vaporariorum* na transmissão de um isolado brasileiro do ToCV.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 O tomateiro no Brasil e no mundo

O tomateiro é uma das hortaliças mais plantadas e consumidas no Brasil e no mundo, depois da batata. No mundo foram produzidas em 2010 cerca de 145,75 milhões de toneladas segundo a FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Os principais países produtores de tomate são China (29% da produção mundial), Estados Unidos (9%), Índia (8%) e Turquia (7%). A Ásia produz mais da metade (56%) do total mundial, as Américas 17% e a Europa 12%. O Brasil é o nono maior produtor, produzindo em 2010 quase 3% da produção mundial de tomates (FAO, 2012). Segundo o IBGE, em 2011 o Brasil produziu cerca de 3.753.961 t e os estados brasileiros que mais produzem tomate são Goiás, maior produtor desde 1999, São Paulo e Minas Gerais. Esses três estados representam quase 60% da produção brasileira de tomate, sendo que Goiás colheu 1.112.309 t ou 29,5% da produção nacional, seguido de São Paulo, com 17,3% ou 651.256 t e Minas Gerais com 12,9% ou 486.569 t (IBGE, 2011).

A importância do tomate está relacionada com seu alto consumo no mundo inteiro (FAO, 2012) e também ao seu valor nutritivo (MARANCA, 1981). Alimento pouco calórico, o tomate possui apenas 6,5% de matéria seca, ou seja, 93,5% de água. É rico em vitaminas A, C e K (MARANCA, 1981). Possui em sua composição um pigmento, o licopeno, que é um carotenóide vermelho encontrado predominantemente em tomates e em alguns frutos (melancia e mamão) e vegetais (cenoura). Esse pigmento, apesar de não ser considerado um nutriente essencial, é o principal carotenóide transportado no sangue humano com propriedades antioxidantes, o que traz benefícios à saúde humana. Seus efeitos benéficos na prevenção de doenças, principalmente o câncer e patologias cardíacas são muito estudados (LEVI; SHARONI, 2004).

O tomateiro foi classificado por Miller em 1754 como *Lycopersicon esculentum* Mill e renomeado por Child em 1990 e por Peralta e Spooner em 2006, como *Solanum lycopersicum* L., nome científico utilizado atualmente (DIEZ; NUEZ, 2007). É uma planta dicotiledônea da família das solanáceas. Suas flores são radiais

com cinco estames. O ovário é súpero, normalmente bicarpelar, mas com a domesticação dessa planta foram surgindo ovários multiloculares, bem como um maior número de pétalas e sépalas. O tomateiro é uma planta perene de porte arbustivo que se cultiva como anual. Pode se desenvolver de forma rasteira, semi-ereta ou ereta e seu crescimento é limitado nas variedades determinadas e ilimitado nas indeterminadas (NUEZ, 2001).

O centro de origem do gênero *Solanum* está localizado na região andina que hoje é compartilhada pela Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Chile. A distribuição natural desse gênero se estende desde o norte do Chile ao sul da Colômbia e na costa do Pacífico. Há controvérsias sobre a domesticação do tomateiro. Alguns acreditam que foi feita no Peru, mas há fortes indícios de que foi realizada do México (NUEZ, 2001). A palavra tomate vem de '*tomatl*' língua nahuac do México (RODRÍGUEZ; RODRÍGUEZ; SAN JUAN, 1997).

A primeira descrição botânica do tomateiro foi feita em 1554 por Andrea Mattioli, no jardim botânico de Pádua (Itália). Nos séculos XVI a XIX o tomateiro foi introduzido na Europa, onde passou a ser utilizado principalmente na Espanha e na Itália para a alimentação humana. Nos outros países europeus era utilizado somente como ornamental, pois havia a crença de que a planta do tomateiro era venenosa como outras plantas solanáceas européias, como a beladona, entre outras. Os espanhóis e os portugueses foram os primeiros a difundirem o tomate por todo o mundo através das suas expedições marítimas (NUEZ, 2001; RODRÍGUEZ; RODRÍGUEZ; SAN JUAN, 1997). Atualmente, com o melhoramento das espécies, existem cultivares adaptadas ao processamento e a exploração da variabilidade tem aumentado ainda mais o número de variedades (DIEZ; NUEZ, 2007). No mercado brasileiro há variedades de tomate para mesa, que se distribuem em quatro tipos diferentes: Santa Cruz, caqui, caqui longa vida e cereja, que pode ser vermelho ou amarelo. Há também o tomateiro rasteiro que produz frutos para indústria. A época de plantio do tomateiro no Brasil varia de uma região para outra, mas geralmente se situa entre fevereiro e maio, período em que atinge maior produção, o que torna o preço nesta época muito baixo, considerando seu alto custo de produção. Fora de época, o tomate se torna um negócio compensador pelo seu maior preço de mercado (FAHL et al., 1998), portanto, o tomate é produzido o ano inteiro, o que favorece a manutenção dos insetos vetores e das doenças como um todo, incluindo as de origem viral.

2.1.2 *Tomato severe rugose virus*

O *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) pertence à família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*. Os begomovírus tem partículas geminadas, com simetria icosaédrica e diâmetro de 15 a 20 nm. São constituídos de um ou dois DNAs circulares de fita simples que produzem pseudorecombinantes viáveis (KING et al., 2011). O ToSRV possui dois DNAs circulares de fita simples: o DNA-A com 2592 nucleotídeos e cinco ORFs, denominadas AV1, AC1, AC2, AC3, AC4 e o DNA-B com 2568 nucleotídeos e duas ORFs, BV1 and BC1 (BARBOSA et al., 2011b). Este vírus, na atualidade, é um dos responsáveis pelos maiores danos na cultura do tomateiro no Brasil.

O primeiro relato da presença de geminivírus no Brasil foi feito por Costa (1965), que descreveu o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), causador do mosaico dourado em feijoeiro, mas essa virose parece estar presente desde 1950 (COSTA; BENNETT, 1950). Flores, Silberschmidt e Kramer (1960) relataram a presença de uma clorose infecciosa das malváceas em tomateiro, que depois foi caracterizada por Matys et al. (1975) como sendo causada pelo *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), aparentemente o primeiro geminivírus relatado em tomateiro no Brasil. Como descrito adiante, o aumento de surtos com begomovirose em tomateiro foi consequência do surgimento e da grande infestação por *B. tabaci* biótipo B. No Brasil, o ToSRV já foi encontrado nos estados de SP, MG, GO, DF, RJ e PE (CASTILLO-URQUIZA et al., 2007; CONTRIM et al., 2007; FERNANDES et al., 2008; LIMA et al., 2006; REZENDE et al., 1997). Além do tomateiro e do pimentão (*Capsicum annum* L.) (BEZERRA-AGASIE et al., 2006; NOZAKI et al., 2006), o ToSRV foi encontrado no início de 2008 infectando batateira (*Solanum tuberosum* L.), em Sumaré-SP (SOUZA-DIAS et al., 2008).

De 2003 a 2004, Contrim et al. (2007) realizaram um levantamento de begomovirose em tomateiros em municípios do centro-oeste paulista e encontraram begomovírus em 60% das 166 amostras infectadas/analizadas, dentre os quais o ToSRV e o ToYVSV. Entre 2002 e 2004, Fernandes et al. (2008) realizaram um levantamento na região Centro-oeste do Brasil onde o ToSRV foi a espécie prevalente em plantas infectadas com begomovírus. De 2.295 amostras de plantas suspeitas coletadas, 717 amostras (31%) continham alguma espécie de begomovírus. Dentro das amostras infectadas com begomovírus, 61% estavam

infectadas com o ToSRV, 29% com o *Tomato golden vein virus*, 7,1% com o *Tomato mottle leaf curl virus*, 0,7% com o *Tomato yellow vein streak virus* e 1,4% com duas novas espécies putativas de begomovírus. Essas amostras eram constituídas de plantas de tomate para processamento e para mesa. O ToSRV estava presente em 94% das amostras de tomateiro para processamento, coletadas em GO e MG e em 23% das amostras de tomateiro para mesa coletadas nos estados do DF, GO, PE, BA, SP e MG.

Barbosa et al. (2011b) caracterizaram molecularmente o genoma completo do ToSRV e identificaram as seguintes espécies como hospedeiras experimentais desse vírus: *Amaranthus spinosus* L., *Emilia sonchifolia* (L.) DC., *Chenopodium album* L., *C. ambrosioides* L., *Euphorbia heterophylla* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Capsicum annuum* L., *Datura stramonium* L., *Nicandra physaloides* L., *Nicandra clevelandii* Gray, *N. tabacum* L. cv. TNN e *Solanum americanum* Mill.

Ainda não existe, na literatura brasileira, dados completos sobre a relação ToSRV e *B. tabaci* (MARUBAYASHI, 2009) mas sabe-se que essa espécie é capaz de transmitir 115 diferentes espécies de begomovírus de maneira persistente circulativa (HOGENHOUT et al., 2008). Existem raros relatos de begomovírus com propagação dentro do vetor ou transmissão sexual do vírus entre indivíduos de *B. tabaci*, como foi observado com o *Tomato yellow leaf curl virus* (GHANIM; CZOSNEK, 2000; METHA et al., 1994). A transmissão transovariana foi relatada somente para TYLCV e *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* em *B. tabaci* (BOSCO et al., 2004).

2.1.3 *Tomato chlorosis virus*

O *Tomato chlorosis virus* (ToCV) pertence à família *Closteroviridae* e ao gênero *Crinivirus*. O ToCV possui um genoma bipartido, com duas moléculas de RNA, de fita simples positiva, encapsidadas em capsídeos alongados flexuosos, com comprimentos de 650-800 e 700-900 nm. O RNA1 traduz duas proteínas responsáveis por diversas funções na replicação viral, incluindo domínios de uma protease tipo papaína, uma metiltransferase e uma helicase presentes na primeira ORF e uma proteína do tipo RdRp que é expressa por um *frameshift* ribossomal ao final da primeira ORF. O RNA 2 possui sete ORFs, traduzidas em proteínas das quais algumas devem atuar no movimento célula a célula, na transmissão através do

vetor ou que possuem um domínio transmembrana (FAUQUET, 2005; WINTERMANTEL et al., 2005; WINTERMANTEL; WISLER, 2006).

Esse vírus emergente foi primeiramente identificado em 1996 em plantas de tomate na Flórida (USA) (WISLER et al., 1998b), sendo posteriormente constatada a sua presença nas Ilhas Canárias (EWSN, 1999), na Espanha, em Málaga e Almeria (NAVAS-CASTILLO et al., 2000), em Algarve (Portugal) (LOURO et al., 2000), Marrocos (HANAFI, 2002), Porto Rico (WINTERMANTEL et al., 2001), Itália (Puglia, Sardenha e Sicília) (ACOTTO et al., 2001), Grécia (Poros, Rhodos e Kriti) (DOVAS; KATIS; AVGELIS, 2002), França (DECOIN, 2003 apud EPPO, 2005), Israel (SEGEV et al., 2004), Taiwan (TSAI et al., 2004), Líbano (ABOU-JAWDAH et al., 2006), Turquia (CEVIK; ERKIS, et al., 2008), Ilhas Mayotte (MASSÉ et al., 2008), Cuba (MARTÍNEZ-ZUBIAUR, 2008), Ilhas Maurício (LETT, 2009), Hungria (BESE et al., 2011), Geórgia (SUNDARAJ et al., 2011), Costa Rica (VARGAS et al., 2011) e Sudão (FIALLO-OLIVE et al., 2011). Esse vírus se tornou importante especialmente nos Estados Unidos, na Europa e sudeste da Ásia (WINTERMANTEL, 2005; WINTERMANTEL; WISLER, 2006). Entre 2006 e 2007 foi constatada a presença do ToCV infectando plantas de tomate pela primeira vez na América do Sul, no Brasil, no município de Sumaré-SP (BARBOSA et al., 2008). De 2007 a 2010, o ToCV foi detectado em amostras de mais cinco estados brasileiros: Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Provavelmente este vírus já deve estar disseminado e amplamente distribuído em todo o país (BARBOSA et al., 2011a).

O ToCV pode induzir no tomateiro sintomas de mosaico clorótico irregular que se desenvolve primeiramente nas folhas de baixo até chegar às folhas do ponteiro. Ocorre um enrolamento de folhas baixas, que podem exibir bronzeamento, manchas necróticas, além de ficarem quebradiças. Tudo isso afeta significativamente a produtividade, devido à diminuição da área fotossintética e declínio no desenvolvimento da planta (OEPP/EPPO, 2005; NAVAS-CASTILLO; MORIONES, 2000; WINTERMANTEL; WISLER, 2006). Os sintomas foliares podem ser confundidos com a deficiência de magnésio, o que dificulta a diagnose e o espalhamento do vírus. Além disso, não aparecem antes de 3 a 4 semanas após a inoculação em tomateiro (WINTERMANTEL; WISLER, 2006). Não há informações disponíveis sobre o impacto econômico do vírus, mas em 1998 e especialmente em 1999 foram relatadas epidemias em Málaga, na Espanha com incidências frequentes de mais de 30% de plantas sintomáticas. Isso foi relacionado à elevada

população do vetor *B. tabaci* naquela região. Não houve diferença na incidência do vírus entre as plantas de diferentes variedades de tomateiro (NAVAS-CASTILHO et al., 2000).

Além do tomateiro (WISLER et al., 1996) o ToCV também infecta naturalmente *Capsicum annuum* L. (BARBOSA; TEIXEIRA; REZENDE, 2010; LOZANO; MORIONES; NAVAS-CASTILLO, 2004:), *Zinnia* sp. (TSAI et al., 2004). e *Solanum tuberosum* L. (FREITAS et al., 2012). Wintermantel e Wisler (2006) transmitiram experimentalmente o ToCV para as seguintes espécies: *Tetragonia expansa* Murr., *Gomphrena globosa* L., *Vinca rosea* L., *Beta macrocarpa* Guss., *Chenopodium capitatum* (L.) Asch., *C. murale* L., *Spinacia oleracea* L., *Callistephus chinensis* (L.) Nees, *Calendula officinalis* L., *Limonium latifolium* (J. E. Sm.) Kuntze, *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt., *Nicotiana benthamiana* Domin., *N. clevelandii* Gray, *N. edwardsonii* Christie & D.W. Hall, *N. glutinosa* L., *N. megalosiphon* Huerch & Muell., *N. tabacum* L., *Petunia hybrida* Vilm., *Physalis alkekengi* L., *P. ixocarpa* Brot., *P. wrightii* Gray e *Solanum acaule* Bitter.

A transmissão do ToCV é feita eficientemente de maneira semi-persistente pelos aleirodídeos das espécies *B. tabaci* biótipo B e *Trialeurodes abutilonea* e menos eficiente por *T. vaporariorum* e *B. tabaci* biótipo A (WINTERMANTEL; WISLER, 2006). *Trialeurodes vaporariorum* é praga cosmopolita de hortaliças e ornamentais em cultivo protegido. No Brasil, em 2003, na região de Itatiba, SP, observaram-se infestações sob condições de campo em hortaliças e ornamentais, com maiores populações em tomateiro e feijão-vagem (LOURENÇÃO et al., 2008). Não há relatos da presença de *T. abutilonea* no Brasil.

Os períodos de acesso a aquisição (PAA) e inoculação (PAI) do ToCV ainda não foram exatamente determinados, mas utilizam-se para ambos 24 h para uma transmissão eficiente (WINTERMANTEL; WISLER, 2006; WISLER et al., 1998a). A transmissão desse vírus por sementes é improvável (EPPO, 2005). Wintermantel e Wisler (2006) testaram a eficiência de transmissão de ToCV por *B. tabaci* biótipo B e verificaram a persistência do vírus no vetor por até 3 dias. Para isso, observaram que um mesmo indivíduo de *B. tabaci* biótipo B possui uma eficiência de transmissão de 70% após 24 h de aquisição do vírus; 36% de transmissão no segundo dia após a aquisição e 5% de transmissão três dias após adquirir o vírus. Os mesmos autores verificaram que *B. tabaci* biótipo B e *T. abutilonea* foram responsáveis por 100% de sucesso na transmissão do vírus em plantas inoculadas

com 40 aleirodídeos. Quando 20 insetos foram utilizados obtiveram 85% de transmissão nas plantas-teste. *B. tabaci* biótipo A obteve 74% de sucesso na transmissão do ToCV e *T. vaporariorum* apenas 34%, quando confinaram-se 40 aleirodídeos infectivos por planta.

O controle do ToCV é feito através do controle do inseto vetor e *roguing* de plantas infectadas que podem servir como fonte de inóculo (EPPO, 2005; WINTERMANTEL; WISLER, 2006).

2.1.4 *Bemisia tabaci*

Bemisia tabaci pertence à família *Aleyrodidae*, subordem *Sternorrhyncha* e é conhecida vulgarmente por 'mosca-branca'. São insetos pequenos de 1 mm de comprimento com quatro asas membranosas recobertas por uma pulverulência branca. Os ovos são colocados na face inferior das folhas, ficando presos por um pedúnculo curto. Eclodindo, as ninfas passam a sugar a folha geralmente também na face inferior. Elas se locomovem apenas inicialmente, fixando-se posteriormente de forma semelhante às cochonilhas. O ciclo completo dos aleirodídeos é de cerca de 15 dias. As fêmeas possuem longevidade de 18 dias. Ninfas e adultos se alimentam penetrando seu aparelho sugador labial nas folhas, até atingir o floema, de onde extraem a seiva (JONES, 2003). Esses aleirodídeos provocam uma ação toxicogênica na planta, mas os maiores prejuízos são devidos à transmissão de vírus (GALLO et al., 2002). Aleirodídeos são insetos polípagos que infestam plantas de diversas espécies da vegetação espontânea e cultivadas, tais como mandioca, algodoeiro, caupi, crucíferas, tabaco, batateira, batata doce, ervilha, quiabo, pimenta, pimentão, poinsétia e crisântemo (DE BARRO, 1995).

B. tabaci tem sido considerada um complexo de indivíduos ou até mesmo um grupo de espécies, por ter diversos biótipos incompatíveis sexualmente (BROWN; FROLICH; ROSELL, 1995; MARTIN; MIFSUD; RAPISARDA, 2000; PERRING, 2001).

Apesar do conceito de biótipo de *B. tabaci* ser muito utilizado atualmente, recentemente De Barro et al. (2011), concluíram que há no momento evidências suficientes para afirmar que *B. tabaci* não é constituída por biótipos. *B. tabaci* é um complexo de pelo menos 24 espécies que não se distinguem morfológicamente. Essas espécies podem ser distinguidas molecularmente, através de comparações

de nucleotídeos do gene da citocromo oxidase I (mtCO1) usando 3,5% como limite de divergência.

B. tabaci foi primeiramente descrita em 1889 na Grécia (GENNADIUS, 1889 apud OLIVEIRA; HENNEBERRY; ANDERSON, 2001). Em 1897 apareceu nos Estados Unidos e em 1928 ocorreu o primeiro relato de *B. tabaci* (Gennadius) no Brasil (BONDAR, 1929). A partir de 1970, *B. tabaci* causava danos por ser vetora de alguns geminivírus, mesmo em baixa incidência (COSTA, 1974). Nos anos 80, a população desse aleirodídeo parece ter entrado em equilíbrio, ocorrendo poucos surtos em alguns estados (YUKI, 2001). Até a década de 90 era ocasional, sendo vetor de vírus de plantas e infestando tomate, feijão e soja (LOURENÇÃO; NAGAI, 1994). Posteriormente, na região de Campinas foi observada a incidência de 70% de infestação em tomateiros rasteiros e estaqueados (YUKI; KUNYUKI; BETTI, 1998). Entre 1997 e 1998 surgiram grandes surtos de *B. tabaci* na região norte do estado de São Paulo, nas culturas da soja e do algodoeiro (LOURENÇÃO et al., 1999). A partir de 1991, foi relatado no estado de São Paulo o aparecimento de um novo biótipo de *B. tabaci*, denominado biótipo B, enquanto que o biótipo anterior foi denominado biótipo A. O biótipo B também tinha sido anteriormente classificado por alguns pesquisadores como outra espécie, *B. argentifolii*. A razão pela qual esse biótipo foi enquadrado como espécie é sua incompatibilidade sexual com o biótipo A. *B. tabaci* biótipo B foi primeiramente encontrada na Flórida, USA, em 1986, infestando severamente plantas de poinsetia (*Euphorbia pulcherrima* Willd), em casa-de-vegetação. Acredita-se que esse biótipo foi trazido para o Brasil nos anos 90 através de plantas ornamentais de outros países onde ela já ocorria. Em 2003, amostras de aleirodídeos coletadas em algodoeiro (*Gossipium* sp.), couve (*Brassica oleracea*) e soja (*Glycine max*) foram analisadas por Truol et al. (2003) e confirmaram a presença e a predominância de *B. tabaci* biótipo B no Brasil. Isso pode ser explicado pelo fato de que *B. tabaci* biótipo B é muito fértil, pois coloca em média cerca de 300 ovos por fêmea, enquanto que *B. tabaci* biótipo A coloca apenas 110 ovos por fêmea (GALLO et al., 2002). *B. tabaci* biótipo B, além de ser vetora de vírus, também induz o amadurecimento irregular dos frutos de tomateiro, prateamento em folhas de aboboreira, talo branco em brócolis e contribui para a formação de fumagina nas plantas atacadas (BROWN; FROLICH; ROSELL, 1995; GALLO et al., 2002; LOURENÇÃO; NAGAI, 1994). Em 1995, as perdas brasileiras causadas por *B. tabaci* em tomateiro, algodoeiro, feijoeiro, quiabeiro, meloeiro,

repolho, melancia, entre outras culturas superaram 5 bilhões de dólares (LIMA; MORETZOHN; OLIVEIRA, 2000).

Estudos de *Electrical Penetration Graphs* têm sido feitos com adultos e ninfas de *B. tabaci* biótipo B e descrevem com detalhes a penetração estiletar entre as células da planta, dentro das células e dentro do tecido vascular, através de ondas eletromagnéticas (JIANG, WALKER, 2003; JIANG et al., 1999). Esses últimos autores, por exemplo, mostraram que *B. tabaci* biótipo B realizou em média 79 provas em 6 h de alimentação em folhas de tomate. Essa tecnologia tem permitido melhor compreensão dos processos de transmissão de vírus de relações semi-persistente e persistente circulativa com esse inseto.

O grande aumento das viroses associadas com *B. tabaci* biótipo B tem sido atribuído à grande dispersão desse inseto por todo o mundo. Além disso, o plantio intensivo de monoculturas e a consequente resistência de *B. tabaci* biótipo B a inseticidas têm dificultado ainda mais o controle de vírus transmitidos por esse inseto (DE BARRO, 1995).

B. tabaci biótipo B transmite vírus de plantas classificados em diferentes famílias, tais como: *Geminiviridae* (gênero Begomovírus), *Closteroviridae* (gênero Crinivírus), *Betaflexiviridae* (gênero Carlavírus) e *Potyviridae* (gênero Ipomovírus) (KING et al., 2011).

2.1.5 Manejo de begomoviroses e criniviroses com ênfase no controle químico do vetor

O manejo de begomoviroses em tomateiros tem sido muito difícil. O uso de híbridos resistentes/tolerantes tem sido recomendado quando disponíveis. Para tomateiros estaqueados há híbridos comerciais com o gene *Ty-1* que confere boa tolerância aos begomovírus que ocorrem no Brasil, porém a resistência/tolerância não é total. Na verdade esse gene foi caracterizado originalmente por conferir resistência ao begomovírus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), que ocorre na Europa e Ásia e não relatado no Brasil até o momento. Além disso, outras medidas são preconizadas para adoção simultânea: (i) utilizar somente mudas sadias de alta qualidade produzidas em viveiros à prova de insetos; (ii) não realizar plantios escalonados; (iii) destruir os restos culturais imediatamente após o término da colheita; (iv) manter as imediações das plantações no limpo; (v) não efetuar plantios

novos próximos a culturas como soja, feijoeiro e algodoeiro, por estas serem hospedeiras do aleirodídeo; (vi) efetuar o controle químico racional da *B. tabaci* biótipo B e (vii) adubar as plantas adequadamente (INOUE-NAGATA et al., 2009). O controle químico do vetor, amplamente empregado pelos produtores, muitas vezes de maneira isolada, não tem sido eficaz provavelmente pelos seguintes motivos: (i) a gama de hospedeiros do aleirodídeo envolve mais de 500 espécies vegetais; (ii) a presença frequente de ninfas do inseto na face inferior das folhas das plantas; (iii) a extrema mobilidade dos insetos adultos e (iv) a rapidez com que o inseto desenvolve resistência à maioria das classes de inseticidas disponíveis no mercado (NAKHALA; MAXWELL, 1998). Estudos feitos para o desenvolvimento de estratégias de controle da begomovirose denominada “tomato yellow leaf curl”, causada pelo TYLCV, predominante e destrutiva em diversos países do hemisfério Norte, mas que até o momento não foi constatada no Brasil, apontam que somente o manejo integrado pode ser capaz de minimizar os danos causados por essa fitovirose. Tal prática inclui o uso integrado das medidas acima apontadas mais a alteração nas datas de transplante para evitar que as plantas jovens sejam expostas à altas populações de *B. tabaci*. Isso exige um conhecimento da flutuação populacional do inseto na região de plantio (NAKHALA; MAXWELL, 1998).

Com base nesta dificuldade de controlar as viroses transmitidas por vetores, novos inseticidas mais seguros e efetivos tem surgido (CASIDA; QUISTAD, 1998). Constantemente são desenvolvidos e descobertos inseticidas com diferentes modos de ação e seletividade para o uso no manejo integrado de pragas.

O controle químico do vetor costuma ser muito utilizado por ser de efeito imediato. Existem inúmeros grupos químicos de inseticidas para mosca branca com diferentes princípios ativos. A maioria deles, principalmente os mais utilizados, tem apresentado relatos em todo o mundo de resistência a inseticidas, como os dos grupos dos neonicotinóides, organofosforados, piretróides, carbamatos e reguladores de crescimento. Para evitar a resistência dos insetos a inseticidas deve-se alternar inseticidas com diferentes modos de ação. (CAHILL et al., 1994; ELBERT; NAUEN, 2000; FERREIRA; AVIDOS, 1998, MESQUITA et al., 2001; OMER et al., 1993).

Os inseticidas químicos e naturais podem afetar o comportamento dos insetos. Podem aumentar o tempo da primeira prova do homóptero, aumentar ou diminuir o tempo de prova, alterar a duração da salivação ou da ingestão, tempo de

prova em tecidos específicos e número de provas. Pode aumentar voo, movimentação e atividades em geral do inseto e reduzir a colonização. Além disso, no caso de viroses não persistentes, se o inseticida reduz a colonização do vetor, que pode espalhar ainda mais os vírus. Para um inseticida ser eficiente para viroses não persistentes, o mesmo deve matar o vetor rapidamente, repelir o vetor ou modificar o comportamento do vetor para prevenir a picada de prova. Inseticidas sistêmicos se espalham no floema das plantas, por isso eles tem tido sucesso no controle de viroses persistentes. De outro lado, não é tão eficiente para as viroses não persistentes são adquiridas e inoculadas em células da epiderme, pois o inseto não entra em contato com o sistêmico (PERRING; GRUENHAGEN; FARRAR, 1999). Reguladores de crescimento atingem as ninfas, mas não adultos. Inseticidas de contato atingem adultos e poucas vezes ovos e ninfas (FERREIRA; AVIDOS, 1998). Alguns compostos de inseticidas dificultam a alimentação em doses subletais, enquanto outros parecem paralisar o aparelho bucal de insetos sugadores (CASTLE et al., 2009 b).

Não há relatos sobre alternativas de controle para doenças causadas por crinivírus no Brasil. Em outros países tem sido recomendado o controle do inseto vetor e o *roguing* de plantas infectadas que podem servir como fonte de inóculo (OEPP, 2005; WINTERMANTEL; WISLER, 2006).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Condução dos experimentos

Foram utilizadas plantas de tomate do Grupo Santa Cruz, variedade Kadá. As sementeiras foram feitas em bandejas de isopor contendo substrato (Plantmax®). As plântulas foram transplantadas no estádio 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 foi feita uma vez por semana com uma fórmula 10-10-10 de NPK diluída na água de irrigação. Pulverizações com inseticidas foram feitas a cada duas semanas.

2.2.2 Isolados virais

Foram utilizados um isolado do ToSRV, obtido de uma planta de tomateiro cereja, coletado em Piracicaba-SP, e um isolado do ToCV, obtido de um tomateiro do grupo Santa Cruz, oriundo de Sumaré-SP. Ambos os isolados tiveram sua identidade confirmada pelo sequenciamento parcial de seus genomas. Eles foram mantidos separadamente e em mistura em tomateiro (figura 1). O ToCV foi mantido também em *Gomphrena globosa* e o ToSRV em *Emilia sonchifolia* em casa-de-vegetação, hospedeiros diferenciais desses vírus.

2.2.3 Colônia de *B. tabaci* biótipo B

Colônias do aleirodídeo *B. tabaci* biótipo B livres de vírus, iniciadas com adultos coletados em São Paulo, foram mantidas em plantas de couve (*Brassica oleraceae* L.), soja [(*Glycine max* L.) Merrill], abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* L.) e abóbora moranga (*Cucurbita maxima* L.), em telado à prova de insetos, no Departamento de Fitopatologia e Nematologia Agrícola da ESALQ/USP (figura 1).

2.2.4 Transmissão dos vírus

A transmissão dos dois vírus foi feita mediante manipulação dos adultos de *B. tabaci* biótipo B através do uso de um aspirador composto de um tubo de plástico ligado a outro de vidro, onde os insetos aspirados ficaram retidos. Entre os dois tubos foi colocado um filtro de voil. A aspiração e a expiração dos insetos foi feita com a boca através do tubo plástico.

Os insetos livres de vírus foram inicialmente colocados sobre folhas destacadas comprovadamente infectadas com o vírus a ser transmitido, acondicionadas em tubos de polipropileno de 50 mL (do tipo Falcon). Para manter a aeração no ambiente de aquisição do vírus os tubos foram recobertos por tecido voil (figura 1). Os aleirodídeos foram mantidos nas folhas durante 24 h para a aquisição do vírus (PAA). Depois desse tempo foram transferidos para as folhas das plantas teste sadias presas em sacos de tecido voil de 10 x 10 cm com um orifício para a introdução dos insetos. Para garantir uma transmissão eficiente o período de acesso

à inoculação (PAI) foi de 24 h. Após esse período os insetos foram eliminados manualmente e pela pulverização das plantas com inseticida sistêmico.

Figura 1 – Sintoma de ToCV (a e b); sintoma de ToSRV em folhas de tomateiro; (c) e de ambos em folhas de tomateiro (d); *Bemisia tabaci* em folha de couve (e); tubo de polipropileno de 50 mL utilizado para o confinamento de alelodídeos para a alimentação em folhas infectadas com vírus (f)

2.2.5 Determinação das relações da *B. tabaci* biótipo B com o ToSRV e o ToCV

2.2.5.1 Período de Acesso à Aquisição (PAA) dos vírus

Para o ToCV e o ToSRV separadamente, foram testados cinco períodos de acesso à aquisição (PAA), de 5, 10, 20 e 30 minutos e 1 h. Os insetos foram primeiramente colocados para se alimentar em plantas infectadas com os vírus (ToSRV ou ToCV) pelos períodos mencionados. Após cada PAA os insetos foram transferidos para plantas saudáveis de tomateiro e deixados para se alimentarem por um período mínimo de 24 h para a transmissão do vírus. Após esse período os insetos foram eliminados. A inoculação foi realizada utilizando-se dez insetos por planta, em um vaso com duas plantas. Foram usadas no mínimo de dez plantas por tratamento. Como controles foram mantidas duas plantas saudáveis e duas inoculadas com cada um dos vírus com insetos que tiveram os PAA e PAI de 24 h. As plantas foram mantidas em casa de vegetação para avaliação dos sintomas. Foram feitos 40 dias após a inoculação dos vírus os testes de PCR e RT-PCR para confirmação da infecção pelo begomovírus e crinivírus, respectivamente. O experimento foi repetido uma vez.

2.2.5.2 Período de Acesso à Inoculação (PAI) dos vírus

Foram testados cinco períodos de acesso à inoculação (PAI) para ambos os vírus separadamente, de 5, 10, 20 e 30 minutos, 1 h. Os insetos foram colocados para se alimentar em plantas infectadas com os vírus (ToSRV ou ToCV) durante 24 h para a aquisição. Depois foram transferidos para plantas saudáveis de tomateiro e deixados para se alimentarem pelos períodos de inoculação a serem testados. Após cada período os aleirodídeos foram eliminados manualmente e logo em seguida com inseticidas. Foram usadas um mínimo de dez plantas por tratamento. A inoculação foi realizada utilizando-se dez insetos por planta, em um vaso com duas plantas. As avaliações foram feitas como descritas anteriormente. O experimento foi repetido uma vez.

2.2.5.3 Período de retenção do ToSRV no inseto

Adultos de *B. tabaci* biótipo B foram colocados em tubos de polipropileno contendo folha de tomateiro infectado com o vírus, durante um período de aquisição de 24 h. Em seguida esses insetos foram transferidos para plantas de couve não hospedeiras do vírus. A diferentes intervalos de tempo alguns insetos foram transferidos para plantas de tomateiro sadio para transmissão do vírus, em gaiolas de 1,5 cm de diâmetro por 1 cm de altura instaladas sob as folhas. Os períodos testados foram de 0, 5, 15, 25 e 27 dias. Foram mantidas plantas sadias como controle negativo. As plantas não hospedeiras do vírus com aleirodídeos foram trocadas aos quinze dias para evitar que as ninfas passassem à fase adulta e se misturassem aos demais adultos. Foram feitas dez repetições para cada tratamento e duas para cada tratamento controle. As avaliações foram feitas como descritas anteriormente e as análises de PCR realizadas após 25 dias da inoculação do ToSRV. O experimento foi repetido uma vez.

2.2.5.4 Detecção do ToSRV no inseto

Após a determinação do PAA e do PAI mínimos do ToSRV por *B. tabaci* biótipo B, analisou-se a presença do vírus no inseto por períodos ainda mais curtos, nos tempos de 1, 3 e 5 minutos após a alimentação em plantas infectadas.

Adultos de *B. tabaci* biótipo B foram mantidos em tubos de vidro vazios, cobertos com tecido voil. Em seguida, uma folha de tomateiro infectada com o ToSRV foi colocada dentro do tubo. O recipiente foi sacudido por alguns segundos para que algumas moscas pousassem na folha e assim o tempo foi cronometrado. Após os tempos indicados acima para a aquisição do vírus, a folha foi rapidamente transferida para um segundo tubo e sacudida, para que os aleirodídeos saíssem da folha. Parte desses insetos foi logo em seguida submetida à extração de DNA total para a posterior detecção do vírus. A outra parte foi transferida para plantas de couve, não hospedeira do vírus, por um período de 24 h (a fim de limpar os estiletes e/ou passar o período de latência do vírus) para então ser submetida à análise para detecção do vírus. Para a detecção do vírus foram usados grupos de 10 insetos em cada uma das situações. O DNA viral presente nos aleirodídeos foi detectado por RCA seguido por PCR. Não foi realizado teste de transmissão.

2.2.6 Interação do ToSRV e do ToCV na transmissão por *B. tabaci* biótipo B

Adultos de *B. tabaci* livres de vírus foram succionados com aspirador bucal e colocados para se alimentar em folhas de tomateiro sistemicamente infectadas com: a) ToCV; b) ToSRV e c) a mistura de ambos. Após 24 h para a aquisição dos vírus nas folhas infectadas, os insetos foram confinados em gaiolas de 1,5 cm de diâmetro por 1 cm de altura, instaladas sob uma folha de tomateiro sadio. Foi confinado apenas um inseto por planta. O período de alimentação para a inoculação dos vírus foi de aproximadamente 24 h. Após a inoculação os alelodídeos foram retirados destas plantas e eliminados. Foram mantidas plantas de tomateiro sadias não inoculadas como controle. As plantas foram mantidas em casa de vegetação. Após aproximadamente 40 dias da inoculação foram coletadas amostras de cada planta para as análises de PCR ou RT-PCR para a detecção do ToSRV e ToCV, respectivamente. Após 60 dias da inoculação foi realizada a avaliação dos sintomas. Esse experimento foi repetido três vezes.

2.2.7 Eficiência de *Trialeurodes vaporariorum* na transmissão do ToCV

Adultos de *T. vaporariorum* foram coletados em plantas de abobrinha de moita 'Caserta' mantidas em casa de vegetação na Estação Experimental da Syngenta Seeds Ltda - Rogers, em Itatiba-SP. A identificação do inseto foi realizada pelo Dr. André Lourenção, IAC, Campinas, SP.

Os testes de transmissão foram realizados com 5, 10, 20, 30 e 40 insetos por vaso, com duas plantas de tomateiro sadio cada um. O PAA foi de 24 h e o PAI de 48 h. Como controle da transmissão do crinivírus foram usados adultos de *B. tabaci* biótipo B infectivos para ToCV. Foram testadas dez plantas de tomateiro para cada tratamento e duas para cada tratamento controle (positivo e negativo). A avaliação foi realizada por observação de sintomas e testes de RT-PCR cerca de 40 dias após a inoculação.

2.2.8 Avaliação do inseticida cloridrato de cartape para o controle da transmissão do ToSRV por *B. tabaci* biótipo B

Dois ensaios foram realizados para avaliar a eficiência do inseticida cloridrato de cartape, inseticida de contato e ingestão que possui ação de choque contra aleirodídeos, na transmissão do ToSRV por *B. tabaci* biótipo B. Vinte e cinco plantas de tomateiro Kadá sadias com cerca de vinte centímetros de altura foram acondicionadas separadamente em três gaiolas. Cada gaiola foi confeccionada em madeira nas dimensões de 0,6 x 1,5 x 1,0 m, revestida com *voil*. A cada ensaio foram feitos três tratamentos, um em cada gaiola.

O primeiro tratamento simulou a infecção primária (Gaiola P) que acontece em um campo de tomateiro pulverizado com o inseticida, adjacente a outras plantas infectadas com o vírus, não pulverizadas, nas quais os insetos adquiriram o vírus. Desta forma, adultos de *B. tabaci* biótipo B sadios foram inicialmente mantidos por 24 h em tomateiro Kadá infectado com o ToSRV para a aquisição do vírus. Em seguida foram liberados no interior de uma das gaiolas onde as plantas de tomate já haviam sido previamente pulverizadas com o inseticida na dose recomendada pelo fabricante para tomateiro de 1,25 g de ingrediente ativo/L de calda, aplicada até o ponto de escorrimento. Foram liberados 200 aleirodídeos. Da mesma forma, a pulverização e liberação foi repetida mais duas vezes nessa gaiola, com o intervalo de uma semana após à última liberação.

O segundo tratamento simulou a infecção secundária (Gaiola S) que acontece no interior de um campo de tomateiro pulverizado com o inseticida e que contém em seu interior plantas infectadas com o vírus. Dentro desta gaiola foram colocadas vinte e cinco plantas de tomate sadias e cinco plantas infectadas com o ToSRV distribuídas aleatoriamente. A mesma solução de cloridrato de cartape foi aplicada às plantas sadias e infectadas. No dia seguinte foram soltos cerca de 200 aleirodídeos livres de vírus nesta gaiola. Esse procedimento também foi repetido mais duas vezes, conjuntamente às repetições nos demais tratamentos.

O terceiro tratamento foi o controle (Gaiola C) onde as plantas não receberam inseticida. Dentro dessa gaiola foram colocadas vinte e cinco plantas de tomate sadias e cinco plantas infectadas com o ToSRV dispostas de maneira aleatória. Concomitante aos outros dois tratamentos, foram liberados nesta gaiola cerca de

200 adultos de *B. tabaci* biótipo B sadios. Essa liberação foi repetida mais duas vezes conjuntamente com a liberação de aleirodídeos dos demais tratamentos.

Após cerca de três semanas da última liberação de insetos nas gaiolas as plantas foram avaliadas por meio de PCR para a detecção do ToSRV.

2.2.9 Detecção dos vírus

2.2.9.1 Extração do DNA total para a detecção do ToSRV em aleirodídeos

A extração do DNA total dos aleirodídeos foi feita adaptando-se o protocolo de Idris, Smith e Brown (2001). Foram amostrados cerca de dez insetos por tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Os insetos foram macerados com o auxílio de pistilos plásticos. Acrescentaram-se 84 µL de tampão de lise (5 mM Tris-HCl e 0,05 mM EDTA), 2,4 µL de proteinase K (50 µg/mL) e 36 µL de Triton X-100 1,7%. A mistura foi incubada a 65°C por 20 minutos e centrifugada a 9000 g por 30 segundos. O sobrenadante foi recolhido e transferido para novo tubo. Como controles foram usados aleirodídeos que se alimentaram em plantas de tomateiro sadias. O DNA total extraído foi imediatamente submetido à reação de RCA.

2.2.9.2 RCA

O DNA total extraído de insetos foi inicialmente submetido à uma reação do tipo *Rolling Circle Amplification* (RCA) que amplifica DNA circular com o uso de DNA polimerase e primers randômicos resistentes a exonucleases. A RCA foi realizada segundo o protocolo do kit illustra TempliPhi® da GE Healthcare, utilizando-se 1 µL do DNA total.

2.2.9.3 Extração do DNA total para detecção do ToSRV em plantas

O DNA total das folhas coletadas das plantas-testes a serem analisadas foi extraído em tubos de microcentrífuga (do tipo *ependorf*) de 1,5 mL, protocolo adaptado de Dellaporta et al. (1983). Discos provenientes de folhas foram macerados com o auxílio de pistilos plásticos, na presença de 500 µL de tampão de extração de DNA (NaCl 0,5 M; EDTA 0,05 M; Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; β-mercaptoetanol 0,2%) e 33 µL de uma solução de SDS 20%. A mistura foi agitada

por 30 segundos e incubada a 65°C por 30 minutos. Posteriormente foram adicionados 160 µL de acetato de potássio 5 M e a mistura foi submetida a uma centrifugação a 13000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde 200 µL de isopropanol foram adicionados e a mistura foi agitada lentamente. Foi feita a centrifugação a 13000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70%. Foi feita a centrifugação a 13000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi removido. O precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 20 µL de água Milli-Q. Como controles positivos da reação foram utilizados extratos de folhas de tomateiro sabidamente infectadas com o ToSRV. Como controles negativos foram utilizadas folhas de tomateiro sadio.

2.2.9.4 PCR

A detecção do ToSRV foi feita por PCR a partir do DNA total das amostras. Foram utilizados 5 µL de DNA total extraído das amostras vegetais ou do produto da RCA do DNA total de *B. tabaci*, 7,8 µL de água Milli-Q, 2,5 µL do tampão 10X da enzima Taq DNA polimerase, 2,0 µL de MgCl₂ 50 mM, 2,0 µL de dNTP's 10 mM, 0,25 µL da enzima Taq DNA polimerase, 0,25 µL do oligonucleotídeo iniciador específico (senso) ToSRV1f (AAG GCG ACG TCT TTG GAA GG) 20 mM e 0,25 µL do oligonucleotídeo iniciador específico (anti-senso) ToSRV2r (CTC AGC GGC CTT GTT ATA TTT) (FERNANDES et al., 2010). O regime do termociclador para essa reação foi de 94°C por 3 minutos e 30 ciclos de amplificação de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C e 4 minutos a 72°C, com uma etapa final de 5 minutos a 72°C. O produto desta amplificação foi corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (1:10000, Invitrogen) e o tamanho dos fragmentos obtidos (820 pb), visualizados em um transiluminador de luz UV, foram comparados com marcador de 1Kb (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) em gel de agarose a 1%.

2.2.9.5 Extração de RNA total para a detecção do ToCV

A extração foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante do Trizol® LS (Invitrogen). Discos foliares amostrados foram acondicionados no interior de tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e macerados, com o auxílio de pistilos plásticos na presença de nitrogênio líquido. Foi adicionado 1 mL de Trizol® para 50 a 100 mg

de tecido macerado em cada tubo. Após a agitação vigorosa, incubou-se a mistura por 5 minutos a temperatura ambiente. Acrescentou-se 0,2 mL de clorofórmio em cada tubo. Após agitação manual por 15 segundos a mistura foi incubada sob temperatura ambiente por 5 minutos. A suspensão foi centrifugada a 12000 g por 15 minutos, a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para novo tubo, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol, que foi misturado agitando-se o tubo lentamente. Incubou-se essa solução à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugou-se a 12000 g por 10 minutos a 4 °C para a precipitação do RNA. Após o descarte do sobrenadante o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75%, centrifugando-se a 7500 g por 5 minutos a 4°C. O etanol foi descartado com cuidado para que o precipitado não fosse eliminado. O precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 30 µL de água livre de RNase ou água 'DEPC'. Amostras de tomates infectados com o ToCV foram utilizados como controles positivos e amostras de tomates sadios como controles negativos.

2.2.9.6 Nested RT-PCR

A detecção do ToCV foi feita por Nested RT-PCR através do RNA total extraído das amostras. Para realizar a síntese da primeira fita do cDNA (RT = *Reverse Transcription*), 3 µL de RNA total extraído das folhas de tomateiro foram misturados a 7 µL de água 'Milli-Q' tratada com DEPC, 1 µL de desoxinucleosídeos trifosfatados (dNTP's – 10 mM), 1 µL do oligonucleotídeo iniciador específico (anti-senso) HS-12 (5'-CC(G/T)CCACCAAA(A/G)TCGTA-3') a 20 mM (DOVAS; KATIS; AVGELIS, 2002) em tubos do tipo *ependorf* de 0,5 mL. A mistura foi levada para o termociclador, onde permaneceu incubada a 65°C por 5 minutos e 2°C por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 5 µL de Buffer First M-MLV, 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL da enzima transcriptase reversa M-MLV. A mistura foi incubada a 37°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos, sendo depois mantida a 4°C até a sua retirada.

Na primeira reação de PCR foram utilizados 15,3 µL de água Milli-Q, 2,5 µL de tampão 10X da enzima Taq DNA polimerase, 0,8 µL de MgCl₂ 50 mM, 1,5 µL de dNTP's 10 mM, 3,0 µL de cDNA extraído, 0,8 µL do oligonucleotídeo iniciador específico (senso) HS-11 (5'-GG(G/T)TT(A/G)GA(G/T)TT(C/T)GGTACTAC-3'), 0,8 µL do oligonucleotídeo iniciador específico (anti-senso) HS-12 (5'-

CC(G/T)CCACCAAA(A/G)TCGTA-3') ambos a 20 mM (DOVAS; KATIS; AVGELIS, 2002) e 0,3 µL de enzima Taq DNA polimerase. Essa solução foi aquecida a 94°C por 3 minutos e depois submetida a 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 49°C por 40 segundos, 72°C por 50 segundos e uma temperatura final de 72°C por 10 minutos. A segunda reação de PCR foi feita da mesma maneira, com a mesma quantidade de reagentes, mas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos ToC-5 (senso) (5'- GGT TTG GAT TTT GGT ACT ACAT TCAGT -3') a 20 mM e ToC-6 (anti-senso) (5'- AA ACT GCCT GCAT GAAA AGT CTC - 3') a 20 mM (DOVAS; KATIS; AVGELIS, 2002) na proporção de 0,8 µL e 3,0 µL do produto da primeira reação de PCR. O regime do termociclador foi de 95°C por 1 minuto, com 40 ciclos de 95°C por 20 segundos, 60°C por 15 segundos, 72°C por 10 segundos e uma temperatura final de 72°C por 2 minutos. O DNA foi corado com SYBR® Safe DNA gel Stain e separado por eletroforese em gel de agarose a 1% por cerca de 40 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados (463 pb) foram visualizados após a eletroforese em transiluminador de luz UV e as imagens foram arquivadas.

2.2.9.7 Sequenciamento de nucleotídeos

Para a confirmação da identidade dos vírus que foram detectados através de PCR e RT-PCR, fragmentos de DNA amplificados foram purificados através de kit de purificação Wizard® SV Gel e PCR Clean-up System (Promega) ou PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen), segundo o protocolo de cada fabricante. Em seguida foram quantificados com uma concentração mínima de 50 ng de DNA/µL e mantidos em freezer a -20°C. Estes produtos de PCR ou RT-PCR foram expedidos juntamente com os respectivos oligonucleotídeos iniciadores específicos para a MacroGen Korea, localizada em Seoul, Korea, onde foi feito o sequenciamento direto de nucleotídeos de cada uma das amostras. Os resultados dos sequenciamentos foram transmitidos de forma on-line através da home page da empresa, disponível em <http://dna.macrogen.com/eng/> e as qualidades das sequências foram analisadas pelo *Electropherogram Quality Analysis* da Embrapa disponível em <http://bioinformatica.cenargen.embrapa.br/phph/> e depois submetidas ao pacote de programas *Staden*. A sequência consenso obtida foi comparada com as demais sequências disponíveis no Genbank pelo programa *BLASTn* disponível em

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=WGS&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch.

2.3 Resultados

2.3.1 Relações de transmissão do ToSRV e do ToCV com *B. tabaci* biótipo B

2.3.1.1 Períodos de Acesso à Aquisição e à Inoculação do ToSRV

Os períodos mínimos de acesso à aquisição e à inoculação do ToSRV por *B. tabaci* biótipo B foram de 5 minutos (Tabela 1 e 2), com eficiência média de transmissão de 10%. Para os PAA de 10 minutos até 1 h a eficiência média de transmissão variou de 10% a 20%. Após 24h de PAA a eficiência média de transmissão foi de 75%. Valores semelhantes de eficiência média de transmissão foram obtidos para PAI variando de 10 minutos a 24h.

Tabela 1 - Transmissão do ToSRV pela *B. tabaci* biótipo B após diferentes períodos de acesso à aquisição (PAA) do vírus e 24 h de acesso à inoculação (PAI)

PAA	Experimento 1		Experimento 2		Média (%)
	PCR*	%	PCR*	%	
5 min	1/10	10	1/10	10	10
10 min	2/9	22	1/10	10	16
20 min	1/10	10	1/10	10	10
30 min	1/10	10	3/10	30	20
1 h	0/9	0	4/10	40	20
24 h	1/ 2	50	2/2	100	75
Sadio	0/2	0	0/2	0	0

*Número de plantas positivas no PCR/número de plantas inoculadas com 10 adultos de *B. tabaci* biótipo B

Tabela 2 - Transmissão do ToSRV pela *B. tabaci* biótipo B após 24 h de acesso à aquisição (PAA) e diferentes períodos de acesso à inoculação (PAI) do vírus

<i>PAI</i>	<i>Experimento 1</i>		<i>Experimento 2</i>		<i>Média (%)</i>
	<i>PCR*</i>	<i>%</i>	<i>PCR*</i>	<i>%</i>	
5 min	2/10	20	0/8	0	10
10 min	1/9	11,1	1/10	10	10,5
20 min	0/10	0	3/10	30	15
30 min	0/10	0	3/10	30	15
1 h	1/10	10	3/9	33,3	21,6
24 h	1/ 2	50	2/2	100	75
Sadio	0/2	0	0/2	0	0

*Número de plantas positivas no PCR/número de plantas inoculadas com 10 adultos de *B. tabaci* biótipo B

2.3.1.2 Períodos de Acesso à Aquisição e à Inoculação do ToCV

Os períodos mínimos de acesso à aquisição e à inoculação encontrados para o ToCV por *B. tabaci* biótipo B estão nas tabela 3 e 4, respectivamente. A eficiência de transmissão após 5 minutos de PAA foi em média 15%. Quando o PAA variou de 10 minutos a 1 h, a eficiência média de transmissão foi de aproximadamente 40%. Para um PAA de 24h a eficiência média de transmissão foi de 100%. A eficiência média de transmissão após 5 minutos de PAI foi de 25%. Para os demais PAI a eficiência média de transmissão variou de 25% a 50%.

Tabela 3 - Transmissão do ToCV pela *B. tabaci* biótipo B após diferentes períodos de acesso à aquisição (PAA) do vírus e 24h de acesso à inoculação

PAA	Experimento 1		Experimento 2		Média (%)
	PCR*	%	PCR*	%	
5 min	2/10	20	1/10	10	15
10 min	4/10	40	4/10	40	40
20 min	3/10	30	5/10	50	40
30 min	4/9	44,4	3/9	33,3	38,8
1 h	4/10	40	4/10	40	40
24 h	2/2	100	2/2	100	100
Sadio	0/2	0	0/2	0	0

*Número de plantas positivas no PCR/número de plantas inoculadas com 10 adultos de *B. tabaci* biótipo B.

Tabela 4 - Transmissão do ToCV pela *B. tabaci* biótipo B após diferentes períodos de acesso à inoculação (PAI) do vírus após 24 h de acesso à aquisição

PAI	Experimento 1		Experimento 2		Média (%)
	PCR*	%	PCR*	%	
5 min	3/10	30	2/10	20	25
10 min	4/10	40	1/10	10	25
20 min	3/10	30	2/10	20	25
30 min	4/10	40	5/10	50	45
1 h	4/10	40	5/10	50	45
24 h	1/ 2	50	1/2	50	50
Sadio	0/2	0	0/2	0	0

*Número de plantas positivas no PCR/número de plantas inoculadas com 10 adultos de *B. tabaci* biótipo B

2.3.1.3 Detecção do ToSRV no inseto

A análise de PCR para a detecção do ToSRV em insetos que se alimentaram em plantas infectadas por períodos de 1 a 5 minutos estão na tabela 5 e figura 2. Produtos de PCR de 2 amostras tiveram a sequência de nucleotídeos identificada, as quais mostraram identidades de 99% com a sequência correspondente do DNA-A do isolado Sumaré do ToSRV (GenBank: EU086591.2).

Tabela 5 - Detecção de vírus em *B. tabaci* biótipo B em análise de PCR

PAA	Grupos de insetos infectivos/grupos de insetos testados por PCR*	
	Imediatamente após o	24h após o PAA
	PAA	
1min	6/6	6/6
3 min	6/6	5/6
5 min	6/6	6/6
24h	1/1	1/1

*Grupo de 10 insetos adultos

Nota-se que apenas um minuto de alimentação em folha infectada com o ToSRV foi suficiente para a aquisição do vírus por adultos de *B. tabaci* biótipo B (tabela 5). O mesmo ocorreu após períodos de alimentação de 3 e 5 minutos. O vírus foi detectado nos insetos 24h depois dos respectivos PAAs, quando os insetos foram mantidos em planta não hospedeira do vírus. Insetos que não se alimentaram em tomateiro infectado (controle sadio) não tiveram o ToSRV detectado por PCR. Não foi feito teste de transmissão neste caso.

Figura 2 - Detecção do ToSRV em *B. tabaci* biótipo B por PCR. DNA total extraído de grupos de 10 adultos que se alimentaram na fonte de inóculo por 1, 3, 5 minutos e 24 h. M= Marcador 1kb Plus; S= DNA total de insetos não virulíferos

2.3.1.4 Retenção do ToSRV em *B. tabaci*

Os resultados de dois experimentos independentes para avaliar a retenção do ToSRV em *B. tabaci* biótipo B estão na tabela 6 e ilustrados na figura 3. Um dia após a aquisição do vírus a eficiência de transmissão para tomateiro foi em média 75%. Essa eficiência de transmissão se manteve 5 dias após a aquisição do vírus pelo inseto. Quinze dias após a aquisição do vírus pelos insetos a eficiência média de transmissão foi de 83,3%, caindo para 66,7% decorridos 25 dias da aquisição. Aos 27 dias os insetos restantes estavam mortos.

Tabela 6 – Detecção do ToSRV em adultos de *B. tabaci* biótipo B no período de 0 a 25 dias após o PAA do vírus

Tempo de retenção (dias)	Número de plantas positivas/número de plantas inoculadas	
	Experimento 1	Experimento 2
0	7/10	8/10
5	7/10	8/10
15	6/8	9/10
25	6/9	6/9
Sadia não inoculada	0/10	0/10

Figura 3 - Detecção do ToSRV por RT-PCR em gel de agarose a 1%. M = Marcador 1kb Plus; as amostras de 1 a 9 correspondem às plantas de tomateiro inoculadas com *B. tabaci* biótipo B alimentadas previamente em tomateiro infectado com o ToSRV por 24 h e transferidas para couve, onde ficaram durante 25 dias; + = controle positivo (ToSRV); S = planta sadia

2.3.2 Interação do ToSRV e ToCV na transmissão por *B. tabaci* biótipo B

Os resultados de 4 experimentos independentes da eficiência de adultos individuais de *B. tabaci* biótipo B na transmissão do ToSRV e ToCV isolados e em mistura estão na tabela 7. Em média, um único inseto foi capaz de transmitir o ToSRV para 18 de 38 plantas inoculadas (47,4%) quando o inseto adquiriu o vírus em uma fonte de inóculo contendo apenas este begomovírus. O ToCV foi transmitido da mesma maneira para 17 de 38 plantas inoculadas (44,7%) quando a fonte de inóculo continha apenas esse crinivírus. Insetos que adquiriram os dois vírus simultaneamente transmitiram os dois vírus em conjunto para 17 de 38 (44,7%) plantas inoculadas. Apenas 4 das 38 (10,5%) plantas inoculadas com insetos que adquiriram os dois vírus conjuntamente foram infectadas apenas com o ToCV. Esse valor foi o mesmo para a infecção simples com o ToSRV com *B. tabaci* biótipo B na planta fonte de ambos os vírus. Em tomateiros sadios usados como controle não foram detectados os vírus.

Tabela 7 - Eficiência de transmissão do ToSRV, do ToCV e da mistura de ambos, por um adulto de *B. tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro cv. Kadá

Tratamentos	<i>Experimento 1*</i>			<i>Experimento 2*</i>			<i>Experimento 3*</i>			<i>Experimento 4*</i>		
	<i>ToCV</i>	<i>ToSRV</i>	<i>ToSRV</i> + <i>ToCV</i>	<i>ToCV</i>	<i>ToSRV</i>	<i>ToSRV</i> + <i>ToCV</i>	<i>ToCV</i>	<i>ToSRV</i>	<i>ToSRV</i> + <i>ToCV</i>	<i>ToCV</i>	<i>ToSRV</i>	<i>ToSRV</i> + <i>ToCV</i>
Insetos que adquiriram os dois vírus em mistura	5/8	5/8	4/8	4/10	6/10	4/10	8/10	6/10	5/10	4/10	4/10	4/10
Insetos que adquiriram o ToCV	4/8	-	-	3/10	-	-	7/10	-	-	3/10	-	-
Insetos que adquiriram o ToSRV	-	5/8	-	-	4/10	-	-	6/10	-	-	3/10	-

*Número de plantas positivas na análise de RT-PCR ou PCR/número de plantas inoculadas. A detecção do ToCV foi feita por RT-PCR e a do ToSRV por PCR

2.3.3 Transmissão do ToCV por *T. vaporariorum*

Os resultados de dois experimentos independentes estão na tabela 8. *T. vaporariorum* transmitiu o vírus até mesmo quando utilizados apenas 5 insetos por vaso com duas plantas, com uma eficiência de 11,5%. Com o aumento do número de insetos, utilizando-se 10, 20, 30 e 40 adultos, a eficiência média de transmissão aumentou respectivamente para 15,4, 26,9, 45,8 e 57,7%. Essas médias de eficiência foram menores que aquelas obtidas na transmissão por *B. tabaci* biótipo B, que foram de 58,3, 75,0, 81,8, 83,3 e 100% quando as plantas foram inoculadas com 5, 10, 20, 30 e 40 insetos por vaso de duas plantas. Tomateiros sadios foram mantidos como controle negativo e neles não foi detectado o ToCV na RT-PCR.

Figura 4 - Detecção do ToCV por RT-PCR em gel de agarose a 1%. M corresponde ao marcador 1kb Plus; as amostras de 1 a 16 correspondem às plantas de tomateiro inoculadas com 40 aleirodídeos por vaso de duas plantas; a amostra + ao controle positivo (planta infectada com ToCV) e S à planta sadia

Tabela 8 - Eficiência de transmissão do ToCV por diferentes números de adultos de *T. vaporariorum* e de *B. tabaci* biótipo B para plantas de tomateiro cv. Kadá

Nº de insetos	Nº de plantas infectadas/Nº de plantas inoculadas				% média de infecção	
	Experimento 1		Experimento 2			
	<i>T. vaporariorum</i>	<i>B. tabaci</i>	<i>T. vaporariorum</i>	<i>B. tabaci</i>		
5	1/16	0/2	2/10	7/10	11,5	58,3
10	2/16	1/2	2/10	8/10	15,4	75,0
20	4/16	2/2	3/10	7/9	26,9	81,8
30	6/14	2/2	5/10	8/10	45,8	83,3
40	10/16	2/2	5/10	10/10	57,7	100,0
Controle sadio	0/8	0/8	0/5	0/5	0	0

2.3.4 Efeito do inseticida cloridrato de cartape no controle da transmissão do ToSRV

Os resultados de dois experimentos sobre a eficiência do inseticida cloridrato de cartape no controle da transmissão de ToSRV pela *B. tabaci* biótipo B estão na tabela 9. Quando as plantas foram pulverizadas com o inseticida e receberam insetos virulíferos (simulação da infecção primária, gaiola P), a porcentagem média de infecção foi de 52%. Esse valor foi ligeiramente inferior à média de infecção das plantas usadas como controle (58%), onde não foi aplicado inseticida (Gaiola C). No entanto, quando plantas sadias e infectadas pulverizadas com o inseticida receberam insetos avirulíferos (simulação da infecção secundária, gaiola S), as porcentagens de infecção no primeiro e no segundo experimento foram de 0% e 12%, respectivamente.

Tabela 9 - Transmissão do ToSRV por *B. tabaci* biótipo B para tomateiros cv. Kadá pulverizados com o inseticida cloridrato de cartape, simulando as transmissões primária (Gaiola P) e secundária (Gaiola S)

Gaiolas*	Número de plantas infectadas/número de plantas inoculadas				
	Experimento 1	%	Experimento 2	%	% média**
Gaiola P	13/25	52	13/25	52	52 a
Gaiola S	0/25	0	3/25	12	6 b
Gaiola C	14/25	56	15/25	60	58 a

*Gaiola P =Tomateiros sadios pulverizados com cloridrato de cartape + vetores virulíferos para o ToSRV

Gaiola S = Tomateiros sadios e infectados pulverizados com cloridrato de cartape +vetores avirulíferos

Gaiola C = Tomateiros sadios e infectados não pulverizados + vetores avirulíferos

** Médias na coluna seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.4 Discussão

2.4.1 Relação do ToSRV com a *B. tabaci* biótipo B

O primeiro estudo das relações do ToSRV com a *B. tabaci* biótipo B foi feito por Marubayashi (2009), utilizando um isolado viral obtido de pimentão, denominado PJU, em testes de transmissão em tomateiro e pimentão. O autor constatou que os períodos mínimos de acesso à aquisição (PAA) e à inoculação (PAI) do vírus foram de 15 minutos, exceto para o PAI quando o inseto adquiriu o vírus em planta infectada de pimentão e a transmissão foi efetuada para tomateiro. Nessa combinação o PAI mínimo foi de 30 minutos. A eficiência de transmissão também variou em função da combinação espécie da planta fonte de inóculo/espécie da planta inoculada. O autor, no entanto, não analisou PAA e PAI inferiores a 15 minutos. No presente trabalho constatou-se que os tempos mínimos para o PAA e o PAI do isolado do ToRSV de tomateiro foram de 5 minutos (Tabelas 1 e 2), ligeiramente inferiores aos obtidos por Marubayashi (2009). As eficiências médias de transmissão em ambos os casos foi de 10%, aumentando a medida que os tempos para o PAA e PAI aumentaram. Estudos semelhantes foram conduzidos com dois outros begomovírus que ocorrem em tomateiro no Brasil, o ToRMV (SANTOS; ÁVILA; RESENDE, 2003) e o ToYVSV (FIRMINO et al., 2009). No primeiro caso os autores constataram tempos mínimos de aquisição e de inoculação de 15 e 30 minutos, respectivamente. Já os tempos mínimos para a aquisição e a transmissão do ToYVSV pela *B. tabaci* biótipo B foram de 30 minutos e 10 minutos, respectivamente. Verifica-se, pelo exposto, que os tempos mínimos de aquisição e de transmissão dos begomovírus pelo vetor *B. tabaci* biótipo B apresentam algumas variações em função da espécie viral estudada. Também podem ser afetados pelo número de insetos utilizados nos testes de transmissão, espécie da planta teste (MARUBAYASHI, 2009), população do inseto e condições ambientais em que o experimento foi conduzido. Essa mesma variação pode ser encontrada em estudos com begomovírus de outros países. Os períodos mínimos para a aquisição e a inoculação do isolado de Israel do TYLCV pela *B. tabaci* biótipo B foram de 15 e 30 minutos, respectivamente. Já o período mínimo para a aquisição do isolado do mesmo vírus da Jordânia foi de 1 h (COHEN; NITZANY, 1966; MANSOUR; AL-MUSA, 1992; MEHTA et al., 1994). Brown e Nelson (1988), ao estudarem a interação do *Chino del tomate virus* (CdTV) com a *B. tabaci* detectaram períodos mínimos de acesso à aquisição e à inoculação de 1 h e 2 h, respectivamente, sendo

estes tempos bastante superiores aos obtidos com espécies de begomovírus que ocorrem em tomateiros no Brasil, incluindo a do presente estudo.

No caso do isolado do ToSRV desse trabalho constatou-se ainda que insetos que se alimentaram em plantas infectadas por períodos de 1, 3 e 5 minutos continham o vírus no corpo, conforme detectado por PCR (tabela 5, figura 2), embora testes de transmissão não tenham sido realizados. Ghanim, Morin e Czosnek (2001) estudaram de maneira bastante detalhada, por meio da detecção do vírus por PCR, o processo de translocação e a passagem do TYLCV pelos diferentes órgãos da *B. tabaci* biótipo B desde o processo de aquisição até a transmissão do vírus. A detecção do vírus nos estiletes dos insetos foi rara. No entanto, depois de dez minutos de alimentação na planta infectada o begomovírus foi detectado na cabeça dos insetos. Trinta minutos depois de ser encontrado na cabeça dos insetos o vírus pôde ser detectado no intestino. Passados mais 30 minutos o TYLCV foi encontrado na hemolinfa. Decorridas cinco horas e meia o vírus já estava na glândula salivar. O tempo de translocação do *Squash leaf curl virus* (SLCV) nesse aleirodódeo foi similar ao encontrado para o TYLCV (ROSELL; TORRES-JEREZ; BROWN, 1999). Atzmon, Van Hoss e Czosnek (1998) analisaram a presença do TYLCV em pequenos quadrados de tecidos de plantas onde apenas um inseto foi transferido após se alimentar durante 5 minutos em tomateiro contendo o vírus. Nesse caso a detecção do vírus ocorreu em duas das doze amostras analisadas. Quando os tempos de aquisição do vírus foram de 10 e 30 minutos, o número de amostras positivas foram 7 e 12, respectivamente. Porém, como o ponto de inoculação foi retirado para análise, essas plantas não foram invadidas sistemicamente pelo vírus.

Ainda não há estudo sobre a distribuição específica do ToSRV nas células da planta, porém o resultado aqui obtido na relação vírus-vetor sugerem a possibilidade de que o ToSRV pode estar presente nas células do mesofilo, como é o caso de outros begomovírus. Rushing et al. (1987) parecem ter sido os primeiros a identificar que o TGMV pode infectar células do mesofilo, além daquelas do floema. Análise de tecidos de *Nicotiana benthamiana* infectada com o TGMV, em microscópio de luz e eletrônico de transmissão, revelou a presença de efeitos citopáticos típicos de geminivírus em células do floema, do mesofilo e da epiderme foliar, sendo mais evidentes no núcleo e nos cloroplastos. Morra e Petty (2000) compararam a distribuição celular do TGMV e do BGMV em *N. benthamiana* e confirmaram que o

BGMV fica limitado ao floema, enquanto o TGMV pode invadir células do mesofilo foliar. Através de complementação genética e análise de vírus híbridos recombinantes esses autores demonstraram que três elementos genéticos do TGMV determinam a invasão sistêmica do vírus nos tecidos do mesofilo. As proteínas NSP, MP e CP estão envolvidas no movimento de begomovírus (LEVI; TZFIRA, 2010; LAZAROWITZ; BEACHY, 1999; ROJAS et al., 2005). Os estudos de movimento que tem usado o *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) como modelo mostram que esse vírus não é limitado ao floema e se move para o tecido do mesofilo. Dentro da célula, a NSP se liga ao DNA, transportando-o do núcleo para o citoplasma. O movimento célula a célula se dá através do dsDNA do BDMV liberado no citoplasma, que se liga à proteína MP formando um complexo que passa através dos plasmodesmas (LEVI; TZFIRA, 2010; NOUEIRY et al., 1994; ROJAS et al., 1998). Para o movimento à longa distância o vírus apenas passa pelos plasmodesmas de células de tecidos vasculares e a NSP e a MP não são requeridas (HOU et al., 1998). O *Abutilon mosaic virus* (AbMV) é um begomovírus limitado ao floema, também utilizado em estudos de movimento. Uma diferença entre o movimento do BDMV e do ABMV está no movimento intracelular do AbMV, onde a NSP transporta o DNA do núcleo para a periferia da célula, e esse complexo NSP-DNA é transportado célula a célula pela MP, diferentemente do BDMV onde somente o DNA é transportado pela MP (FRISCHMUTH et al., 2007; HEHNLE et al., 2004; LEVI; TZFIRA, 2010; ZHANG et al., 2001, 2002).

A presença do vírus no mesofilo foliar pode facilitar a sua aquisição pelo inseto logo no início da penetração do estilete nos tecidos da folha, uma vez que o inseto sabidamente alimenta-se nos vasos do floema. Aleirodídeos podem aceitar ou rejeitar a planta antes ou durante a penetração estiletar na epiderme. Penetram seus estiletes primeiramente entre as paredes das células, intracelularmente na epiderme, raramente através dos estômatos. (FREEMAN et al., 2001; JANSEN; TJALLING; LENTEREN, 1989; POLLARD, 1955). A profundidade de penetração dos estiletes é a mesma de seu comprimento. Adultos possuem estiletes com comprimentos médios de 217 µm. Já o comprimento médio dos estiletes das ninfas de primeiro estágio é de 113 µm, segundo estágio 135 µm, terceiro estágio 142 µm, quarto estágio 158 µm, muito mais longos do que a distância da camada da epiderme até o floema, por exemplo, de folhas de algodoeiro que varia de 53 a 127 µm. *B. tabaci* biótipo B quando começa a se alimentar da folha da planta provavelmente não

possui um caminho determinado para seu estilete encontrar o floema, encontrando-o através de tentativa e erro. A rejeição à planta pode ocorrer tão logo o aleirodídeo alcance a epiderme da planta. (CHU et al., 2000; FREEMAN et al., 2001, JANSEN; TJALLING; LENTEREN, 1989).

As características anatômicas do inseto juntamente com estudos de comportamento alimentar e transmissão de vírus permitem compreender a transmissão de begomovírus em tempos relativamente curtos de alimentação. Jiang et al. (2000) monitoraram o comportamento alimentar de *B. tabaci* biótipo B, por meio do “Electrical Penetration Graph” (EPG), durante o processo de transmissão do TYLCV variando de 3,5 a 14 h. Os resultados obtidos claramente demonstraram que a duração ($5,56 \pm 0,52$ minutos) da forma de onda elétrica $E(pd)_1$ (relacionada à salivação do inseto no floema) correlacionou-se acentuadamente com a inoculação do vírus. A inoculação do vírus na planta também foi possível durante a detecção ($6,98 \pm 1,59$ minutos) de ondas elétricas da forma $E(pd)_2$ (relacionada à ingestão do inseto no floema), uma vez que se detectou um aumento na taxa de transmissão em relação ao caso anterior. Constatou-se ainda que em dois casos, de 36 analisados, houve transmissão do TYLCV sem a detecção da onda elétrica relacionada ao floema. Os autores apontaram que nesses casos as partículas virais podem ter sido inoculadas nas células companheiras do floema durante breves picadas intracelulares.

Adultos de *B. tabaci* biótipo B que adquiriram o ToSRV durante 24 h em tomateiro infectado permaneceram virulíferos por um período de até 25 dias, período máximo que os insetos sobreviveram (Tabela 6) quando mantidos em planta imune ao vírus. Com base somente na análise de sintomas das plantas inoculadas por meio do vetor, Idris e Brown (1998) detectaram a persistência do *Sinaloa tomato leaf curl virus* (STLCV) em adultos de *B. tabaci* por no máximo 9 dias. Já o *Squash leaf curl virus* (SLCV) ficou retido no inseto por 26 dias (COHEN et al., 1983). O TYLCV e um begomovírus que infecta *Euphorbia prunifolia* ficaram retidos no vetor por até 20 dias (COHEN; NITZANY, 1966; COSTA; BENNETT, 1950), enquanto o *Chino del tomate virus* (CdTV) ficou retido por 4 a 7 dias, sendo que esta variação foi proporcional ao tempo de aquisição do vírus pelo aleirodídeo (BROWN; NELSON, 1988). O ToYVSV ficou retido em *B. tabaci* por 20 dias (FIRMINO et al., 2009). No presente estudo não foi possível determinar o período de latência do ToSRV em *B. tabaci* biótipo B. Marubayashi (2009) realizou diversos experimentos para

identificar o período de latência do isolado PJU do ToSRV em fêmeas e machos desse aleirodídeo, usando apenas um inseto nos testes de transmissão, mas não logrou êxito. Firmino et al. (2009) identificaram como sendo de aproximadamente 16 h o período de latência do ToYVSV em *B. tabaci*. O mesmo número de horas foi encontrado para o período de latência do ToRMV (SANTOS; ÁVILA; REZENDE, 2003). Brown e Nelson (1988) ao estudarem a relação do *Chino del tomate virus* (CdTV) com a *B. tabaci* contataram período de latência de 17h. O SCLV e o TYLCV, que também tiveram sua relação com a *B. tabaci* estudada, mostraram valores de latência de 19 e 21 h, respectivamente, sendo um pouco maiores do obtido com o ToYVSV (COHEN et al., 1983; MANSOUR; AL-MUSA, 1992). Mehta et al. (1994) estudando um outro isolado do TYLCV constataram um período de latência de 24 h, mostrando assim que pode haver variações da interação vírus/vetor dentro de uma mesma espécie. Considerando-se que nos ensaios do presente trabalho para a identificação do tempo mínimo de acesso à inoculação do ToSRV os insetos permaneceram na fonte de inóculo por 24 h para a aquisição do vírus, com resultados positivos de transmissão, pode-se supor que o período de latência é inferior a 24 h, estando de acordo com os exemplos acima mencionados.

2.4.2 Relação do ToCV com a *B. tabaci* biótipo B

Sabe-se que a relação vírus-vetor no caso do ToCV é do tipo semi-persistente, isto é, o inseto é capaz de transmitir o vírus logo após a aquisição, uma vez que não há período de latência. Utilizando-se o mesmo critério para a identificação do PAA e do PAI para o ToSRV, verificou-se que a *B. tabaci* biótipo B adquiriu e transmitiu o ToCV após períodos mínimos de alimentação de 5 minutos (Tabelas 3 e 4).

O tempo de retenção do ToCV em *B. tabaci* biótipo B já foi identificado por Wintermantel e Wisler (2006) como sendo de três dias, usando 30 insetos por planta e PAA de 24 h. Os autores verificaram também que o tempo de retenção do vírus em *T. abutilonea* foi de cinco dias. As espécies menos eficientes para a transmissão do ToCV, *B. tabaci* biótipo A e *T. vaporariorum*, retiveram o vírus por apenas um dia. Diferente do que já foi relatado para espécies de begomovírus, onde algumas são restritas aos vasos do floema, enquanto outras também podem infectar células do mesofilo foliar, estudos de citopatologia com dois crinivírus que infectam o tomateiro

não evidenciaram a presença deles além das células dos vasos do floema. Wisler et al. (1996) analisaram em microscópio de luz tecidos de *N. clevelandii* infectada com o *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) e constataram a presença de inclusões citoplasmática características de closterovírus somente no floema. Wisler et al. (1998b), analisando tecidos da mesma planta porém infectada com o ToCV encontraram corpos de inclusões típicos de closterovírus somente nos tecidos do floema.

Johnson et al. (2002) parecem ter sido os primeiros a estudar a transmissão de um closterovírus, o *Lettuce chlorosis virus* (LCV) em *Malva parviflora*, monitorando a alimentação do vetor *B. argentifolii* por meio da técnica de EPG. Verificaram que as picadas intracelulares antes de atingirem o floema, efetuadas pelo inseto não tiveram grande importância na transmissão do vírus, pois somente um inseto (5%), dos 19 analisados, inoculou o LCV. No entanto, dos 23 insetos que alimentaram-se no floema, 11 (48%) transmitiram o vírus.

2.4.3 Interação do ToSRV e ToCV na transmissão por um adulto de *B. tabaci*

A transmissão do ToSRV e do ToCV separadamente e em mistura através da *B. tabaci* biótipo B também foi motivo de estudo no presente trabalho. A eficiência de transmissão dos vírus isoladamente ou em mistura, por um único inseto, foi bastante semelhante (tabela 7), sugerindo não ter ocorrido interferência entre os vírus nos processos de aquisição e de transmissão.

Dalmon et al. (2009) compararam a eficiência de *T. vaporariorum* na transmissão de dois crinivírus, o ToCV e o TICV, adquiridos isoladamente ou em mistura pelo inseto. A probabilidade estimada de transmissão variou de 0,01 a 0,13 e não foi significativa entre o ToCV e o TICV, ou entre os vírus isoladamente e em mistura. Wintermantel et al. (2008), usando Real-time RT-PCR, compararam a concentração de ambos em infecções simples e mistas e verificaram que ela variou em função do hospedeiro. A concentração dos dois vírus decresceu na infecção mista quando em *Physalis wrightii*, em comparação com a infecção individual dos vírus. Em *N. benthamiana*, no entanto a concentração do TICV aumentou, enquanto que a do ToCV diminuiu na infecção mista em comparação com a infecção dos dois vírus separadamente.

Ohnish et al. (2010) examinaram a persistência de duas estirpes do TYLCV (“mild” e Israel) em adultos de *B. tabaci* biótipo B, após aquisições consecutivas das estirpes pelos insetos e constataram que a porcentagem de insetos individuais que transmitiram as duas estirpes simultaneamente foi maior (75%) do que a daqueles que transmitiram apenas uma estirpe (25%), independente de qual delas foi adquirida primeiro. Quando os insetos adquiriram primeiro a estirpe de Israel e depois a “mild”, o número de plantas infectadas com ambas as estirpes (44,4%) foi semelhante ao daquelas infectadas com cada uma das estirpes isoladamente (55,6%), semelhante ao que se obteve no presente trabalho de transmissão do ToSRV e ToCV. No entanto, quando a sequência de aquisição das estirpes foi invertida, o número de plantas infectadas por ambas foi aproximadamente duas vezes (70,4%) superior ao daquelas infectadas com apenas uma estirpe (29,6%). Os autores não encontraram explicações para essa diferença.

Em outro trabalho com um isolado normal do *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* e um mutante não transmissível por *B. tabaci* biótipo B, Caciagli et al. (2009) constataram que a transmissão do isolado normal pelo inseto foi inibida pela presença do mutante, embora ela tenha sido capaz de circular na hemolinfa e entrar na glândula salivar. O mutante possui um aminoácido alterado na proteína capsial responsável pela transmissão pelo vetor.

Macêdo (2011) comparou a transmissão simples e mista do ToSRV e outro begomovírus, o *Tomato golden vein virus*, ambos transmitidos por *B. tabaci* biótipo B e não encontrou diferenças significativas na eficiência da transmissão do vírus isoladamente ou em mistura.

A interação entre vírus transmitidos por afídeos também já foi motivo de investigações. Roberts et al. (1993), por exemplo, estudaram a eficiência do afídeo *Aphis craccivora* na transmissão do *Cucumber mosaic virus* (CMV) e do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), ambos de relação não persistente com o vetor, para plantas de caupi cv. Tvu 76, após os afídeos terem adquirido os vírus isoladamente e em mistura. No primeiro caso, *A. craccivora* foi mais eficiente na transmissão do CABMV (60%) do que do CMV (20%). No entanto, quando os afídeos adquiriram primeiro o CABMV, seguido do CMV, somente o primeiro foi transmitido para 100% das plantas.

Pinto et al. (2008) estudaram a eficiência dos afídeos *A. gossypii* e *Myzus persicae* na transmissão do CMV em infecção simples e mista com dois potyvírus,

Papaya ringspot virus – type W (PRSV-W) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) para abobrinha de moita e constataram que a transmissão do PRSV-W, ZYMV e CMV, separadamente, foi mais eficiente do que quando os potyvírus estavam em mistura com o CMV. Essa redução na transmissão desses vírus quando adquiridos simultaneamente pelo vetor pode estar associada à competição por sítios de aderência dos vírus no estilete do afídeo. Verificaram também que em geral os potyvírus foram transmitidos com mais eficiência pelas duas espécies de afídeos do que o CMV.

2.4.4 Transmissão do ToCV por *Trialeurodes vaporariorum*

Não se sabe ao certo desde quando *T. vaporariorum* está presente no país, mas existem relatos da sua ocorrência no Brasil desde 1968 (Silva et al., 1968). Neste trabalho verificou-se que adultos desse aleirodídeo coletados na região de Atibaia, SP foram capazes de transmitir o ToCV, porém com menor eficiência do que *B. tabaci* biótipo B (Tabela 8). Usando 40 adultos de *T. vaporariorum* por vaso com duas plantas obteve-se 57,7% de plantas infectadas, enquanto o mesmo número de adultos de *B. tabaci* biótipo B causou infecção em 100% das plantas. A eficiência de *T. vaporariorum* na transmissão do isolado brasileiro do ToCV foi um pouco superior aquela relatada por Wintermantel e Wisler (2006), usando o mesmo número de insetos por vaso, que foi de 34%. Esses autores constataram ainda que entre as quatro espécies de aleirodídeos usadas nos testes de transmissão, *T. vaporariorum* foi a menos eficiente. Usando um ou cinco insetos por planta não houve transmissão. Quando usaram 10 insetos por planta obtiveram apenas 4% de transmissão.

2.4.5 Controle químico da *B. tabaci* e o controle da begomovirose

Nos experimentos de avaliação do efeito do controle químico do vetor na transmissão do begomovírus ToSRV, simulando as disseminações primária e secundária, ficou demonstrado que o inseticida Cartap reduziu de maneira bastante significativa a transmissão secundária, porém não teve qualquer efeito na transmissão primária (Tabela 9). Esse resultado pode ser facilmente compreendido, pois ficou demonstrado experimentalmente que o tempo mínimo para inoculação do

ToSRV pela *B. tabaci* biótipo B foi de apenas 5 minutos (Tabela 2). Jiang et al. (2000) já haviam relatado que um inseto virulífero foi capaz de transmitir o TYLCV após um contato com o floema com duração inferior a 2 minutos. Assim sendo, qualquer inseto virulífero que chega à plantação, terá chance de inocular o ToSRV em pelo menos uma planta, caso o inseticida não o mate em menos de 5 minutos. No entanto, inseto que adquire o vírus dentro da plantação de tomateiros tratados com inseticida, terá chance muito reduzida, ou quase zero, de transmiti-lo para plantas vizinhas. Isso porque após a aquisição os begomovírus de uma maneira geral passam por um período de latência no vetor de várias horas, tempo esse provavelmente suficiente para eliminar o inseto antes de transmitir o vírus. Essa sugestão tem apoio nos resultados de Fugi et al. (2004), que avaliaram a ação de diferentes inseticidas (Focus, Actara, Confidor, Mospilan, Thiobel e a mistura Meothrin + Orthene) no controle de *B. tabaci* em tomateiro em casa de vegetação. Focus, Actara, Confidor, Mospilan, e a mistura Meothrin + Orthene apresentaram eficiência no controle de adultos somente a partir do primeiro para o segundo dia da aplicação, com níveis de mortalidade variando de 86 a 97%. Thiobel, que tem cartape como ingrediente ativo, exibiu eficiência após as 6 primeiras horas, quando provocou 85% de mortalidade, atingindo 99% de controle 72 h após a pulverização das plantas. Por essa rapidez de ação, este inseticida foi escolhido para a realização dos experimentos nesse trabalho.

Há várias décadas o uso do controle químico de vetores para prevenção ou redução da disseminação de vírus de plantas tem sido amplamente empregado pelos agricultores, porém muitas vezes sem alcançar o objetivo desejado conforme discutido nos trabalhos de revisão de Broadbent (1957) e Perring, Gruenhagen, Farrar (1999). Esses últimos autores, analisando dezenas de trabalhos da literatura internacional relacionados com esse tema, apontam casos de sucesso e de insucesso de controle de fitoviroses com base no controle químico do vetor, levando-se em consideração o tipo de relação vírus-vetor (não persistente, semi-persistente, persistente circulativa e persistente propagativa).

Mason, Racanti e Bosco (2000) estudaram o efeito do inseticida neonicotinóide thiamethoxam na prevenção da transmissão do TYLCV por *B. tabaci* biótipo B em condições de casa de vegetação. Os autores constataram que tomateiros infectados e tratados com o inseticida ficaram totalmente ineficientes para a aquisição do vírus pelos insetos até pelo menos 8 dias após a aplicação do

produto, pois a maioria dos insetos morreu durante as 24 h de PAA e os insetos que sobreviveram foram colocados em plantas saudáveis, mas morreram antes de inocular o vírus na planta. Em outro ensaio esses autores usaram plantas fontes do vírus pulverizadas com thiamethoxam e com água (controle) para avaliar a interferência do inseticida na aquisição do vírus, 14, 21 e 28 após a pulverização. Quando aplicado via foliar ou via solo na planta fonte de inóculo e na planta teste (similar à infecção secundária estudada no presente trabalho), comparado ao tratamento controle da planta fonte com inseticida e planta teste sem inseticida, o thiamethoxam reduziu a infecção por TYLCV, mas não impediu a infecção pelo vírus até 8 dias depois da pulverização. Quando a planta fonte de TYLCV não recebeu inseticida via foliar e as plantas testes foram pulverizadas com thiamethoxam (semelhante à infecção primária), não houve redução significativa na infecção quando comparado com o tratamento com plantas fonte e plantas teste não pulverizadas (resultado semelhante ao obtido na Gaiola P do presente trabalho), mas quando este mesmo tratamento foi quando via solo, houve redução da infecção.

Em um estudo realizado no Egito por Mazyad et al. (1986), foi constatado que campos de tomate tratados com inseticida foram infectados com o begomovírus TYLCV através de fontes de infecção fora do experimento. Em Giza e Esmaelia campos pulverizados apresentaram altas taxas de infecção com esse begomovírus, de 80 a 100%, devido à presença de plantas velhas infectadas perto do experimento e ao controle ineficiente dos insetos. Assim, para o controle de geminivirose, os inseticidas tem um papel importante no impedimento da infecção secundária, dentro da cultura, mas é pouco eficiente para controlar os alelodídeos que adquiriram o vírus fora da cultura e já ultrapassaram o período de latência para a transmissão do vírus, ou seja, infecção primária. Isso mostra que o uso de inseticidas deve ser recomendado para controlar as populações do vetor, no entanto o aumento do número de pulverizações não impedirá a infecção se houver fontes de inóculo com a presença do vetor do lado externo da plantação.

Castle et al. (2009a), em campos de melão cantaloupe em Yuma, AZ, USA, verificaram que imidacloprid e thiamethoxam, inseticidas neonicotinóides, não foram capazes de suprimir a incidência do crinivírus *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV). Apenas preveniram contra altas densidades de ovos e ninfas, comparados ao controle não tratado. Apesar desse resultado, a mistura do thiamethoxam com chorantraniliprole em uma formulação comercial conhecida como

Durivo® diminuiu a taxa de infecção em relação aos dois componentes da mistura separados e principalmente em relação ao tratamento controle não pulverizado. Apesar disso, não houve impedimento da infecção do vírus por completo. Semelhante ao que ocorre em todo o mundo, a preocupação dos agricultores desta área com o espalhamento do vírus induz o uso mais intensivo dos inseticidas, o que proporciona uma forte pressão de seleção que aumenta a resistência dos insetos a este tipo de controle químico.

3 CONCLUSÕES

- Os períodos mínimos de acesso à aquisição e à inoculação do ToSRV e do ToCV pela *B. tabaci* biótipo B foram de 5 minutos;
- O tempo de retenção do ToSRV pela *B. tabaci* biótipo B foi de 25 dias;
- A eficiência de um único adulto de *B. tabaci* biótipo B na transmissão simultânea do ToSRV e do ToCV foi semelhante a aquela da transmissão individual dos vírus;
- *Trialeurodes vaporariorum* foi menos eficiente que *B. tabaci* biótipo B na transmissão do ToCV;
- O inseticida cloridrato de cartape reduziu a infecção secundária do ToSRV pela *B. tabaci* biótipo B, mas não restringiu a infecção primária do vírus em tomateiros.

REFERÊNCIAS

- ABOU-JAWDAH, Y.; EL MOHTAR, C.; ATAMIAN, H.; SOBH, H. First report of *Tomato chlorosis virus* in Lebanon. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 3, p. 378, 2006.
- ACOTTO G.P.; VAIRA, A.M.; VECCHIATI, M.; FINETTI SIALER, M.M., GALLITELLI D.; DAVINO, M. First report of *Tomato chlorosis virus* in Italy. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p. 1208, 2001.
- ATZMON G.; VAN HOSS, H.; CZOSNEK, H. PCR-amplification of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) from squashes of plants and insect vectors: application to the study of TYLCV acquisition and transmission. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 189-194, 1998.
- BARBOSA, J.C.; TEIXEIRA, L.D.D.; REZENDE, J.A.M. First report on the susceptibility of sweet pepper crops to *Tomato chlorosis virus* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 3, p. 374, 2010.
- BARBOSA, J.C.; BARRETO, S.D.; INOUE-NAGATA, A.K.; REZENDE, J.A.M. Characterization and Experimental Host Range of a Brazilian Tomato Isolate of *Tomato severe rugose virus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 9, p. 644-646, 2011a.
- BARBOSA, J.C.; COSTA, H.; GIORIA, R.; REZENDE, J.A.M. Occurrence of *Tomato chlorosis virus* in tomato crops in five Brazilian states. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 4, p. 256-258, 2011b.
- BARBOSA, J.C.; TEIXEIRA, A.P.M.; MOREIRA, A.G.; CAMARGO, L.E.A.; BERGAMIN FILHO, A.; KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 12, p. 1709, 2008.
- BESE, G.; BOKA, K.; KRIZBAI, L.; TAKACS, A. First report of *Tomato chlorosis virus* in Tomato from Hungary. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 3, p. 363, 2011.
- BEZERRA-AGASIE, I.C.; FERREIRA, G.B.; DE ÁVILA, A.C.; INOUE-NAGATA, A.K. First report of *Tomato severe rugose virus* in chili pepper in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 1, p. 114, 2006.

BONDAR, G. Aleyrodídeos do Brasil. **Boletim do Laboratório de Patologia Vegetal do Estado da Bahia**, Salvador, n. 5, p. 1-17, 1929.

BOSCO, D., MASON, G.; ACCOTTO, G. P. TYLCSV DNA, but not infectivity, can be transovarially inherited by the progeny of the whitefly vector *Bemisia tabaci* (Gennadius). **Virology**, New York, v. 323, p. 276–283, 2004.

BROADBENT, L. Insecticidal control of the spread of plant viruses. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 2, p. 339-354, 1957.

BROWN, J.K.; NELSON, M.R. Transmission, host range and virus-vector relationships in *Chino del tomate virus*, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 72, n. 1, p. 866-869, 1988.

BROWN, J.K.; FROLICH, D.R.; ROSELL, R.C. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 40, p. 511-534, 1995.

CACIAGLI, P.; PILES, V.M.; MARIAN, D.; VECCHIATI, M.; MASENGA, V.; MASON, G., FALCIONI, T., NORIS, E. Viron stability is important for the circulative transmission of *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* by *Bemisia tabaci*, but virion access to salivary glands does not guarantee transmissibility. **Journal of Virology**, London, v. 83, p. 5784-5795, 2009.

CAHILL, M.; BYENE, F.J.; DENHOLM, I.; DEVOSHIRE, A.L.; GORMAN, K.J. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci*. **Pesticide Science**, Oxford, v. 42, p. 137-139, 1994.

CASIDA, J.E.; QUISTAD, G.B. Golden age of insecticide research: Past, present, or future? **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 43, p. 1-16, 1998.

CASTILLO-URQUIZA, G.P.; BESERRA JÚNIOR, J.E.A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; VARSANI, A.; LIMA, A.T.M.; BARROS, D.R.; ZERBINI, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato in Paty do Alferes, R.J., Brasil. **Virus Reviews and Research**, Belo Horizonte, v. 12, p. 233, 2007.

CASTLE, S.; PALUMBO, J. PRABHAKER, N. Newer insecticides for plant virus disease management, **Virus Research**, Amsterdam, v. 14, n. 2, p. 131-9, 2009 a.

CASTLE, S.J.; PRABHAKER, N.; HENNEBERRY, T.J.; TOSCANO, N.C. Host plant influence on susceptibility of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) to insecticides. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 99, n. 3, p. 263-273, 2009b.

CEVIK, B.; ERKIS, G. First report of *Tomato chlorosis virus* in Turkey. **Plant Pathology**, Oxford, v. 57, n. 4, p. 767, 2008.

CHU, C.C.; FREEMAN, T.P.; BUCKNER, J.S.; HENNEBERRY, T.J.; NELSON, D.R.; WALKER, G.P.; NATWICK, E.T. *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) colonization on upland cottons and relationships to leaf morphology and leaf age. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 93, p. 912-919, 2000.

COHEN, S.; NITZANY, F.E. Transmission and host range of the *Tomato yellow leaf curl virus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 56, p. 1127-1131, 1966.

COHEN, S.; DUFFUS, J.E.; LARSEN, R.C.; LIU, H.; FLOCK, R.A. Purification, serology and vector relationships of *Squash leaf curl virus*, a whitefly-transmitted geminivirus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, p. 1669-1673, 1983.

CONTRIM, M.A.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; NARITA, N.; ZERBINI, F.M.; PAVAN, M.A. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 300-303, 2007.

COSTA, A.S. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, v. 13, p. 121-130, 1965.

_____. Moléstias do tomateiro no Brasil transmitidas pela mosca-branca *Bemisia tabaci*. **Fitopatologia**, Lima, v. 9, n. 2, p. 47, 1974.

COSTA, A.S.; BENNETT, C.W. Whitefly-transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 40, p. 266-283, 1950.

DALMON, A.; FABRE F.; GUILBAUD, L.; LECOQ, H.; JACQUEMOND, M. Comparative whitefly transmission of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* from single or mixed infections. **Plant Pathology**, Edinburgh, v. 58, n. 2, p. 221-227, 2009

DE BARRO, P.J. ***Bemisia tabaci* biotype B**: a review of its biology, distribution and control. 2nd ed. Canberra: CSIRO, Division of Entomology, 1995. 58p. (Bulletin, 36).

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

DECOIN, M. Tomates et concombres, gare aux nouveaux virus: a propos de cinq organismes 'à lutte obligatoire'. **Phytoma – la Défense des Végétaux**, Paris, n. 558, p. 27–29, 2003.

DIEZ, M.J.; NUEZ, F. Tomato. In: PROHENS, J.; NUEZ, F. **Vegetables II -Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae**. New York: Springer, 2007. v. 2, chap. 1, p. 249.

DOVAS C.I.; KATIS, N.I.; AVGELIS, A.V. Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 1345–1349, 2002.

ELBERT, A.; NAUEN, R. Resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides in southern Spain with special reference to neonicotinoids. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, p. 60-64, 2000.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. Data sheets on quarantine pests – *Tomato chlorosis crinivirus*. **Bulletin OEPP/EPPO**, Paris, n. 35, p. 439–441, 2005.

EUROPEAN WHITEFLY STUDIES NETWORK. Summary of results. In: CANARY ISLANDS WORKSHOP, 1999, Norwich. Norwich: John Innes Centre, 1999. p.1.

FAHL, J.I.; CAMARGO, M.B.P.; PIZZINATTO, M.A.; BETTI, J.A.; MELO, A.M.T.; DEMARIA, I.C.; FURLANI, A.M.C. **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. 6. ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 1998. 396p. (Boletim, 200).

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, V.; BALL, L.A. (Ed.). **Virus taxonomy**: classification and nomenclature of viruses: eight report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier; Academic Press, 2005. 1259p.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 21 jun. 2012.

FERNANDES, F.; RALBUQUERQUE, L.C.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; ÁVILA, A.C.; INOUE-NAGATA, A.K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, Amsterdam, v. 36, p. 241-258, 2008.

FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUE, L.C.; INOUE-NAGATA, A.K. Development of a species-specific detection method for three Brazilian tomato begomoviruses. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 43-47, 2010.

FERREIRA, L.T.; AVIDOS, M.F.D. Mosca-branca: presença indesejável no Brasil. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 4, p. 22-26, 1998.

FIALLO-OLIVE, E.; HAMED, A.A.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato in Sudan. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 12, p. 1592-1592, 2011.

FIRMINO, A.C.; YUKI, V.A.; MOREIRA, A.G.; REZENDE, J.A.M. *Tomato yellow vein streak virus*: relationship with *Bemisia tabaci* biotype B and host range. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 66, p. 793-799, 2009.

FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K.; KRAMER, M. Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. **O Biológico**, Campinas, v. 26, p. 65-69, 1960.

FREEMAN, T.P.; BUCKNER, J.S.; NELSON, D.R.; CHU, C.C.; THOMAS J. HENNEBERRY, T.J. Stylet penetration by *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) into host leaf tissue. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 94, n. 5, p. 761-768, 2001.

FREITAS, D.M.S.; NARDIN, I.; SHIMOYAMA, N.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; REZENDE, J.A.M. First report of *Tomato chlorosis virus* in potato in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 4, p. 593.3, 2012.

FRISCHMUTH, S.; WEGE, C.; HÜLSER, D.; JESKE, H. The movement protein BC1 promotes redirection of the nuclear shuttle protein BV1 of *Abutilon mosaic geminivirus* to the plasma membrane in fission yeast. **Protoplasma**, New York, v. 230, p. 117–123, 2007.

FUGI, C.G.Q.; ALVES, A.C.; FERREIRA, A.; LOURENÇÃO, A.L. 2004. Eficiência da aplicação de inseticidas em tomateiro sobre adultos de *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em casa de vegetação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 20., 2004, Gramado, 2004. **Programa e Resumos...**, Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. Resumo EN-521-A, p. 356.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.C.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GENNADIUS, P. Disease of tobacco plantations in the trikonía: the aleurodid of tobacco. **Ellenike Georgia**, Trikonía, v. 5, p. 1–3, 1889.

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

GHANIM, M.; MORIN, S.; CZOSNEK, H. Rate of *Tomato yellow leaf curl virus* translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n.2, p. 188-196, 2001.

HANAFI, A. Invasive species: a real challenge to IPM in the Mediterranean region? **European Whitefly Studies Network Newsletter**, Norwich, n. 13, p. 4, 2002.

HEHNLE, S.; WEGE, C.; JESKE, H. The interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. **Journal of Virology**, London, v. 78, p. 7698–7706, 2004.

HOGENHOUT, S.A.; AMMAR, E.D.; WHITFIELD, A.E.; REDINBAUGH, M.G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 46, p. 327-359, 2008.

HOU, Y.M.; PAPLOMATAS, E.J.; GILBERTSON, R.L. Host adaptation and replication properties of two bipartite geminiviruses and their pseudorecombinants. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 11, 208–217, 1998.

IDRIS, A.M.; BROWN, J.K. *Sinaloa tomato leaf curl virus* geminivirus: biological and molecular evidence for a new sub-group III virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p. 648-657, 1998.

IDRIS, A.M.; SMITH, S.E.; BROWN, J.K. Ingestion, transmission, and persistence of *Chino del tomate virus* (CdTV), a New World begomovirus, by Old and New World biotypes of the whitefly vector *Bemisia tabaci*. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 139, p. 45-154, 2001.

INOUE-NAGATA, A.K.; ÁVILA, A.C.; VILLAS BOAS, G.L. Os geminivírus em sistema de produção integrada de tomate indústria. **Embrapa Hortalças. Circular Técnica**, Brasília, v. 71, p. 1-12, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. **IBGE**, Rio de Janeiro, v. 24 n. 1, p. 76-77, 2011.

JANSSEN, J.A.M.; TJALLINGII, W.F.; VAN LENTEREN, J.C. Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 52, p. 69-81, 1989.

JIANG, Y.X.; WALKER, G.P. Electrical penetration graphs of the nymphal stage of *Bemisia argentifolii*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 109, p. 101-111, 2003.

JIANG, Y.X.; DE BLAS, C.; BARRIOS, L.; FERERES, A. Correlation between whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) feeding behavior and transmission of tomato yellow leaf curl virus. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 93, p. 573-579, 2000.

JIANG, Y.X.; LEI, H.; COLLAR, J.L.; MARTIN, B.; MUNIZ, M.; FERERES, A. Probing and feeding behavior of two distinct biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants. **Journal of Economic Entomology**, Berlin, v. 92, p. 357-366, 1999.

JOHNSON, D.D.; WALKER, G.P.; CREAMER, R. Stylet penetration behavior resulting in inoculation of a semipersistently transmitted closterovirus by the whitefly *Bemisia argentifolii*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 102, n. 2, p. 115-123, 2002.

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

KING, A.M.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M.; CARSTENS, E.B. **Virus taxonomy**: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier, 2011. 1338p.

LAZAROWITZ, S.G.; BEACHY, R.N. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. **Plant Cell**, Baltimore, v. 11, p. 535–548, 1999.

LEVI, J.; SHARONI, Y. The functions of tomato lycopene and its role in human health. **HerbalGram**, Austin, v. 62, p. 49-56, 2004.

LEVY, A.; TZFIRA, T. *Bean dwarf mosaic virus*: a model system for the study of viral movement. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 11, n. 4, p. 451–461, 2010.

LETT, J.M.; HOAREAU, M.; REYNAUD, B.; SAISON, A.; HOSTACHY, B.; LOBIN, K.; BENIMADHU, S.P. First report of *Tomato chlorosis virus* in tomato on Mauritius Island. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n. 1, p. 111, 2009.

LIMA, A.T.; PEREIRA, C.O.; ALFENAS-ZERBINI, P.; PAULA, M.B.; MELLO, R.N.; ZERBINI, F.M. Primeiro relato de infecção pelo geminivírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em tomateiro no estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 224-224, 2006. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 39., 2006, Salvador.

LIMA, L.H.C.; MORETZOHN, M.C.; OLIVEIRA, M.R.V. Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 1–5, 2000.

LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v. 53, p. 53-59, 1994.

LOURENÇÃO, A.L.; YUKI, V.A.; ALVES, S.B. Epizootia de *Aschersonia* cf. *goldiana* em *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring no Estado de São Paulo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 343-345, 1999.

LOURENÇÃO, A.L.; ALVES, A.C.; FUGI, C.G.Q.; MATOS, E.S. Outbreaks of *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Hemiptera: Aleyrodidae) under Field Conditions in the State of São Paulo, Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 1, p. 89-91, 2008.

LOURO, D.; ACCOTTO, G.P.; VAIRA A.M. Occurrence and diagnosis of *Tomato chlorosis virus* in Portugal. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, 589-592, 2000.

LOZANO, G.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. First report of sweet pepper (*Capsicum annuum*) as a natural host plant for *Tomato chlorosis virus*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 224, 2004.

MACÊDO, M.A. **Estudo dos fatores que influenciam a predominância do begomovírus *Tomato severe rugose virus* no Brasil**. 2011. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

MASON, G; RACANTI, M.; BOSCO, D. The effect of thiamethoxam, a second generation neonicotinoid insecticide, in preventing transmission of *Tomato yellow leaf curl geminivirus* (TYLCV) by the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). **Crop Protection**, Guildford, v. 19, p. 473-479, 2000.

MANSOUR, A.; AL-MUSA, A. *Tomato yellow leaf curl virus*: host range and virus vector relationship. **Plant Pathology**, Edinburgh, v. 41, p. 122-125, 1992.

MARANCA, G. **Tomate**: variedades, cultivo, pragas e doenças, comercialização. São Paulo: Livraria Nobel, 1981. 158p.

MARTIN, J.H.; MIFSUD, D.; RAPISARDA, C. The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of Europe and the Mediterranean basin. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 90, p. 407-448, 2000.

MARTÍNEZ-ZUBIAUR, Y.; FIALLO-OLIVÉ, E.; CARRILLO-TRIPP, J.; RIVERA-BUSTAMANTE, R. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato in single and mixed infections with *Tomato yellow leaf curl virus* in Cuba. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 5, p. 836, 2008.

MARUBAYASHI, J.M. **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**. 2009. 93 p. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu. 2009.

MASSÉ, D.; LEFEUVRE, P.; DELATTE, H.; ABDOUL-KARIME, A.L.; HOSTACHY, B.; REYNAUD, B.; LETT, J.M. *Tomato chlorosis virus*: first report in Mayotte Island. **Plant Pathology**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 388, 2008.

MATYS, J.C.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R.; COSTA, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 1, p. 267-74. 1975.

MAZYAD, H.M.; NAKHLA, A. A.; EI-AMRETY, DOSS, S.A. Further studies of tomato yellow leaf curl virus in Egypt. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 190, p. 121-130, 1986.

MEHTA, P.A.; WYMAN, J.W.; NAKHLA, M.K.; MAXWELL, D.P. Transmission of *Tomato yellow leaf curl geminivirus* by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Journal of Economic Entomology**, Berlin, v. 87, p. 1291-1297, 1994.

MESQUITA, A.L.M.; PERETTO, A.J.; BRAGA SOBRINHO, R.; ROSSETTI, A.G. Efeito de inseticidas no controle da mosca-branca na cultura do melão. **Comunicado Técnico Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, v. 56, p. 1-4, 2001.

MORRA, M.R.; PETTY, I.T.D. Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. **Plant Cell**, Baltimore, v. 12, n. 11, p. 2259–2270, 2000.

NAKHLA, M.K.; MAXWELL, D.P. Epidemiology and management of tomato yellow leaf curl disease. In: HADIDI, A.R. KHETERPAL, K.; KOGANEZAWA, H. (Ed.). **Plant virus disease control**. St. Paul: APS Press, 1998. chap. 43, p. 565–583.

NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. ToCV: a new threat to European horticulture. **European Whitefly Studies Network Newsletter**, Norwich, n. 3, p. 10-13, 2000.

NAVAS-CASTILLO, J.; CAMERO, R.; BUENO, M.; MORIONES, E. Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain associated with infections of *Tomato chlorosis virus*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 8, p. 835-837, 2000.

NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, Cambridge, v. 76, p. 925–932, 1994.

NOZAKI, D.N.; SAKATE, R.K.; HASEGAWA, J.M.; CEZAR, M.A.; DZIUBA, P.H.; PAVAN, M.A. First report of *Tomato severe rugose virus* infecting pepper plants in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 321-321, 2006.

NUEZ, F. Tomate. In: NUEZ, F.; RINCÓN, A.R., TELLO, J.; CUARTERO, J.; SEGURA, B. **El cultivo del tomate**. Madrid: Mundi-Prensa, 2001. p. 1-793.

OHNISHI, J.; KITAMURA, T.; TERAMI, F.; HONDA, K. Co-transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)-Mld and TYLCV-IL by the whitefly *Bemisia tabaci*. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 77, n. 1, p. 54-59, 2011.

OLIVEIRA, M.R.V.; HENNEBERRY, T.J.; ANDERSON P. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. **Crop Protection**, Guildford, v. 20, p. 709–723, 2001.

OMER, A.D.; JOHNSON, M.W.; TABASHNIK, B.E.; COSTA, H.S.; ULLMAN, D.E. Sweetpotato whitefly resistance to insecticides in Hawaii: intra-island variation is related to insecticides use. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 67, p. 173-182, 1993.

PERRING, T.M. The *Bemisia tabaci* species complex. **Crop Protection**, Guildford, v. 20, p. 725-731, 2001.

PERRING, T.M.; GRUENHAGEN, N.M.; FARRAR, C.A. Management of plant viral diseases through chemical control of insect vectors. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 44, p. 457-481, 1999.

PINTO, Z.V.; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; PIEDADE, S.M.S. Ability of *Aphis gossypii* and *Myzus persicae* to transmit *Cucumber mosaic virus* in single and mixed infection with two Potyviruses to zucchini squash. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 34, p.183 - 185, 2008.

POLLARD, D.G. Feeding habits of the cotton whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 43, p. 664-671, 1955.

REZENDE, W.L.; MILITÃO NETO, V.; GOULART, L.R.; GIOVANINI, M.P.; JULIATTI, F.C.; FERNANDES, J.J. Mixed infection by geminiviruses in tomato plants, detected by LIS-SSCP-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 338, 1997.

ROBERTS, J.M.F.; THOTTAPPILLY, G.; HODGSON, G.J. The ability of *Aphis craccivora*, *A. gossypii* and *A. citricola* to transmit single and mixed viruses to cowpeas. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 138, p. 164-170, 1993.

RODRÍGUEZ, R.R.; RODRIGUEZ, J.M.T.; SAN JUAN, J.A.M. **Cultivo moderno del tomate**. Madrid: Mundi-Prensa, 1997. 255p.

ROJAS, M.R.; HAGEN, C.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 361–394, 2005.

ROJAS, M.R.; NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. *Bean dwarf mosaic geminivirus* movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. **Cell**, Cambridge, v. 95, p. 105–113, 1998.

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

RUSHING, A.E.; SUNTER, G.; GARDINER, W.E.; DUTE, R.R.; BISARO, D.M. *Ultrastructural aspects of tomato golden mosaic virus infection in tobacco*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, p. 1231–1236, 1987.

SANTOS, C.D.G.; ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 664-673, 2003.

SEGEV, L.; WINTERMANTEL, W.M.; POLSTON, J.E.; LAPIDOT, M. First report of *Tomato chlorosis virus* in Israel. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 1160, 2004.

SILVA, A.G.A.; GONÇALVES, C.R.; GALVÃO, D.M.; GONÇALVES, A.J.L.; GOMES, J.; SILVA, M.N.; SIMONI, L. Insetos, hospedeiros e inimigos naturais. In: _____. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil: seus parasitos e predadores**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968. t. 1, pt. 2, p. 621-622.

SOUZA-DIAS, J.A.C.; SAWAZAKI, H.E.; PERNAMBUCO-FO, P.C.A.; ELIAS, L.M.; MALUF, H. *Tomato severe rugose virus*: another begomovirus causing leaf deformation and mosaic symptoms on potato in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 3, p. 487, 2008.

SUNDARAJ, S.; SRINIVASAN, R.; WEBSTER, C.G.; ADKINS, S.; PERRY, K.; RILEY, D. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato in Georgia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 7, p. 881, 2011.

TRUOL, G.; LAGO, W.N.M.; QUEIROZ, P.R.; LIMA, L.H.C.; OLIVEIRA, M.R.V.; LAGUNA, G.; PAIVA, W.M.; ALMEIDA, A.M.R. Variabilidade genética determinada por RAPD-PCR de populações de *Bemisia tabaci* provenientes do Brasil, Argentina e Uruguai. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Brasília, v. 54, p. 1-19, 2003.

TSAI, W.S.; SHIH, S.L.; GREEN, S.K.; HANSON, P.; LIU, H.Y. First report of the occurrence of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in Taiwan. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 311, 2004.

VARGAS, J.A. ; HAMMOND, R.; HERNANDEZ, E.; BARBOZA, N.; MORA, F.; RAMIREZ, P First report of *Tomato chlorosis virus* infecting sweet pepper in Costa Rica. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 11, p. 1482, 2011.

WINTERMANTEL, W.M. Co-infection of *Beet mosaic virus* with *Beet yellowing viruses* leads to increased disease severity on sugar beet. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 325-331, 2005.

WINTERMANTEL, W.M.; WISLER, G.C. Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 6, p. 814-819, 2006.

WINTERMANTEL, W.M.; CORTEZ, A.A.; ANCHIETA, A.G.; GULATI-SAKHUJA, A. Co-infection by two criniviruses alters accumulation of each virus in a host-specific manner and influences efficiency of virus transmission. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 12, p. 1340-1345, 2008.

WINTERMANTEL, W.M.; POLSTON, J.E.; ESCUDERO, J.; PAOLI, E.R. First report of *Tomato chlorosis virus* in Puerto Rico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p. 228, 2001.

WINTERMANTEL, W.M.; WISLER, G.C.; ANCHIETA, A.G.; LIU, H.Y.; KARASEV, A.V.; TZANETAKIS, I.E. The complete nucleotide sequence and genome organization of *Tomato chlorosis virus*. **Archives of Virology**, Vienna, v. 150, p. 2287-2298, 2005.

WISLER, G.C.; DUFFUS, J.E.; LIU, H.Y; LI, R.H. A new whitefly transmitted virus infecting tomato from Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 71, 1996. Supplement.

_____. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 270–280, 1998a.

WISLER, G.C.; LI, R.H.; LIU, H.Y; LOWRY, D.S.; DUFFUS, J.E. *Tomato chlorosis virus*: a new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p. 402–409, 1998b.

YUKI, V.A. Mosca branca: histórico dos surtos e medidas de controle como praga e vetora de vírus. **O Agrônomo**, Campinas, v. 53, n. 1, p. 22-25, 2001.

YUKI, V.A.; KUNIYUKI, H.; BETTI, J.A. Alta incidência de geminivírus em tomateiros em algumas regiões do Estado de São Paulo, em 1997. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 24, n. 1, p. 61, 1998.

ZHANG, S.C.; GHOSH, R.; JESKE, H. Subcellular targeting domains of *Abutilon mosaic geminivirus* movement protein BC1. **Archives of Virology**, Vienna, v. 147, p. 2349–2363, 2002.

ZHANG, S.C.; WEGE, C.; JESKE, H. Movement proteins (BC1 and BV1) of *Abutilon mosaic geminivirus* are cotransported in and between cells of sink but not of source leaves as detected by green fluorescent protein tagging. **Virology**, New York, v. 290, p. 249–260, 2001.