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

Identificação de hospedeiros alternativos do *Tomato chlorosis virus*

Arnaldo Esquivel Fariña

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2015**

Arnaldo Esquivel Fariña
Engenheiro Agrônomo

Identificação de hospedeiros alternativos do *Tomato chlorosis virus*

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba
2015

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

Esquivel Fariña, Arnaldo

Identificação de hospedeiros alternativos do *Tomato chlorosis virus* / Arnaldo Esquivel Fariña. - - Piracicaba, 2015.
49 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Crinivirus 2. *Solanum lycopersicum* 3. Tomateiro 4. Epidemiologia I. Título

CDD 635.642
E77i

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

À minha família e amigos,

Com amor

Dedico

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, por todo o apoio, pelos conselhos e pelo carinho.

Ao professor Dr. Jorge Alberto Marques Rezende, por ter me aceitado como parte do grupo, pela paciência, estímulo e excelente orientação.

Aos companheiros de laboratório: Pedro Mansilla, Viviana García, Michel Vargas, Débora Freitas, Marina Gouvêa, Rodrigo Toloy, Tatiana Mituti, Talita Zocca, Gabriel Favara e Heron Kraide, por todo o apoio, pela convivência e ensinamentos.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e a todos os que fazem parte dela.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia ESALQ/USP, em especial a José Edivaldo Buriolla, Pedro Arthuso, Fabiana Nunes Wolak e Iraides Oliveira pelo apoio nos momentos necessários.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia ESALQ/USP, como também de outros Departamentos, pelos conhecimentos transmitidos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 O tomateiro.....	15
2.2 Amarelão do tomateiro causado pelo <i>Tomato chlorosis virus</i>	16
2.3 Hospedeiros do ToCV	18
2.4 Manejo da doença	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Plantas-teste	23
3.2 Fonte de inóculo do ToCV	23
3.3 Colônia de <i>B. tabaci</i> biótipo B	23
3.4 Detecção do ToCV	23
3.4.1 Extração de RNA total	23
3.4.2 RT-PCR.....	24
3.5 Sequenciamentos de nucleotídeos	25
3.6 Avaliação da reação de diferentes espécies/variedades à infecção com o ToCV.....	26
3.6.1 Em teste de transmissão sem chance de escolha do vetor.....	26
3.6.2 Em teste de transmissão com chance de escolha do vetor.....	27
3.7 Análise da preferência de <i>B. tabaci</i> à oviposição em plantas expostas a transmissão com chance de escolha do vetor.	28
3.8 Recuperação do ToCV para tomateiros	29
4 RESULTADOS	31
4.1 Reação de diferentes espécies à infecção com o ToCV	31
4.1.1 Em teste de transmissão sem chance de escolha do vetor.....	31
4.1.2 Em teste de transmissão com chance de escolha do vetor.....	34
4.2 Recuperação do ToCV das espécies suscetíveis para tomateiros.....	34
4.3 Oviposição de <i>Bemisia tabaci</i> biótipo B em espécies suscetíveis ao <i>Tomato chlorosis virus</i>	35
4.4 Identidade do isolado do <i>Tomato chlorosis virus</i>	37
5 DISCUSSÃO	39
REFERÊNCIAS	45

RESUMO

Identificação de hospedeiros alternativos do *Tomato chlorosis virus*

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais cultivadas no mundo. No Brasil, a cultura está entre as de maior importância econômica e social. Nos últimos anos, foi detectada a incidência de uma espécie de crinivírus, *Tomato chlorosis virus* (ToCV), nos principais estados produtores dessa hortaliça no país. O ToCV é transmitido por *Bemisia tabaci* biótipo B de maneira semi-persistente. O objetivo deste trabalho foi identificar hospedeiros alternativos do isolado brasileiro do ToCV, que podem atuar como fonte primária de inóculo do patógeno. Um isolado brasileiro (A JQ952600) foi inoculado em plantas sadias de 73 espécies, pertencentes a 14 famílias, por meio de *B. tabaci* biótipo B, em testes com e sem chance de escolha do vetor. Também foi avaliada a preferência para oviposição do vetor em testes com chance de escolha. Por último, foi feita a recuperação do vírus das hospedeiras suscetíveis infectadas para plantas de tomate por meio do vetor, em teste sem chance de escolha. A detecção do ToCV foi feita por nested-PCR a partir de RNA total extraído das amostras foliares. Foram usados os pares de oligonucleotídeos iniciadores HS-11 / HS-12 e TOC-5 / TOC-6. O amplicon específico do ToCV de 463 pb esperado foi detectado no RNA total extraído de 19 espécies pertencentes às famílias Solanaceae e Amaranthaceae. A identidade do isolado viral foi confirmada por sequenciamento de nucleotídeos de alguns amplicons. Confirmou-se a suscetibilidade de *Chenopodium album*, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. edwarsonii*, *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *Solanum americanum*, *S. pimpinellifolium* e *Spinacea oleracea* à infecção com o ToCV. As espécies *Capsicum annuum*, *Physalis angulata*, *P. peruviana* e *S. tuberosum* var. Asterix, relatadas como suscetíveis ao vírus no campo, foram infectadas experimentalmente. *Beta vulgaris* var. cicla, *Chenopodium quinoa*, *S. aculeatissimum*, *S. melongena* e *S. sessiliflorum* foram identificadas pela primeira vez como espécies suscetíveis ao ToCV. No teste de transmissão com chance de escolha do vetor, verificou-se alta suscetibilidade de quase todas as espécies à infecção com o ToCV. Também se encontrou que a grande maioria das espécies suscetíveis ao vírus exibiu boa preferência à oviposição de *B. tabaci* biótipo B. Porém, as espécies da família Amaranthaceae mostraram os menores valores para estas duas variáveis. No teste de recuperação do ToCV para plantas de tomate, todas as espécies identificadas como suscetíveis ao vírus mostraram ser boas fontes de inóculo do patógeno. A eliminação de hospedeiros alternativos do vírus presentes na vegetação espontânea, restos de culturas e plantas voluntárias infectadas deve ser parte das estratégias de manejo do amarelo do tomateiro.

Palavras-chave: Crinivírus; *Solanum lycopersicum*; Tomateiro; Epidemiologia

ABSTRACT

Identification of alternative hosts of *Tomato chlorosis virus*

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most cultivated plants in the world. In Brazil, tomato crops are among the most economic and social crops. In recent years, the incidence of a crinivirus species, *Tomato chlorosis virus* (ToCV), in the main tomato producing states in the country has been constantly observed. The ToCV is transmitted by *Bemisia tabaci* biotype B in a semi-persistent manner. The aim of this study was to identify alternative hosts of the Brazilian isolate of ToCV, which can act as a primary source of inoculum of the pathogen in the field. A Brazilian isolate of the crinivirus (A JQ952600) was inoculated in healthy plants of 73 species, belonging to 14 families, through *B. tabaci* biotype B, in tests with and without chance of choice for the vector. It was also evaluated the preference for vector oviposition on plants used for the free choice transmission test. Finally, the recovery of the virus from susceptible species to tomato plants was carried out by *B. tabaci* biotype B in tests without chance of choice for the vector. The detection of ToCV was done by nested PCR from total RNA extracted from leaf samples. Primer pairs HS-11 / HS-12 and TOC-5 / TOC-6 were used. The specific amplicon of 463 bp of the ToCV was detected in total RNA extracted from 19 species of the Solanaceae and Amaranthaceae families. The identity of the virus isolate was confirmed by nucleotide sequencing of some amplicons. The results confirmed that *Chenopodium album*, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. edwarsonii*, *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *Solanum americanum*, *S. pimpinellifolium*, and *Spinacea oleracea* were susceptible to ToCV infection. *Capsicum annuum*, *Physalis angulata*, *P. peruviana*, and *S. tuberosum* var. Asterix, reported as susceptible to ToCV in the field, were experimentally infected. *Beta vulgaris* var. *cicla*, *Chenopodium quinoa*, *S. aculeatissimum*, *S. melongena* e *S. sessiliflorum* were for the first time identified as susceptible to infection with ToCV. The high susceptibility of the above-mentioned species was confirmed in the free choice transmission test with *B. tabaci* biotype B. It was also found that the vast majority of the susceptible species to the virus exhibited good preference for oviposition of *B. tabaci* biotype B. Except the species of the Amaranthaceae family, which showed the lowest values for both variables. For ToCV recovery test to tomato plants, all species identified as susceptible to the virus proved to be good sources of inoculum of the pathogen. The elimination of alternative hosts of the virus present in natural vegetation, abandoned crops and voluntary infected plant debris should be part of the management strategies of tomato yellowing.

Keywords: Crinivirus; *Solanum lycopersicum*; Tomato; Epidemiology

1 INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é uma das hortaliças mais produzidas e consumidas no Brasil e no mundo. No ano de 2012 a produção mundial foi cerca de 161,7 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2012). Os principais produtores foram a China (28% da produção mundial), os Estados Unidos (8%), a Índia (7,6%) e a Turquia (6%). A Ásia produziu mais da metade (60%) do total mundial, as Américas 15% e a Europa 12%. O Brasil colheu em 2012 quase 2,3% da produção mundial (FAOSTAT, 2012).

Atualmente, a produção de tomate no Brasil tem maior importância nas regiões do Sudeste e Centro-Oeste. Em 2014 o Estado de Goiás detinha a maior participação na produção nacional (37,3%), seguido por São Paulo (30%) e Paraná (10,4%), que juntos concentraram cerca dos 77,7% do total produzido no país (IBGE, 2015).

Em geral, a cultura do tomateiro, nas regiões tropicais e subtropicais é afetada por quebras de rendimento e depreciação da qualidade da matéria prima, em razão da ocorrência de doenças, pragas e estresses abióticos (MELO & VILELA, 2005). Entre as doenças que afetam a cultura, as viroses estão entre as mais problemáticas por causa do difícil controle. Uma dessas viroses, denominada amarelão do tomateiro, é causada por uma espécie do gênero *Crinivirus*, o *Tomato chlorosis virus* (ToCV). Este vírus induz sintomas que incluem amarelecimento internerval, manchas necróticas, enrolamento e engrossamento de folhas mais baixas, etc., reduzindo a produção quantitativa e qualitativa de frutos (WISLER et al., 1998a). A redução do peso dos frutos, quando as plantas são infectadas bem jovens, pode ser da ordem de 50% (MANSILLA, 2015).

No Brasil, o ToCV teve a sua primeira constatação no ano de 2006 em tomateiros na região de Sumaré, São Paulo (BARBOSA et al., 2008), e posteriormente foi relatado nos estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais e Rio de Janeiro (BARBOSA et al., 2011). A presença do ToCV nesses estados é uma forte indicação de que o vírus pode

estar presente em outros estados, se não em todas as regiões produtoras de tomate do Brasil, visto que *Bemisia tabaci* biótipo B, um dos vetores mais eficiente deste vírus, é encontrado em todo o país. O aleirodideo *B. tabaci* biótipo B, mais recentemente referido por MEAM1, é uma praga cosmopolita e uma das mais importantes invasoras do mundo, características que facilitam a disseminação do vírus, tanto na cultura do tomateiro como em outros hospedeiros cultivados e silvestres (DE BARRO et al., 2011)

O manejo do amarelão em tomateiro baseia-se principalmente no controle químico do vetor, que geralmente não tem sido eficaz. Não há variedades ou híbridos de tomateiros comerciais resistentes ao crinivirus. Raras são as recomendações de medidas culturais para o manejo da doença, entre as quais a erradicação de fontes de inóculo que incluem tomateiros velhos infectados e hospedeiros alternativos do vírus.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi determinar os principais hospedeiros do ToCV que podem atuar como fonte de inóculo primária do patógeno, para obter subsídios que auxiliem na elaboração de estratégias de manejo da doença no campo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O tomateiro

O centro de origem do tomateiro é a região andina do continente americano. Ele foi domesticado durante as civilizações Inca e Asteca e levado à Europa no século XVI. O tomateiro pertence à família Solanaceae que possui mais de 3.000 espécies, incluindo muitas de importância econômica como a batateira, a berinjela, o fumo e o pimentão. O gênero *Solanum* é o maior dentro da família e compreende 1200 a 1700 espécies diferentes (BERGOUNGNOUX, 2014).

A produção mundial de tomate teve uma expansão acentuada nos últimos anos, e a causa desse crescimento é atribuída à industrialização em larga escala, o aumento da demanda de alimentos preparados nas diversas formas, às refeições fora do domicílio, etc. (DIEESE, 2010). Também houve um acréscimo no consumo de derivados de tomate devido ao aumento da população urbana, embora de forma heterogênea, conforme as regiões no mundo e de acordo com a renda per capita da população (Camargo et al., 2006).

O Brasil tem uma área cultivada com tomateiro equivalente a 63.632 ha, com uma produção anual de 4.041.795 t e uma produtividade média de 63,5 t/ha. É o nono produtor mundial de tomate (FAO, 2012). Mais de 70% da produção de tomate no Brasil está concentrada nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, principalmente nos estados de Goiás (37,3%), São Paulo (30%) e Paraná (10,4%) (IBGE, 2015).

A cadeia produtiva do tomate é uma das mais importantes da indústria alimentícia sendo a produção um dos elos iniciais. Segundo estudo sobre “Desenvolvimento do Sistema Agroindustrial do Tomate”, devido às características intrínsecas na produção, beneficiamento, processamento e comercialização, os cultivos de tomate são destinados ao consumo *in natura* e ao abastecimento industrial, constituindo-se em duas cadeias

produtivas distintas desde as variedades utilizadas, formas de cultivo até o consumo final (CAMARGO et al., 2006).

A importância do tomate está relacionada ao seu alto consumo no mundo e ao seu valor nutritivo, pois é rico em vitaminas A, C e K (MARANCA, 1981). Seus efeitos benéficos na prevenção de doenças, principalmente do câncer e patologias cardíacas, estão bem documentadas (LEVI & SHARONI, 2004). Os carotenoides são reconhecidos por terem papel importante na prevenção de doenças humanas, além de serem potentes antioxidantes (RAO & RAO, 2007).

2.2 Amarelão do tomateiro causado pelo *Tomato chlorosis virus*

O ToCV foi primeiramente identificado na Florida, onde vinha causando a doença conhecida como “Yellow dwarf disorder of tomato”. Depois disso, o ToCV foi detectado causando sérios prejuízos em cultivos de tomateiro e de pimentão em 20 países, entre os quais os Estados Unidos, Portugal, Espanha, Porto Rico, Itália, Grécia, Taiwan, Israel, México e Brasil (NAVAS-CASTILLO et al., 2011).

Sintomas induzidos pelo vírus no tomateiro incluem amarelecimento internerval, manchas necróticas, enrolamento e engrossamento das folhas baixas, enquanto as folhas superiores parecem normais. Outros sintomas são a redução do vigor das plantas e senescência precoce dependendo do hospedeiro (WISLER et al., 1998a; WINTERMANTEL, 2004). Os sintomas de ToCV em tomateiro podem aparecer dentro de 3 a 4 semanas após a inoculação do vírus (WINTERMANTEL & WISLER, 2006). Ocorre uma redução do rendimento das plantas devido à perda de área fotossintética. Apesar de não ocorrer sintomas óbvios nas frutas, a produção é frequentemente afetada pela redução do tamanho e do número de frutos. Na Espanha, incidências de até 30% de tomateiros infectados foram observadas em áreas com elevadas populações do vetor (NAVAS-CASTILLO et al., 2010). Em ensaios de avaliação de resistência/tolerância de diferentes

genótipos de tomateiro ao amarelão causado pelo ToCV, a redução do peso dos frutos colhidos das plantas infectadas quando jovens variou de 21 a 52 %, quando comparada com os frutos colhidos das respectivas plantas sadias (MANSILLA, 2015).

No Brasil, o ToCV teve sua primeira constatação no ano 2006 em tomateiros na região de Sumaré, São Paulo (BARBOSA et al., 2008). Posteriormente, foi constatado nos estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais e Rio de Janeiro (BARBOSA et al., 2011). Acredita-se que esse vírus já estava ocorrendo no Brasil a mais tempo, porém os sintomas foram erroneamente atribuídos à fitotoxidez por uso de agroquímicos ou a desordens nutricionais, como relatado na literatura internacional (BARBOSA et al., 2008). Há também um relato de infecção de tomateiros por um closterovirus na região de Campinas, SP, em 1998, transmitido por *B. tabaci*, cuja descrição dos sintomas é semelhante aos causados pelo ToCV (PAVAN et al., 1999).

Dentro da família *Closteoviridae*, o gênero *Crinivirus* inclui as espécies transmitidas por aleirodídeos, e os gêneros *Ampleovirus* e *Closterovirus* contêm aquelas transmitidas por pulgões e cochonilhas, respectivamente (LIVERATUS et al., 2004). A maioria dos crinivirus possui partículas filamentosas e um genoma composto por duas moléculas de RNA de fita simples, senso positivo. Exceção para o *Potato yellow vein virus* (PYVV) que possui três moléculas de RNA. As duas moléculas de RNA, denominadas RNA 1 e RNA 2, são independentemente encapsidadas. O RNA1 codifica proteínas envolvidas na replicação e o RNA 2 codifica proteínas envolvidas na encapsidação do RNA, movimento e transmissão pelo vetor (KARASEV, 2000; LIVERATUS et al., 2004; MARTELLI et al., 2002). O comprimento das partículas varia de 650-850 nm e 700-900 nm. (MARTELLI et al., 2002). O RNA 1 do isolado brasileiro é constituído por 8594 nucleotídeos e contém quatro fases abertas de leitura (open reading frame – ORF) e o RNA 2 é constituído por 8242 nucleotídeos e contém nove ORFs (ALBUQUERQUE et al., 2013).

As sequências parciais de nucleotídeos do gene que codifica a proteína HSP70h (homóloga da “heat shock protein”) de todos os isolados brasileiros do ToCV, incluindo o primeiro isolado detectado no país, apresentam 99,9 a 100% de identidade com sequências de nucleotídeos correspondentes de outros isolados encontrados ao redor do mundo. Esta baixa diversidade genética sugere que todos os isolados brasileiros do ToCV podem ter sido originados a partir de uma única fonte (BARBOSA et al., 2013). Análises filogenéticas usando sequências de nucleotídeos completas do RNA 1 e do RNA 2 de um isolado brasileiro do ToCV estão intimamente relacionadas com as sequências de nucleotídeos correspondentes de isolados do ToCV da Grécia (ALBUQUERQUE et al., 2013).

O ToCV é um vírus limitado ao floema e transmitido de forma semi-persistente pelo vetor (WISLER et al., 1998b). A notável propriedade biológica do ToCV é sua capacidade de ser transmitido por três espécies de aleirodídeos: *B. tabaci* biótipos A e B, *Trialeurodes abutilonea* e *T. vaporariorum* (WISLER et al., 1998b; WINTERMANTEL et al., 2004). *B. tabaci* biótipo B e *T. abutilonea* são os vetores mais eficientes do vírus. Este persiste por até 5 dias em *T. abutilonea*, 2 dias em *B. tabaci* biótipo B, e apenas 1 dia em *B. tabaci* biótipo A e *T. vaporariorum*. (WINTERMANTEL & WISLER, 2006). No Brasil não há relato da presença de *T. abutilonea*, porém sabe-se que *T. vaporariorum* também transmite o ToCV (FREITAS et al., 2011). Em estudos de relações de *B. tabaci* biótipo B com um isolado brasileiro do ToCV os períodos mínimos de acesos à aquisição e à inoculação foram de cinco minutos, respectivamente (FREITAS, 2012).

2.3 Hospedeiros do ToCV

O ToCV já foi encontrado infectando naturalmente plantas de *Zinnia elegans* em Taiwan (TSAI et al., 2004) e *Solanum nigrum* na Espanha (FONT et al., 2004). Em Portugal foram encontradas plantas de *Physalis ixocarpa* e *P. peruviana* infectadas naturalmente

com o ToCV e apresentando clorose internerval (TRENADO & LOURO, 2007). Na Coréia do Sul foram encontradas infectadas naturalmente com o ToCV as espécies: *Cardamine flexuosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Conyza canadensis*, *Erigeron annuus*, *Ipomoea hederacea*, *Mazus pumilus*, *Phytolacca americana*, *Quamoclit coccinea*, *Solanum americanum*, *Sonchus asper*, *Stellaria media*, *Trigonotis peduncularis*, *Vicia tetrasperma*, *V. angustifolia* var. *segetilis* e *Youngia japonica* (KIL et al., 2015).

No Brasil, no estado de São Paulo, plantas de *Physalis angulata* dentro e em torno nos campos de tomateiro com alta incidência de ToCV foram encontradas exibindo clorose nas folhas inferiores. As plantas também apresentavam altas populações de aleirodídeos (FONSECA et al., 2007). Na Espanha, sintomas de amarelecimento e/ou avermelhamento internerval foram observadas em plantas de *Chenopodium album*, *C. murale* e *Solanum nigrum* encontradas em torno de campos de tomateiros (FONT, 2004).

Experimentalmente o vírus já foi transmitido para 25 espécies de plantas de sete famílias diferentes: Aizoaceae (*Tetragonia expansa*), Amaranthaceae (*Gomphrena globosa*), Apocynaceae (*Vinca rosea*), Chenopodiaceae (*Beta macrocarpa*, *Chenopodium capitatum*, *C. murale*, *Spinacia oleracea*), Compositae (*Callistephus chinensis*, *Calendula officinalis*), Plumbaginaceae (*Limonium latifolium*), Solanaceae (*Capsicum annuum*, *Cyphomandra betaceae*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. edwardsonii*, *N. glutinosa*, *N. megalosiphon*, *N. tabacum*, *Petunia hybrida*, *Physalis alekengi*, *P. ixocarpa*, *P. wrightii*, *Solanum lycopersicum*, *S. nigrum*, *S. acaule*) e Umbeliferaceae (*Anthriscus cereifolium*) (WINTERMANTEL e WISLER, 2006; MORRIS et al., 2006). *P. wrightii* e *N. benthamiana* foram relatadas como fontes de inóculo com infecções múltipla do *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) e ToCV (WINTERMANTEL et al., 2008). No Brasil, o ToCV já foi transmitido experimentalmente para *C. annuum*, *C. album*, *C. ambrosoides*, *Datura*

stramonium, *G. globosa*, *N. physalodes*, *N. benthamiana*, *N. glutinosa* e *S. americanum* (BARBOSA, dados não publicados).

O ToCV foi reportado no Brasil infectando naturalmente plantas de pimentão (*C. annuum*) e de batata (*S. tuberosum*) por Barbosa et al., (2008) e Freitas et al., (2012) respectivamente. Também foi detectado nos tubérculos de plantas de batata infectadas que posteriormente produziram plantas infectadas na Espanha (FORTES & NAVAS-CASTILLO, 2012).

Os sintomas variam dependendo do hospedeiro, mas geralmente induz intenso amarelecimento, nanismo e enrolamento das folhas em uma ampla gama de espécies de ervas daninhas e culturas comerciais (WINTERMANTEL & WISLER, 2006).

Em estudos da dinâmica temporal e espacial da doença causada pelo ToCV em tomateiro na região de Sumaré, São Paulo, constatou-se um forte efeito de bordos, o que corrobora com a hipótese da importância das fontes externas de inoculo no desenvolvimento da doença (CALAÇA, 2011).

2.4 Manejo da doença

O manejo de doenças causadas por vírus transmitidos por *B. tabaci* biótipo B tem sido muito difícil. No caso do tomateiro, o uso de híbridos resistentes/tolerantes tem sido recomendado quanto disponíveis. Outras medidas recomendadas para o controle de doenças causados por begomovirus também transmitidos por *B. tabaci*, que também podem ser recomendadas para o controle do amarelão são: (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 à culturas como soja, feijoeiro o algodoeiro, por estas serem hospedeiras de

aleirodídeos; (vi) efetuar o controle químico racional da *B. tabaci* biótipo B; e (vii) adubar as plantas adequadamente (INOUE-NAGATA et al., 2009).

Atualmente, o método mais usado para reduzir as perdas do amarelão em tomateiros é o controle do vetor com inseticidas. Produtos à base de Imidacloprid são os mais frequentemente utilizados para o controle de *B. tabaci*, e podem ser aplicados por meio da pulverização da folhagem, tratamento de sementes ou por meio de aplicação por gotejamento. (WINTERMANTEL, 2004). Enquanto os inseticidas reduzem efetivamente populações do vetor, esse método de controle é ineficiente para o controle da infecção com o vírus, porque o inseto pode transmiti-lo antes de ser morto pelo inseticida (WINTERMANTEL, 2004).

Para as culturas afetadas por vírus transmitidos por *B. tabaci* e que são inicialmente produzidas em condições controladas para posterior transplante, como é o caso do tomateiro, as plantas podem ser protegidas contra infestação de adultos por meio de túneis de malha fina, que permitem passagem da luz e de ar, mas que impedem a entrada de insetos (LOURENÇÃO, 2002). A detecção do vírus no material produzido em viveiros, juntamente com o controle eficaz do vector irá reduzir a disseminação do vírus, bem como limitar os danos às culturas sensíveis, tanto em ambientes de estufa como de campo (WINTERMANTEL, 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Plantas-teste

Foram avaliadas diferentes espécies de plantas daninhas e cultivadas da coleção de sementes do Laboratório de Virologia do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP (Tabela 1). As sementeiras foram feitas em vasos de alumínio, contendo composto de solo mais matéria orgânica. As plantas foram mantidas em casa de vegetação.

3.2 Fonte de inóculo do ToCV

Foi utilizado um isolado do ToCV obtido de planta de tomate, coletado em Piracicaba (SP). Sua identidade foi confirmada por sequenciamento parcial de nucleotídeos do genoma viral. As plantas infectadas foram mantidas em gaiolas com *voil* à prova de insetos em casa de vegetação.

3.3 Colônia de *B. tabaci* biótipo B

Colônia do aleirodídeo *B. tabaci* biótipo B livre de vírus, iniciada com adultos coletados em São Paulo, foi mantida em plantas de couve (*Brassica oleraceae*), em telado à prova de insetos, no interior da casa de vegetação no Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP.

3.4 Detecção do ToCV

3.4.1 Extração de RNA total

A extração do RNA total foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante do Trizol LS (Invitrogen). Discos foliares amostrados foram acondicionados no interior de tubos de micro centrifuga 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. A mistura foi agitada vigorosamente e incubada por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio em cada

tubo. A suspensão foi centrifugada a 12000 g por 15 min, a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol e a mistura foi agitada lentamente. A solução foi incubada à temperatura ambiente por 10 min e centrifugada a 12000 g por 10 min a 4°C para a precipitação do RNA. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70%. Em seguida foi feita a centrifugação a 7000 g por 5 min a 4°C e o etanol foi descartado cuidadosamente para que o precipitado não fosse eliminado. O precipitado foi seco à temperatura ambiente e dissolvido em 30 µL de água com DEPC (Diethylpyrocarbonate). RNA total extraído de tomateiro infectado com o ToCV e de tomateiro sadio foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.4.2 RT-PCR

A detecção do ToCV foi feita por nested-PCR a partir de RNA total extraído das folhas das plantas estudadas. Para realizar a síntese da primeira fita do cDNA (RT= Reverse Transcription) 3 µL de RNA total extraído das folhas das plantas inoculadas foram misturados a 7 µL de água “Mili-Q” tratada com DEPC, 1 µL de desoxinucleosídeos trifosfatados (dNTP's 10 mM), 1 µL de oligonucleotídeo iniciador específico (anti-senso) HS-12 (5'- CC(G/T)CCACCAAA(A/T)TCGTA-3') a 20 mM (DOVAS et al., 2002) em tubos do tipo eppendorf de 0,5 mL. A mistura foi acondicionada no termociclador, onde permaneceu incubada a 65°C por 5 min e 2°C por 2 min. Em seguida foram adicionados 5 µL de tampão M-MLV e 1 µL da enzima transcriptase reversa M-MLV. A mistura foi incubada a 37°C por 50 min, 70°C por 15 min, sendo depois mantida a 4°C até sua retirada.

Na primeira reação de PCR foram utilizados 15,3 µL de água tratada com DEPC, 2,5 µL de tampão 10X da enzima Taq DNA polimerase, 0,8 µL de MgCL₂ 50 nM, 1,5 µL de dNTP's 10 mM, 3,0 µL de cDNA, 0,8 µL de 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 da enzima Taq DNA polimerase. Essa solução foi aquecida a 94°C por 3 min e depois submetida a 35 ciclos de 94°C por 30 s, 49°C por 40 s, 72°C por 50 s e uma temperatura final de 72°C por 10 min.

A segunda reação de PCR foi feita da mesma maneira, com a mesma quantidade de reagentes, mas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos (senso) ToC 5 (5'-GGTTTGGATTTTGGTACTACCTTCAGT-3') a 20 mM e Toc 6 (anti-senso) (5'-AAACTGCCTGCATGAAAAGTCTC'3) a 20 mM (DOVAS et al., 2002) na proporção de 0,8 µL cada um e 3,0 µL do produto da primeira reação de PCR. O regime do termociclador foi de 95°C por 1 min com 40 ciclos de 95°C por 20 s, 60°C por 15 s, 72° por 10 s e uma temperatura final de 72°C por 2 min.

O DNA amplificado foi corado com SYBR safe DNA gel stain e separado por electroforese em gel de agarose 1% por cerca de 40 minutos. Os fragmentos de DNA foram visualizados após a eletroforese em transiluminador de luz UV e as imagens foram arquivadas.

3.5 Sequenciamentos de nucleotídeos

Para confirmar a identidade do ToCV usado nos ensaios, os produtos da RT-PCR de algumas amostras representativas foram purificados mediante o kit de purificação Wizard® SV Gel e PCR Clean-up System (Promega) ou PureLink™PCR Purification Kit (Invitrogen), segundo o protocolo de cada fabricante. Os amplicons purificados foram quantificados e mantidos em freezer a -20°C. Estes amplicons foram expedidos juntamente com os oligonucleotídeos iniciadores específicos para a Macrogen Korea, localizada em Seul, Coréia, onde foi realizado o sequenciamento direto de nucleotídeos. Os resultados dos sequenciamentos foram transmitidos de forma on-line através da página web da

empresa (disponível em: <http://dna.macrogen.com/eng/>) e a qualidade das sequências foi analisada pelo Electropherogram Quality Analysis da Embrapa (Disponível em: <http://bioinformatica.cenargem.embrapa.br/phph/>). As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com outras sequências correspondentes disponíveis no Genbank mediante o programa BLASTn (ALTSCHUL, 1997) disponível na página web da National Center for Biotechnology – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.6 Avaliação da reação de diferentes espécies/variedades à infecção com o ToCV

3.6.1 Em teste de transmissão sem chance de escolha do vetor

A transmissão do vírus foi feita por meio do vetor *B. tabaci* biótipo B. Os insetos livres de vírus foram manipulados através de um aspirador constituído de um tubo plástico ligado a tubos de polipropileno de 50 mL (do tipo Falcon). Como fonte de inóculo foram usadas folhas destacadas de tomateiro infectados com o ToCV, as quais foram acondicionadas individualmente em tubos Falcon de 50 mL. Para manter a aeração no ambiente de aquisição do vírus, os tubos foram recobertos por tecido *voil*. Aproximadamente 150 aleirodídeos foram confinados nas folhas no interior do tubo Falcon por um período de 24 h para aquisição do vírus (PAA). Após esse período, os insetos foram coletados e liberados no interior de gaiolas de acrílico contendo cinco plantas saudáveis da espécie vegetal. Uma espécie por gaiola. Como controle da infectividade do ToCV foram usadas plantas de tomateiro, as quais foram acondicionadas em gaiolas confeccionadas com copo plástico e tecido *voil*. Foi usada uma proporção de 15-20 insetos por planta. Para garantir uma transmissão eficiente, o período de acesso à inoculação (PAI) foi de 24 h. Após esse período, os insetos foram eliminados pela pulverização das plantas com inseticida sistêmico. As plantas foram mantidas em casa de vegetação para avaliação com base nos sintomas e detecção do vírus por RT-PCR.

Figura 1- Ilustração das gaiolas usadas no teste de transmissão do ToCV sem chance de escolha do vetor

3.6.2 Em teste de transmissão com chance de escolha do vetor

Para a transmissão do vírus em ensaio com chance de escolha do vetor foram utilizadas somente as espécies vegetais que foram confirmadas como susceptíveis ao ToCV no ensaio sem chance de escolha. Vinte e cinco plantas de tomateiro infectados com o ToCV foram acondicionadas nas laterais e no centro de uma gaiola de 2 x 0,80 x 1,70 m, coberta com *voil*. Também foram acondicionadas 3 plantas de couve contento aleirodídeos. Em seguida, 5 plantas sadias de cada espécie foram expostas entre os tomateiros, para a transmissão do ToCV, por um período de 7 dias. Foram incluídas plantas sadias de tomateiro como controle. O ensaio foi repetido 3 vezes, totalizando 15 plantas por espécie exposta. Após cada período, as plantas foram retiradas da gaiola, pulverizadas com inseticida sistêmico e mantidas em casa de vegetação para avaliação da infecção com base nos sintomas e detecção do vírus por RT-PCR.

Figura 2 - Ilustração da gaiola usada nos testes de transmissão com chance de escolha do vetor. Tomateiros infectados com o ToCV, entre os quais foram distribuídas as espécies a serem testadas

3.7 **Análise da preferência de *B. tabaci* à oviposição em plantas expostas a transmissão com chance de escolha do vetor.**

A oviposição da *B. tabaci* biótipo B nas espécies usadas no teste de transmissão com chance de escolha do vetor foi avaliada através da contagem de ovos em três folhas localizadas nas regiões baixa, intermediária e superior de cada planta. Em cada folha a contagem de ovos foi realizada em três regiões, escolhidas ao acaso, de 1 cm², usando um molde (Figura 3). A identificação dos ovos foi feita com uma lupa de 60 mm de diâmetro e aumento de 16X. As médias de ovos depositados foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 3 - Molde e lupa usados na contagem de ovos de *B. tabaci* biótipo B em folhas das plantas expostas a transmissão do ToCV com chance de escolha do vetor

3.8 Recuperação do ToCV para tomateiros

Para avaliar o potencial de cada espécie suscetível como fonte de inóculo do ToCV, foi realizado um teste de recuperação do vírus para tomateiros saudáveis. Plantas de tomate saudáveis foram inoculadas por meio do vetor *B. tabaci* após aquisição do vírus em folhas destacadas das diferentes espécies de plantas infectadas com o ToCV no teste de transmissão sem chance de escolha. Os insetos foram confinados em folhas de cada espécie, no interior de tubo Falcon de 50 mL por 24 h para aquisição do vírus. Foram usadas ao redor de 150 insetos por tubo. Depois disso foram transferidas para cinco plantas de tomateiro para cada espécie fonte de inóculo. O procedimento de avaliação das plantas foi o mesmo descrito anteriormente.

4 RESULTADOS

4.1 Reação de diferentes espécies à infecção com o ToCV

4.1.1 Em teste de transmissão sem chance de escolha do vetor

Na tabela 1 são apresentados os resultados da reação de 73 espécies, de 14 famílias, à infecção com o ToCV por meio da inoculação com *B. tabaci* biótipo B em teste sem chance de escolha do vetor.

Tabela 1 - Reação de diferentes espécies à infecção com o *Tomato chlorosis virus*, transmitido por *B. tabaci* biótipo B, em teste sem chance de escolha do vetor (Continua)

Espécies	Família	Sintoma	Nº de plantas infectadas/inoculadas
<i>Alternanthera brasiliana</i>	Amaranthaceae	-	0/5
<i>Alternanthera tenella</i>	Amaranthaceae	-	0/5
<i>Amaranthus retroflexus</i>	Amaranthaceae	-	0/5
<i>Amaranthus viridis</i>	Amaranthaceae	-	0/5
<i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i>	Amaranthaceae	CI	3/5
<i>Chenopodium album</i>	Amaranthaceae	AS	5/5
<i>Chenopodium quinoa</i>	Amaranthaceae	AS	2/2
<i>Gomphrena globosa</i>	Amaranthaceae	CD	4/5
<i>Spinacia oleracea</i>	Amaranthaceae	C	5/5
<i>Acanthospermum hispidum</i>	Asteraceae	-	0/5
<i>Galinsoga parviflora</i>	Asteraceae	-	0/5
<i>Helianthus annuus</i>	Asteraceae	-	0/5
<i>Lactuca sativa</i>	Asteraceae	-	0/5
<i>Parthenium hysterophorus</i>	Asteraceae	-	0/5
<i>Porophyllum ruderale</i>	Asteraceae	-	0/5
<i>Zinnia elegans</i>	Asteraceae	-	0/5
<i>Crambe cordifolia</i>	Brassicaceae	-	0/5
<i>Raphanus sativus</i>	Brassicaceae	-	0/5
<i>Citrullus lanatus</i>	Cucurbitaceae	-	0/5
<i>Cucumis melo</i>	Cucurbitaceae	-	0/5
<i>Cucumis metuliferus</i>	Cucurbitaceae	-	0/5
<i>Cucumis sativus</i>	Cucurbitaceae	-	0/5
<i>Cucurbita maxima</i>	Cucurbitaceae	-	0/5

Tabela 1 - Reação de diferentes espécies à infecção com o *Tomato chlorosis virus*, transmitido por *B. tabaci* biótipo B, em teste sem chance de escolha do vetor (Continuação)

Espécies	Família	Sintoma	Nº de plantas infectadas/inoculadas
<i>Cucurbita moschata</i>	Cucurbitaceae	-	0/5
<i>Cucurbita pepo</i>	Cucurbitaceae	-	0/5
<i>Lagenaria siceraria</i>	Cucurbitaceae	-	0/5
<i>Luffa aegyptiaca</i>	Cucurbitaceae	-	0/5
<i>Trichosanthes cucumerina</i>	Cucurbitaceae	-	0/5
<i>Euphorbia heterophylla</i>	Euphorbiaceae	-	0/5
<i>Arachis hypogaea</i>	Fabaceae	-	0/5
<i>Cajanus cajan</i>	Fabaceae	-	0/5
<i>Crotalaria breviflora</i>	Fabaceae	-	0/5
<i>Crotalaria juncea</i>	Fabaceae	-	0/5
<i>Crotalaria lanceolata</i>	Fabaceae	-	0/5
<i>Desmodium tortuosum</i>	Fabaceae	-	0/5
<i>Leucaena leucocephala</i>	Fabaceae	-	0/5
<i>Medicago sativa</i>	Fabaceae	-	0/5
<i>Phaseolus lunatus</i>	Fabaceae	-	0/5
<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	-	0/5
<i>Senna occidentalis</i>	Fabaceae	-	0/5
<i>Vigna mungo</i>	Fabaceae	-	0/5
<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	-	0/5
<i>Abelmoschus esculentus</i>	Malvaceae	-	0/5
<i>Mirabilis jalapa</i>	Nyctaginaceae	-	0/5
<i>Passiflora caerulea</i>	Passifloraceae	-	0/5
<i>Passiflora edulis</i>	Passifloraceae	-	0/5
<i>Passiflora foetida</i>	Passifloraceae	-	0/5
<i>Passiflora morifolia</i>	Passifloraceae	-	0/5
<i>Passiflora mucronata</i>	Passifloraceae	-	0/5
<i>Passiflora suberosa</i>	Passifloraceae	-	0/5
<i>Portulaca oleracea</i>	Portulacaceae	-	0/5
<i>Polygonum convolvulus</i>	Polygonaceae	-	0/5
<i>Ruta graveolens</i>	Rutaceae	-	0/5
<i>Richardia brasiliensis</i>	Rubiaceae	-	0/5
<i>Capsicum annum</i>	Solanaceae	Cl	3/5

Tabela 1 - Reação de diferentes espécies à infecção com o *Tomato chlorosis virus*, transmitido por *B. tabaci* biótipo B, em teste sem chance de escolha do vetor (Conclusão)

Espécies	Família	Sintoma	Nº de plantas infectadas/inoculadas
<i>Capsicum baccatum</i>	Solanaceae	-	0/5
<i>Capsicum chinense</i>	Solanaceae	-	0/5
<i>Datura stramonium</i>	Solanaceae	CI	5/5
<i>Nicandra physalodes</i>	Solanaceae	-	0/5
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Solanaceae	CI	5/5
<i>Nicotiana clevelandii</i>	Solanaceae	CI	5/5
<i>Nicotiana edwarsonii</i>	Solanaceae	CI	5/5
<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanaceae	CI	5/5
<i>Physalis angulata</i>	Solanaceae	CI	5/5
<i>Physalis peruviana</i>	Solanaceae	C	5/5
<i>Solanum aculeatissimum</i>	Solanaceae	CI	3/3
<i>Solanum americanum</i>	Solanaceae	CI	5/5
<i>Solanum gilo</i>	Solanaceae	-	0/5
<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	AS	4/5
<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Solanaceae	CI	4/5
<i>Solanum sessiliflorum</i>	Solanaceae	CI	5/5
<i>Solanum tuberosum</i> var. <i>asterix</i>	Solanaceae	CI	4/5

C: clorose; CD: clorose difusa CI: Clorose internerval; AS; assintomática

Também foram inoculadas 10 e 12 variedades, respectivamente das espécies *Glycine max* (Conquista, Mirador, BRS-154, TM6 801, BRS-184, M72-51, BINX Potência RR, BRS-132, BRS-295 RR e RS 607560) e *Phaseolus vulgaris* (BT2, Feijao Branco, Pérola, Milênio, Harmonia, Estilo, Imperador, Tangara, Canário 101, Tybata, Alvorada e Carioquiña). Nenhuma planta das variedades destas duas espécies exibiu sintomas de infecção e o vírus não foi detectado por Nested-PCR. Todas as plantas de tomateiro utilizadas como controle da infectividade dos insetos foram infectadas com o ToCV.

4.1.2 Em teste de transmissão com chance de escolha do vetor

Na tabela 2 são apresentados os resultados de três ensaios independentes de transmissão do ToCV para espécies vegetais previamente identificadas como suscetíveis ao vírus, por meio de *B. tabaci* biótipo B, sem chance de escolha do vetor. *Solanum aculeatissimum* e *Beta vulgaris* var. *cicla* não foram incluídas no teste de transmissão com chance de escolha e na análise de preferência à oviposição do vetor *B. tabaci* biótipo B, pois a constatação da suscetibilidade dessas espécies ao ToCV ocorreu após a realização destes ensaios.

Tabela 2 - Infecção de espécies suscetíveis ao ToCV em teste de transmissão por *B. tabaci*, com chance de escolha do vetor

Espécies	N° de plantas infectadas/inoculadas			% total de plantas infectadas
	Primeiro ensaio	Segundo ensaio	Terceiro ensaio	
<i>Solanum lycopersicum</i>	5/5	5/5	5/5	100
<i>Solanum melongena</i>	5/5	5/5	5/5	100
<i>Solanum sessiliflorum</i>	5/5	5/5	5/5	100
<i>Solanum americanum</i>	5/5	5/5	5/5	100
<i>Physalis peruviana</i>	5/5	5/5	5/5	100
<i>Physalis angulata</i>	5/5	5/5	5/5	100
<i>Datura stramonium</i>	5/5	5/5	5/5	100
<i>Nicotiana tabacum</i>	5/5	5/5	4/5	93,3
<i>Nicotiana clevelandii</i>	5/5	5/5	4/5	93,3
<i>Nicotiana edwarsonii</i>	4/5	5/5	5/5	93,3
<i>Nicotiana benthamiana</i>	5/5	4/5	5/5	93,3
<i>Solanum pimpinellifolium</i>	4/5	5/5	3/5	80
<i>Solanum tuberosum</i>	4/5	3/5	4/5	73,3
<i>Gomphrena globosa</i>	3/5	3/5	3/5	60
<i>Nicotiana glutinosa</i>	2/5	2/5	3/5	46,6
<i>Spinacea oleracea</i>	1/5	2/5	2/5	33,3
<i>Chenopodium album</i>	2/5	1/5	1/5	26,6
<i>Capsicum annuum</i>	1/5	2/5	0/5	20
<i>Chenopodium quinoa</i>	0/5	1/5	0/5	6,6

4.2 Recuperação do ToCV das espécies suscetíveis para tomateiros

A porcentagem de transmissão do ToCV por *B. tabaci* biótipo B, utilizando como fontes de inóculo folhas destacadas das diferentes espécies infectadas, foi superior à 80%. Na Tabela 3 são apresentados os resultados deste ensaio.

Tabela 3 - Transmissão do *Tomato chlorosis virus* de diferentes espécies suscetíveis, por *Bemisia tabaci* biótipo B, para tomateiros

Espécies fontes de ToCV	Nº de tomateiros infectados/inoculados	% de tomateiros infectados
<i>Capsicum annuum</i>	4/5	80
<i>Chenopodium album</i>	4/5	80
<i>Chenopodium quinoa</i>	5/5	100
<i>Datura stramonium</i>	5/5	100
<i>Gomphrena globosa</i>	4/5	80
<i>Nicotiana benthamiana</i>	5/5	100
<i>Nicotiana clevelandii</i>	5/5	100
<i>Nicotiana edwarsonii</i>	4/5	80
<i>Nicotiana glutinosa</i>	5/5	100
<i>Nicotiana tabacum</i>	5/5	100
<i>Physalis angulata</i>	5/5	100
<i>Physalis peruviana</i>	5/5	100
<i>Solanum americanum</i>	5/5	100
<i>Solanum lycopersicum</i>	5/5	100
<i>Solanum melongena</i>	5/5	100
<i>Solanum pimpinellifolium</i>	4/5	80
<i>Solanum sessiliflorum</i>	5/5	100
<i>Solanum tuberosum</i>	4/5	80
<i>Spinacea oleracea</i>	5/5	100

4.3 Oviposição de *Bemisia tabaci* biótipo B em espécies suscetíveis ao

Tomato chlorosis virus

Na tabela 4 são apresentados os resultados da preferência de *B. tabaci* biótipo B para oviposição nas espécies inoculadas com o ToCV, nos ensaios com chance de escolha do vetor.

Tabela 4 - Médias de ovos/cm² em plantas suscetíveis ao ToCV expostas à transmissão do vírus com chance de escolha de *B. tabaci* biótipo B

Primeiro ensaio		Segundo ensaio		Terceiro ensaio	
Espécies	Média de ovos/cm ²	Espécies	Média de ovos/cm ²	Espécies	Média de ovos/cm ²
<i>Nicotiana tabacum</i>	7,28 a	<i>Solanum melongena</i>	10,0 a	<i>Solanum melongena</i>	15,68 a
<i>Solanum melongena</i>	6,10 ab	<i>Nicotiana glutinosa</i>	7,92 ab	<i>Datura stramonium</i>	10,96 ab
<i>Physalis peruviana</i>	5,58 abc	<i>Physalis peruviana</i>	6,72 ab	<i>Physalis peruviana</i>	7,28 abc
<i>Solanum americanum</i>	5,22 abcd	<i>Nicotiana clevelandii</i>	6,46 abc	<i>Nicotiana glutinosa</i>	7,36 abcd
<i>Nicotiana clevelandii</i>	4,76 abcd	<i>Nicotiana edwarsonii</i>	6,32 abc	<i>Nicotiana tabacum</i>	6,64 abcd
<i>Nicotiana edwarsonii</i>	4,52 abcde	<i>Nicotiana tabacum</i>	6,52 abc	<i>Nicotiana edwarsonii</i>	5,68 abcd
<i>Datura stramonium</i>	3,76 abcde	<i>Solanum sessiliflorum</i>	3,56 abcd	<i>Nicotiana clevelandii</i>	5,40 abcd
<i>Nicotiana benthamiana</i>	3,50 abcde	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	3,30 abcde	<i>Nicotiana benthamiana</i>	3,42 bcd
<i>Nicotiana glutinosa</i>	2,90 abcde	<i>Nicotiana benthamiana</i>	3,20 abcde	<i>Solanum sessiliflorum</i>	3,46 bcd
<i>Solanum lycopersicum</i>	2,80 bcde	<i>Solanum americanum</i>	2,96 bcde	<i>Solanum lycopersicum</i>	3,28 bcde
<i>Physalis angulata</i>	2,22 bcde	<i>Solanum lycopersicum</i>	1,94 cde	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	3,24 bcde
<i>Solanum tuberosum</i>	1,92 bcde	<i>Datura stramonium</i>	1,60 def	<i>Physalis angulata</i>	2,96 cdef
<i>Solanum sessiliflorum</i>	1,76 bcde	<i>Solanum tuberosum</i>	1,34 def	<i>Solanum americanum</i>	2,22 cdef
<i>Solanum pimpinellifolium</i>	1,42 cde	<i>Capsicum annuum</i>	0,76 def	<i>Solanum tuberosum</i>	2,21 def
<i>Capsicum annuum</i>	1,00 de	<i>Physalis angulata</i>	0,52 ef	<i>Capsicum annuum</i>	0,76 ef
<i>Gomphrena globosa</i>	0,06 e	<i>Gomphrena globosa</i>	0,04 f	<i>Gomphrena globosa</i>	0,50 f
<i>Spinacea oleracea</i>	0,0	<i>Spinacea oleracea</i>	0,0	<i>Spinacea oleracea</i>	0,0
<i>Chenopodium album</i>	0,0	<i>Chenopodium album</i>	0,0	<i>Chenopodium album</i>	0,0
<i>Chenopodium quinoa</i>	0,0	<i>Chenopodium quinoa</i>	0,0	<i>Chenopodium quinoa</i>	0,0

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

4.4 Identidade do isolado do *Tomato chlorosis virus*

Os resultados da comparação das sequências de nucleotídeos dos amplicons obtidos do isolado viral usado neste trabalho com aquelas sequencias correspondentes disponíveis no NCBI GenBank, acessos KP217197 (China), AY903448 (EUA), DQ136143 (Espanha), KJ433489.1 (Arábia Saudita), JQ288897 (Brasil), mostraram 93-100% de identidade.

5 DISCUSSÃO

Em um dos primeiros estudos da gama parcial de hospedeiros do ToCV, em condições experimentais relatado por Wintermantel & Wisler (2006), foram identificadas como suscetíveis as espécies *Gomphrena globosa*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. tabacum*, *N. edwarsonii*, *N. glutinosa* e *Spinacia oleracea*, e como não suscetíveis as espécies *Arachis hypogaea*, *Cucumis melo*, *C. sativus*, *Cucurbita pepo*, *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris* e *Sonchus oleraceus*. Esses resultados coincidem em grande parte com os obtidos no presente trabalho. No entanto, há duas discrepâncias; o pimentão (*Capsicum annuum*) e a *Datura stramonium* foram relatadas como não suscetíveis por aqueles autores, porém mostraram-se suscetíveis à infecção experimental com o isolado brasileiro do ToCV.

Em outro estudo de gama de hospedeiros feito por Morris et al. (2006) foram relatadas como não suscetíveis as espécies, *Pisum sativus*, *P. vulgaris*, *Raphanus sativus* e *Vicia faba*, concordando com os resultados obtidos no presente trabalho. No mesmo estudo também foram relatadas como não suscetíveis a berinjela (*S. melongena*), a batata (*S. tuberosum*) e o pimentão (*C. annuum*). O ToCV foi reportado no Brasil infectando naturalmente plantas de pimentão (*C. annuum*) e de batata (*S. tuberosum*) por Barbosa et al. (2008) e Freitas et al. (2012), respectivamente. O ToCV também já foi detectado em tubérculos de batata (*S. tuberosum*) infectados que posteriormente produziram plantas infectadas na Espanha (FORTES & NAVAS-CASTILLO, 2012). A capacidade de introduzir o vírus em regiões produtoras de solanáceas por meio do plantio de tubérculos infectados coloca-a entre espécies hospedeiras mais importantes do ToCV para a sua sobrevivência e disseminação. A berinjela mostrou-se suscetível a este crinivirus no presente trabalho.

Entre as espécies relatadas na literatura como hospedeiras do ToCV mas que não foram identificadas como tal no presente trabalho se encontram *Zinnia elegans* (TSAI et al., 2004) e *Nicandra physaloides* (BARBOSA, dados não publicados)

Plantas de fumo (*N. tabacum*) foram suscetíveis à infecção experimental com o ToCV (WINTERMANTEL & WISLER, 2006) e encontradas naturalmente infectadas com esse crinivirus na Espanha (FIALLO-OLIVÉ et al., 2014). Neste país

as plantas de fumo infectadas com o ToCV e infestada com o aleirodídeo *B. tabaci* estavam no exterior de casas de vegetação contendo plantas de tomate também infectadas com o ToCV. No Brasil, a região sul é responsável por 94,4% da produção total de fumo em folhas do país. Na safra 2013/2014, 52% foi produzido no Rio Grande do Sul, 29% em Santa Catarina e 19% no Paraná (AFUBRA, 2015). A suscetibilidade desta espécie ao isolado brasileiro do ToCV, associada à afinidade com o vetor, encontrada na análise de preferência a oviposição no teste com chance de escolha, demonstra o potencial desta planta em influir na epidemiologia da doença em culturas de solanáceas. Não há até o momento relato de infecção natural do fumo com o ToCV no Brasil.

No Brasil, já foi relatada a infecção natural de plantas de *Physalis angulata* com o ToCV no estado de São Paulo (Fonseca et al. 2013). Os autores mencionaram que as plantas tinham uma grande infestação de *B. tabaci* e comprovaram a transmissão do vírus para plantas de tomate. No Brasil são reconhecidas 11 espécies de *Physalis* (D'ARCY et al., 2005). *P. angulata* é nativa da América do Sul e no Brasil é popularmente conhecida como camapú, balãozinho, juá de capote, bucho-de-rã, camambu, mata-fome, bate-testa e balão-rajado (MUNIZ et al., 2011). É uma espécie amplamente utilizada na medicina popular como anticoagulante, anti-inflamatório, antisséptico, analgésico, etc. (CHIANG et al., 1992). É uma planta daninha bastante frequente em quase todo o território brasileiro (LORENZI, 2006). A espécie está frequentemente presente em campos de produção de tomate, devido à sua tolerância natural aos herbicidas usados atualmente na produção desta olerícola (FONSECA et al., 2013), tornando-a importante fonte de inóculo primário do patógeno.

Plantas de *Physalis peruviana* apresentando clorose internerval infectadas naturalmente com o ToCV foram encontradas em Portugal (TRENADO et al., 2007). *P. peruviana* é uma frutífera de grande valor nutricional e econômico que está sendo incorporada no quadro das pequenas frutas no Brasil, onde a *Physalis* é popular no Norte e Nordeste, mas é novidade nas regiões Sul e Sudeste (CHAVES, 2006). Ela pode ser encontrada nos mercados locais, principalmente em São Paulo e Rio de Janeiro, mas ainda tem sido importada da Colômbia a preços elevados, pois a produção brasileira ainda é pequena (RODRIGUES et al., 2009). Inicialmente, a

planta cresce de forma herbácea, a partir do segundo ano constitui um arbusto perene (FISCHER, 2000). Além da suscetibilidade ao isolado brasileiro do ToCV, as médias de oviposição do vetor nesta espécie foram das mais altas (Tabela 3), características que junto ao fato de ser uma planta perene, pode torna-la importante fonte de inóculo do vírus o ano todo.

Entre a outras espécies de plantas daninhas, *D. stramonium* e *Chenopodium album* foram suscetíveis ao ToCV no estudo feito por Barbosa (dados não publicados) e plantas de *Solanum americanum* (Sin. *S. nigrum*) foram encontradas infectadas naturalmente no Uruguai (ARRUABARRENA et al., 2015), na Espanha (FONT et al., 2000) e na Coréia do Sul (KIL et al., 2015). *S. americanum* é uma planta bastante frequente em todo o país, infestando geralmente áreas de lavouras anuais e perenes, pomares, cafezais, jardins e terrenos baldios (LORENZI, 2006). A distribuição e a abundância de *S. americanum* no território brasileiro, junto com a suscetibilidade ao ToCV (Tabela 1) e a capacidade de servir de fonte de inóculo do vírus (Tabela 4) colocam-na entre as espécies hospedeiras do vírus de grande importância entre as ervas daninhas.

D. stramonium é bastante frequente, infestando lavouras anuais, pastagens, pomares, beira de estradas e terrenos baldios. É muito mais frequente na Região Sul do Brasil (LORENZI, 2006). A suscetibilidade ao vírus e a afinidade com o vetor, encontrada nos ensaios feitos no presente trabalho, demonstra o potencial desta espécie em influir na epidemiologia da doença.

S. pimpinellifolium já foi relatada como suscetíveis ao ToCV por Mansilla (2015). A espécie é uma parente próxima de *S. lycopersicum*, é resistente ao ácaro-rajado porque possui tricomas glandulares tipo IV (ALBA et al., 2009; FERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., 2003). Híbridos obtidos pelo cruzamento desta espécie com o tomateiro 'Moneymaker' foram estudados para avaliar a resistência ao vetor *B. tabaci*. Estudos de EPG (*electrical penetration graph*) indicaram que adultos do aleirodideo passaram mais tempo sem se alimentar no híbrido e mostraram capacidade reduzida para iniciar as picadas no tecido vegetal. Em estudo de mesma natureza feito por Silva et al. (2012) as maiores densidades de tricomas glandulares, com predominância do tricoma tipo IV, ocorreram nos híbridos que apresentaram as

menores infestações de *B. tabaci*. Assim, concluiu-se que a resistência a este aleirodideo está relacionada à densidade de tricomas e aos teores de acilaçúcares, confirmando o potencial de *S. pimpinellifolium* nos programas de melhoramento do tomateiro. No presente trabalho não foram encontradas diferenças significativas na oviposição de *B. tabaci* em *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* (Tabela 4) e as porcentagens de infecção das plantas com o ToCV foram de 80% e 100%, respectivamente, (Tabela 2).

Beta vulgaris var. *cicla*, *C. quinoa*, *Solanum aculeatissimum*, *S. melonegena* e *S. sessiliflorum*, não parecem ter sido previamente relatadas como suscetíveis ao ToCV. Não há, todavia, informações sobre infecção natural destas espécies com este crinivírus.

Os grãos de *Chenopodium quinoa* apresentam demanda crescente no mundo, principalmente como alternativa protéica de qualidade com baixo colesterol e por pacientes celíacos (SPEHAR et al., 1997). Na perspectiva de ser produzido em larga escala no Brasil, como alternativa de sucessão (safrinha) no sistema de plantio direto, o grão poderá ser utilizado pelas indústrias de alimentos e rações (SPEHAR, 2002). Pela semelhança, no início da fase vegetativa, *C. quinoa* pode confundir-se com a planta daninha *C. album*, conhecida no Brasil como ançarinha-branca ou erva-formigueira-branca, o que pode causar problemas no cultivo comercial. Esta última ocorre como planta invasora no Sul e, mais recentemente, foi identificada no cerrado (NASCIMENTO, 2000). Ambas as espécies se mostraram assintomáticas quando infectadas com o ToCV, porém de baixa preferência para oviposição de *B. tabaci* biótipo B. Mesmo assim, não podem ser descartadas dentro da epidemiologia da doença devido à grande capacidade de adaptação do vetor em diferentes espécies de plantas.

A berinjela (*S. melongena*) é cultivada em maior escala nos Estados do Paraná, Goiás, São Paulo e Rio de Janeiro (EMBRAPA, 1998). No estudo realizado por Tsai & Wang (1996), indivíduos de *B. tabaci* biótipo B alimentados em berinjela desenvolveram significativamente mais rápido e mostraram uma maior oviposição quando comparados a insetos criados em tomateiro (*S. lycopersicum*), batata-doce (*Ipomoea batatas*), pepino (*C. sativus*) e feijoeiro (*P. vulgaris*). Em outro estudo feito por Qiu et al. (2003) as sobrevivências totais de ovo a adulto de *B. tabaci* biótipo B

em couve (*Brassica oleracea*), berinjela (*S. melongena*), tomateiro (*S. lycopersicum*) e pepino (*C. sativa*) foram maiores na couve e na berinjela, e a taxa intrínseca de crescimento natural para *B. tabaci* em berinjela foi a mais elevada. As plantas de berinjela infectadas com o ToCV no presente trabalho não mostraram sintomas evidentes do vírus e foram as mais preferidas para a oviposição de *B. tabaci* biótipo B no teste com chance de escolha. Essas características colocam-a entre as hospedeiras potenciais do ToCV identificadas no presente trabalho. É necessário investigar a infecção natural da berinjela com esse crinivirus.

S. sessiliflorum, ou cubiu é uma hortaliça-fruto bastante difundida entre os povos indígenas e tradicionais da região Amazônica. É originária da região do alto Orinoco da bacia Amazônica, podendo ser encontrada em toda a Amazônia brasileira, peruana, equatoriana, colombiana e venezuelana (SILVA-FILHO 1998). As plantas desta espécie mostraram uma alta suscetibilidade à infecção com ToCV (Tabela 2) e alguma preferência de *B. tabaci* para oviposição (Tabela 4).

A importância das diferentes espécies identificadas como hospedeiras do isolado brasileiro do ToCV na epidemiologia do amarelão do tomateiro pode variar dependendo dos diferentes ecossistemas nos quais se apresentam, e das espécies vetoras do vírus presentes no Brasil (*B. tabaci* biótipo B e *T. vaporariorum*), as quais também são dependentes da flora nativa do local e condições climáticas regionais.

Deve-se considerar ainda a preferência da espécie vetora para a espécie suscetível ao ToCV. Nos testes de recuperação do crinivirus dessas espécies para tomateiro (Tabela 3) constatou-se que todas foram excelentes fontes do ToCV, quando o vetor foi confinado para a aquisição do vírus. No entanto, algumas exibiram baixíssima preferência para oviposição do inseto (Tabela 4), sugerindo não serem hospedeiras preferenciais para colonização. Portanto, há necessidade de avaliar o real potencial dessas espécies como fonte de inóculo do ToCV em condições naturais, onde o inseto tem chance de escolha entre as espécies cultivadas e daninhas presentes na região.

Outro aspecto a ter em conta para compreender a importância das espécies como fontes de inóculo é o momento do ano em que elas são encontradas no campo, o qual pode variar entre elas e as regiões onde são encontradas. Kil et al.

(2015) ao estudarem hospedeiros do ToCV na Coréia do Sul, propuseram uma visão espaço temporal para destacar as épocas de predominância das diferentes espécies hospedeiras do ToCV. Seguindo aquela visão, no Brasil, espécies de clima temperado como o espinafre (*S. oleracea*) ou a quinoa (*C. quinoa*) podem servir de reservatórios do vírus durante o inverno e servir de fonte de inóculo primária do vírus para os hospedeiros presentes na primavera. Entre as espécies de clima quente, como o fumo, a berinjela, a batata e o pimentão podem servir como fonte de inóculo primária do vírus durante o período da primavera e verão. Por outro lado, plantas infectadas de *P. peruviana*, espécie perene, podem servir de fonte de inóculo o ano todo. Finalmente, as espécies de plantas daninhas *P. angulata* e *S. americanum* podem ser encontradas quase o ano todo em regiões com inverno ameno, dessa forma, podem ser excelentes fontes de inóculo primário do vírus.

Portanto, o planejamento das estratégias para o controle do amarelão do tomateiro deve incluir o manejo das espécies de plantas cultivadas e daninhas suscetíveis ao ToCV, levando-se em consideração as diferentes variáveis citadas e as diferentes regiões do país aonde elas são encontradas. A eliminação de hospedeiros alternativos, restos de cultura e plantas voluntárias visa à erradicação do patógeno, de maneira a reduzir as fontes de inóculo e consequentemente a dispersão vírus. De forma geral, o manejo deverá ser feito principalmente antes do plantio dos tomateiros no campo, visando evitar a infecção das plantas jovens, que podem resultar em perdas significativas na produção.

REFERÊNCIAS

AFUBRA, Associação dos Fumicultores do Brasil. Disponível na Internet em <http://www.afubra.com.br>. Acesso em: 18 ago.2015

ALBA, J.M.; MONTSERRAT, M.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. Resistance to the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) by acylsucroses of wild tomato (*Solanum pimpinellifolium*) trichomes studied in a recombinant inbred line population. **Experimental and Applied Acarology**, Málaga, v 47, p. 35-47, 2009.

ALBUQUERQUE, L.C.; VILLANUEVA, F.; RENATO, O.; RESENDE, R.; NAVAS-CASTILLO, J.; BARBOSA, J.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; Molecular characterization reveals Brazilian *Tomato chlorosis virus* to be closely related to a Greek isolate. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38 n. 4, p 332-336, 2013.

ALTSCHUL, S. GAPPED, B. ; PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, UK, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.

ARRUABARRENA, A.; RUBIO L.; GONZÁLEZ-ARCOS, M.; SÁNCHEZ CAMPOS, S.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S. First report of *Solanum sisymbriifolium* and *S. americanum* as a natural weed Hosts of *Tomato chlorosis virus* (genus Crinivirus) in South America. **Plant disease**, Saint Paul, v 99, p. 895-895, 2015.

BARBOSA, J.C.; COSTA, H.; GIORIA, R.; REZENDE, J.A.M. Ocurrence of *Tomato chlorosis virus* in tomato crops in five Brazilian states. **Tropical Plant Phatology**, Brasília, v.36, p. 256-258, 2011.

BARBOSA, J.C.; REZENDE, J.A.M.; FILHO, B.M. Low Genetic Diversity Suggests a Single Introduction and recent spread of *Tomato chlorosis virus* in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin v. 161, n. 11/12; p. 884–886, 2013.

BARBOZA, 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 on the susceptibility of sweet papper crops to ToCV em Brasil. **Plant disease**, Saint Paul, v. 94. p. 1709, 2008.

BERGOUGNOUX, V. The history of tomato: from domestication to biopharming. **Biotechnology Advances**, Oxford, UK, v. 32, n. 1, p. 170–189, 2014.

CALAÇA, H.A. **Dinâmica temporal e espacial da virose causada por *Tomato chlorosis virus* (ToCV) em tomateiro**, 2011. 101p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

CAMARGO, F.P.; ALVES. S.H.; CAMARGO, W.P.; VILELA, N.J. Cadeia produtiva de tomate industrial no Brasil: resenha da década de 1990, produção regional e perspectivas. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.36, n.11, p. 7-20, 2006.

CHAVES, A.C. **Propagação e avaliação fenológica de *Physalis* sp. na região de Pelotas-RS**. 2006. 65p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.em

CHIANG, H.C.; JAW, S.M.; CHEN, P.M. Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells in vitro. **Anticancer Research**, Taipei, v. 12, n. 4, p. 1155-1162, 1992.

D'ARCY, W.; ROJAS, C.B.; NEE, M.H. Solanaceae. In Flora of the Venezuelan Guayana BERRY, P. ;HOLST, B.; YATSKIEVYCH, K. (ED.). **Missouri Botanical Garden Press**, St. Louis. v.9: p.194-246 ,2005.

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

DIEESE, A. **Produção Mundial e Brasileira de Tomate**. local:editor,2001. 19p.

DOVAS, C.I.; KATIAS, N.I.; AVGELIS. A.D.; Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of yellowing disease of tomato in Greece. **Plant Disease**. Saint Paul,. v. 81, p. 423, 2002.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cultivo da berinjela (*Solanum melongena* L.). Embrapa Hortaliças, Rio de Janeiro, 1998. 26p. (Instruções Técnicas, 15),

FAO. FAOSTAT Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 12 mar. 2014.

FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; SALINAS, M.; ALVAREZ, M.; CUARTERO, J. Inheritance of resistance to two-spotted spider mite and glandular leaf trichomes in wild tomato *Lycopersicon pimpinellifolium*. **American Society for Horticultural Science**, Málaga,. v.128, p.188-195, 2003.

FIALLO-OLIVÉ, E.; ESPINO, A.I.; BOTELLA-GUILLÉN, M.; GÓMEZ-GONZÁLEZ, E.; REYES-CARLOS, J.A.; NAVAS-CASTILLO. J. Tobacco: A New Natural Host of *Tomato chlorosis virus* in Spain. **Plant Disease**. Saint Paul, v. 98, n. 8, p. 1162, 2014.

FISCHER, G. Crecimiento y desarrollo. in: FLÓREZ, V.J.; FISCHER, H.; SORA, A.D. **Producción, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana* L.)**. Bogotá:Universidad nacional de Colombia, 2000. p.9-26.

FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S.; ABREU H.; NOGUEIRA, I.; PEREIRA-CARVALHO, R.C. *Physalis angulata*: A New Natural Host of *Tomato chlorosis virus* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul. v. 97 n.5, p.692. 2007.

FONT. M.I.; JUAREZ M.; MARTINEX, O.; JORDA, C. Curret status and newly discovered natural hosts of *Tomato infectious chlorosis virus* and *Tomato Chlorosis virus* in Spain. **Plant Disease**, Saint Paul. v. 88, p.92, 2002.

FORTES, I.M.; NAVAS-CASTILLO, J. Potato, an experimental and natural host of the crinivirus *Tomato chlorosis virus*. **European Journal of Plant Pathology**, Málaga, v.134, p. 81–86, 2012.

FREITAS, D.M.S.; NARDIN, I.; SHIMOYANA, 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 p.593, 2012.

FREITAS, D.M.S.; REZENDE, J.A.M.; LOURENZAO, A.L.; MATOS, E.S.; (2011) Transmissão do *Tomato chlorosis virus* (ToCV) por *Trialeurodes* no Brasil. **Summa Phytopatologica**, Saint Paul, v. 37 p.15, 2011.

FREITAS, S.D.M. **TRSV e ToCV relações com *B. tabaci* biotipo B e a eficiência de um inseticida no controle da transmissão do TRSV**. 2011. 74p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

GARCÍA-CANO, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. Resistance to *Tomato chlorosis virus* in wild tomato species that impair virus accumulation and disease symptom expression. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 6, p. 582–592, 2010.

INOUE-NAGATA, A.K.; ÁVILA, A.C.; VILLAS BOAS, G.L. **Os geminivirus em sistema de produção integrada de tomate indústria**. Brasília: Embrapa hortaliças, 2009. 12p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA Y ESTADISTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro IBGE, 2013.

KARASEV, A.V. Genetic diversity and evolution of Closteroviruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 293-324, 2000.

KIL, E.; YE-JI LEE, Y.; CHO, S.; AUH, C.; KIM, D.; LEE, K.; KIM, M.; CHOI, H.; KIM, C.; Identification of natural weed hosts of *Tomato chlorosis virus* in Korea by RT-PCR with root tissues. **European Journal of Plant Pathology**, Seúl v. 142, n. 2, p. 419-426, 2015.

LEVI, J.; SHARONI, Y. The functions of tomato lycopene and its role in human health. **American Botanical Council**, Beer-Sheva, v. 62, p.49-56, 2004.

LIVERATUS, I.C.; ELIASO, E.; MULLER, G.; OLSTROORM, R.C.L.; SALAZAR, L.F.; PLEIJ, C.W.A.; COUTTS, R.H.A. Analysis of the RNA of *Potato yellow vein virus*: evidence for a tripartite genome and conserved 3'-terminal structures among members of the genus Crinivirus. **Journal of General Virology**, London, v. 85, p. 2065-2075, 2004.

LORENZI, H. Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional. 6.ed. Nova Odessa:Plantarum, 2006. 269p.,

LOURENÇÃO A.L. Situação atual da mosca branca no Brasil – Medidas de controle. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.153-155, 2002.

MANSILLA, P.J. **Resistência de genótipos de tomateiro à infecção com o *Tomato chlorosis virus* e tolerância à doença**. 2015. 61p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Piracicaba, 2015.

MARANCA, G. **Tomate**: variedades, cultivo, pragas e doenças, comercialização. São Paulo: Livreria Nobel, 1981. 333p.

MARTELLI, G.P.; AGRANOVSKY, A.A.; BAR-JOSEPH, M.; BOSCHIA, D.; CANDRESS, E.T.; COUTTS, R.H.A.; DOLJIA W.; FALK, B.W.; GONSALVES, D.; JELKMANN, W.; KARASEV, A.V.; MINAFRA, A.; NAMBA, S.; VETTEN, H.J.; WISLER, G.C.; YOSHIKAWA N. The Family Clostoviridae revised. **Archives of Virology**, Bari, v.147, p. 2039-2044, 2000.

MELO, P.C.T.; VILELA, N.J. Desafios e perspectivas para a cadeia brasileira do tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p.154-157, 2005.

MORRIS, J.; STEEL, E.; SMITH, P.; BOONHAM, N.; SPENCE, N.; BARKER, I. Host range studies of *Tomato Chlorosis virus*, and Cucumber vein yellowing virus transmitted by *Bemisia tabaci* (Gennadius). **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 114, p. 265-273, 2006.

MUNIZ, J.; KRETZSCHMAR, A.A.; RUFATO, L.; PELIZZA, T.R.; MARCHI, T.; DUARTE, A.E.; LIMA, A.P.F. & GARANHANI, F. Conduction systems for *Physalis* production in southern Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n.3, p.830-838, 2011.

NASCIMENTO, E.P. *Chenopodium album*, um problema no cerrado. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 1, n. 1, p. 1, 2000.

NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 114, p. 219-273, 2011.

PAVAN, M.A.; MELLO, P.C.T.; SITOLIN, I.M. Caracterização parcial de um closterovirus infectando tomateiro na região de Campinas, SP. **Summa Phytopatologica**, Botocatu, v. 25 p.36-37, 1999.

QIU, B.L.; REN, S.X.; LIN L.; MUSA, P.D.; Effect of host plants on the development and reproduction of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Acta Ecologica Sinica**, Guangzhou, v. 23, p.1206-1211, 2003.

RAO, A.V.; RAO, L.G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, Toronro, v.55, n. 3, p. 207-216, 2007.

RODRIGUES, E.; ROCKENBACH, I. I.; CATANEO, C.; GONZAGA, L. V.; CHAVES, E. S.; FETT, R. Minerals and essential fatty acids of the exotic fruit *Physalis peruviana* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.3, p. 642-645, 2009.

SILVA, K.F.A.S.; MICHEREFF, F.M.; FONSECA, M.E.; TEXEIRA, A.C.A.; TORRES, J.B. Resistência de genótipos de tomateiro à *Bemisia tabaci* mediada por tricomas glandulares e acilaçúcares. **Horticultura Brasileira**, Recife, v. 30, p. S1493-S1500, 2012.

SILVA-FILHO, D.F. **Cocona** (*Solanum sessiliflorum* Dunal): Cultivo y utilización. Tratado de Cooperacion Amazonica, Secretaria Pro-Tempore, Caracas, Venezuela,. 1998. 105p.

SPEHAR, C.R. Utilização da quinoa como alternativa para diversificar alimentos. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. Uberlândia, MG: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal/ UFU. 2002. p. 49-58.

SPEHAR, C.R.; SANTOS, R.L.B.; SOUZA, P.M. Novas espécies de plantas de cobertura para o plantio direto. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DO SISTEMA PLANTIO DIRETO, Passo Fundo. EMBRAPA-Trigo, 1997. p. 169-172.

TRENADO, H.P.; ISABEL, M.; FORTES, I.M.; LOURO, D.; NAVAS-CASTILL, J. *Physalis ixocarpa* and *P. peruviana*, new natural hosts of *Tomato chlorosis virus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 118, p. 193–196, 2007.

TSAI, J.G. ; WANG, K.H. Development and Reproduction of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) on Five Host Plants. **Environmental Entomology**, Florida, v. 25, n.4, p. 810-816.1996.

TSAI, W.S.; SHIN, 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.

WINTERMANTEL, W.M.; Progress on management and control of criniviruses in tomato. **CTC Report**,. 2004. 3p.

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

WISLER, G.C.; DUFFUS, J.E.; LIU, H.Y.; LI, H.R. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteoviruses. **Plant Disease**, Saint Paul. v. 82, p. 270-280. 1998a

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