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

**Respostas biológicas e comportamentais de *Bemisia tabaci* (Genn.)
(Hemiptera: Aleyrodidae) a plantas de tomate infectadas com *Tomato
chlorosis virus* (ToCV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e atividades
estiletares associadas à inoculação de ToCV**

Nathalie Kristine Prado Maluta

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

**Piracicaba
2017**

Nathalie Kristine Prado Maluta
Engenheira Agrônoma

Respostas biológicas e comportamentais de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) a plantas de tomate infectadas com *Tomato chlorosis virus* (ToCV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e atividades estiletares associadas à inoculação de ToCV

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES**

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

Piracicaba
2017

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

Maluta, Nathalie Kristine Prado

Respostas biológicas e comportamentais de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) a plantas de tomate infectadas com *Tomato chlorosis virus* (ToCV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e atividades estiletares associadas à inoculação de ToCV / Nathalie Kristine Prado Maluta. – versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - Piracicaba, 2017.

127 p.

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

1. Mosca-branca 2. Relação vírus-vetor-planta hospedeira 3. *Begomovirus* 4. *Crinivirus* 5. *Electrical Penetration Graph*. I. Título

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial a minha mãe Edi, pela educação que me foi dada, por me apoiar SEMPRE e por acreditar na minha capacidade. Muito obrigada!

Ao amigo e ‘namorado’ Thiago, pela amizade e paciência incondicional durante o ano de doutorado-sanduíche e por servir como psicólogo nos momentos em que achei que não seria capaz! Obrigada pelo amor, carinho, dedicação e companheirismo, Te Amo demais e sem você teria sido muito mais difícil!!!!

As minhas pequenas filhas de quatro patas ‘Sophie’ e ‘Lola’, que estiveram comigo em todos os momentos, me trazendo alegria, me dando motivos para continuar e tornando o doutorado muito mais leve e feliz!

As amigas Bruna, Ariane, Fernanda (‘chica’), Lillian e Mariana Bossi que sempre permaneceram próximas mesmo quando havia um oceano de distância entre nós! A amiga mais recente (mas não menos importante) Karla pela amizade, risadas e apoio nos últimos meses do doutorado. Ao amigo Jean, que me faz uma imensa falta e virou um anjo no meio desse processo.

Aos amigos que fiz em Madri mais do que maravilhosos e que sempre tentarei estar por perto: Michele, Andres, Allan e Mariela pelo convívio diário em casa e/ou no laboratório, paciência durante meus “chororôs” e pelos ótimos passeios e noites no “Cien Montaditos” que tivemos! Sem vocês eu não estaria aqui! Los echo de menos todos los días!

Ao Prof. Dr. João R. S. Lopes, pela orientação e ensinamentos durante toda a pós-graduação e por acreditar sempre no meu potencial.

Ao Dr. Alberto Fereres pela co-orientação e ensinamentos durante toda a pós-graduação. Por estar sempre disposto a me ensinar nas análises estatísticas e experimentos, e ter me recebido durante um ano em seu laboratório ICA-CSIC em Madri-Espanha, fatos que permitiram este trabalho de ser concluído com bons resultados.

As pesquisadoras Dr. Elisa Garzo e Dra. Aranzazu Moreno pela amizade, ensinamentos na área de EPG e por terem tido paciência e dedicação em me auxiliar nos experimentos durante os períodos que estive no ICA-CSIC.

Aos companheiros do ICA-CSIC: Michele, Andres, Beatriz, Maria, Sara, Jaime, Gonzalo, Inês, Pablo, Mariela, Ainara e Ana Moreno pela parceria nos trabalhos, amizade durante o ano que estive lá, e aos ensinamentos de espanhol! Ao Sr. Casimiro pela produção de todo material vegetal utilizado.

Aos companheiros do Laboratório de Insetos Vetores da ESALQ-USP: pelo convívio e companheirismo durante todos esses anos.

Ao Dr. Jesús Navas-Castillo por me receber tão bem durante alguns períodos em seu laboratório no Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea ‘La Mayora’, (IHSM-UMA-CSIC) em Málaga-Espanha, e a Dra. Elvira Fiallo-Olivé pela paciência em me ensinar e auxiliar nas hibridizações moleculares.

Ao Dr. André Lourenção do IAC por fornecer a colônia de mosca-branca e sempre contribuir com seus conhecimentos.

Ao Prof. Jorge A. M. Rezende e aos alunos do Departamento de Fitopatologia da ESALQ-USP por fornecerem os isolados de vírus e pelas análises moleculares.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa nos primeiros meses de doutorado.

Agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro fornecendo bolsa nacional (2012/24974-1), projeto temático (2012/51771-4) e bolsa BEPE (2014/26125-7), e a Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ-USP pela oportunidade de poder concretizar mais um projeto.

Agradeço a todos que fizeram, de alguma forma parte desse trabalho, seja diretamente no ambiente de trabalho ou participando da minha vida pessoal. Cada um de vocês é responsável por um pedacinho deste trabalho!

OBRIGADA!

GRACIAS!

EPÍGRAFE

*"Sometimes we have to choose between
what is right and what is easy"*

Albus Dumbledore

"EXPECTO PATRONO"

Harry Potter

*"Nada hay absoluto,
Todo se cambia,
Todo se mueve
Todo revoluciona
Todo vuelve y se va"*

Frida Kahlo

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. PREFERÊNCIA PARA POUSO E COMPORTAMENTO ARRESTANTE DE <i>BEMISIA TABACI</i> (GENN.) (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) EM PLANTAS INFECTADAS COM <i>TOMATO CHLOROSIS VIRUS</i> (TOCV) E <i>TOMATO SEVERE RUGOSE VIRUS</i> (TOSRV)	21
RESUMO.....	21
ABSTRACT	22
2.1. INTRODUÇÃO	23
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.2.1. Material biológico: criação de mosca-branca, plantas e isolados de vírus.....	24
2.2.2. Preferência (com chance de escolha) para pouso de <i>B. tabaci</i> MEAM 1 em plantas infectadas com ToCV e ToSRV	26
2.2.3. Comportamento arrestante (experimento de dupla-escolha) de <i>B. tabaci</i> MEAM 1 após o pouso em plantas não infectadas e infectadas com ToCV e ToSRV.....	28
2.2.4. Análise dos dados.....	28
2.3. RESULTADOS	29
2.4. DISCUSSÃO	38
2.5. CONCLUSÕES	43
3. EFEITOS DIRETO E INDIRETO DO CRINIVÍRUS <i>TOMATO CHLOROSIS VIRUS</i> (TOCV) NO DESEMPENHO BIOLÓGICO DE <i>BEMISIA TABACI</i> (GENN.) (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE)	49
RESUMO.....	49
ABSTRACT	50
3.1. INTRODUÇÃO	51
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	52
3.2.1. Material biológico: criação de mosca-branca, plantas e isolados de vírus.....	52
3.2.2. Efeito direto de ToCV sobre parâmetros biológicos de <i>B. tabaci</i> MEAM 1.....	53
3.2.3. Efeito indireto de ToCV sobre parâmetros biológicos de <i>B. tabaci</i> MEAM 1	55
3.2.4. Análise estatística.....	56
3.3. RESULTADOS	56
3.3.1. Efeito direto de ToCV no desempenho biológico de <i>B. tabaci</i> MEAM 1.....	56
3.3.2. Efeito indireto de ToCV no desempenho biológico de <i>B. tabaci</i> MEAM 1	58
3.4. DISCUSSÃO	61
3.4.1. Efeito direto de ToCV no desempenho biológico de <i>B. tabaci</i>	61
3.4.2. Efeito indireto do vírus ToCV no desempenho biológico de <i>B. tabaci</i>	63
3.5. CONCLUSÕES	65
4. COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE <i>BEMISIA TABACI</i> (GENN.) (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) EM PLANTAS DE TOMATE INFECTADAS COM VÍRUS <i>TOMATO CHLOROSIS VIRUS</i> E <i>TOMATO SEVERE RUGOSE VIRUS</i>	71
RESUMO.....	71
ABSTRACT	72
4.1. INTRODUÇÃO	73
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	75
4.2.1. Material biológico: criação de mosca-branca, plantas e isolados de vírus.....	75
4.2.2. Técnica de Gráficos de Penetração Elétrica - Electrical Penetration Graph (EPG)	77
4.2.3. Marcação das ondas de EPG e análise estatística.....	78
4.3. RESULTADOS	82
4.3.1. Efeito indireto da infecção pelo crinivírus ToCV no comportamento alimentar de <i>B. tabaci</i> MEAM 1	82
4.3.2. Efeito indireto do begomovírus ToSRV no comportamento alimentar de <i>B. tabaci</i> MEAM 1	88
4.4. DISCUSSÃO	93
4.5. CONCLUSÕES	97

5. ATIVIDADES DE PENETRAÇÃO ESTILETAR DE <i>BEMISIA TABACI</i> (GENN.) (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) ASSOCIADAS À INOCULAÇÃO DO CRINIVÍRUS TOMATO CHLOROSIS VIRUS (TOCV).....	105
RESUMO	105
ABSTRACT.....	106
5.1. INTRODUÇÃO	107
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	108
5.2.1. Material biológico: insetos, plantas e isolado de vírus.	109
5.2.2. Associação de formas de onda de EPG com a inoculação de ToCV	109
5.2.3. Análise da infecção por ToCV	114
5.2.4. Análise estatística	115
5.3. RESULTADOS	115
5.4. DISCUSSÃO	117
5.5. CONCLUSÕES	120

RESUMO

Respostas biológicas e comportamentais de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) a plantas de tomate infectadas com *Tomato chlorosis virus* (ToCV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e atividades estiletares associadas à inoculação de ToCV

Vários fitovírus são capazes de influenciar o comportamento e desenvolvimento biológico de seus insetos vetores de modo a favorecer sua disseminação entre plantas hospedeiras, mas pouco se sabe a respeito dos efeitos de infecções virais sobre moscas-brancas *Bemisia tabaci* (Genn.), uma vez que se trata de um complexo de espécies, que transmite vírus de diferentes gêneros com distintos modos de transmissão. Considerando-se a importância de *B. tabaci* como praga e vetora e o grande prejuízo causado a diversos cultivos devido à transmissão de fitovírus, o presente trabalho teve como objetivos: a) Investigar a preferência para pouso e o comportamento arrestante de *B. tabaci* MEAM 1 (Middle East-Asia Minor 1) em plantas de tomate não infectadas e infectadas com o crinivírus *Tomato chlorosis virus* (ToCV) transmitido de modo semipersistente, e o begomovírus persistente-circulativo, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV); b) Avaliar os efeitos diretos e indiretos de ToCV sobre o desempenho biológico de *B. tabaci* MEAM 1 c) Comparar o comportamento alimentar de adultos não-virulíferos de *B. tabaci* MEAM 1 em plantas de tomate não infectadas e infectadas com ToCV ou ToSRV, utilizando-se a técnica de *Electrical Penetration Graph* (EPG); d) Correlacionar as atividades estiletares de *B. tabaci* MED (Mediterranean) com a inoculação de ToCV em tomateiro. Verificou-se que plantas infectadas com ToCV não exercem atração sobre *B. tabaci* MEAM 1; há efeito direto quando o inseto está virulífero; no entanto, este efeito não parece favorecer a disseminação de ToCV. Já ToSRV exerce efeito direto que favorece sua disseminação, pois insetos virulíferos são mais atraídos por plantas não infectadas. A mosca-branca exibe comportamento arrestante em plantas de tomate sadias, e tende a deixar plantas infectadas com ToCV ou ToSRV, sugerindo que tais vírus reduzem a qualidade nutricional da planta hospedeira. Em relação ao desenvolvimento biológico do inseto, observou-se efeito direto de ToCV apenas de alongamento da duração do primeiro ínstar ninfal, e efeito indireto negativo sobre a viabilidade da fase ninfal, pois apenas 32% das ninfas eclodidas chegaram à fase adulta em plantas infectadas, contrastando com 77% em plantas não infectadas. Nos ensaios de EPG, verificou-se que a infecção de plantas de tomate por ToCV ou ToSRV não influenciou o comportamento alimentar do vetor de modo a favorecer a transmissão desses vírus, pois afetou apenas parâmetros não relacionados às atividades floemáticas. A transmissão de ToCV está principalmente associada à salivacão nos elementos de floema (forma de onda E₁) (52,2% de plantas infectadas), mas pode ocorrer com baixa frequência antes de E₁ (3,5%). Entretanto, há maior eficiência de transmissão quando os indivíduos realizam vários episódios de E₁+E₂ (ingestão de seiva nos vasos do floema). Os dados obtidos na presente tese ajudam a esclarecer um pouco mais as complexas relações entre *B. tabaci* e diferentes fitovírus, e como as respostas comportamentais podem variar em função do modo de transmissão.

Palavras-chave: Mosca-branca; Relações vírus-vetor-planta hospedeira; *Begomovirus*; *Crinivirus*; *Electrical Penetration Graph*.

ABSTRACT

Biological and behavioral responses of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) to tomato plants infected with *Tomato chlorosis virus* (ToCV) and *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) and stylets activities associated with inoculation of ToCV.

Several phytoviruses are capable of influencing the behavior and biological development of their insect vectors in order to promote their spread among host plants, but information about the effects of viral infections on whiteflies *Bemisia tabaci* (Genn.) is not available, since it is a species complex, which transmits virus belonging to different genus with distinct transmission modes. Considering *B. tabaci* importance as a pest and a vector and the great damage caused to several crops due to the transmission of phytovirus, the present work had as objectives: a) To investigate the preference for landing and the arrestant behavior of *B. tabaci* MEAM 1 (Middle East-Asia Minor 1) in non-infected and infected tomato plants with semi-persistent crinivirus, *Tomato chlorosis virus* (ToCV) and the persistent-circulative begomovirus, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV); b) To evaluate the direct and indirect effects of ToCV on the biological performance of *B. tabaci* MEAM 1 c) To compare the feeding behavior of non-viruliferous *B. tabaci* MEAM 1 in non-infected and ToCV or ToSRV-infected tomato plants using the Electrical Penetration Graph (EPG) technique; d) Correlate the stylets activities of *B. tabaci* MED (Mediterranean) with the inoculation of ToCV in tomato. It has been found that ToCV-infected plants do not exert an attraction on *B. tabaci* MEAM 1; there is a direct effect when the insect is viruliferous, however, this effect does not seem to favor the spread of ToCV. ToSRV has a direct effect that favors its dissemination, as viruliferous insects are more attracted to non-infected plants. The whitefly exhibits an arrestment behavior on non-infected plants, and tends to leave plants infected by ToCV or ToSRV, suggesting that such viruses reduce the nutritional quality of the host plant. In relation to the biological development, we observed a direct effect of ToCV only on the first ninfal instar, and a negative indirect effect on nymphal viability, since only 32% of the initial individuals reached adulthood in ToCV-infected plants contrasting with 77% in non-infected plants. In the EPG tests, it was verified that the infection of tomato plants by ToCV or ToSRV did not influence the feeding behavior of the vector in order to favor the transmission of these viruses, since it affected only parameters not related to the phloem. The transmission of ToCV is mainly associated to salivation in the phloem elements (waveform E1) (52,2% of infected plants), but may occur in a low proportion before E1 (3,5%). However, there is a greater efficiency of transmission when individuals perform several episodes of E1 + E2 (phloem sieve elements). The data obtained in this thesis help to clarify a little more about the complex relationships between *B.tabaci* and different phytovirus, and how the behavioral responses may vary depending on the mode of transmission.

Keywords: Whitefly; Virus-vector-host plant relationships; *Begomovirus*; *Crinivirus*; Electrical Penetration Graph.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As moscas-brancas (Hemiptera: Aleyrodidae) são consideradas pragas importantes não só devido aos danos diretos ocasionados pela sucção de seiva e, em certos casos, ação toxicogênica, mas principalmente por atuarem como vetoras de inúmeros fitovírus de relevância mundial, ou pela associação com fungos saprófitas que crescem sobre os excrementos (*honeydew*) desses insetos (fumagina), afetando a taxa fotossintética das plantas (Inbar & Gerling, 2008). As moscas-brancas do complexo *Bemisia tabaci* (Gennadius) têm ampla gama de plantas hospedeiras, principalmente nas famílias Brassicaceae, Solanaceae e Cucurbitaceae, além de espécies de plantas ornamentais e frutíferas (Lourenção & Nagai, 1994; Martinez et al., 2000; Li et al., 2011). Dentre as espécies de Solanaceae, destaca-se o tomateiro, *Solanum lycopersicum* (L.), uma vez que *B. tabaci* é considerada praga importante na cultura (Butin; Gilbertz; Oetting, 1993), podendo ocasionar perdas de até 100% da produção.

Embora os primeiros relatos de *B. tabaci* no Brasil datem de 1923 (Bondar, 1928), este inseto ganhou maior destaque em âmbito nacional no início dos anos 1990, quando foi observado em cultivos de hortaliças, no interior do Estado de São Paulo, o biótipo “B” da espécie (Lourenção et al., 2015), também referido por alguns autores como sendo uma espécie distinta, *Bemisia argentifolii* Perrings & Bellows (Lourenção & Nagai, 1994; França et al., 1996; Villas Bôas et al., 1997). Com o surgimento do biótipo B de *B. tabaci* no Brasil, os problemas com doenças viróticas se intensificaram (Ribeiro et al., 1998), principalmente nas culturas de tomate, feijão, melão e batata (Lourenção et al., 2015).

Foi proposto que *B. tabaci* representa um complexo de diversas espécies crípticas (não mais um complexo de biótipos), baseando-se em homologia do gene mtCOI (citocromo oxidase mitocondrial I) (De Barro et al., 2011). Há evidências de que esse complexo seja formado por pelo menos 36 espécies diferentes que, embora morfologicamente indistinguíveis, podem ser separadas molecularmente (De Barro et al., 2011; Liu et al., 2012a; Firdaus et al., 2012), sendo o biótipo B classificado como a espécie Middle East-Asia Minor 1 (MEAM 1) (De Barro et al., 2011).

Os vírus de plantas variam em suas relações com insetos vetores, podendo ser circulativos e/ou propagativos (transmissão persistente) ou apenas carregados nos estiletes ou no estomodeu (transmissão não persistente ou semipersistente) (Nault, 1997). O complexo *B. tabaci* transmite vírus pertencentes a diferentes famílias e gêneros com distintos modos de transmissão, sendo de transmissão semipersistente (não circulativos) os dos gêneros *Carlavirus* (família: *Betaflexiviridae*), *Ipomovirus* (família: *Potyviridae*), *Torradovirus* (família:

Secoviridae) e *Crinivirus* (família: *Closteroviridae*); e de transmissão persistente-circulativa os inseridos no gênero *Begomovirus* (família: *Geminiviridae*) (Navas-Castillo et al., 2011). Há uma grande diversidade de begomovírus (288 espécies) e crinivírus (13 espécies) (ICTV, 2015), sendo que a espécie MEAM 1 transmite eficientemente vírus de ambos os gêneros. Ademais, esta espécie de *B. tabaci* se adaptou muito melhor aos cultivos de solanáceas que o biótipo A, denominado atualmente como espécie New World (NW) (De Barro et al., 2011). A introdução de uma espécie vetora eficiente e polífaga como MEAM 1 culminou com a rápida disseminação de inúmeros vírus no Brasil e em muitas partes do mundo (Liu et al., 2012a).

Dentre os vírus com grande importância transmitidos por *B. tabaci*, está o *Tomato chlorosis virus* (ToCV), que é um crinivírus limitado aos vasos do floema, transmitido de modo semipersistente, que possui como vetores tanto *B. tabaci* NW, MEAM 1 (Wisler et al., 1998a, 1998b) e Mediterranean (MED) (De Barro et al., 2011) (anteriormente conhecida como *B. tabaci* biótipo Q) (Navas-Castillo et al., 2000; Wintermantel & Wisler, 2006), como também as moscas-brancas *Trialeurodes abutilonea* Haldeman e *T. vaporariorum* Westwood (Wisler et al., 1998b).

ToCV foi primeiramente identificado na Flórida, onde vinha causando desde 1989 a doença denominada *yellow leaf disorder* (Wisler et al., 1998b). Posteriormente, foi detectado causando sérios prejuízos em aproximadamente 20 países, entre os quais os Estados Unidos, Portugal, Porto Rico, Itália, Grécia, Taiwan, Israel, México, Espanha e Brasil (Navas-Castillo et al., 2011). No Brasil, ToCV teve seu primeiro relato 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).

Este crinivírus tem afetado diferentes culturas, principalmente o tomateiro, sendo que em algumas regiões foi encontrado infectando cultivos de batata (*S. tuberosum* L.) (Freitas et al., 2012; Fortes & Navas-Castillo, 2012), pimenta (*Capsicum annuum* L.) (Lozano et al., 2004; Barbosa et al., 2010; Fortes et al., 2012), e tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Fiallo-Olivé et al., 2014), entre outras espécies de vegetais (Wintermantel & Wisler, 2006), incluindo grãos, hortaliças e plantas ornamentais. No Brasil, além de tomateiro, esse vírus foi constatado em plantas de pimentão (*Capsicum* sp.) no estado de São Paulo (Barbosa et al., 2010) e de batata no estado de Goiás, município de Cristalina (Freitas et al., 2012), sendo esse o primeiro relato em cultivos de batata no país.

Os sintomas expressados pelas plantas infectadas com ToCV são semelhantes àqueles apresentados quando há deficiência nutricional, fitotoxidez por uso de agroquímicos e aos causados pela infecção de *Tomato infectious chlorotic virus* (TICV) (*Closteroviridae*:

Crinivirus), tais como amarelecimento e clorose entre as nervuras das folhas mais velhas (baixeiras). Com o avanço da doença, as folhas se tornam mais espessas, quebradiças, com áreas necróticas, aspecto de bronzeamento, bordas foliares enroladas e voltadas para cima (Wintermantel & Wisler, 2006).

Diferentemente do crinivírus ToCV, que possui RNA de fita simples e é transmitido de modo semipersistente por diferentes gêneros de moscas-brancas, o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) é um begomovírus com DNA de fita simples, genoma bipartido, transmitido de modo persistente-circulativo apenas por espécies do complexo *B. tabaci* (Fauquet et al., 2003). Ambos os vírus apresentam grande importância em tomateiro no Brasil atualmente, sendo que ToSRV já foi encontrado nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal, Pernambuco, Rio de Janeiro e Santa Catarina (Rezende et al., 1997; Castillo-Urquiza et al., 2007; Cotrim et al., 2007; Fernandes et al. 2008).

Além do tomateiro, ToSRV foi relatado em cultivos de batata (Souza-Dias et al., 2008), pimenta “dedo-de-moça” (Bezerra-Agasie et al., 2006) e pimentão, no estado de São Paulo (Rocha et al., 2012; Nozaki et al., 2006). Este begomovírus também pode ser encontrado infectando naturalmente plantas daninhas, tal como *Nicandra physaloides* (L.), conhecida popularmente como juá-de-capote (Barbosa et al., 2009). Em plantas de pimentão os sintomas de ToSRV são caracterizados por amarelecimento de nervuras, mosaico amarelo, deformação, mosqueado, redução de crescimento e enrolamento do limbo foliar (Rocha et al., 2012). Esses sintomas são similares aos relatados em tomateiro (Macêdo, 2011).

Assim como outros patógenos que infectam plantas e animais, muitos vírus dependem exclusivamente de vetores para disseminarem-se para novos hospedeiros. Como estratégia para promover sua disseminação, alguns desses micro-organismos podem alterar o comportamento e performance biológica de seus vetores em seu próprio benefício. De modo geral, a infecção de vírus nas plantas induz mudanças morfológicas e alterações fisiológicas (na qualidade nutricional, balanço hídrico e padrão de voláteis), as quais podem modificar a atratividade, preferência, alimentação e desempenho biológico de seus vetores nestas plantas (Ferreira & Moreno, 2009; Mauck et al., 2012; Fang et al., 2013; Ferreira et al., 2016).

Tais alterações decorrentes da infecção de fitopatógenos em insetos já foram observadas para o afídeo *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae) e *Pea enation mosaic virus* (PEMV) (gênero *Enamovirus*) (Hodge & Powell, 2010), e para o *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) (gênero *Luteovirus*) e seu vetor, o afídeo *Macrosiphum avenae* (Fabricius) (Ferreira et al., 1989), bem como para moscas-brancas do complexo *B. tabaci* e alguns vírus transmitidos pelas mesmas (Rubinstein & Czosnek, 1997; McKenzie, 2002; Jiu et al., 2007;

Fang et al., 2013; Moreno-Delafuente et al., 2013; Pan et al., 2013; Maluta et al., 2014; Fereres et al., 2016). Em certos casos, a infecção viral pode alterar as atividades estiletares e/ou locais de alimentação do inseto, contribuindo para uma maior probabilidade de inoculação do vírus em tecidos vegetais (Moreno-Delafuente et al., 2013; Carmo-Sousa et al., 2014; He et al., 2015).

Os estudos existentes na literatura sobre os efeitos de patógenos sobre diferentes aspectos biológicos e comportamentais de seus vetores concentram-se principalmente nas relações vírus-afídeos. A maioria desses estudos demonstram que os vírus frequentemente induzem mudanças no fenótipo da planta hospedeira, modificando as interações vírus-vetor-planta hospedeira de modo a promover maior disseminação viral. No caso da transmissão não persistente de vírus por afídeos, geralmente há redução no período em que o inseto vetor permanece nas plantas infectadas com estes vírus após a aquisição (Mauck et al., 2012), possivelmente porque os vírus de transmissão não persistente são retidos por curtos períodos de tempo (minutos ou poucas horas) (Nault 1997). Tal fato foi constatado para o afídeo *Rhopalosiphum maidis* Fitch, em plantas de soja, os quais permaneceram por mais tempo em plantas saudáveis do que em plantas infectadas com o *Soybean mosaic virus* (SMV) (gênero *Potyvirus*) (Fereres et al., 1999). Mais recentemente, Mauck et al. (2010) relataram que afídeos foram atraídos por voláteis liberados por plantas infectadas com o vírus não persistente, *Cucumber mosaic virus* (gênero *Cucumovirus*). Porém, uma vez que os insetos pousaram e realizaram provas nas plantas, eles rapidamente deixaram as mesmas, não realizando uma alimentação prolongada. Diferentemente, o afídeo *Sitobion avenae* (Fabricius) realizou períodos mais longos de alimentação no floema em plantas infectadas com o vírus persistente BYDV do que em plantas saudáveis (Fereres et al., 1990; Quiroz et al., 1992).

Baseando-se em uma síntese literária, Mauck et al. (2012) propuseram uma hipótese em que o efeito de infecções virais em insetos vetores dependeria do tipo de relação vírus-vetor-planta hospedeira, de modo a favorecer a disseminação do vírus. Assim, dependendo do modo de transmissão do vírus pelo vetor (persistente ou não persistente) e localização do vírus no tecido vegetal (tecidos superficiais ou vasculares), o comportamento do inseto vetor seria modificado de modo a permanecer por longos períodos se alimentando na planta infectada ou realizar breves provas e rapidamente deixá-la. De acordo com esta hipótese, os insetos vetores que pousassem sobre uma planta infectada com vírus não-persistente (os quais podem ser rapidamente adquiridos em tecidos superficiais da planta) deveriam realizar picadas de provas de curta duração em células da epiderme e/ou parênquima, e rapidamente saírem dessa planta para evitar salivagem excessiva e consequente redução ou perda do inóculo viral adquirido (Collar et al., 1997). Por outro lado, no caso de vírus de transmissão persistente, que geralmente

são adquiridos em tecidos vegetais mais profundos (como floema ou parênquima floemático) e portanto, demandam períodos mais longos de acesso à aquisição, os insetos vetores deveriam ser estimulados a permanecer mais tempo sobre a planta infectada, de modo a atingir o floema com seus estiletes e maximizar a probabilidade de aquisição do vírus.

Até o momento, a maioria dos estudos com plantas infectadas com diferentes vírus demonstraram que estes modificam indiretamente o comportamento de seus vetores, por causar alterações fisiológicas nas plantas infectadas, aumentando a atratividade e preferência dos afídeos (Feres & Moreno, 2009; Eigenbrode et al., 2002; Mauck et al., 2010; Carmo-Sousa et al., 2014). Entretanto, pesquisas similares envolvendo interações vetor-vírus-planta hospedeira são mais escassas no que se refere às moscas-brancas. Há alguns estudos sobre o efeito de vírus sobre *B. tabaci*, porém, por se tratar de um complexo de espécies que transmite inúmeros vírus, com diferentes modos de transmissão, os efeitos relatados têm sido variáveis, concentrando-se nas relações de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (gênero *Begomovirus*) com *B. tabaci* (Rubinstein & Czosnek, 1997; McKenzie, 2002; Liu et al., 2012b; Liu et al., 2013; Moreno-Delafuente et al., 2013; Pan et al., 2013; Maluta et al., 2014; He et al., 2015).

Por representarem modos de transmissão variados e um complexo de espécies crípticas, as relações de diferentes vírus com *B. tabaci* são especialmente interessantes para o estudo dos efeitos que os vírus de plantas podem ter sobre o comportamento e desempenho biológico de seu vetor. Portanto, estudos dessa natureza envolvendo o crinivírus ToCV (transmissão semipersistente) e o begomovírus ToSRV (transmissão persistente-circulativa) representam um bom modelo para investigar como plantas infectadas com vírus com diferentes modos de transmissão podem modificar o comportamento e desempenho biológico da mosca-branca, de forma a favorecer a disseminação viral.

Assim, este trabalho teve por objetivos: a) Estudar a preferência para pouso e o comportamento arrestante de *B. tabaci* MEAM 1 (virulíferos e não-virulíferos) em plantas de tomate não infectadas e infectadas com ToCV e ToSRV (capítulo 2); b) Investigar os efeitos da infecção por ToCV na planta hospedeira ou no próprio inseto vetor, sobre o desempenho biológico de *B. tabaci* MEAM 1 (capítulo 3); c) Comparar o comportamento alimentar de *B. tabaci* MEAM 1 em plantas de tomate não infectadas e infectadas com ToCV e ToSRV, utilizando-se a técnica de *Electrical Penetration Graph* (EPG) (capítulo 4) d) e as atividades estiletares envolvidas na inoculação de ToCV (capítulo 5).

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, J.C.; BARRETO, S.S.; INOUE-NAGATA, A.K.; REIS, M.S.; FIRMINO, A.C.; BERGAMIM FILHO, A.; REZENDE, A. A. M. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, p. 440-443, 2009.
- 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**, v. 92, p.1709, 2008.
- 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**, v. 94, p. 374, 2010
- 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**, v. 36, p. 256-258, 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**, v. 90, p. 114, 2006.
- BONDAR, G. **Aleyrodídeos do Brasil: 2ª contribuição**, São Paulo, Secretaria da Agricultura, Indústrias e Obras Públicas, Seção de Patologia Vegetal, 1928. 37 p.
- BUTIN, G.D.; GILBERTZ, D.A.; OETTING, R.D. Chlorophyll loss and gas exchange in tomato leaves after feeding injury by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 86, p. 517-522, 1993.
- CARMO-SOUSA, M.; MORENO, A.; GARZO, E., FERERES, A. A non-persistently transmitted-virus induces a pull–push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. **Virus Research**, p.1-9, 2014.
- 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. **Virus reviews and Research**, v, 12, p. 233, 2007.
- COLLAR, J. L.; AVILLA, C.; FERERES, A. New correlations between aphid stylet paths and nonpersistent virus transmission. **Environmental Entomology**, v. 26, p. 537-544, 1997.
- COTRIM, 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**, v. 33, p. 300-303, 2007.
- De BARRO, P. J.; LIU, S. S.; BOYKIN, L. M.; DINSDALE, A. B. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 1–19, 2011.

- EIGENBRODE, S.D.; DING, H.; SHIEL, P.; BERGER, P.H. Volatiles from potato plants infected with *Potato leafroll virus* attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 269, p. 455-460, 2002.
- FANG, Y.; JIAO, X.; XIE, W.; WANG, S.; WU, Q.; SHI, X.; CHEN, G.; SU, Q.; YANG, H.; PAN, H.; ZHANG, Y. *Tomato yellow leaf curl virus* alters the host preferences of its vector *Bemisia tabaci*. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1-5, 2013. DOI: 10.1038/srep02876
- FAUQUET, C.M.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P.; STENGER, D.C.; STANLEY, J. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species **Archives of Virology**, v. 48, p. 405-421, 2003.
- FERERES, A.; KAMPMEIER, G. E.; IRWIN, M. E. Aphid attraction and preference for soybean and pepper plants infected with potyviridae. **Annals Entomological Society of America**, v. 92, p. 542-548, 1999.
- FERERES, A.; LISTER, R. M.; ARAYA, J. E.; FOSTER, J. E. Development and reproduction of the English grain aphid (Homoptera: Aphididae) on wheat cultivars infected with *Barley yellow dwarf virus*. **Environmental Entomology**, v. 18, p. 388-393, 1989.
- FERERES, A.; SHUKLE, R. H.; ARAYA, J. E.; FOSTER, J. E. Probing and feeding behavior of *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae) on three wheat cultivars infected with *Barley yellow dwarf virus*. **Journal of Applied Entomology**, v. 109, p. 29-36, 1990.
- FERERES, A.; MORENO, A. Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. **Virus Research**, v. 141, p. 158-168, 2009.
- FERERES, A.; PEÑAFLO, M. F. G.; FAVARO, C. F.; AZEVEDO, K. E. X.; LANDI, C. H.; MALUTA, N. K. P.; BENTO, J. M. S.; LOPES, J. R.S. Tomato infection by whitefly-transmitted circulative and non-circulative viruses induce contrasting changes in plant volatiles and vector behaviour. **Viruses**, v. 8, p. 225, 2016.
- FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUE, 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**, v. 36, p. 251-258, 2008.
- FIALLO-OLIVÉ, E.; ESPINO, A.; 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**, v. 98, p. 1162, 2014.
- FIRDAUS, S.; VOSMAN, B.; HIDAYATI, N.; JAYA SUPENA E. D.; VISSER, R. G, van HEUSDEN, A. W. The *Bemisia tabaci* species complex: additions from different parts of the world. **Insect Science** v. 20, p. 723-733, 2012.
- FORTES, I. M.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. *Tomato chlorosis virus* in pepper: prevalence in commercial crops in south-eastern Spain and symptomatology under experimental conditions. **Plant Pathology**, v. 61, p. 994-100, 2012.

- FORTES, I. M.; NAVAS-CASTILLO, J. Potato, an experimental and natural host of the crinivirus *Tomato chlorosis virus*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 134, p. 81-86, 2012.
- FRANÇA, F.; VILLAS BÔAS, G.L.; CASTELO BRANCO, M. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, p. 369-372, 1996.
- 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**, v.96, p.593, 2012.
- HE, W. B.; LI, J.; LIU, S. S. Differential profiles of direct and indirect modification of vector feeding behavior by a plant virus. **Scientific Reports**, v. 5, p.7682; 2015. DOI:10.1038/srep07682.
- HODGE, S.; POWELL, G. Conditional facilitation of an aphid vector, *Acyrtosiphon pisum*, by the plant pathogen, pea enation mosaic virus. **Journal of Insect Science**, v. 10, p. 1-14, 2010.
- INBAR M; GERLING D. Plant-mediated interactions between whiteflies, herbivores, and natural enemies. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p.431-448, 2008.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV):** www.ictv.org
- JIU, M.; ZHOU, X.P.; TONG, L.; XU, J.; YANG, X. Vector-virus mutualism accelerates population increase of an invasive whitefly. **PLos One**, v. 2, p. 1-8, 2007.
- LI, S. J.; AHMED, M. Z.; REN, S. X.; DU, Y. Z.; WU, J. H.; CUTHBERTSON, A. G. S.; QIU, B. L. Host plants and natural enemies of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in China. **Insect Science**, v. 18, p. 101-120, 2011.
- LIU, S. S.; COLVIN, J.; De BARRO, P. J. Species concepts as applied to the whitefly *Bemisia tabaci* systematics: How many species are there? **Journal of Integrative Agriculture**, v.11, p. 176–186, 2012a.
- LIU B.; PREISSER, E. L.; CHU, D.; PAN, H.; XIE, W.; WANG, S.; WU, Q.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. Multiple forms of vector manipulation by a plant-infecting virus: *Bemisia tabaci* and *Tomato yellow leaf curl virus*. **Journal of Virology**, v.87, p. 4929-4937, 2013.
- LIU, B.; YAN, F.; CHU, D.; PAN, H.; JIAO, X.; XIE, W.; WU, Q.; WANG, S.; XU, B.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. Difference in feeding behaviors of two invasive whiteflies on host plants with different suitability: implication for competitive displacement. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, p. 697–706, 2012b.
- LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. **Bragantia**, v. 53, p. 53-59, 1994.

- LOURENÇÃO, L. A.; KRAUSE-SAKATE, R.; VALLE, G. E. Mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B. In: VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Pragas introduzidas no Brasil: Insetos e Ácaros**. 2015. chap. 39, p. 682-707.
- 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**, v. 88, p. 224, 2004.
- MACÊDO, M.A. **Estudos dos fatores que influenciam a predominância do begomovírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) no Brasil**. 2011. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Brasília, Brasília, 2011.
- MALUTA, N. K. P.; GARZO, E.; MORENO, A.; LOPES, J. R. S.; FERERES, A. *Tomato yellow leaf curl virus* benefits population growth of the Q biotype of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**, v. 43, p. 385-392, 2014.
- MARTINEZ, S. S.; CARVALHO, A. O. R.; VIEIRA, L. G.; NUNES, L. M.; BIANCHINI, A. Identification, geographical distribution and host plants of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotypes (Homoptera: Aleyrodidae) in the State of Paraná, Brazil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 597-603, 2000.
- MAUCK, K. E.; BOSQUE-PÉREZ, N. A.; EIGENBRODE, S. D.; DE MORAES, C. M.; MESCHER, M. C. Transmission mechanisms shape pathogen effects on host-vector interactions: evidence from plant viruses. **Functional Ecology**, v.26, p. 1162-1175, 2012.
- MAUCK, K. E.; DE MORAES, C. M.; MESCHER, M. C. Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 3600-3605, 2010.
- McKENZIE, C.L. Effect of *Tomato mottle virus* (ToMoV) on *Bemisia tabaci* biotype B (Homoptera: Aleyrodidae) oviposition and adult survivorship on healthy tomato. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, p. 367–368, 2002.
- MORENO-DELAFUENTE, A.; GARZO, E.; MORENO, A.; FERERES, A. A plant virus manipulates the behaviour of its whitefly vector to enhance its transmission efficiency and spread. **PLos One**, v. 8, p. 1-10, 2013.
- NAULT, L.R. Arthropod transmission PF plant viruses: a new synthesis. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 90, p. 521-541, 1997.
- 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**, v84, p. 835–837, 2000.
- NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ E, AND SÁNCHEZ-CAMPOS S. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 219-248, 2011.

- NOZAKI, D.N.; KRAUSE-SAKATE, R.; 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**, v. 31, p. 321, 2006.
- PAN, H. P.; CHU, D.; LIU, B.; SHI, X.; GUI, L.; XIE, W.; CARRIERE, Y.; LI, X.; ZHANG, Y. Differential effects of an exotic plant virus on its two closely related vectors. **Science Reports**, v.3, p. 1-6, 2013.
- QUIROZ, C.; LISTER, R. M.; SHUKLE, R. H.; ARAYA, J. E.; FOSTER, J. E.; Selection of symptom variants from the NY-MAV strain of *Barley yellow dwarf virus* and their effects on the feeding behavior of the vector *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae). **Environmental Entomology**, v. 21, p. 376-381, 1992.
- REZENDE, W.L.; MILITÃO NETO, V.; GOULART, L.R.; GIOVANINI, M.P.; JULIATTI, F.C.; FERNANDES, J.J. Infecção mista em plantas de tomate infectadas por geminivírus, detectada por meio de LIS-SSCP-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 338, 1997.
- RIBEIRO, S.G.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; FERNANDES, J. J.; FARIA, J.C.; LIMA, M.F.; GILBERTSON, R.L.; ZAMBOLIM, E.M.; ZERBINI, F.M. Widespread occurrence of tomato geminivirus in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease**, v. 82, p. 830, 1998.
- ROCHA, K.C.; SAKATE, R.K.; PAVAN, M.A.; KOBORI, R.F.; GIORIA, R.; YUKI, V.A. Avaliação de danos causados pelo *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em cultivares de pimentão. **Summa Phytopathologica**, v. 38, p. 87-89, 2012.
- RUBINSTEIN, G.; CZOSNEK, H. Long-term association of *Tomato yellow leaf curl virus* with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. **Journal of General Virology**, v.78, p.2683-2689, 1997.
- SOUZA-DIAS, J.A.C.; SAWAZAKI, H.E.; PERNAMBUCO-FO, P.C.A.; ELIAS, L.M. *Tomato severe rugose virus*: another begomovírus causing leaf deformation and mosaic symptoms on potato in Brazil. **Plant Disease**, v. 92, p. 487, 2008.
- VILLAS BÔAS, G.L.; FRANÇA, F.H.; DE ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C. Manejo integrado da mosca-branca *Bemisia argentifolli* em diferentes plantas hospedeiras. **Horticultura Brasileira**, v. 20, p. 71-79, 1997.
- WINTERMANTEL, W. M.; WISLER, G. C. Vector Specificity, Host Range, and Genetic Diversity of *Tomato chlorosis virus*. **Plant Disease**, 90: 814-819, 2006.
- WISLER, G. C.; DUFFUS, J. E.; LIU, H. Y.; LI, R. H. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. **Plant Disease**, 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**, 88: 402-409, 1998b.

2. **PREFERÊNCIA PARA POUSO E COMPORTAMENTO ARRESTANTE DE *Bemisia tabaci* (GENN.) (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) EM PLANTAS INFECTADAS COM *Tomato chlorosis virus* (ToCV) E *Tomato severe rugose virus* (ToSRV)**

Resumo

Infecções ocasionadas por vírus podem não apenas alterar características fenotípicas (morfológicas e fisiológicas) das plantas hospedeiras, como também modificar o comportamento de insetos vetores de forma mutualística ou até mesmo antagonista, a fim de promover sua disseminação para novos hospedeiros. Por outro lado, os fitovírus diferem em seu modo de transmissão, dependendo de certos padrões comportamentais do vetor para o sucesso de sua disseminação. Deste modo, investigaram-se os efeitos da infecção de *Tomato chlorosis virus* (ToCV), um crinivírus transmitido de modo semipersistente, e de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), um begomovírus transmitido de modo persistente, sobre a preferência para pouso e comportamento arrestante do vetor *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) Middle East-Asia Minor 1 (MEAM 1) em tomateiro. Os resultados mostraram que ToCV e ToSRV afetam diretamente a preferência para pouso deste inseto em plantas infectadas vs. não infectadas, em testes de livre-escolha. Essas alterações comportamentais do inseto vetor parecem não beneficiar a disseminação de ToCV, pois insetos ToCV-virulíferos respondem indistintamente a plantas saudáveis ou infectadas pelo vírus, enquanto que insetos não-virulíferos preferem plantas não infectadas. Por outro lado, insetos ToSRV-virulíferos pousam preferencialmente sobre plantas não infectadas, o que favorece a disseminação do vírus para novas plantas. No teste de comportamento arrestante, verificou-se que a maioria dos insetos permanece em plantas não infectadas, quando liberados sobre as mesmas. Um maior número de indivíduos movimenta-se para plantas não infectadas, quando inicialmente liberados sobre plantas infectadas com ToCV ou ToSRV, sugerindo que tais vírus reduzem a qualidade nutricional da planta hospedeira para *B. tabaci* MEAM 1.

Palavras-chave: Mosca-branca; Interação vírus-vetor-planta hospedeira; Modos de transmissão; Comportamento de inseto vetor

Abstract

Virus infection may change not only the host-plant phenotypic (morphological and physiological) characteristics, but can modify the behavior of their insect vector in a mutualistic or rather antagonistic manner, to promote their spread to new hosts. On the other hand, the phytovirus differ in their modes of transmission, depending on certain behavior patterns of the vector for the success of its dissemination. Thus, it was investigated the infection effects of two different modes of virus transmission: a semipersistently transmitted *Tomato chlorosis virus* (ToCV) and a persistently transmitted *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) on settling and arrestment behavior of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) Middle East-Asia Minor 1 (MEAM 1) on tomatoes. Our work shows that ToCV and ToSRV may directly affect insect's preference for landing on either infected or non-infected plants in free-choice assays. These behavioral changes of the insect vector does not seem to benefit the spread of ToCV, because ToCV-viruliferous insects respond indistinctly to non-infected or ToCV-infected plants, whereas non-viruliferous insects prefer non-infected ones. In the other hand, ToSRV-viruliferous insects prefer to land on non-infected plants, which increase the rate of spread to new host plants. In the arrestment behavior assay, it was verified that the majority of the insects remain on non-infected plants, when released on them. A great number of insects move in the direction to non-infected plants when initially released on ToCV or ToSRV infected, suggesting that such virus reduce the nutritional quality of the host plants for *B. tabaci* MEAM 1.

Keywords: Whitefly; Virus-vector-host plant interaction; Modes of transmission; Insect vector behavior

2.1. Introdução

Os patossistemas envolvendo artrópodes vetores caracterizam-se por complexas interações planta-patógeno-vetor devido à diversidade de organismos participantes sob condições ambientais variáveis. Fitopatógenos necessitam se disseminar de um hospedeiro a outro e, embora possa haver outras maneiras de transmissão, a grande maioria dos vírus de plantas são disseminados por meio de vetores (Hull, 2014).

Assim como outros fitopatógenos, os vírus podem promover modificações na composição de voláteis, na coloração e em aspectos hormonais, nutricionais e de balanço hídrico de plantas hospedeiras, que por sua vez podem influenciar o comportamento, biologia, fisiologia e dinâmica populacional de seus insetos vetores (Werner et al., 2009; Fang et al., 2013; Moreno-Delafuente et al. 2013; Fereres et al., 2016). Tais alterações no inseto vetor podem favorecer a disseminação de vírus, uma vez que plantas infectadas podem ser mais atrativas e/ou melhorar a performance biológica dos vetores, de modo a favorecer a aquisição viral e posterior inoculação de novas plantas (Pan et al., 2013; Carmo-Sousa et al., 2014; Maluta et al., 2014; Carmo-Sousa et al., 2016). Porém, há casos onde se observaram efeitos neutros ou negativos de patógenos sobre o desempenho biológico e comportamental de seus vetores (Rubinstein & Czosnek, 1997; Fang et al., 2013; Pan et al., 2013; He et al., 2015), o que poderia afetar de modo negativo a disseminação para novos hospedeiros.

Os efeitos ocasionados por vírus sobre seus vetores podem variar em função do modo de transmissão, fator este que está intimamente relacionado à coevolução vírus-vetor (Nault, 1997). Vírus de transmissão dos tipos não persistente (NP) e semipersistente (SP) não são circulativos, ficando retidos no forro cuticular do aparelho bucal (estiletes maxilares) ou intestino anterior (estomodeu) do inseto (Ng & Falk, 2006). Por outro lado, os vírus de transmissão do tipo persistente circulam ou se multiplicam no corpo do vetor, necessitando para isso vencer diversas barreiras fisiológicas e morfológicas através de um processo de coevolução (Gray & Gildow, 2003), o que caracteriza a relação como mais íntima e específica, e frequentemente mutualística (Castle et al., 1998; Czosnek et al., 2002; Mauck et al., 2012; Ohnishi et al., 2009).

Tendo em perspectiva todos os aspectos envolvidos na transmissão de um patógeno por um vetor, a seleção hospedeira é uma etapa fundamental, na qual o inseto vetor decide se uma determinada planta é adequada ou não para alimentação e postura, com implicações importantes sobre o sucesso de aquisição do patógeno, no caso de uma planta infectada ou de inoculação em uma planta sadia. De modo geral, a seleção hospedeira é composta por diversas

etapas, sendo que inicialmente o inseto tem de ser atraído pela planta, seja por pistas visuais ou olfativas; posteriormente pousa sobre a mesma para avaliação de pistas táteis e gustativas e, finalmente, ocorre dispersão para um novo hospedeiro, em caso de rejeição ou permanência na planta, em caso de aceitação (Thorsteinson, 1960; Mauck et al., 2012). Assim, a preferência de um inseto por plantas pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo a infecção da planta e/ou do inseto vetor pelo patógeno (Fang et al., 2013; Mas et al., 2014). Portanto, a análise do comportamento de seleção hospedeira do inseto vetor é uma ferramenta importante para compreender suas relações com a disseminação do patógeno e a epidemiologia de uma doença.

Em virtude da importância da mosca-branca, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) como praga e vetora de fitovírus e as complexas relações existentes entre ambos, o presente capítulo teve como objetivo avaliar o efeito da infecção viral no processo de seleção hospedeira desse vetor, e suas implicações na disseminação de dois vírus transmitidos de modo distinto. Para tal, investigou-se a preferência para pouso e o comportamento arrestante de adultos virulíferos e não-virulíferos de *B. tabaci* MEAM 1 (Middle East-Asia Minor 1, anteriormente conhecida como biótipo B) em plantas de tomate não infectadas e infectadas com o crinivírus *Tomato chlorosis virus* (ToCV), transmitido de modo semipersistente ou com o begomovírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), transmitido de modo persistente-circulativo.

Tais estudos são de suma importância para a compreensão das relações vírus-vetor e epidemiologia de vírus disseminados por *B. tabaci*, além de investigar se vírus com diferentes modos de transmissão são capazes de manipular de forma distinta o comportamento de seleção hospedeira de seu vetor, como estratégia para otimizar sua disseminação natural.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Material biológico: criação de mosca-branca, plantas e isolados de vírus.

Os ensaios de preferência e comportamento arrestante de *Bemisia tabaci* MEAM 1 foram conduzidos em casa-de-vegetação do Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, SP. A população inicial de moscas-brancas *B. tabaci* MEAM 1 foi obtida junto ao Instituto Agrônomo (IAC). Sendo esta população periodicamente caracterizada molecularmente como pertencente ao biótipo B (espécie MEAM 1) (Fontes et al., 2010, 2012; Valle et al., 2013).

A colônia dos insetos foi mantida em casa-de-vegetação sob temperatura ambiente em gaiolas de metal, revestidas com tela anti-afídica sobre plantas de couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. cv. Manteiga) plantadas em vasos plásticos contendo substrato Tropstrato HT, composto de casca de pinus, turfa e vermiculita expandida com umidade de 60% p/p (Vida Verde Ltda, 2016).

O isolado de ToCV foi obtido de tomateiro no município de Sumaré-SP. Já o isolado de ToSRV foi obtido em tomateiro cereja no município de Piracicaba-SP. Ambos isolados foram fornecidos pelo Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP e mantidos em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara), separadamente em diferentes casas-de-vegetação livres de insetos. A caracterização molecular dos vírus foi confirmada por PCR como descrito previamente para ToSRV (Dellaporta et al., 1983; Fernandes et al., 2010) e ToCV (Dovas et al., 2002).

Para a manutenção dos isolados e obtenção de plantas-fontes de vírus para os experimentos, foram realizadas semanalmente, aquisições de ToCV e ToSRV em plantas de tomate infectadas e posterior inoculação em plantas de tomate sadias (2 - 4 folhas verdadeiras) utilizando-se os insetos da colônia mantida em casa-de-vegetação.

Para a obtenção de plantas infectadas, utilizaram-se folhas sintomáticas provenientes de tomateiro infectado (com ToCV ou ToSRV), as quais foram colocadas em tubos tipo *falcon* com algodão umedecido na ponta do pecíolo a fim de manter a turgência da folha. Liberaram-se 80 - 100 adultos sadios de mosca-branca por tubo *falcon* com a folha infectada, onde foram mantidas por um Período de Acesso à Aquisição (PAA) de 48 h. Após este período, grupos de 20 - 25 insetos virulíferos foram confinados em gaiolas do tipo *clip-cage* sobre folíolo de planta de tomate (cv. Santa Clara) sadio com 2 - 3 folhas verdadeiras, por um Período de Acesso à Inoculação (PAI) de 5 dias. Após o PAI, o *clip-cage* juntamente com o folíolo inoculado foram removidos da planta para evitar a possibilidade de infestação do material com ovos e ninfas.

Para a obtenção das plantas sem vírus para os tratamentos controle, empregou-se a mesma metodologia de inoculação com gaiolas *clip-cage*, porém utilizando-se 20 - 25 insetos não-virulíferos (não submetidos ao PAA de 48 h em folhas infectadas), de modo a reproduzir o mesmo tipo de dano na planta decorrente da alimentação por mosca-branca. Sendo assim, as plantas inoculadas com ToCV e ToSRV receberam a denominação de ToCV-infectadas e ToSRV-infectadas e as plantas “inoculadas” com insetos não-virulíferos foram denominadas plantas não infectadas. A infecção das plantas foi confirmada por PCR como descrito previamente para ToSRV (Dellaporta et al., 1983; Fernandes et al., 2010) e ToCV (Dovas et al., 2002).

Para os ensaios de preferência para pouso e comportamento arrestante foram utilizadas plantas de tomateiro com 3 - 4 semanas após a inoculação por insetos, quando as plantas infectadas com ToCV e ToSRV apresentavam sintomas claros dos vírus.

Utilizaram-se adultos não-virulíferos de 1 - 10 dias de idade, provenientes da colônia de *B. tabaci* MEAM 1 mantida em couve em casa-de-vegetação, mas que foram previamente condicionados por 72 h em tomateiro sadio. Os insetos virulíferos foram obtidos da mesma colônia, porém submetendo-os previamente a um PAA de 72 h em plantas de tomate infectado com ToCV ou ToSRV. Os insetos foram utilizados nos ensaios imediatamente após o PAA de 72 h, uma vez que ToCV possui modo de transmissão semipersistente e há perda significativa de infectividade dos insetos em períodos superiores a 1 dia após a aquisição desse vírus (Wintermantel & Wisler, 2006). Para ToSRV utilizou-se a mesma metodologia a fim de comparação, embora este seja um vírus persistente.

Os ensaios de preferência para pouso e comportamento arrestante foram realizados dentro gaiolas de observação com revestimento translúcido, no interior de casa-de-vegetação (22-30° C), iniciando-se sempre entre 8 - 9 h da manhã.

2.2.2. Preferência (com chance de escolha) para pouso de *B. tabaci* MEAM 1 em plantas infectadas com ToCV e ToSRV

Para os ensaios de preferência para pouso de *B. tabaci* MEAM 1 em plantas de tomate infectadas vs. não infectadas, 250 moscas-brancas (não-virulíferas ou virulíferas) foram liberadas em gaiolas do tipo *Bugdorm*, modelo BD2400F (MegaView Science Co., Ltd., Taichung 40762, Taiwan), revestidas de plástico transparente e tecido de malha fina, com dimensões de 75 x 75 cm de base e 115 cm de altura (Fig. 1). Para a liberação, os insetos foram previamente adormecidos em baixa temperatura ($\pm 0^{\circ}\text{C}$) por 2 min e acondicionados em tubos de vidro (1 cm de diâmetro e 5 cm de altura) revestidos com fita preta e tampa de rosca, em grupos de 50 indivíduos por tubo (totalizando 5 tubos por repetição).

Em seguida os tubos contendo os insetos foram colocados em uma plataforma de voo posicionada no topo da gaiola *Bugdorm* (aproximadamente 50 - 60 cm do topo das plantas), e destampados para a saída dos insetos. Na base da gaiola abaixo da plataforma de voo, foram colocadas seis plantas, sendo três não infectadas e três infectadas (ToCV-infectadas ou ToSRV-infectadas), dispostas alternadamente em círculo, formando uma arena experimental (Fig. 1), conforme delineamento descrito por Fereres et al. (1999) e Carmo-Sousa et al. (2014).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 10 repetições (gaiolas) por tratamento (insetos virulíferos ou não-virulíferos) e para cada vírus (ToCV e ToSRV), de modo a determinar se a preferência por plantas infectadas ou não infectadas variou em função da presença do vírus no inseto vetor e/ou na planta. Avaliou-se o número total de insetos pousados nas plantas 6 e 24 h após a liberação dos insetos, e o número total de ovos depositados após 24 h da liberação.

Para ToCV foi realizado um experimento adicional em que avaliações do número de insetos pousados sobre as plantas também foram feitas em períodos de tempo mais curtos (5, 15 e 30 min; 1, 2, 3, 4 e 5 h) após a liberação. Este procedimento foi adotado para ToCV por se tratar de um vírus transmitido de modo semipersistente, que pode ser adquirido e inoculado em menor período de tempo devido à ausência de latência no vetor. Assim este experimento visou demonstrar se há diferenças na preferência de insetos virulíferos/não-virulíferos em períodos de tempos mais curtos ou mais longos de exposição às plantas.

Figura 1. Arena experimental para realização de ensaio de preferência de *B. tabaci* MEAM 1 (esquerda) por plantas infectadas (com ToCV ou ToSRV) e não infectadas, as quais encontravam-se alternadas formando um círculo. Ao topo, plataforma de voo, onde foram colocados os tubos com insetos para liberação (direita).

2.2.3. Comportamento arrestante (experimento de dupla-escolha) de *B. tabaci* MEAM 1 após o pouso em plantas não infectadas e infectadas com ToCV e ToSRV

Esta etapa do estudo permitiu determinar o tempo de permanência de moscas-brancas em plantas infectadas (com ToCV ou ToSRV) ou plantas de tomate não infectadas após o pouso. Para tal, duas plantas, sendo uma infectada (ToCV ou ToSRV-infectada) e outra não infectada, foram posicionadas a 20 cm de distância uma da outra dentro de uma gaiola *Bugdorm* (Fig. 1). Em um primeiro ensaio foram liberados 20 adultos não-virulíferos na planta não infectada, contando-se quantos indivíduos movimentaram-se para a planta infectada em períodos sucessivos de tempo após a liberação (5, 15 e 30 min; 1, 6 e 24 h); para plotagem dos dados nos gráficos, os tempos em minutos foram transformados em horas (0.083; 0.25 e 0.50 h). Em um segundo ensaio, foram liberados 20 insetos não-virulíferos na planta infectada e registrou-se a movimentação dos mesmos para a planta não infectada nos referidos períodos de tempo. Tanto os insetos como as plantas foram utilizados apenas uma única vez. Foram realizadas 12 repetições de cada tratamento (utilizando-se insetos não-virulíferos e virulíferos) para ambos os vírus.

O experimento foi realizado independentemente com insetos virulíferos e não-virulíferos, para verificar se o comportamento arrestante ou a propensão de deslocamento para a planta vizinha é influenciada pela presença do vírus no inseto vetor.

2.2.4. Análise dos dados

Para análise dos dados foi utilizado o *software* da IBM SPSS versão 19.0 (SPSS, 2010). Os dados dos ensaios de preferência para pouso (livre-escolha) foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e aqueles que não apresentaram uma distribuição normal foram transformados com base na média e variância dos mesmos em $\ln(x+1)$. Para os dados que mesmo depois de transformados não seguiram uma distribuição normal, foi aplicado o teste não-paramétrico de *U. Mann-Whitney*. Já para os dados brutos ou transformados que seguiram uma distribuição normal foi aplicado o teste *t*-Student.

Para os dados dos experimentos de comportamento arrestante (dupla-escolha), a princípio realizou-se uma análise de variância (one-way ANOVA) dos dados, comparando os dois tratamentos dentro de cada período de avaliação. No caso de insetos não-virulíferos para ToSRV verificou-se diferença estatística apenas em determinados horários de avaliação,

dificultando a interpretação dos dados. Assim, optou-se por realizar uma ANOVA de medidas repetidas utilizando o *software* SuperANOVA a fim de verificar se houve diferenças entre as curvas, ou seja, entre os tratamentos ao longo de todos os períodos de avaliação, de uma forma conjunta. Os dados e as análises realizadas estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

2.3. Resultados

No experimento de preferência para pouso (livre-escolha) observou-se que insetos ToCV-virulíferos não demonstraram preferência por plantas de tomate ToCV-infectadas ou não infectadas na 6ª hora ($t = -0,630$; g.l. = 1, 22; $p = 0,535$), nem na 24ª h ($t = 0,141$; g.l. = 1, 22; $p = 0,889$) após a liberação dos insetos (Fig. 2A). Também não houve diferença entre os tratamentos para o número médio de ovos depositados ($U = 69,00$; g.l. = 1, 22; $p = 0,862$) 24 h após a liberação (Fig 2C).

Para o begomovírus ToSRV foi observada tendência diferente, uma vez que insetos ToSRV-virulíferos preferiram pousar em plantas não infectadas em relação a plantas ToSRV-infectadas 6 h ($t = 2,749$; g.l. = 1, 22; $p = 0,012$) e 24 h ($t = 3,167$; g.l. = 1, 22; $p = 0,004$) após a liberação (Fig 2B). Entretanto, a média de ovos não seguiu a mesma tendência, uma vez que os insetos ovipositaram de modo similar em plantas não infectadas ($185,50 \pm 21,70$ ovos) e ToSRV-infectadas ($221,30 \pm 29,40$ ovos) ($t = -0,881$; g.l. = 1, 22; $p = 0,388$) (Fig 2D).

Figura 2. Número médio ($\pm$ EP) de adultos **virulíferos** de *B. tabaci* MEAM 1 em plantas ToCV-infetadas (A) e ToSRV-infetadas (B) e não infectadas de tomate em teste de livre-escolha 6 e 24 h após a liberação dos insetos, e número médio de ovos depositados nessas plantas (C e D). * Diferença significativa de acordo com teste de *t*-Student ou *U. Mann-Whitney* ($p < 0,05$); **n.s.**: indica que não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos.

Por outro lado, insetos não-virulíferos demonstraram respostas diferentes, uma vez que demonstraram clara preferência em pousar sobre plantas não infectadas em relação a plantas ToCV-infectadas, 6 h ($t = 10,564$; g.l = 1, 22; $p < 0,0001$) e 24 h ($U = 0,000$; g.l = 1, 22 $p < 0,0001$) (Fig 3A) após a liberação; a mesma tendência foi observada para oviposição ($t = 7,183$; g.l = 1, 22; $p < 0,0001$) (Fig 3C).

Insetos não-virulíferos para ToSRV também mostraram preferência em pousar sobre plantas não infectadas ao final de 24 h ($t = 2,669$; g.l = 1, 22; $p = 0,014$), porém na 6ª hora após a liberação não foi observada diferença estatística ($t = 1,568$; g.l = 1, 22; $p = 0,131$) (Fig. 3B). Contudo não houve diferença com relação à oviposição, uma vez que insetos não-virulíferos ovipositaram indiscriminadamente em plantas não infectadas e ToSRV-infectadas ($t = 0,856$; g.l = 1, 22; $p = 0,401$) (Fig. 3D), assim como observado para insetos ToSRV-virulíferos.

Figura 3. Número médio ($\pm$ EPM) de adultos **não-virulíferos** de *B. tabaci* MEAM 1 em plantas ToCV-infetadas (A) e ToSRV-infetadas (B) e não infectadas de tomate sobre teste de livre-escolha 6 e 24 h após a liberação dos insetos, e número médio de ovos depositados nessas plantas (C e D). *Diferença significativa de acordo com teste de *t*-Student ou *U. Mann-Whitney* ($p < 0,05$); **n.s.**: indica que não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos.

No experimento de livre escolha realizado com plantas ToCV-infectadas e não infectadas a fim de verificar se havia diferenças entre tempos curtos e longos de avaliação, observou-se que, assim como no experimento utilizando-se apenas dois períodos de avaliação (6 e 24 h) (Fig. 3A), insetos não-virulíferos demonstram preferência em pousar e se manter em plantas não infectadas com ToCV desde os primeiros 5 min da liberação até a 24^a hora (Fig. 4A). Já insetos ToCV-virulíferos reagiram de modo distinto aos insetos não-virulíferos, uma vez que não mostraram diferenças significativas em número de indivíduos pousados sobre plantas sadias vs. infectadas com ToCV ($p > 0,05$) (Fig. 4B), assim como observado no primeiro experimento em que as avaliações foram feitas apenas 6 e 24 h após a liberação (Fig. 2A).

Figura 4. Número médio ($\pm$ EPM) de adultos **não-virulíferos (A)** e **virulíferos (B)** de *B. tabaci* MEAM 1 pousados em plantas não infectadas e ToCV-infectadas de tomateiro em diferentes tempos (0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, e 24 h) após liberação em plataforma de voo colocada na parte superior da gaiola, em teste de livre-escolha. *Diferença significativa entre médias para um mesmo horário de avaliação, de acordo com teste *t* ou teste *U*. Mann Whitney ($p < 0,05$); ns: tratamentos não diferem entre si para um mesmo horário de avaliação ($p > 0,05$).

No experimento de comportamento arrestante (dupla-escolha), observou-se um comportamento similar de indivíduos virulíferos de *B. tabaci* MEAM 1 em plantas infectadas com vírus (ToCV ou ToSRV) frente a plantas não infectadas (Fig. 5). Para ToCV, observou-se uma clara tendência de insetos virulíferos ($F = 6,66$; g.l = 1, 22; $p = 0,0171$) (Fig. 5A) e não-virulíferos ($F = 32,705$; g.l = 1, 22; $p = 0,0001$) (Fig. 5B) em moverem-se em direção a plantas de tomate não infectadas em curtos (5, 15 e 30 min; 1 h) e longos (6 e 24 h) períodos de tempo após a liberação dos mesmos sobre plantas ToCV-infectadas (Tabela 1). A mesma tendência foi observada para insetos ToSRV-virulíferos ($F = 21,312$; g.l = 1, 22; $p = 0,0001$) (Fig. 5C), os

quais moveram-se de plantas ToSRV-infectadas para plantas não infectadas, ou mantiveram-se em plantas não infectadas quando liberados sobre as mesmas (Tabela 2).

Por outro lado, quando insetos não-virulíferos foram liberados em plantas não infectadas e ToSRV-infectadas, não foram observadas diferenças entre os tratamentos ($F = 5,976$; g.l = 1, 22; $p = 0,226$). Houve apenas diferenças em alguns tempos de avaliação (0,25; 1 e 24 h), quando os insetos se movimentaram mais frequentemente de plantas ToSRV-infectadas em direção a plantas não infectadas ou, quando liberados na planta não infectada, mostraram tendência de permanência sobre a mesma, sendo que essa tendência ficou mais pronunciada com o passar do tempo (Fig. 5D). Porém, realizando uma ANOVA de medidas repetidas observou-se que, embora houvesse diferença significativa entre alguns tempos de avaliação, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 2).

Os dados de comportamento arrestante em plantas ToSRV com insetos não-virulíferos se assemelham aos obtidos no teste de livre escolha (item 2.2.3), uma vez que neste, não foi observada diferença na 6ª hora após a liberação dos insetos não-virulíferos, apenas na avaliação de 24 h, quando os insetos demonstraram preferência em pousar sobre plantas não infectadas com ToSRV. De modo similar, no ensaio de comportamento arrestante observou-se preferência por plantas não infectadas apenas em certos períodos de avaliação (0,25; 1 e 24 h após a liberação dos insetos). No entanto, embora nos outros períodos de avaliação não tenham sido observadas diferenças estatísticas, pode-se verificar uma tendência dos insetos não-virulíferos em preferirem plantas não infectadas tanto no ensaio de livre escolha como no de comportamento arrestante (Fig. 3 e Fig. 5, respectivamente e Tabela 2).

Figura 5. Efeito de plantas de tomate infectadas com ToCV ou ToSRV sobre o comportamento arrestante de *B. tabaci* MEAM 1 em ensaio de dupla-escolha. Porcentagem (%) de adultos **virulíferos** (A e C) e **não-virulíferos** (B e D) de *B. tabaci* pousados que deslocaram de uma planta infectada com ToCV (A e B) ou ToSRV (C e D) para uma planta não infectada e vice-versa após 0.083; 0.25; 0.5; 1; 6 e 24 h após a liberação. Linhas contínuas em cinza representam porcentagem de insetos que moveram de plantas não infectadas para plantas infectadas com um dos dois vírus; e linhas tracejadas em preto representam insetos que moveram-se de plantas infectadas para plantas não infectadas. *Diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de ANOVA de medidas repetidas, o qual compara a curva entre os tratamentos.

Tabela 1. Percentuais médios ($\pm$ EPM) de indivíduos pousados nas plantas, valores de P e F para o teste de one-way ANOVA (compara tempo a tempo de avaliação) e ANOVA de medidas repetidas (compara as curvas dos tratamentos) para os experimentos de comportamento arrestante de *B. tabaci* MEAM 1 não-virulíferas e ToCV-virulíferas em teste de dupla-escolha.

			5min	15min	30min	1h	6h	24h
Insetos não-virulíferos	Médias ± EPM	ToCV-infectada	1,67 ± 0,94	2,08 ± 0,96	3,33 ± 1,12	6,25 ± 1,52	8,75 ± 2,23	11,67 ± 3,39
		Não infectada	12,5 ± 1,9	16,25 ± 2,39	17,08 ± 2,64	22,08 ± 3,28	34,17 ± 4,76	46,67 ± 4,14
One-way ANOVA	p		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,001	< 0,0001	< 0,0001
	F		24,518	28,888	19,346	13,666	23,017	42,74
ANOVA de medidas repetidas (Scheffe´s)	p (tratamento)		0,0001					
	F (tratamento)		32,705					
	g.l		1, 22					
Insetos virulíferos	Médias ± EPM	ToCV-infectada	1,67 ± 0,94	2,92 ± 1,3	4,17 ± 1,49	4,58 ± 1,56	9,58 ± 3,11	11,25 ± 2,55
		Não infectada	6,25 ± 1,96	8,75 ± 2,89	12,5 ± 3,72	17,5 ± 4,87	25,83 ± 5,39	29,17 ± 5,9
One-way ANOVA	p		0,012	0,141	0,067	0,033	0,009	0,012
	F		7,502	2,338	3,709	5,155	8,085	7,502
ANOVA de medidas repetidas (Scheffe´s)	p (tratamento)		0,0171					
	F (tratamento)		6,66					
	g.l		1, 22					

Tabela 2. Percentuais médios ($\pm$ EPM) de indivíduos pousados nas plantas, valores de P e F para o teste de one-way ANOVA (compara tempo a tempo de avaliação) e ANOVA de medidas repetidas (compara as curvas dos tratamentos) para os experimentos de comportamento arrestante de *B. tabaci* MEAM 1 não-virulíferas e ToSRV-virulíferas em teste de dupla-escolha.

			5min	15min	30min	1h	6h	24h
Insetos não-virulíferos	Médias ± EPM	ToSRV-infectada	4,23 ± 1,86	4,62 ± 1,83	6,92 ± 2,37	8,08 ± 1,84	15,00 ± 3,1	19,23 ± 3,24
		Não infectada	8,75 ± 2,62	11,25 ± 2,39	13,75 ± 3,15	16,25 ± 2,76	19,58 ± 3,72	30,42 ± 2,92
One-way ANOVA	p		0,168	0,036	0,093	0,02	0,351	0,018
	F		2,024	4,938	3,064	6,253	0,907	6,494
ANOVA de medidas repetidas (Scheffe´s)	p (tratamento)		0,226					
	F (tratamento)		5,976					
	g.l		1, 22					
Insetos virulíferos	Médias ± EPM	ToSRV-infectada	3,33 ± 1,88	3,75 ± 2,18	5,00 ± 2,75	8,33 ± 3,18	13,33 ± 3,56	18,75 ± 3,90
		Não infectada	11,25 ± 2,96	15,42 ± 2,98	21,25 ± 3,32	23,75 ± 4,18	32,5 ± 2,85	39,17 ± 4,07
One-way ANOVA	p		0,029	0,004	0,001	0,008	<0,0001	<0,0001
	F		5,432	10,098	16,165	8,66	20,275	20,275
ANOVA de medidas repetidas (Scheffe´s)	p (tratamento)		0,0001					
	F (tratamento)		21,312					
	g.l		1, 22					

2.4. Discussão

Fitopatógenos podem induzir mudanças fisiológicas e fenotípicas em seus hospedeiros, a fim de obter vantagens adaptativas e promover uma maior eficiência de transmissão (Liu et al., 2013; Carmo-Sousa et al., 2014; He et al., 2015; Carmo-Sousa et al., 2016; Mauck, 2016).

Postula-se que os vírus não persistentes (NP) reduzam a qualidade da planta hospedeira com a finalidade de promover uma rápida dispersão dos insetos vetores (Mauck et al., 2015), uma vez que tais vírus podem ser adquiridos pelos vetores em tecidos superficiais de plantas infectadas, durante picadas de prova de curta duração (Nault 1997). Ademais, os vírus NP possuem uma relação menos específica e mais superficial com seu vetor, pois são retidos na extremidade apical dos estiletos maxilares, junto ao forro cuticular do canal alimentar, por curtos períodos de tempo (Ng & Falk, 2006; Carmo-Sousa et al., 2014). Em contraste, postula-se que os vírus de transmissão persistente melhorem a qualidade nutricional da planta hospedeira, a fim de promover períodos mais longos de alimentação do inseto vetor (Mauck et al., 2012), uma vez que estes patógenos, de modo geral, encontram-se limitados aos tecidos vasculares das plantas e possuem uma relação circulativa ou propagativa (portanto mais específica) com seus vetores, envolvendo período latente com duração de várias horas a dias (Nault, 1997).

No caso dos vírus transmitidos de modo semipersistente (SP), muitos encontram-se localizados nos vasos do floema, demandando, também, um maior período de permanência na planta infectada e alimentação do inseto vetor no floema para que ocorra aquisição viral (Nault, 1997). No entanto, assim como os vírus NP, possuem uma relação mais superficial com seus vetores, pois são retidos no forro cuticular do estomodeu de seus vetores e retidos por períodos relativamente curtos (meia-vida de horas) (Nault, 1997; Ng & Falk, 2006).

O presente estudo mostra que o comportamento de seleção hospedeira da mosca-branca *B. tabaci* MEAM 1 é significativamente alterado por infecções de vírus na planta hospedeira, ou pela presença do vírus no corpo deste inseto vetor. Entretanto, as respostas comportamentais do inseto frente a plantas de tomate infectadas e não infectadas variaram de acordo com a espécie do vírus, seu modo de transmissão e a presença ou ausência do vírus no corpo do vetor.

Para ToCV, que é um crinivírus transmitido de forma semipersistente por moscas-brancas, os resultados demonstraram que insetos não-virulíferos preferem pousar em plantas não infectadas, em testes de escolha entre plantas de tomate infectadas com ToCV (expostas

previamente a insetos virulíferos) e plantas de tomate não infectadas da mesma idade e variedade (previamente expostas a insetos não-virulíferos). Tais resultados observados divergiram do esperado, uma vez que a princípio, esperava-se que insetos não-virulíferos apresentariam tendência em pousar preferencialmente sobre plantas ToCV-infectadas a fim de adquirir o patógeno, o que otimizaria sua transmissão. Além disso, esperava-se que insetos ToCV-virulíferos prefeririam pousar inicialmente em plantas não infectadas, a fim de inocular o vírus, e após diversas horas mover-se em direção às plantas infectadas a fim de readquirir o patógeno, por se tratar de um vírus semipersistente. No entanto não se observou qualquer preferência, uma vez que os insetos virulíferos pousaram indistintamente sobre plantas ToCV-infectadas e plantas não infectadas.

Assim, as respostas comportamentais de indivíduos de *B. tabaci* MEAM 1 que carregam ou não ToCV na seleção de plantas hospedeiras parecem não contribuir para uma maior dispersão desse vírus em tomateiro. Embora trabalhando com um begomovírus, resultados similares foram relatados por Fang et al. (2013), que estudaram a preferência de duas espécies de *B. tabaci* (MEAM 1 e Mediterranean-MED) por plantas de tomate sadias vs. infectadas com *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Segundo esses autores, indivíduos não-virulíferos de *B. tabaci* MEAM 1 preferiram pousar em plantas não infectadas após 3, 6, 9 12 e 24 horas da liberação em teste de escolha, enquanto que indivíduos virulíferos de *B. tabaci* MEAM 1 e MED não demonstraram preferência entre plantas infectadas com TYLCV e não infectadas, pousando indistintamente sobre ambas. Ao avaliarem as respostas de moscas-brancas *B. tabaci* MEAM 1 virulíferas e não-virulíferas frente aos voláteis de plantas de tomate infectadas ou não por ToCV em ensaios de olfatometria, Fereres et al. (2016) também relataram padrões de escolha semelhantes. Esses autores observaram que plantas infectadas com ToCV apresentam maior quantidade de alguns terpenos, os quais parecem ser importantes substâncias de defesa da planta contra moscas-brancas, como demonstrado anteriormente para plantas infectadas com TYLCV (Luan et al., 2013; Fang et al., 2013).

Estudo similar foi realizado utilizando-se clones de batata das variedades ‘Ágata’ e Bach-4 infectadas e não infectadas com ToCV, no entanto observou-se resposta comportamental diferente de moscas-brancas MEAM 1 frente a estas plantas, uma vez que nos primeiros 30 minutos os indivíduos foram mais atraídos por plantas ‘Ágata’ não infectadas. Na avaliação de 4 e 6 h a preferência foi por clones ‘Ágata’ ToCV-infectados, e nas avaliações de 12, 24 e 72 h os indivíduos foram atraídos indistintamente para plantas infectadas e não infectadas das duas variedades de batata. Verificou-se que clones de batata ‘Ágata’ e Bach-4 infectados com ToCV e não infectados diferiram na quantidade e tipo de volátil, no entanto,

diferentemente do observado em plantas de tomate, clones de batata ToCV-infectados apresentaram supressão de alguns voláteis ou estavam presentes em quantidade menor, fato que poderia explicar a maior preferência por plantas infectadas vs. plantas não infectadas observada em alguns períodos de avaliação (Pereira, 2016).

Por outro lado, os experimentos de preferência para pouso conduzidos com o begomovírus ToSRV, transmitido de modo persistente por *B. tabaci*, verificou-se que insetos virulíferos possuem nítida preferência em pousar sobre plantas não infectadas de tomateiro, comportamento este que favorece a dispersão do vírus, acelerando a curva de progresso da doença. Esses resultados coincidem com os de Carmo-Sousa et al. (2016), que observaram preferência de afídeos carregando o vírus persistente *Curcubit aphid-borne yellows virus* (CABYV) (gênero *Polyovirus*) em pousar sobre plantas sadias de pepino, e concluíram que tal comportamento favorece a disseminação do vírus a plantas sadias no campo. Resultados similares também foram obtidos por Fereres et al. (2016), ao avaliarem a resposta comportamental de indivíduos de *B. tabaci* MEAM 1 carregando ou não ToSRV frente aos voláteis de plantas de tomate infectadas por este vírus vs. plantas não infectadas. Utilizando olfatômetro em Y, esses autores constataram que insetos ToSRV-virulíferos foram mais atraídos por voláteis de plantas não infectadas, enquanto que insetos avirulíferos não revelaram preferência entre voláteis de plantas infectadas e não infectadas.

É importante salientar que, no presente trabalho, indivíduos não-virulíferos de *B. tabaci* MEAM 1 não apresentaram preferência de pouso entre plantas de tomate infectadas com ToSRV e plantas não infectadas nas primeiras 6 h do teste de livre-escolha, mas passaram a preferir plantas não infectadas na 24^a. hora. Este comportamento pode ser decorrente do fato de que este vírus é adquirido com eficiência em períodos de acesso à aquisição de poucas horas (Marubayashi 2009; Freitas 2012; Toloy 2015). Sendo assim, é provável que após um período de exposição de muitas horas a plantas infectadas no teste de livre-escolha, uma proporção significativa de indivíduos tenha adquirido ToSRV, passando a se comportar como insetos virulíferos, ou seja, exibindo preferência por plantas não infectadas, o que então promoveria a dispersão do vetor e inoculação de novas plantas.

Tais resultados sugerem que o vírus persistente ToSRV é capaz de manipular diretamente o comportamento de seleção hospedeira da mosca-branca *B. tabaci* MEAM 1 em favor de sua própria disseminação, uma vez que insetos virulíferos pousam mais frequentemente sobre plantas de tomate não infectadas, aumentando a probabilidade de transmissão do vírus. Esse tipo de manipulação no comportamento da mosca-branca não foi observado no caso do vírus semipersistente ToCV, em que insetos virulíferos respondem

indistintamente a plantas infectadas e não infectadas pelo vírus. É importante considerar é que ToSRV é um vírus transmitido de forma persistente-circulativa e, como tal, possui uma relação muito estreita com o inseto vetor, o que explicaria uma influência da infecção viral no comportamento, biologia e preferência da mosca-branca, com efeitos positivos na disseminação viral, evidenciando uma co-evolução entre vírus e vetor (Eigenbrode et al., 2002; Bosque-Perez & Eigenbrode, 2011). Em contraste, ToCV é um vírus não circulativo, retidos no forro cuticular da porção anterior do tubo digestivo, cuja associação com o vetor é mais superficial.

Estudos prévios utilizando o vírus não-persistente *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Família: *Bromoviridae*, Gênero: *Cucumovirus*) demonstraram que a curtos períodos de tempo (30 min) o afídeo *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) tende a pousar em plantas infectadas com CMV em testes de livre-escolha entre plantas sadias vs. infectadas, mas essa preferência se altera após longos períodos de tempo (48 h) (Carmo-Sousa et al., 2014). CMV aumenta a atratividade de plantas infectadas (induzindo maior emissão de voláteis), mas os afídeos atraídos para as mesmas rapidamente se dispersam, pois a infecção por CMV reduz a qualidade nutricional do hospedeiro afetando negativamente a performance dos indivíduos nessas plantas (Mauck et al., 2010). Esta estratégia é benéfica para CMV, uma vez que, sendo um vírus não-persistente, é adquirido durante breves provas em tecidos superficiais de plantas infectadas, podendo ser imediatamente transmitido para plantas sadias, se o inseto se dispersar.

Os vírus analisados no presente estudo, ToCV e ToSRV, pertencem a gêneros cujas espécies virais colonizam principalmente o tecido floemático, necessitando mais tempo para serem adquiridos ou inoculados. No entanto, há necessidade de estudos mais detalhados sobre a distribuição desses vírus em plantas hospedeiras. Um trabalho recente de microscopia envolvendo hibridização *in situ* mostrou que o begomovírus ToSRV também está presente em células companheiras e epidermais de tomateiro, havendo evidências de que possa ser adquirido em curtos períodos de acesso à aquisição pelo vetor nesses tecidos superficiais (Toloy, 2015). Entretanto, devido à existência de um período latente de begomovírus em insetos vetores, ToSRV somente poderá ser transmitido para plantas sadias após várias horas da aquisição.

Nos testes de comportamento arrestante, os resultados revelaram tendência de permanência dos insetos virulíferos em plantas não infectadas, que foi mais acentuada para o vírus persistente ToSRV do que para o semipersistente ToCV. No caso de ToCV houve maior permanência (efeito arrestante) quando os insetos foram liberados em plantas não infectadas tanto para insetos virulíferos como para não virulíferos, sendo este efeito arrestante mais acentuado para os últimos. Por outro lado, não houve diferença em efeito arrestante entre plantas infectadas e não infectadas com ToSRV quando insetos não virulíferos foram liberados

sobre as mesmas, exceto em alguns períodos de avaliação (por exemplo, 24 h após a liberação), quando os insetos se movimentaram mais frequentemente de plantas ToSRV-infectadas em direção a plantas não infectadas. Essas tendências comportamentais de insetos não virulíferos são, de um modo geral, consistentes com as observadas nos testes de preferência para pouso.

Os padrões de comportamento arrestante de mosca-branca observados no presente estudo podem estar relacionados com diferenças na qualidade nutricional entre plantas de tomate infectadas e não infectadas com ToCV e ToSRV. Mauck et al. (2012) postularam, com base na literatura, que vírus de transmissão persistente promoveriam melhores condições nutricionais nas plantas hospedeiras para os insetos vetores, a fim de que estes permaneçam por períodos mais longos nestas plantas. Por outro lado, a infecção por vírus não-persistentes resultaria em menor qualidade nutricional nas plantas hospedeiras, a fim de agilizar a saída do inseto da planta infectada após breves provas. Porém, em se tratando do complexo *Bemisia tabaci*, além do efeito de diferentes vírus sobre a planta hospedeira, parece haver diferenças nas respostas comportamentais e biológicas entre espécies de moscas-brancas deste complexo. Para um mesmo vírus (TYLCV), observaram-se respostas de não preferência ou efeitos negativos sobre a espécie *B. tabaci* MEAM 1 (biótipo B) (Rubinstein & Czosnek 1997; Fang et al., 2013; Pan et al., 2013) e efeitos benéficos ou neutros sobre a espécie MED (biótipo Q) (Maluta et al. 2014; Fang et al., 2013; Pan et al., 2013).

Em resumo, os resultados obtidos nos testes de preferência para pouso e de comportamento arrestante no presente estudo mostram que ToCV e ToSRV influenciam diretamente o inseto vetor, uma vez que indivíduos não-virulíferos e virulíferos se comportam de maneira distinta em relação a plantas infectadas e não infectadas por esses vírus. Porém, as alterações comportamentais induzidas pelo crinivírus ToCV em *B. tabaci* MEAM 1 não parecem favorecer a sua disseminação, já que indivíduos virulíferos pousam indistintamente sobre plantas ToCV-infectadas e plantas não infectadas, enquanto que indivíduos não-virulíferos apresentam forte preferência por plantas não infectadas. Em contraste, no caso do begomovírus ToSRV, insetos virulíferos mostraram forte preferência para pousar em plantas não infectadas, o que eleva a sua probabilidade de transmissão por *B. tabaci* MEAM 1. Assim, esse begomovírus parece tirar vantagem das interações com seu vetor, aumentando a preferência por plantas não infectadas após os insetos tornarem-se virulíferos. Tais resultados demonstram as complexas relações existentes entre fitovírus e seu vetor *B. tabaci*, com possíveis implicações na epidemiologia das viroses.

2.5. Conclusões

- A presença ou não dos vírus ToSRV e ToCV no corpo de *B. tabaci* MEAM 1 alteram seu comportamento frente às plantas de tomate não infectadas e infectadas com os mesmos vírus.
- O crinivírus ToCV afeta a seleção hospedeira do inseto vetor; no entanto, os comportamentos observados não favorecem a transmissão de ToCV para novos hospedeiros.
- O comportamento de seleção hospedeira observado para moscas-brancas ToSRV-virulíferas favorece a inoculação de novas plantas hospedeiras.

Referências

- BOSQUE-PÉREZ, N. A.; EIGENBRODE, S. D. The influence of virus-induced changes in plants on aphid vectors: Insights from luteovirus pathosystems. **Virus Research**, v. 159, p. 201-205, 2011.
- CARMO-SOUSA, M.; MORENO, A.; GARZO, E., FERERES, A. A non-persistently transmitted-virus induces a pull–push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. **Virus Research**, p.1-9, 2014.
- CARMO-SOUSA, M.; MORENO, A.; PLAZA, M.; GARZO, E.; FERERES, A. *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) modifies the alighting, settling and probing behaviour of its vector *Aphis gossypii* favouring its own spread. **Annals of Applied Biology**. v. 169, p. 284-297, 2016.
- CASTLE, S. J.; MOWRY, T. M.; BERGER, P. H. Differential settling by *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) on various virus infected host plants. **Annals of the Entomological Society of America**, v.91, p. 661-667, 1998.
- CZOSNEK, H.; GHANIM, M.; GHANIM, M. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci*- insights from studies with *Tomato yellow leaf curl virus*. **Annals of Applied Biology**, v. 140, p. 215-231, 2002.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Report**, v.1, p. 19–21, 1983.
- 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**, v. 86, p. 1345–1349, 2002.
- EIGENBRODE, S. D.; DING, H.; SHIEL, P.; BERGER, P. H. Volatiles from potato plants infected with Potato leafroll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). **Proceedings of the Royal Society of London Series B. Biological**, v. 269, p. 455-460, 2002.
- FANG, Y.; JIAO, X.; XIE, W.; WANG, S.; WU, Q.; SHI, X.; CHEN, G.; SU, Q.; YANG, H.; PAN, H.; ZHANG, Y. *Tomato yellow leaf curl virus* alters the host preferences of its vector *Bemisia tabaci*. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1-5, 2013. DOI: 10.1038/srep02876.
- FERERES, A.; KAMPMEIER, G. E.; IRWIN, M. E. Aphid attraction and preference for soybean and pepper plants infected with potyviridae. **Annals Entomological Society of America**, College Park, v. 92, p. 542-548, 1999.
- FERERES, A.; PEÑAFLORES, M. F. G.; FAVARO, C. F.; AZEVEDO, K. E. X.; LANDI, C. H.; MALUTA, N. K. P.; BENTO, J. M. S.; LOPES, J. R.S. Tomato infection by whitefly-transmitted circulative and non-circulative viruses induce contrasting changes in plant volatiles and vector behaviour. **Viruses**, v. 8, p. 225, 2016.

- 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**, v. 35, p. 43-47, 2010.
- FONTES, F.H.M.; COLOMBO, C.A.; LOURENÇÃO, A.L. Caracterização molecular e divergência genética de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) em diferentes culturas e locais de cultivo. **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 221-226, 2010.
- FONTES, F.H.M.; COLOMBO, C.A.; LOURENÇÃO, A.L. Structure of genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) populations in Brazilian crops and locations. **Scientia Agricola**, v. 69, p. 47-53, 2012.
- FREITAS, D. M. S. *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*. 2012. 74p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ/USP, Piracicaba. 2012.
- GRAY, S.; GILDOW, F. E. Luteovirus-aphid interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 539-566, 2003.
- HE, W. B.; LI, J.; LIU, S. S. Differential profiles of direct and indirect modification of vector feeding behavior by a plant virus. **Scientific Reports**, v. 5, p.7682; 2015. DOI:10.1038/srep07682.
- HULL, R. 2014. **Plant Virology**. 5th Ed., Elsevier Academic Press, California, USA. 1120 pp.
- LIU B.; PREISSER, E. L.; CHU, D.; PAN, H.; XIE, W.; WANG, S.; WU, Q.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. Multiple forms of vector manipulation by a plant-infecting virus: *Bemisia tabaci* and *Tomato yellow leaf curl virus*. **Journal of Virology**, v.87, p. 4929-4937, 2013.
- LUAN, J. B.; YAO, D. M.; ZHANG, T.; WALLING, L. L.; YANG, M.; WANG, Y.J.; LIU, S. S. Suppression of terpenoid synthesis in plants by a virus promotes its mutualism with vectors. *Ecology Letters*, v. 16, p. 390–398, 2013.
- MALUTA, N. K. P.; GARZO, E.; MORENO, A.; LOPES, J. R. S.; FERERES, A. *Tomato yellow leaf curl virus* benefits population growth of the Q biotype of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**, v. 43, p. 385-392, 2014.
- 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, 109p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2009.
- MAS, F.; VEREIJSEN, J.; SUCKLING, D. M. Influence of the pathogen *Candidatus Liberibacter solanacearum* on tomato host plant volatiles and psyllid vector settlement. **Journal of Chemical Ecology**, p. 1197-1202, 2014.

- MAUCK, K. E.; De MORAES, C. M.; MESCHER, M. C. Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 3600-3605, 2010.
- MAUCK, K. E.; BOSQUE-PÉREZ, N. A.; EIGENBRODE, S. D.; De MORAES, C. M.; MESCHER, M. C. Transmission mechanisms shape pathogen effects on host-vector interactions: evidence from plant viruses. **Functional Ecology**, v. 26, p.1162-1175, 2012.
- MAUCK, K. E.; De MORAES, C. M.; MESCHER, M. C. Infection of host plants by *Cucumber mosaic virus* increases the susceptibility of *Myzus persicae* aphids to the parasitoid *Aphidius colemani*. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10963, 2015.
- MAUCK, K. E. Variation in virus effects on host plant phenotypes and insect vector behavior: what can it teach us about virus evolution? **Current Opinion in Virology**, v. 21, p. 114-123, 2016.
- MORENO-DELAFUENTE, A.; GARZO, E.; MORENO, A.; FERERES, A. A plant manipulation the behavior of its whitefly vector to enhance its transmission efficiency and spread. **PLoS One**, v.8, p.1-10, 2013.
- NAULT, L. R. Arthropod transmission of plant viruses: A new synthesis. **Annals of the Entomological society of America**, v. 90, p.521-541, 1997.
- NG, J. C.; FALK, B. W. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 183-212, 2006.
- OHNISHI, J.; KITAMURA, T.; TERAMI, F.; HONDA, K. A selective barrier in the midgut epithelial cell membrane of the nonvector whitefly *Trialeurodes vaporariorum* to *Tomato yellow leaf curl virus* uptake. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, p.131-139, 2009.
- PAN, H. P.; CHU, D.; LIU, B.; SHI, X.; GUI, L.; XIE, W.; CARRIERE, Y.; LI, X.; ZHANG, Y. Differential effects of an exotic plant virus on its two closely related vectors. **Science Reports**, v.3, p. 1-6, 2013.
- PEREIRA, L. S. **Interações *Bemisia tabaci* biótipo B e *Tomato chlorosis virus* em clones de batata**. 2016. 66P. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas, 2016.
- RUBINSTEIN, G.; CZOSNEK, H. Long-term association of *Tomato yellow leaf curl virus* with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 2683–2689, 1997.
- SPSS INC (2010) **IBM Statistics SPSS 19.0 Package** for Windows. Chicago:USA.
- THORSTEINSON, A. J. Host selection in phytophagous insects. **Annual Review of Entomology**, v.5, p.193-218, 1960.
- TOLOY, R. S. **Período mínimo para a aquisição do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) por *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiro e identificação de sítios de aquisição do**

vírus. 2015. 94p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ/USP, Piracicaba. 2015.

VALLE, G.E.; LOURENÇÃO, A.L.; ZUCCHI, M.I.; PINHEIRO, J.B.; DE ABREU, A.G. Population variability of *Bemisia tabaci* (Genn.) in different hosts. **Genetics Molecular Research**, v. 12, p. 4615-4624, 2013.

VIDA VERDE LTDA: Acesso em: <http://www.vidaverde.agr.br/produtos.htm>

WERNER, B. J.; MOWRY, T. M.; BOSQUE-PÉREZ, N. A.; DING, H.; EIGENBRODE, S. D. Changes in green peach aphid responses to potato leafroll virus-induced volatiles emitted during disease progression. **Environmental Entomology**, v. 38, p. 1429-1438, 2009.

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

3. EFEITOS DIRETO E INDIRETO DO CRINIVÍRUS *Tomato chlorosis virus* (TOCV) NO DESEMPENHO BIOLÓGICO DE *Bemisia tabaci* (GENN.) (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE)

Resumo

Os fitovírus podem influenciar diretamente seus vetores, bem como indiretamente por intermédio de plantas hospedeiras, alterando assim o desempenho biológico e comportamental dos vetores a fim de disseminarem-se para novos hospedeiros. Deste modo, o presente capítulo teve como objetivo estudar os efeitos diretos e indiretos do crinivírus *Tomato chlorosis virus* (ToCV) - transmitido de modo semipersistente- sobre o desempenho biológico de *Bemisia tabaci* (Genn.) MEAM 1 (Middle East-Asia Minor 1). Foram analisados os efeitos diretos (em plantas de couve, imune ao vírus) e indiretos (em plantas de tomate, hospedeiro suscetível) de ToCV sobre os parâmetros biológico de *B. tabaci*: duração e viabilidade ninfal, fecundidade, fertilidade e longevidade de machos e fêmeas. Os resultados revelaram efeito direto apenas sobre a duração do primeiro instar ninfal, que foi mais longo em insetos virulíferos; os demais ínstaes e parâmetros da fase jovem e adulta não sofreram alterações. Em contrapartida, indivíduos que se desenvolveram em plantas de tomateiro infectado foram afetados negativamente pelo ToCV, pois levaram mais tempo até atingirem a fase adulta e apresentaram menor viabilidade ninfal comparados com indivíduos que se desenvolveram em plantas não infectadas. Assim, os resultados demonstram efeito negativo indireto de ToCV sobre moscas-brancas que se desenvolvem em tomateiro infectado, caracterizado por maior mortalidade e duração da fase ninfal, mas sem efeitos na fase adulta. Embora tenha havido alongamento do 1º instar ninfal em insetos virulíferos que se desenvolveram em plantas de couve, pode-se dizer que o efeito direto do vírus é neutro, pois nenhum outro parâmetro foi afetado.

Palavras-chave: Biologia de insetos; Mosca-branca; *Crinivirus*.

Abstract

Phytoviruses can directly influence their vectors as well as indirectly through host plants, thereby altering the biological and behavioral performance of vectors in order to spread to new hosts. Thus, the present chapter aimed to study the direct and indirect effects of the crinivirus *Tomato chlorosis virus* (ToCV) - transmitted semi-persistently - on the biological performance of *Bemisia tabaci* (Genn.) MEAM 1 (Middle East Asia Minor 1). The direct effects (on cabbage plants, -immune to the ToCV) and indirect (on tomato plants, ToCV-susceptible) of ToCV on biological parameters of *B. tabaci*: nymphal duration and viability, fecundity, fertility and longevity of males and females. The results showed a direct effect only on the first instar duration, which was longer for viruliferous insects, but the other instars and parameters of juvenile and adult phase have not changed. In contrast, when individuals developed in infected tomato plants, ToCV negatively affected them, since they took longer to reach adulthood and there was less nymphal viability in these plants compared to individuals that developed in non-infected plants. Thus, our results demonstrate an indirect negative effect of ToCV on whiteflies that develop in infected tomato, characterized by higher mortality and duration of the nymphal phase, but without effects in the adult phase. Although there was an effect on the 1st instar duration of the nymphs, it can be said that the direct effect of the virus was neutral, since no other parameter was affected.

Keywords: Insect biology; Whitefly; *Crinivirus*.

3.1. Introdução

Frente à vasta quantidade de vírus e outros patógenos transmitidos por vetores e as complexas interações existentes entre eles, vem sendo cada vez mais estudados os efeitos dos patógenos sobre o comportamento e desempenho biológico de seus vetores. São vários os exemplos que se pode encontrar na literatura, não se restringindo apenas às relações vírus-vetor (Mckenzie, 2002; Guo et al., 2010, 2012; Mauck et al., 2010, 2012, 2016; Stafford et al., 2011; Ingwell et al., 2012; Carmo-Sousa et al., 2014), mas também às relações de bactérias fitopatogênicas e seus respectivos vetores (Nachappa et al., 2012; Mas et al., 2014). Tais alterações podem ser entendidas como estratégias dos patógenos para promover sua disseminação a novos hospedeiros.

Muitos estudos envolvendo efeito de patógenos sobre seus vetores foram conduzidos com base nas relações vírus-afídeos (Miller & Coon, 1964; Posen, 1969; Fereres et al., 1989; Fereres et al., 1999; Eingenbrode, 2002; Fiebig et al., 2004; Hodge & Powell, 2010). Porém, há vários estudos relacionados às interações de vírus com moscas-brancas (Rubinstein & Czosnek, 1997; Czosnek et al., 2001; Jiu et al., 2007; Guo et al., 2010, 2012; Pusag et al., 2012; Fang et al., 2013; Liu et al., 2013; Moreno-Delafuente et al., 2013; Pan et al., 2013; Maluta et al., 2014; Pereira, 2016), tripses (Medeiros et al., 2004; Belliure et al., 2005), cigarrinhas (Maramorosch, 1958; Jensen, 1959) e psílídeos (Nachappa et al., 2012; Mas et al., 2014), entre outros insetos vetores de fitopatógenos. No entanto, estudos comparando os efeitos diretos e indiretos de vírus com diferentes modos de transmissão (não-persistente, semipersistente e persistente) sobre o comportamento e desempenho de seus vetores ainda é muito escasso (Mauck et al., 2012).

Partindo do pressuposto de que muitos vírus podem influenciar a biologia de seus vetores, estudos com diferentes begomovírus foram conduzidos com a finalidade de verificar seus efeitos no ciclo de vida e desempenho biológico de moscas-brancas do complexo *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae). Como exemplo destas interações, pode-se citar o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (gênero *Begomovirus*), que é transmitido de modo persistente. As relações entre *B. tabaci* e TYLCV tem sido amplamente estudada não só devido à sua importância econômica, mas também pelas evidências de que este vírus (formado por inúmeros isolados) possui características de patógeno de insetos (Bosco et al., 2004), afetando diversos parâmetros comportamentais e biológicos de seu vetor *B. tabaci* (Rubinstein & Czosnek, 1997; Mckenzie, 2002; Jiu et al., 2007; Fang et al., 2013; Maluta et al., 2014; He et al., 2015).

Embora diversos estudos tenham sido realizados sobre as relações entre moscas-brancas e vírus de plantas, há na literatura poucos exemplos relacionados aos efeitos diretos de vírus (decorrentes da presença do vírus no corpo do inseto vetor) sobre seus vetores (Rubinstein & Czosnek, 1997; Moreno-Deladuate et al., 2013; Maluta et al., 2014). A maioria dos relatos se referem a efeitos indiretos no comportamento e biologia do vetor mediados por alterações fisiológicas na planta infectada. Ademais, os estudos sobre esse tema enfocaram quase que exclusivamente um único vírus de transmissão persistente, TYLCV. No entanto, postula-se, que os diferentes tipos de relação vírus-vetor, ou seja, não-persistente (*stylet-borne*), semipersistente (*forgut-borne*), persistente circulativa e persistente propagativa (Nault, 1997) possam influenciar de forma distinta nos efeitos diretos e indiretos sobre a biologia e/ou comportamento dos vetores (Mauck et al., 2012).

Tendo em vista a importância do complexo *B. tabaci* como praga e vetor de diversos fitovírus com diferentes modos de transmissão, o presente capítulo teve como objetivo investigar se o crinivírus de transmissão semipersistente *Tomato chlorosis virus* (ToCV, gênero *Crinivirus*) afeta direta e indiretamente o desempenho biológico de seu vetor *B. tabaci* MEAM 1 desde a fase imatura (duração e viabilidade ninfal) até parâmetros da fase adulta (fecundidade, fertilidade e longevidade de machos e fêmeas).

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Material biológico: criação de mosca-branca, plantas e isolados de vírus.

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação do Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, SP, utilizando-se a espécie MEAM 1 de *B. tabaci*, por ser predominante no Brasil.

A população inicial de *B. tabaci* MEAM 1 foi obtida junto ao Instituto Agronômico (IAC). A colônia dos insetos foi mantida em casa-de-vegetação sob temperatura ambiente, em gaiolas revestidas com tela anti-afídica sobre plantas de couve-manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. cv. Manteiga) plantadas em vasos plásticos contendo substrato Tropstrato HT composto de casca de pinus, turfa e vermiculita expandida com umidade de 60% p/p (Vida Verde Ltda, 2016). Espécimes de referência (*vouchers*) de *B. tabaci* MEAM 1 usados no estudo, foram armazenados em etanol 100% em ultrafreezer (-80°C) no Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos da ESALQ/USP.

O isolado de *Tomato chlorosis virus* (ToCV) foi obtido de tomateiro no município de Sumaré-SP, e fornecido pelo Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ- USP. Para a manutenção do isolado, semanalmente foram realizadas aquisições e inoculações em novas plantas sadias de tomateiro. Para a aquisição, insetos adultos não sexados foram colocados em tubos *falcon* contendo uma folha de tomate sintomática (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara) por um Período de Acesso à Aquisição (PAA) de 48 h. Posteriormente cada grupo de 20-25 insetos foi transferido para uma nova planta de tomate no estágio de 2-4 folhas verdadeiras (aproximadamente 15 dias), utilizando-se uma gaiola tipo *clip-cage* para confinar os insetos, para um Período de Acesso à Inoculação (PAI) de 5 dias. Após o PAI, os insetos juntamente com a folha onde estavam foram removidos para eliminar ovos e ninfas. Para a obtenção das plantas de tomate controle (não-infectadas) utilizou-se a mesma metodologia descrita para plantas ToCV-infectadas, porém infestando as plantas (2-4 folhas verdadeiras) com insetos sadios provenientes da criação de manutenção por um PAI de 5 dias. Para confirmação da infecção por ToCV nas plantas inoculadas foram realizadas extrações de RNA e posterior RT-PCR, como descrito por Freitas et al. (2012).

Os experimentos de efeitos diretos (3.2.2) e indiretos (3.2.3) de ToCV nos parâmetros biológicos de *B. tabaci* MEAM 1 foram conduzidos em casa-de-vegetação telada com temperatura variando entre 25-30°C. Os tratamentos controle (insetos não-virulíferos ou plantas não infectadas) e com infecção de vírus (insetos virulíferos ou plantas infectadas) foram mantidos em compartimentos separados em uma mesma casa-de-vegetação, dentro de gaiolas do tipo *Bugdorm*, modelo BD2400, revestidas de plástico transparente e tecido de malha fina, com dimensões de 75 x 75 cm de base e 115 cm de altura.

3.2.2. Efeito direto de ToCV sobre parâmetros biológicos de *B. tabaci* MEAM 1

Avaliou-se a duração e viabilidade dos quatro ínstares ninfais e total (de toda a fase ninfal), longevidade de machos e fêmeas, fecundidade e fertilidade de insetos virulíferos (que adquiriram ToCV no primeiro ínstar ninfal) e não virulíferos em plantas de couve-manteiga (cv. Manteiga), que é imune ao ToCV, permitindo assim a verificação apenas dos efeitos diretos do vírus sobre o vetor, sem a intervenção de alterações fisiológicas de uma planta infectada pelo mesmo vírus.

Os insetos virulíferos e não-virulíferos usados no experimento foram produzidos a partir de adultos previamente sadios de *B. tabaci* MEAM 1, provenientes da colônia de manutenção em couve-manteiga. Para a produção de insetos virulíferos, adultos sadios de mosca-branca foram colocados em grupos de aproximadamente 20 indivíduos por gaiola do

tipo *clip-cage*, em duas plantas de tomate infectado com ToCV (3 - 4 semanas após a inoculação), para realização de postura. O mesmo procedimento foi realizado para a produção de insetos do tratamento controle (insetos não-virulíferos), colocando-se adultos sadios de mosca-branca em duas plantas de tomate não infectado (previamente “inoculadas” com insetos sadios), em grupos de aproximadamente 20 insetos por *clip-cage*, para que fossem submetidas às mesmas condições das moscas-brancas do tratamento com vírus. Transcorrido um período de oviposição de 24 h, os insetos adultos foram retirados das plantas com auxílio de um sugador bucal, permanecendo apenas os ovos.

As ninfas que eclodiram dos ovos depositados foram transferidas para plantas de couve (25 - 30 dias de idade) 24 h após a eclosão (1º ínstar ninfal), totalizando aproximadamente 220 ninfas por tratamento, as quais foram distribuídas em grupos de dez ninfas por folha, sendo utilizadas três folhas por planta de couve, onde permaneceram durante toda a fase jovem na fase abaxial das folhas. Após sua fixação em um determinado ponto da folha, o que ocorreu ao final do 1º ínstar, cada ninfa foi numerada sequencialmente para acompanhamento individual de seu desenvolvimento. Ao atingirem o quarto ínstar ninfal foram postas as gaiolas do tipo *clip-cage* para permitir a captura dos insetos logo após a emergência.

Durante o período de desenvolvimento ninfal, avaliou-se diariamente a sobrevivência dos indivíduos e mudanças de ínstar de modo a calcular a viabilidade (% sobrevivência) e duração (de cada ínstar e de toda a fase ninfal). Para a obtenção das médias e análise dos dados, foram consideradas apenas ninfas que sobreviveram mais de três dias após a transferência, a fim de descartar mortalidade acarretada pela manipulação. Ademais, para que fosse possível analisar os dados de viabilidade ninfal, cada planta de couve foi considerada uma parcela, totalizando oito parcelas por tratamento. Já para a análise dos dados de duração dos ínstaes, cada ninfa foi considerada uma repetição.

Com a emergência dos adultos foi realizada a sexagem e foram formados 22 casais de cada tratamento, os quais foram colocados em plantas de couve de aproximadamente 30 dias de idade. Os casais foram mantidos individualizados em gaiolas do tipo *clip-cage* para realização de postura na face abaxial de folhas de couve (em número de 3 - 4 casais por planta) em distintas folhas, onde foram trocados de local dentro da mesma folha a cada três dias para propiciar espaço suficiente aos insetos para a realização das posturas. Avaliou-se o número total de ovos depositados pelas fêmeas em cada tratamento. O número de ninfas eclodidas (fertilidade) foi avaliado sempre 15 dias após o primeiro dia de cada período de postura de três dias. Para as análises referentes aos dados de fecundidade e fertilidade, cada casal foi considerado uma repetição. Já para a análise dos dados referentes à longevidade, cada indivíduo

foi considerado uma repetição separadamente. Para a longevidade realizou-se análise de 22 fêmeas e 19 machos no tratamento controle e 22 fêmeas e 20 machos no tratamento com indivíduos que adquiriram ToCV, uma vez que alguns machos escaparam das gaiolas *clip-cages* durante o período.

3.2.3. Efeito indireto de ToCV sobre parâmetros biológicos de *B. tabaci* MEAM 1

Avaliou-se a duração e viabilidade dos quatro ínstaras ninfais e total (de toda a fase ninfal), longevidade de machos e fêmeas, fecundidade e fertilidade dos insetos que se desenvolveram em plantas de tomate infectadas ou não pelo ToCV. Utilizaram-se sete plantas de tomate com sintomas claros de infecção por ToCV e sete plantas não infectadas (“inoculadas” com insetos sadios), com aproximadamente 35 dias de idade. Para tal, adultos não-virulíferos e não sexados de *B. tabaci* MEAM 1 provenientes da colônia de manutenção foram divididos em grupos de 20 indivíduos por gaiola do tipo *clip-cage* para realizar postura em plantas de tomate não infectadas e ToCV-infectadas. As posturas foram realizadas na quarta, quinta e sexta folha contadas de baixo para cima, sendo que esta disposição foi escolhida por serem as folhas que apresentavam sintomas na maioria das plantas do tratamento com vírus. Os adultos foram retirados das plantas após 24 h de postura, permanecendo apenas os ovos. Após a eclosão, foram mantidas no máximo dez ninfas em cada folha, totalizando 30 ninfas por planta. As ninfas foram mantidas sem a proteção das *clip-cages* até atingirem o 4º ínstar, quando então foram confinadas sob as gaiolas para permitir a captura dos adultos logo após a emergência.

Para a obtenção das médias e análise dos dados de desenvolvimento ninfal neste experimento, foram consideradas todas as ninfas desde a eclosão, não sendo necessário descontar um período de três dias, visto que não houve manipulação e transferência das ninfas de primeiro ínstar. Contudo, a análise dos dados de duração e viabilidade do período ninfal foi feita utilizando-se a mesma abordagem descrita para efeito na biologia em plantas de couve (item 3.2.2).

Após a emergência dos adultos, formaram-se 22 casais provenientes dos tratamentos de plantas infectadas e não infectadas pelo vírus, os quais foram individualizados em gaiolas do tipo *clip-cage* em novas plantas de tomate infectadas (com sintomas claros de ToCV) e não infectadas, respectivamente, para avaliação da fecundidade, fertilidade e longevidade. Foram colocados três casais por planta, os quais foram realocados para novos folíolos dentro da mesma

folha composta a cada três dias. Porém, no tratamento com plantas ToCV-infectadas foram contabilizados apenas ovos de 17 fêmeas, visto que algumas escaparam logo nos primeiros dias.

Para as análises de longevidade foram utilizadas 21 fêmeas e 19 machos no tratamento controle (plantas não infectadas) e 15 fêmeas e 15 machos no tratamento com indivíduos que se desenvolveram em plantas infectadas. Houve diferença na quantidade de fêmeas analisadas quanto à fecundidade e longevidade, uma vez que, embora tenha sido contabilizado o número de ovos, ao final do experimento algumas fêmeas escaparam ou morreram dentro do *clip-cage* mas não foram encontradas, não sendo, portanto, contabilizadas nas análises de longevidade. O número de ninfas eclodidas (fertilidade) foi avaliado sempre 15 dias após o primeiro dia de cada postura de três dias. Para as análises dos dados de fecundidade e fertilidade, cada casal foi considerado uma repetição. Já para a análise dos dados referentes à longevidade, cada indivíduo foi considerado uma repetição.

3.2.4. Análise estatística

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, onde cada tratamento e seu respectivo controle foram mantidos em plantas e compartimentos separados dentro da mesma casa-de-vegetação. Para análise dos dados foi utilizado o *software* da IBM SPSS versão 19.0 (SPSS, 2010). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sendo transformados em $\ln(x+1)$, $\sqrt{x+1}$ ou $\arcsen\sqrt{x}/100$ (no caso de porcentagem) com base na média e variância, quando necessário. Para os dados que, mesmo depois de transformados não seguiram uma distribuição normal foi aplicado o teste não paramétrico de U. Mann-Whitney. Já para os dados brutos ou transformados que seguiram uma distribuição normal, foi aplicado o teste *t*-Student.

3.3. Resultados

3.3.1. Efeito direto de ToCV no desempenho biológico de *B. tabaci* MEAM 1

No experimento de efeito direto de ToCV sobre a duração do período ninfal observou-se que apenas o 1º ínstar foi afetado, havendo maior duração do período quando as ninfas estavam virulíferas (4,47 dias) comparado às não-virulíferas (3,79 dias). Tal fato culminou com um efeito na duração total, porém pode-se observar que foi em decorrência do efeito no 1º

ínstar, uma vez que os demais ínstares tiveram duração em dias muito semelhantes, não havendo diferença estatística (Tabela 3).

Tabela 3. Duração média (dias)¹ ($\pm$ EPM) (n) dos estádios ninfais e do período ninfal (total) e adulto de *B. tabaci* MEAM 1 em plantas de couve, após a aquisição de ToCV no 1º ínstar durante 24 h (insetos virulíferos), em relação a insetos não-virulíferos.

Estágio		Insetos virulíferos	Insetos não-virulíferos	p
Ninfal	1º ínstar ¹	4,47 $\pm$ 0,06a (186)	3,79 $\pm$ 0,05b (196)	<0,0001
	2º ínstar ¹	2,45 $\pm$ 0,11a (170)	2,48 $\pm$ 0,06a (188)	0,097
	3º ínstar ¹	6,58 $\pm$ 0,09a (161)	6,78 $\pm$ 0,09a (181)	0,232
	4º ínstar ¹	3,45 $\pm$ 0,06a (158)	3,38 $\pm$ 0,06a (179)	0,335
	Total ¹	16,82 $\pm$ 0,12a (158)	16,41 $\pm$ 0,05b (179)	0,010
Adulto	Fêmea ²	24,41 $\pm$ 2,86a (22)	29,36 $\pm$ 3,23a (22)	0,293
	Macho ²	16,75 $\pm$ 2,62a (20)	23,11 $\pm$ 3,13a (19)	0,105

(n): número de indivíduos sobreviventes nos referidos ínstares utilizados para análise estatística;

EPM: erro padrão da média;

¹ Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de *U. Mann-Whitney* ($p < 0,05$).

² Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de *t-Student* ($p < 0,05$).

No caso da viabilidade ninfal, foi avaliado cada um dos quatro ínstares e a viabilidade total do período, que expressa o percentual de adultos emergidos em relação ao número inicial de ninfas de 1º ínstar transferidos para as plantas de couve. Diferentemente da duração do período ninfal que foi afetada no primeiro ínstar quando ninfas estavam virulífera, a viabilidade não sofreu qualquer efeito. Deste modo pode-se observar que a viabilidade do período ninfal ficou em torno de 81 a 88%, para ninfas virulíferas e não-virulíferas, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Viabilidade ninfal média (%) ($\pm$ EPM) de *B. tabaci* MEAM 1 em plantas de couve, após a aquisição de ToCV no 1º ínstar em relação a indivíduos não-virulíferos.

Insetos	n	1º ínstar ¹	2º ínstar ¹	3º ínstar ¹	4º ínstar ¹	Total ²
Virulíferos	8	96,8 $\pm$ 1,7 a	91,5 $\pm$ 3,5 a	93,9 $\pm$ 2,3 a	98,5 $\pm$ 1,5 a	81,6 $\pm$ 3,3 a
Não-virulíferos	8	96,9 $\pm$ 2,4 a	95,9 $\pm$ 1,2 a	95,7 $\pm$ 2,2 a	99,0 $\pm$ 0,7 a	88,2 $\pm$ 3,7 a
p	-	0,610	0,666	0,546	0,644	0,203

(n): número de plantas utilizadas como parcelas utilizados para análise estatística;

EPM: erro padrão da média;

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de *U. Mann-Whitney* ($p < 0,05$).

² Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste *t*-Student ($p \leq 0,05$);

Para a obtenção dos dados referentes à fecundidade foi avaliado o número total de ovos depositados por fêmea da espécie durante toda a vida. Encontrou-se que, em média, uma fêmea que adquiriu ToCV no 1º ínstar ninfal (indivíduos denominados virulíferos) depositou 239,82 ($\pm$ 24,06) ovos ao longo de sua vida, enquanto que as fêmeas que não tiveram contato com o vírus (indivíduos denominados não-virulíferos) depositaram em média 287,05 ($\pm$ 26,16) ovos em plantas de couve ($t = 1,344$; g.l = 1, 42; $p = 0,186$). Já a fertilidade foi de 97,44% ($\pm$ 0,88) e 89,93% ($\pm$ 5,77) ($U = 187,00$; g.l = 1, 42; $p = 0,186$) para ovos depositados por fêmeas que adquiriram o vírus no 1º ínstar ninfal frente àquelas que não adquiriram respectivamente. Deste modo, nenhum parâmetro reprodutivo de *B. tabaci* MEAM 1 foi afetado diretamente pelo ToCV nas condições em que o estudo foi realizado.

Com relação à duração da fase adulta de indivíduos que adquiriram ToCV no 1º ínstar em relação aos que não adquiriram, observou-se que não houve diferenças na longevidade de fêmeas e machos, sendo que a longevidade das fêmeas virulíferas foi em média de 24,41 ($\pm$ 2,86) dias e das não-virulíferas de 29,36 ($\pm$ 3,23) dias ($t = 1,066$; g.l = 1, 42; $p = 0,293$). Já a longevidade média dos machos virulíferos e não-virulíferos, foi de 16,75 ($\pm$ 2,62) e 23,11 ($\pm$ 3,13) dias respectivamente ($t = 1,662$; g.l = 1, 37; $p = 0,105$) (Tabela 3). Deste modo, os insetos que adquiriram o vírus na fase ninfal não tiveram a duração da fase adulta afetada diretamente em decorrência do crinivírus ToCV.

3.3.2. Efeito indireto de ToCV no desempenho biológico de *B. tabaci* MEAM 1

Pode-se observar que, o período ninfal de indivíduos que se desenvolveram em plantas infectadas com ToCV foi maior que àquelas que desenvolveram em tomateiro não infectado. Diferentemente do efeito direto, o efeito indireto mais pronunciado foi no 2º ínstar e embora

no 3º ínstar houvesse diferença média de um dia entre os indivíduos que se desenvolveram em plantas infectadas e não infectadas, não foi detectada diferenças significativas (Tabela 5). Ao final do estágio ninfal, os indivíduos que desenvolveram em plantas de tomateiro infectado com ToCV levaram em média mais de um dia para emergirem como adultos (17,88 dias) que àquelas ninfas que se desenvolveram em plantas de tomateiro não infectado (16,47 dias).

Tabela 5. Duração média (dias)¹ ± (EPM) (n) dos estádios ninfais e do período ninfal total e adulto de moscas-brancas *B. tabaci* MEAM 1 que se desenvolveram em plantas de tomate infectadas com ToCV em relação a indivíduos que se desenvolveram em tomateiros não infectados.

Estágio		Plantas ToCV-infectadas	Plantas não infectadas	p
Ninfal	1º instar ¹	3,87 ± 0,13a (180)	3,77 ± 0,11a (162)	0,323
	2º instar ¹	3,27 ± 0,14a (145)	2,87 ± 0,13b (149)	0,003
	3º instar ¹	7,58 ± 0,37a (65)	6,65 ± 0,15a (139)	0,190
	4º instar ¹	3,42 ± 0,14a (61)	3,51 ± 0,09a (136)	0,475
	Total ¹	17,88 ± 0,50a (61)	16,47 ± 0,19b (136)	0,017
Adulto	Fêmea ²	22,66 ± 4,28a (19)	17,85 ± 2,56a (21)	0,433
	Macho ²	18,13 ± 3,22a (15)	12,05 ± 2,07a (15)	0,122

(n): número de indivíduos sobreviventes nos referidos ínstaes utilizados para análise estatística;

EPM: erro padrão da média;

¹ Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de *U. Mann-Whitney* ($p < 0,05$).

² Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de *t-Student* ($p < 0,05$).

A viabilidade de ninfas que se desenvolveram em plantas infectadas com ToCV foi fortemente afetada em comparação as ninfas que se desenvolveram em plantas de tomateiro não infectado, uma vez que apenas 32,6% dos indivíduos que se desenvolveram em plantas com ToCV chegaram a fase adulta em comparação aos 77,7% daqueles que desenvolveram em plantas não infectadas com o crinivírus (Tabela 6). Assim, devido às condições das plantas infectadas, houve maior mortalidade ninfal que nas plantas que não estavam infectadas.

Tabela 6. Viabilidade ninfal média (%) ($\pm$ EPM) de *B. tabaci* MEAM 1 em plantas de tomate fonte de ToCV em relação a indivíduos que se desenvolveram em plantas de tomate sadio

Plantas	n	1° instar ¹	2° instar ¹	3° instar ¹	4° instar ²	Total ²
Infectadas	7	94,8 $\pm$ 1,8 a	81,5 $\pm$ 3,5 a	43,1 $\pm$ 7,1 a	93,6 $\pm$ 3,6 a	32,6 $\pm$ 6,3 a
Não infectadas	7	95,0 $\pm$ 3,9 a	91,2 $\pm$ 3,8 a	90,9 $\pm$ 2,3 b	94,5 $\pm$ 3,7 a	77,7 $\pm$ 5,8 b
p	-	0,944	0,087	<0,0001	0,832	<0,0001

(n): número de plantas utilizadas como parcelas utilizados para análise estatística;

EPM: erro padrão da média;

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de U. Mann-Whitney ($p < 0,05$).

² Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de t-Student ($p < 0,05$).

No que se refere aos parâmetros da fase adulta avaliou-se fecundidade, fertilidade e longevidade de machos e fêmeas. Assim, para a obtenção dos dados referentes à fecundidade avaliou-se o número total de ovos depositados por fêmea da espécie durante toda a vida. Encontrou-se que, em média, uma fêmea depositou 129,47 ($\pm$ 15,8) ovos em tomateiros ToCV-infectados ao longo de sua vida, enquanto que as que se desenvolveram em plantas não infectadas depositaram em média 198,32 ($\pm$ 30,05) ovos ($t = 1,328$; g.l = 1, 37; $p = 0,192$). Já a fertilidade variou de 94,24% e 89,07 % ($t = -1,813$; g.l = 1,37; $p = 0,078$) para ovos depositados por fêmeas em tomateiro infectado e não infectado respectivamente. Deste modo, nenhum parâmetro reprodutivo de *B. tabaci* MEAM 1 foi afetado indiretamente pelo ToCV nas condições em que o estudo foi realizado.

Com relação à duração da fase adulta também não foram observadas diferenças na longevidade de fêmeas e machos, sendo que a longevidade das fêmeas em plantas ToCV-infectadas foi em média de 22,66 ($\pm$ 4,28 dias) e 17,85 ($\pm$ 2,56) dias em plantas não infectadas de tomateiro ($t = -0,793$; g.l = 1, 34; $p = 0,433$). Já a longevidade média dos machos em tomateiro infectado e não infectado, foi de 18,13 ($\pm$ 3,22) e 12,05 ($\pm$ 2,07) dias respectivamente ($t = -1,588$; g.l = 1, 32; $p = 0,122$) (Tabela 5). Deste modo, independentemente de os indivíduos terem se desenvolvido durante toda a vida em uma planta de tomate infectada com ToCV ou não infectada, os parâmetros referentes à fase adulta não foram significativamente afetados.

3.4. Discussão

3.4.1. Efeito direto de ToCV no desempenho biológico de *B. tabaci*

Pode-se dizer que, efeito direto de um patógeno sobre seu vetor nada mais é que os efeitos gerados em decorrência da infecção do patógeno no organismo do vetor sem o efeito de uma planta hospedeira do patógeno sobre o desempenho do mesmo, independentemente do patógeno ser do tipo não-persistente, semipersistente ou persistente.

Entretanto, na literatura são poucos os exemplos de estudos envolvendo efeito direto de um patógeno sobre o comportamento e desempenho de seu vetor, pois na maioria das pesquisas realizadas os estudos envolviam efeitos indiretos no patógeno no vetor, mediados por alterações fisiológicas na planta hospedeira infectada, a qual possui alterações nos padrões de coloração, voláteis, balanço hídrico, entre outros, que afetam o desenvolvimento biológico e o comportamento dos insetos vetores que ocasionalmente sejam atraídos e/ou se alimentem destas plantas (Wan & Barbosa, 1990). Ademais, outros fatores que dificultam a realização de tais estudos é o frequente manuseio dos insetos nestes experimentos, entre aquisição em uma planta e transferência para outra não hospedeira do patógeno, e o tamanho dos insetos, visto que insetos vetores, de modo geral, apresentam tamanho reduzido, tais como os tripses, psílídeos, pulgões e moscas-brancas.

Sendo assim, no presente estudo foi observado efeito direto do crinivírus ToCV apenas no 1º ínstar ninfal, sendo nos demais ínstaes a duração similar. Contudo, devido a este efeito no primeiro ínstar, houve efeito na duração total devido a baixa variabilidade dos dados. Tal resultado fortalece a hipótese, de que o vírus afetaria o 1º ínstar, pois foi adquirido por ninfas durante 24 h logo após a eclosão, mas que por ser um vírus de transmissão semipersistente, seria perdido com a ecdise, não causando efeitos diretos nos demais ínstaes, bem como nos demais parâmetros da fase ninfal e adulta de *B. tabaci*.

Na literatura, pode-se encontrar estudos que também observaram efeito na duração da fase imatura, assim como observado por Lourenção et al. (1996) os quais detectaram redução do período larval e pupal de *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Noctuidae: Lepidoptera) que se alimentaram de folhas de soja infectadas com vírus do mosaico comum (*Soybean mosaic virus*) (gênero *Potyvirus*) em comparação às lagartas que se alimentaram de folhas provenientes de plantas sadias de soja.

Efeito direto foi observado por Maluta et al. (2014) ao estudarem os efeitos de TYLCV no desempenho biológico de *B. tabaci* MED. Os autores observaram maior duração do período ninfal em ninfas não-virulíferas comparadas com ninfas virulíferas. Porém, diferentemente de

ToCV, o begomovírus TYLCV é um vírus persistente, e afetou a duração de todos os ínstaes ninfais, sem no entanto, afetar a viabilidade ninfal. O mesmo estudo, demonstrou que TYLCV afetou diretamente seu vetor fazendo com que houvesse redução na duração do período ninfal nos indivíduos virulíferos sem gerar efeitos (positivos ou negativos) na fase adulta. Já indivíduos virulíferos para ToCV apresentaram aumento do período ninfal, assim, pode-se dizer que por ser um vírus persistente TYLCV possui maior grau de intimidade com seu vetor, proporcionando uma passagem mais rápida pelo estágio ninfal (o qual é extremamente suscetível a adversidades), aumentando as chances de sobrevivência destes indivíduos até a fase adulta, o que em teoria ampliaria as chances de gerar maior número de potenciais vetores, e as chances de transmissão para novos hospedeiros, já que TYLCV é um vírus persistente, sendo retido no corpo do inseto praticamente durante toda sua vida.

Em relação aos parâmetros da fase adulta, ou seja, fecundidade, fertilidade e longevidade, não foi observado nenhum efeito direto de ToCV, provavelmente porque o inseto após sofrer ecdise do 1º para o 2º ínstar perdeu a infectividade.

Grande parte dos estudos de efeitos diretos de patógenos sobre seus vetores observaram efeitos de vírus sobre parâmetros da fase adulta. Estudo deste tipo foi realizado por Rubinstein & Czosnek (1997), os quais encontraram diferentes resultados em relação ao efeito direto de TYLCV sobre parâmetros biológicos de *B. tabaci* MEAM 1, tal como redução na fecundidade e longevidade de indivíduos virulíferos que adquiriram o vírus após a emergência e que foram mantidos em plantas de berinjela (espécie vegetal imune ao TYLCV). Os autores também verificaram uma taxa de mortalidade de 1.5 a 1.8 vezes maior em indivíduos que adquiriram TYLCV após a emergência.

Pan et al. (2013) também observaram efeitos diretos deletérios de TYLCV no desempenho biológico de *B. tabaci* MEAM 1 em plantas de algodão (não hospedeira de TYLCV), tal como menor taxa de sobrevivência, menor fecundidade e menor tamanho corporal de indivíduos virulíferos comparado à indivíduos não-virulíferos. De forma contrastante, os mesmos autores observaram que *B. tabaci* MED foi beneficiada com a presença do vírus, pois indivíduos virulíferos apresentaram maior taxa de sobrevivência que indivíduos não-virulíferos da mesma espécie. Os distintos resultados encontrados para as espécies de *B. tabaci* (MED e MEAM 1) sugerem que TYLCV- possui uma relação mutualística com *B. tabaci* MED gerando efeitos positivos ou neutros e uma relação patogênica com *B. tabaci* MEAM 1.

3.4.2. Efeito indireto do vírus ToCV no desempenho biológico de *B. tabaci*

Efeito indireto de um patógeno pode ser descrito como os efeitos gerados no inseto em decorrências de alterações na planta hospedeira. Sendo assim, alterações no balanço hídrico, qualidade nutricional, composição de voláteis, afetam o inseto vetor que porventura se alimente destas plantas, sendo que estes efeitos podem favorecer ou não a disseminação do patógeno para novos hospedeiros. Na literatura a grande maioria dos trabalhos verificaram os efeitos dos patógenos no vetor mediados por alterações da planta hospedeira (Pan et al., 2013; Carmo-Sousa et al., 2014; Maluta et al., 2014).

Observou-se efeito indireto do vírus semipersistente ToCV na fase ninfal de *B. tabaci* MEAM 1 tanto na duração como na viabilidade do período. Nas plantas infectadas com ToCV a duração do período foi maior e a viabilidade menor, ou seja, as ninfas demoraram mais tempo para chegar à fase adulta e houve maior mortalidade destas ninfas nas plantas infectadas.

Resultado similar foi obtido por Maluta (2012) a qual observou efeito indireto negativo do begomovírus ToSRV sobre a viabilidade ninfal de *B. tabaci* MEAM 1, sendo a viabilidade das ninfas que se desenvolveram em plantas ToSRV-infectadas de 52,14%, frente a 86,15% daquelas que se desenvolveram em tomateiro não infectado. Entretanto, ToSRV também causou uma redução na longevidade de machos que se desenvolveram em plantas ToSRV-infectadas com o vírus (17,7 dias) comparado com aqueles que se desenvolveram em tomateiro não infectado (26,43 dias). Assim, pode-se verificar que por ToSRV ser um vírus persistente, foi capaz de afetar a fase adulta do seu vetor, diferentemente de ToCV.

Em outro estudo, Maluta et al. (2014) observaram que o begomovírus TYLCV não afetou o período ninfal de *B. tabaci* MED; no entanto, os autores verificaram efeito indireto positivo sobre a fecundidade, sendo que em plantas TYLCV-infectadas os indivíduos depositaram maior número de ovos que aqueles que se desenvolveram em tomateiro não infectado com o begomovírus. Tais estudos também evidenciam um efeito mutualístico do TYLCV com a espécie MED e um efeito patogênico de ToSRV e ToCV sobre a espécie MEAM 1.

Jiu et al. (2007) estudaram os efeitos indiretos de dois begomovírus *Tobacco curly shoot virus* (TbCSV) e *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV), sobre parâmetros biológicos de *B. tabaci* MEAM 1. Neste estudo, os autores não observaram quaisquer efeitos dos vírus no período de desenvolvimento (ovo-adulto), o qual foi de 23,0 dias em plantas de fumo não infectadas e de 22,5 e 22,8 dias em plantas de fumo infectadas com TbCSV e TYLCCNV respectivamente. Já Pusag et al. (2012) encontraram menor duração do período

ninfal nos indivíduos provenientes da colônia virulífera com TYLCV quando comparado com ninfas não-virulíferas do biótipo Q1 de *B. tabaci*, em plantas de tomate.

No presente estudo envolvendo os efeitos de ToCV sobre o desempenho biológico de seu vetor, não foram observados efeitos indiretos sobre parâmetros da fase adulta (fecundidade, fertilidade e longevidade), porém em muitos estudos tais parâmetros são os mais afetados pela infecção de patógenos, assim como relatado por Jiu et al. (2007), os quais verificaram que a longevidade de fêmeas é superior em plantas infectadas que em plantas não infectadas com os begomovírus TbCSV e TYLCCNV. Posen (1969) também verificou maior longevidade dos afídeos *Myzus persicae* que se desenvolveram em plantas com *Potato leafroll virus* (PLRV) (gênero *Polerovirus*) e maior número de progênie nestas plantas que em plantas não infectadas.

Assim, com base nos resultados obtidos pode-se dizer que, nas condições utilizadas houve efeito indireto negativo de ToCV sobre a fase ninfal de *B. tabaci*, uma vez que as ninfas que se desenvolveram em plantas ToCV-infectadas levaram mais tempo para completar a fase jovem e apresentaram maior mortalidade nessas plantas, provavelmente devido à infecção viral que pode gerar desbalanço nutricional na planta, além de alterações fisiológicas, alteração na composição de voláteis (Feres et al., 2016) entre outros, assim como observado por Fiebig et al. (2004) os quais verificaram que *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) (gênero *Luteovirus*) alterou a concentração total de aminoácidos no floema de plantas de trigo, afetando indiretamente seu vetor *Sitobion avenae* (F.). Leal e Lastra (1984), ao analisarem plantas infectadas com *Tomato yellow mosaic virus* (ToYMV), um begomovírus transmitido por *B. tabaci*, observaram redução no peso seco das plantas, redução na concentração de clorofilas a e b, aumento da taxa respiratória destas plantas e redução na quantidade de nitrogênio e consequentemente redução na quantidade de proteínas solúveis.

Tais resultados demonstram a grande variedade de interações existente entre patógenos e seus vetores, sendo que a existência e intensidade dos efeitos ocasionados pelos patógenos pode variar em função das condições em que o experimento foi realizado, bem como com a espécie do vetor, a espécie de patógeno, o modo de transmissão e planta hospedeira. O presente trabalho revelou informações importantes, uma vez que os resultados deixam claro que, apesar de se tratar de um vírus semipersistente, ToCV possui capacidade de gerar efeitos diretos e principalmente indiretos no seu vetor *B. tabaci* MEAM 1, de forma negativa, ou seja, não favorecendo sua disseminação para novos hospedeiros.

3.5. Conclusões

- O crinivírus ToCV afeta direta e indiretamente (por meio da infecção na planta) o desempenho biológico de seu vetor *B. tabaci* MEAM 1.
- Como efeito indireto, o crinivírus ToCV em tomateiro reduz a viabilidade ninfal de *B. tabaci* MEAM 1.
- Como efeito direto, o crinivírus ToCV em tomateiro prolonga a fase ninfal de *B. tabaci* MEAM 1.

Referências

- BELLIURE, B.; JANSSEN, A.; MARIS, P.C.; PETERS, D.; SABELIS, M.W. Herbivore arthropods benefit from vectoring plant viruses. **Ecology Letters**, Oxford, v. 8, p. 70-79, 2005.
- BOSCO, D.; MANSON, 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.
- CARMO-SOUSA, M.; MORENO, A.; GARZO, E., FERERES, A. A non-persistently transmitted-virus induces a pull–push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. **Virus Research**, p.1-9, 2014.
- CZOSNEK, H.; GHANIM, M.; MORIN, S.; RUBENSTEIN, G.; FRIDMAN, V.; ZEIDAN, M. Whiteflies: vectors, and victims (?), of geminiviruses. **Advances in Virus Research**, San Diego, v. 57, p. 291–322, 2001.
- EIGENBRODE, S.D.; DING, H.; SHIEL, P.; BERGER, P.H. Volatiles from potato plants infected with *Potato leafroll virus* attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, London, v. 269, p. 455-460, 2002.
- FANG, Y.; JIAO, X.; XIE, W.; WANG, S.; WU, Q.; SHI, X.; CHEN, G.; SU, Q.; YANG, H.; PAN, H.; ZHANG, Y. *Tomato yellow leaf curl virus* alters the host preferences of its vector *Bemisia tabaci*. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1-5, 2013.
- FERERES, A.; LISTER, R.M.; ARAYA, J.E.; FOSTER, J.E. Development and reproduction of the English grain aphid (Homoptera: Aphididae) on wheat cultivars infected with *Barley yellow dwarf virus*. **Environmental Entomology**, College Park, v. 18, p. 388-393, 1989.
- FERERES, A.; KAMPMEIER, G. E.; IRWIN, M. E. Aphid attraction and preference for soybean and pepper plants infected with potyviridae. **Annals Entomological Society of America**, College Park, v. 92, p. 542-548, 1999.
- FERERES, A.; PEÑAFLORES, M. F. G.; FAVARO, C. F.; AZEVEDO, K. E. X.; LANDI, C. H.; MALUTA, N. K. P.; BENTO, J. M. S.; LOPES, J. R.S. Tomato infection by whitefly-transmitted circulative and non-circulative viruses induce contrasting changes in plant volatiles and vector behaviour. **Viruses**, v. 8, p.1-15, 2016. doi:10.3390/v8080225
- FIEBIG, M.; POEHLING, H.M.; BORGEMEISTER, C. *Barley yellow dwarf virus*, wheat, and *Sitobion avenae*: a case of trilateral interactions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 10, p. 11-21, 2004.
- 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**, v.4, p. 593-593, 2012.
- GENNADIUS, P. Disease of the tobacco plantations in the Trikonía: the aleurodid of tobacco. **Ellenike**, v. 5, p. 1-3, 1889.

- GUO, J.Y.; YE, G.Y.; DONG, S.Z.; LIU, S.S. An invasive whitefly feeding on a virus-infected plant increased its egg production and realized fecundity. **PLos One**, v. 5, p. 1-8, 2010.
- GUO, J.Y.; DONG, S.Z.; YANG, X.I.; CHENG, L.; WAN, F.H.; LIU, S.S.; ZHOU, X.; YE, G.Y. Enhanced vitellogenesis in a whitefly via feeding on a begomovirus-infected plant. **PLos One**, v. 7, p. 1-10, 2012.
- HE, W. B.; LI, J.; LIU, S. S. Differential profiles of direct and indirect modification of vector feeding behavior by a plant virus. **Scientific Reports**, v. 5, p.7682; 2015. DOI:10.1038/srep07682.
- HODGE, S.; POWELL, G. Conditional facilitation of an aphid vector, *Acyrtosiphon pisum*, by the plant pathogen, pea enation mosaic virus. **Journal of Insect Science**, Tucson, v. 10, p. 1-14, 2010.
- INGWELL, L. L.; EIGENBRODE, S. D.; BOSQUE-PÉREZ, N. A. Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. **Scientific Reports**, p. 1-6, 2012.
- JENSEN, D.D. A plant virus lethal to its vector. **Virology**, New York, v. 8, p. 164-175, 1959.
- JIU, M.; ZHOU, X.P.; TONG, L.; XU, J.; YANG, X. Vector-virus mutualism accelerates population increase of an invasive whitefly. **PLos One**, v. 2, p. 1-8, 2007.
- LEAL, N.; LASTRA, R. Altered metabolism of tomato plants infected with *Tomato yellow mosaic virus*. **Physiological Plant Pathology**, v. 24, p. 1-7, 1984.
- LIU B.; PREISSER, E. L.; CHU, D.; PAN, H.; XIE, W.; WANG, S.; WU, Q.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. Multiple forms of vector manipulation by a plant-infecting virus: *Bemisia tabaci* and *Tomato yellow leaf curl virus*. **Journal of Virology**, v.87, p. 4929-4937, 2013
- LOURENÇÃO, A. L.; COSTA, A. S.; PARRA, J. R. P.; AMBROSANO, G. M. B. Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatilis* Hübn. em soja sadia e infectada com o Vírus-do-Mosaico-Comum (SMV). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 25, p. 47-57, 1996.
- MALUTA, N. K. P. **Efeitos direto e indireto dos begomovírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) no desempenho biológico de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae).** 2012. 94p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ/USP, Piracicaba. 2012
- MALUTA, N. K. P.; GARZO, E.; MORENO, A.; LOPES, J. R. S.; FERERES, A. *Tomato yellow leaf curl virus* benefits population growth of the Q biotype of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**, v. 43, p. 385-392, 2014.
- MARAMOROSCH, K. Beneficial effects of vírus-diseased plants on nonvector insects. **Tijdschr**, v. 64, p. 383-391, 1958.

- MAS, F.; VEREIJSEN, J.; SUCKLING, D. M. Influence of the pathogen *Candidatus Liberibacter solanacearum* on tomato host plant volatiles and psyllid vector settlement. **Journal Chem Ecology**, p. 1197-1202, 2014.
- MAUCK, K. E.; De MORAES, C. M.; MESCHER, M. C. Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 3600-3605, 2010.
- MAUCK, K. E.; BOSQUE-PÉREZ, N. A.; EIGENBRODE, S. D.; De MORAES, C. M.; MESCHER, M. C. Transmission mechanisms shape pathogen effects on host-vector interactions: evidence from plant viruses. **Functional Ecology**, v. 26, p.1162-1175, 2012.
- MAUCK, K. E. Variation in virus effects on host plant phenotypes and insect vector behavior: what can it teach us about virus evolution? **Current Opinion in Virology**, v. 21, p. 114-123, 2016.
- McKENZIE, C.L. Effect of *Tomato mottle virus* (ToMoV) on *Bemisia tabaci* biotype B (Homoptera: Aleyrodidae) oviposition and adult survivorship on healthy tomato. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, p. 367–368, 2002.
- MEDEIROS, R.B.; RESENDE, R.D.O.; DE AVILA, A.C. The plant virus *Tomato spotted wilt tospovirus* activates the immune system of its main insect vector, *Frankliniella occidentalis*. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, p. 4976-4982, 2004.
- MILLER, J. W.; COON, B. F. The effect of *Barley yellow dwarf virus* on the biology of its vector the English grain Aphid, *Macrosiphum granarium*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 57, p. 970-974, 1964.
- MORENO-DELAFUENTE, A.; GARZO, E.; MORENO, A.; FERERES, A. A plant virus manipulation the behavior of its whitefly vector to enhance its transmission efficiency and spread. **PLoS One**, v.8, p.1-10, 2013.
- NACHAPPA, P.; SHAPIRO, A.A.; TAMBORINDEGUY, C. Effect of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ on fitness of its insect vector, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Trioizidae), on Tomato. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, p. 41-46, 2012.
- NAULT, L.R. Arthropod transmission PF plant viruses: a new synthesis. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 90, p. 521-541, 1997.
- NG, J.C.K.; FALK, B. Virus-vector interactions mediating non-persistent and semi-persistent transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v.44, p.183–212, 2006.
- PAN, H. P.; CHU, D.; LIU, B.; SHI, X.; GUI, L.; XIE, W.; CARRIERE, Y.; LI, X.; ZHANG, Y. Differential effects of an exotic plant virus on its two closely related vectors. **Science Reports**, v.3, p. 1-6, 2013.
- PEREIRA, L. S. Interações *Bemisia tabaci* biótipo B e *Tomato chlorosis virus* em clones de batata. 2016. 66P. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônômico de Campinas, 2016.

- POSEN, M.B. The effect of potato leafroll virus on the biology of *Myzus persicae*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 75, p. 360-368, 1969.
- PUSAG, J.C.A.; JAHAN, S.M.H.; LEE, K.S.; LEE, S.; LEE, K.Y. Upregulation of temperature susceptibility in *Bemisia tabaci* upon acquisition of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 58, p. 1343-1348, 2012.
- RUBINSTEIN, G.; CZOSNEK, H. Long-term association of *Tomato yellow leaf curl virus* with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 2683–2689, 1997.
- SPSS INC (2010) **IBM Statistics SPSS 19.0 Package** for Windows. Chicago:USA.
- STAFFORD, C. A.; WALKER, G. P.; ULLMAN, D. E. Infection with a plant viruses modifies vector feeding behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.108, p.9350-9355, 2011.
- VIDA VERDE LTDA: Acesso em: <http://www.vidaverde.agr.br/produtos.htm>
- WAN, X.; BARBOSA, P. Growth, development, feeding preference, and food consumption and utilization by tobacco hornworm on tobacco mosaic virus-infected and non-infected tobacco leaves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 46, p. 521-524, 1990.

4. COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE *Bemisia tabaci* (GENN.) (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) EM PLANTAS DE TOMATE INFECTADAS COM VÍRUS *Tomato chlorosis virus* E *Tomato severe rugose virus*

Resumo

Sabe-se que as moscas-brancas pertencentes ao complexo *Bemisia tabaci* são vetoras de uma grande gama de vírus pertencentes principalmente aos gêneros *Crinivirus* e *Begomovirus*, os quais são transmitidos através do processo de alimentação do inseto vetor. Entretanto, vários aspectos do comportamento alimentar deste vetor em plantas infectadas são desconhecidos, uma vez que estas interações variam com a espécie do vetor, espécie de vírus, modo de transmissão, entre outros aspectos. Deste modo, o presente trabalho teve por objetivo comparar o comportamento alimentar de *B. tabaci* MEAM 1 (Middle East-Asia Minor 1) em plantas de tomate não infectadas e infectadas com o vírus semipersistente *Tomato chlorosis virus* (ToCV) e com o vírus persistente-circulativo *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) utilizando-se a técnica de *Electrical Penetration Graph* (EPG) - sistema DC, a fim de verificar se os vírus com distintos modos de transmissão são capazes de afetar de forma diferente o comportamento alimentar do vetor. Foram obtidos registros EPG de 10 h de duração utilizando-se fêmeas adultas não-virulíferas de *B. tabaci* MEAM 1. Analisando-se os registros, observou-se que em plantas ToCV-infectadas os insetos realizaram menor número de provas e caminhamento estiletar intercelular (onda C) que nas plantas não infectadas. Ademais, os indivíduos levaram mais tempo para iniciar a primeira prova nas plantas ToCV-infectadas. Já o begomovírus ToSRV afetou apenas a duração por evento (WDE) dos parâmetros prova, não-prova, onda C e xilema, sendo que a duração da prova e onda C foram superiores nas plantas ToSRV-infectadas que nas não infectadas. Os resultados sugerem uma não preferência por plantas ToCV-infectadas, pois os indivíduos demoraram o dobro de tempo para iniciar a primeira prova e realizaram um menor número de tentativas de alimentação nas plantas infectadas, porém não foi observado efeito indireto no comportamento alimentar de seu vetor que pudesse favorecer sua aquisição. Assim, os resultados sugerem que o vírus semipersistente ToCV, por possuir uma relação co-evolutiva mais superficial com seu vetor *B. tabaci* foi capaz de afetar parâmetros alimentares de seu vetor; sem no entanto, afetar parâmetros relacionados à transmissão de ToCV. Já o ToSRV, por possuir uma relação mais íntima com seu vetor (por circular pelo corpo do inseto), não afetou o comportamento alimentar, provavelmente devido à parâmetros co-evolutivos entre vírus-vetor, que os tornam mais adaptados um ao outro.

Palavras-chave: Mosca-branca; *Electrical Penetration Graph*; *Crinivirus*; *Begomovirus*.

Abstract

It is known that whiteflies belonging to the *Bemisia tabaci* complex are vectors of a large range of viruses belonging mainly to the genera *Crinivirus* and *Begomovirus*, which are transmitted through the insect vector feeding process. However, several aspects of the feeding behavior of this vector in infected plants are unknown, since these interactions vary with the species of the vector, species of virus, mode of transmission, among other aspects. The aim of the present study was to compare the feeding behavior of *B. tabaci* MEAM 1 (Middle East-Asia Minor 1) in tomato plants that were not infected and infected with the semi-persistent *Tomato chlorosis virus* (ToCV) and with the persistent-circulative *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), using the Electrical Penetration Graph (EPG) technique in order to verify if viruses with different modes of transmission are able to affect differently the vector feeding behavior. Ten hours duration EPG records were obtained using non-viruliferous adult females of *B. tabaci* MEAM 1. By analyzing the records, it was observed that in ToCV-infected plants the insects performed a smaller number of probes and intercellular stylet pathway (C wave) than in non-infected plants. In addition, individuals took longer to initiate the first probe in ToCV-infected plants. ToSRV begomovirus affected only the duration per event (WDE) of the probe parameter, non-probe, waveform C and G (xylem), and the duration of the probe and stylet pathway were higher in ToSRV-infected than in non-infected plants. The results suggest a non-preference for ToCV-infected plants, since individuals took twice as long to start the first probe and performed a smaller number of feeding attempts on infected plants, but no indirect effect was observed on the vector's feeding behavior which could favor its acquisition. Thus, the results suggest that the semi-persistent ToCV virus, because it has a superficial co-evolutionary relationship with its vector, was able to affect vector's feed parameters, without affecting parameters related to the transmission of ToCV. On the other hand, since ToSRV has a more intimate relationship with its vector (because it circulates through the body of the insect), did not affect the feeding behavior, probably due to the co-evolutionary parameters between virus-vector, which makes them more adapted to each other.

Keywords: Whitefly; Electrical Penetration Graph; *Crinivirus*; *Begomovirus*

4.1. Introdução

Além dos danos diretos ocasionados às plantas devido ao hábito alimentar e ação toxicogênica, os insetos fitófagos também podem ocasionar danos indiretos relacionado à transmissão de fitopatógenos. Sendo assim, alguns insetos, principalmente os incluídos na Ordem Hemiptera, vem sendo relatados cada dia mais como eficientes vetores de fitovírus e até mesmo de outros patógenos como bactérias e fitoplasmas (Nault, 1997; Hogenhout et al., 2008).

No caso dos vírus, estes na sua maioria necessitam de um organismo vetor para dispersarem-se para novos hospedeiros. Dentre os insetos, os afídeos e as moscas-brancas são vetores de aproximadamente 50% e 33% dos fitovírus conhecidos atualmente (Hogenghout et al., 2008). De modo geral, a epidemiologia destes vírus é complexa pois envolve uma série de fatores destacando-se: isolado e espécie viral; vetor (biótipo, espécie); planta hospedeira, condições ambientais e inter-relações entre os componentes desde tetraedro (planta-vetor-patógeno-ambiente), os quais podem alterar a eficiência de transmissão por um determinado vetor (Nault, 1997).

Devido aos múltiplos fatores envolvidos, a interação entre os fitovírus e seus vetores é ainda pouco compreendida, uma vez que esses insetos se alimentam nos tecidos vegetais superficiais e vasos condutores das plantas, dificultando o conhecimento dos sítios de alimentação, atividades estiletares dentro dos tecidos e locais exatos de aquisição e inoculação de fitovírus. Deste modo, uma melhor compreensão da natureza dessas interações pode permitir o desenvolvimento de estratégias de manejo mais eficientes.

A complexidade das interações é tanta que, muitos patógenos são capazes de induzir mudanças fenotípicas e fisiológicas na planta resultando no aumento da atração e melhor performance dos insetos vetores nas plantas infectadas (Eigenbrode et al., 2002; Carmo-Sousa et al., 2014; Mas et al., 2014; Carmo-Sousa et al., 2016), porém efeitos negativos também já foram relatados (Hammond & Hardy, 1988; Rubinstein & Czosnek, 1997; Fereres & Moreno, 2009).

Além de alterações na planta hospedeira, os fitovírus podem afetar seus vetores a nível celular e comportamental, pois possuem a capacidade de induzir reações nas plantas hospedeiras as quais podem afetar indiretamente (efeito mediado por alterações fisiológicas na planta hospedeira) (Eigenbrode et al., 2002; Werner et al., 2009; Mauck et al., 2010; Ingwell et al., 2012; Fang et al., 2013; Pan et al., 2013; Carmo-Sousa et al., 2014) ou diretamente (quando o vetor carrega o patógeno em seu corpo) o comportamento, biologia, dinâmica populacional e

fisiologia do seu vetor (Stafford et al., 2011; Moreno-Delafuente et al., 2013; Fang et al., 2013; Pan et al., 2013; Carmo-Sousa et al., 2016).

Outro fator que pode afetar as interações vírus-vetor é o modo de transmissão (Mauck et al., 2012; Fereres et al., 2016), uma vez que os vírus podem ser transmitidos de modo não-persistente (NP) onde os viriões estão localizados em tecidos vegetais superficiais e podem ser adquiridos e inoculados por meio de breves provas do vetor no tecido vegetal. Outro modo é o persistente-circulativo (PC), onde geralmente os viriões estão limitados aos vasos de floema e os insetos necessitam de um período mais prolongado de alimentação para a aquisição e inoculação, além de haver circulação do patógeno no corpo do vetor. Também há o persistente-propagativo (PP) onde, há propagação do patógeno no corpo do inseto. Outro modo de transmissão é o semi-persistente (SP), onde os viriões podem estar tanto em tecidos superficiais como nos vasos de floema, e dependendo da sua localização no tecido vegetal pode ser adquirido em poucos minutos ou até algumas horas (Nault, 1997).

Deste modo, os fitovírus (assim como outros patógenos) podem manipular seus hospedeiros em seu próprio benefício, e estas estratégias de manipulação podem variar de acordo com o modo de transmissão, a qual está intimamente relacionada com a história co-evolutiva entre vírus-vetor, e correlacionada com as interações genéticas, ambientais e ecológicas dos mesmos (Cassone et al., 2014) uma vez que vírus transmitidos de modo não-persistente e semi-persistente possuem relação superficial e menos íntima com seu vetor, por não circularem por seu corpo, e estarem retidos no estomodeu (Ng & Falk, 2006). Por outro lado, os vírus persistentes são circulativos e, devido a isso, necessitam ultrapassar diversas barreiras morfológicas e fisiológicas no corpo do vetor, culminando com uma relação mais íntima e específica, resultando numa maior taxa de transmissão, e em alguns casos benefícios para o vetor (Nault, 1997; Castle et al., 1998; Czosnek et al., 2002; Mauck et al., 2012; Ohnishi et al., 2009).

Como mencionado anteriormente, as moscas-brancas, principalmente as do complexo *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae), estão entre o principal grupo de insetos vetores, e são extremamente eficientes na transmissão de vírus pertencentes aos gêneros *Begomovirus* e *Crinivirus*, sendo que, dentro deste último, podemos destacar *Tomato chlorosis virus* (ToCV), transmitido de modo semipersistente pelo complexo *B. tabaci* e por mais duas espécies *Trialeurodes abutilonea* (Haldeman) e *T. vaporariorum* (Westwood), e que nos últimos anos vem causando severas perdas na agricultura em diversos países, incluindo Brasil e Espanha (Navas-Castillo et al., 2011).

Portanto, sabendo-se da importância de *B. tabaci* como praga e vetora de inúmeros fitovírus para uma variada gama de hospedeiros, faz-se necessário o conhecimento do comportamento alimentar deste inseto, pois este pode ser afetado pelos vírus de modo a otimizar a transmissão e dispersão do mesmo no campo (Eigenbrode et al., 2002; Mauck et al., 2012; Moreno-Delafuente et al., 2013; Carmo-Sousa et al., 2014).

Para o estudo do comportamento alimentar de insetos vetores utiliza-se a técnica de *Electrical Penetration Graph* (EPG), a qual permite estudar o comportamento de prova e atividades estiletares dos insetos dentro dos tecidos vegetais em tempo real. Deste modo, os estudos realizados com esta técnica foram aplicados para melhor compreensão dos processos envolvidos na transmissão de um vírus (Prado & Tjallingii, 1994; Collar et al., 1997; Collar & Fereres, 1998; Palacios et al., 2002; Moreno et al., 2005; Moreno et al., 2012), comportamento dos insetos nas plantas infectadas (Alvarez et al., 2007; Moreno-Delafuente et al., 2013; Carmo-Sousa et al., 2014; 2016), resistência de insetos à inseticidas e a variedades vegetais (Álvarez et al., 2006; Rodriguez-Lopez et al., 2011; Miranda et al., 2016), estudos de caracterização do comportamento alimentar (Bonani et al., 2010), entre outros.

Assim, tendo em vista o escasso conhecimento das interações entre vírus-mosca-branca no que se refere aos efeitos da infecção no comportamento alimentar, o presente capítulo objetivou estudar os efeitos indiretos de dois vírus com modos distintos de transmissão, sendo o crinivírus *Tomato chlorosis virus* (ToCV) transmitido de modo semipersistente e o begomovírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) transmitido de modo persistente-circulativo, sobre o comportamento alimentar e estiletar de *B. tabaci* MEAM 1 (Middle East-Asia Minor 1) (biótipo B) em plantas infectadas e não-infectadas, utilizando a técnica de EPG, afim de verificar se os vírus são capazes de afetar de modo diferente o comportamento alimentar de seu vetor nestas plantas.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Material biológico: criação de mosca-branca, plantas e isolados de vírus

Os experimentos de comportamento alimentar de *B. tabaci* MEAM 1 utilizando-se a técnica de EPG foram conduzidos em casa-de-vegetação do Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP. Todos os insetos utilizados foram provenientes de criação livre de vírus mantida sob plantas de couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. cv. Manteiga) mantida em casa-de-vegetação sob

temperatura ambiente ($30^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{C}$), em gaiolas de metal, revestidas com tela anti-afídica (Fig. 6).

Figura 6. A) Gaiola com tela anti-afídica utilizada para a criação de *B. tabaci*, B) planta de couve infestada com moscas-brancas.

O isolado de ToCV foi obtido de tomateiro no município de Sumaré-SP, e o isolado de ToSRV foi obtido em tomateiro cereja no município de Piracicaba-SP, ambos fornecidos pelo Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ- USP e mantidos em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara) separadamente em diferentes casas-de-vegetação livres de insetos.

Para obtenção das plantas fontes de ToCV utilizadas nos registros de EPG, foram realizadas aquisições de ToCV em plantas infectadas, durante um Período de Acesso à Aquisição (PAA) de 48 h. Posteriormente, se procedeu a inoculação de ToCV em plantas saudáveis de tomateiro (cv. Santa Clara de 2-3 folhas verdadeiras) utilizando-se os insetos da colônia mantida em casa-de-vegetação, durante um Período de Acesso à Inoculação (PAI) de 5 dias. Após este período, os insetos e a folha utilizada na inoculação foram removidos a fim de se eliminar possíveis ovos e ninfas. O mesmo foi realizado para a obtenção das plantas fontes de ToSRV e plantas controle (não infectadas) porém neste último caso utilizando-se insetos não-virulíferos.

4.2.2. Técnica de Gráficos de Penetração Elétrica - *Electrical Penetration Graph* (EPG)

A técnica de EPG é uma importante ferramenta para estudar a penetração estiletar e comportamento alimentar, onde o inseto e planta são conectados através de eletrodos em um circuito elétrico, e as oscilações no sistema de voltagem devido as atividades alimentares específicas do inseto na planta são registrados pelo equipamento de EPG, e então digitalizados em tempo real como formas de onda e projetados na tela do computador.

Para a obtenção dos registros de EPG, foram utilizadas fêmeas de moscas-brancas *B. tabaci* MEAM 1 não-virulíferas de 1-10 dias de idade, condicionadas em tomateiro sadio por 72 h antes da realização dos registros. Para a montagem dos insetos, estes foram adormecidos em gelo por aproximadamente 5-10 minutos e, após colocados sobre uma placa de Petri contendo gelo moído no interior sob um microscópio estereoscópico. Os insetos foram posicionados com a região dorsal voltada para cima, onde foi colado com cola de prata condutora (com base de solvente) (Ted Pella, Inc, Colloidal Silver Liquid) um fio de ouro (12 µm de diâmetro e aproximadamente 2 cm de comprimento) na região do pronoto do inseto o qual foi ligado a um eletrodo de cobre.

Após uma hora de jejum o inseto conectado ao eletrodo foi acoplado ao equipamento de EPG, e posicionados sobre a superfície abaxial (da folha mais nova totalmente expandida) de cada planta de tomateiro não infectada e infectado (ToCV/ToSRV-infectada) e seus respectivos controles. Cada mosca-branca foi monitorada por um período de 10 horas, e foram obtidos 23 registros para cada tratamento (planta não infectada e ToCV-infectada) para o vírus ToCV e 22 registros para cada tratamento (planta não infectada e ToSRV-infectada) para o vírus ToSRV.

Para a obtenção dos registros, foram utilizadas plantas de aproximadamente 4-5 semanas após a inoculação e com sintomas típicos dos vírus ToCV ou ToSRV. As plantas utilizadas nos registros EPG, foram usadas no máximo três vezes por tratamento. As plantas controle utilizadas eram da mesma idade e lote das plantas infectadas. Foram considerados registros válidos aqueles em que os insetos se alimentaram até a terceira hora após o início do registro, e que realizaram atividade em pelo menos metade das demais horas após a primeira prova. Utilizou-se um monitor de Corrente-Direta (DC) com 8 canais (modelo Giga-8d, com *software* Stylet+ para Windows (EPG Systems, Wageningen, Holanda) (Tjallingii, 1978; 1988). O equipamento, insetos e plantas foram mantidos dentro de uma gaiola de Faraday para evitar interferências elétricas externas, em sala com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Fig. 7).

Figura 7. A) Equipamento de EPG (modelo Giga-8d) e plantas infectadas e não infectadas alternadas mantidas no interior de uma gaiola de Faraday; B) Inseto colado ao fio de ouro acoplado ao eletrodo e posicionado na face abaxial de folha de tomateiro.

4.2.3. Marcação das ondas de EPG e análise estatística

As formas de onda de EPG para mosca-branca foram reconhecidas e marcadas segundo descrito na literatura (Janssen et al., 1989; Johnson & Walker, 1999; Jiang et al., 1999).

Os distintos padrões de onda de EPG, originados principalmente por alterações na voltagem devido as variações da resistência elétrica do circuito de acordo com a posição dos estiletes nos tecidos vegetais e as variações nas forças eletromotrizes durante a alimentação das moscas-brancas na planta, assim como sua correlação com as atividades alimentares dos insetos estão descritas abaixo:

-Onda np: Comportamento de não prova, quando o inseto ainda não inseriu os estiletes no tecido vegetal.

-Onda C: Refere-se ao padrão de onda mais complexo. Provavelmente é originado em decorrência de um conjunto de atividades estiletares do inseto, se tratando de uma onda com potencial extracelular, quando o inseto está caminhando com os estiletes entre as células (Tjallingii, 1988).

-Onda *pd* (*potential drop*): Está inserido dentro da onda C, a *pd* está associada à penetração dos estiletes no interior das células, de modo geral para moscas-brancas, as *pds* ocorrem em baixa frequência comparado aos afídeos, não ocorrendo durante breves provas e

antecede a fase floemática (Johnson & Walker, 1999). As *pds* de modo geral estão associadas à aquisição e inoculação de vírus não-persistentes (Powell et al., 1995; Martin et al., 1997; Collar & Fereres, 1998) e a inoculação de vírus semipersistentes (Moreno et al., 2012), principalmente por afídeos.

-Onda E: Está associada a um potencial intracelular, e está correlacionada com a penetração dos estiletes nos tecidos floemáticos (Kimmings & Tjallingii, 1985). Pode-se distinguir a onda E em duas: **E₁** a qual está associada com a salivação no floema e de modo geral com a inoculação de vírus persistentes (Prado & Tjallingii, 1994; Jiang et al., 2000; Johnson et al., 2002), **E₂**: está relacionado com a ingestão de seiva do floema, associado principalmente à aquisição de vírus persistentes.

-Onda G: Trata-se de uma onda de potencial extracelular correlacionada com a penetração dos estiletes nos vasos do xilema, e com um processo de ingestão ativa, pois há pressão negativa no xilema (Spiller et al., 1990).

-Onda F: Está associada ao trabalho mecânico dos estiletes em decorrência de dificuldades que o inseto encontra na penetração dos estiletes nos tecidos, sendo essa onda de potencial extracelular.

Os parâmetros de EPG avaliados (sequenciais e não-sequenciais) relatados para as distintas fases e formas de onda foram estimados utilizando uma planilha de Excel descrita por Sarria et al. (2009), a qual permite calcular automaticamente cerca de 125 variáveis. Foram selecionadas as variáveis de EPG mais relevantes para a obtenção das respostas referentes aos efeitos dos vírus ToCV e ToSRV sobre o comportamento alimentar de *B. tabaci* MEAM 1 (Tabela 7). As variáveis selecionadas foram submetidas à análise utilizando-se o *software* IBM SPSS versão 19.0 (SPSS, 2010).

As variáveis selecionadas (Média $\pm$ EP) foram calculadas e comparadas entre os tratamentos conforme descrito por Backus et al. (2007): PPW (*proportion of individuals that produced a specific waveform type*), proporção de indivíduos que realizaram um tipo específico de onda; NWEI (*number of waveform events per insect*): número de vezes que se realiza uma determinada onda por inseto (soma do número de eventos de uma determinada onda realizada por cada indivíduo, dividido pelo número total de insetos para cada tratamento); WDI (*waveform duration (min) per insect*): duração de uma onda ou variável sequencial por inseto (soma das durações de cada evento de uma determinada onda realizada por cada indivíduo, dividida pelo número total de insetos que realizaram tal onda para cada tratamento); WDE (*waveform duration (min) per event*): duração da onda por evento (soma da duração dos eventos

para uma determinada onda realizada pelo número total de insetos dividido pelo número total de eventos de dita onda para cada tratamento).

As variáveis que apresentaram os resultados em porcentagem foram transformadas em $\arcsen\sqrt{x}/100$ (quando não seguiam uma distribuição normal dos dados) e as demais variáveis transformadas em $\sqrt{x+1}$ ou $\ln(x+1)$. Verificou-se a normalidade dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk antes da análise estatística. Após a verificação da normalidade, os dados foram submetidos ao teste *t*-Student (quando seguiram uma distribuição normal) e o teste não-paramétrico de *U. Mann-Whitney* (para dados que não apresentaram uma distribuição normal).

Tabela 7. Variáveis de EPG sequenciais e não-sequenciais utilizadas para avaliar o comportamento alimentar de *B. tabaci* MEAM 1, em plantas de tomate ToCV ou ToSRV-infectadas e seus respectivos controles.

Variáveis não-sequenciais
Número de np (NWEI np)
Número de provas (NWEI Prova)
Número de <i>pd</i> (NWEI <i>pd</i>)
Número de C (NWEI C)
Número de G (NWEI G)
Número de E ₁ (NWEI E ₁)
Número de E ₂ (NWEI E ₂)
Duração de np (WDI np)
Duração de prova (WDI Prova)
Duração de <i>pd</i> (WDI <i>od</i>)
Duração de C (WDI C)
Duração de G (WDI G)
Duração total de E (E) (WDI E)
Duração total de E ₁ (WDI E ₁)
Duração de E ₂ (WDI E ₂)
Variáveis sequenciais
Tempo desde o começo do registro EPG até a 1ª prova
Duração da 1ª prova
Duração da 2ª prova
Tempo do início da 1ª prova à 1ª <i>pd</i>
Tempo do início da prova à 1ª E
Tempo da 1ª prova à 1ª E ₂ prolongada (10 min)
Tempo do início da prova à 1ª E ₂ prolongada (10 min)
Tempo da 1ª prova à 1ª E
Tempo do começo da prova para a 1ª E ₂
Número de provas para a 1ª E
Número de provas após a 1ª E
Número de provas (menores que 3 min) após a 1ª E
Duração total de E ₁ seguida por E ₂
Duração total de E ₁ seguida por E ₂ prolongada (>10 min)
Duração total da fase não-floemática

4.3. Resultados

4.3.1. Efeito indireto da infecção pelo crinivírus ToCV no comportamento alimentar de *B. tabaci* MEAM 1

Os valores das variáveis não-sequenciais obtidos durante 10 horas de registro (0-600 min) através da penetração estiletar de *B. tabaci* MEAM 1 em plantas não infectadas e ToCV-infectadas mostraram diferenças significativas em três dos oito parâmetros analisados, dos quais: número (NWEI) de Não-provas, de Prova e caminhamento estiletar (onda C) (Fig. 8), além dos mesmos parâmetros para duração por evento (WDE).

Sendo assim, moscas-brancas realizaram maior número de não-provas em plantas não infectadas de tomate ($65,95 \pm 6,44$ vezes) comparado com plantas ToCV-infectadas ($31,61 \pm 5,06$ vezes) ($t = 4,57$; $p < 0,000$), e consequentemente maior número de provas ($65,35 \pm 6,44$ vezes) que em plantas ToCV-infectadas ($31,04 \pm 5,04$ vezes) ($t = 4,587$; $p < 0,000$). Tal resultado indica que houve maior número de tentativas de alimentação pelo inseto em plantas não infectadas, assim o inseto inseriu e retirou os estiletes mais vezes nestas plantas. Outra variável não-sequencial afetada foi número de onda C por inseto (NWEI), o qual foi maior em plantas não infectadas ($66,82 \pm 6,51$ vezes) do que em plantas não infectadas ($32,70 \pm 5,22$ vezes) ($t = 4,503$; $p < 0,000$); sendo assim, os insetos realizaram maior número de caminhamento estiletar intercelular (onda C) nas plantas não infectadas (Fig. 8).

Figura 8. Variáveis EPG não-sequenciais e sequenciais (Média $\pm$ EPM) utilizadas para avaliar o comportamento alimentar de *B. tabaci* MEAM 1 em plantas de tomate não infectadas e ToCV-infectadas durante 10 h de registro. (A) Número de vezes que se realizou uma determinada onda por inseto (NWEI); (B) Duração da onda por evento (WDE); (C) Duração (minutos) da onda por inseto (WDI). *Diferenças significativas ($p < 0,05$) segundo o teste *t*-Student (Variáveis que seguiram distribuição normal) ou teste de *U*.Mann-Whitney (Variáveis que não seguiram uma distribuição normal).

Não foram observadas diferenças significativas no que se refere à duração da onda por inseto (WDI) para nenhum dos parâmetros observados. Assim como para o número da onda por inseto (NWEI) em relação à parâmetros relacionados as atividades floemáticas (Tabela 8). Deste modo, embora as moscas-brancas tenham realizado menor número de provas e caminhamento intercelular em plantas ToCV-infectadas (NWEI), a duração destas ondas por inseto (WDI) não foi significativamente diferente.

Em relação a duração da onda por evento (WDE) constataram-se diferenças nos parâmetros: Não-Prova, Prova e C. Observou-se que a duração por evento de Não-prova ($U = 455249,500$; $p < 0,000$), Prova ($U = 499090,000$; $p = 0,008$) e C ($U = 537118,000$; $p = 0,006$) foi maior nas plantas ToCV-infectadas que nas plantas não infectadas (Fig. 8). Sendo assim, os indivíduos realizaram menor número de Provas, Não-provas e Caminhamento Intercelular nas plantas ToCV-infectadas, mas a duração por evento destas ondas foi maior.

Em relação as variáveis sequenciais (Tabela 9) foi observada diferença significativa apenas no parâmetro ‘Tempo desde o começo do registro EPG até a 1^a prova’, onde verificou-se que insetos que estavam nas plantas ToCV-infectadas levaram praticamente o dobro de tempo ($105,31 \pm 15,01$ min) para iniciarem a primeira prova que aqueles que estavam em plantas não infectadas ($56,61 \pm 18,38$ min) ($U = 168,00$; $p = 0,034$) (Fig. 8).

Deste modo, não foi observada nenhuma diferença no que se refere aos parâmetros relacionados ao floema, os quais estão intimamente relacionados à transmissão deste vírus que, até onde se tem informação, é limitado aos vasos de floema (Wisler et al., 1998)

Tabela 8. Média em minutos ($\pm$ EPM) dos valores não-sequenciais de EPG (valores máximo e mínimo entre parênteses) para o comportamento alimentar de moscas-brancas não-virulíferas *B. tabaci* MEAM 1 em plantas de tomate infectadas com o crinivírus *Tomato chlororsis virus* (ToCV-infectada) e não infectadas durante 10 h de registro^a.

Variáveis não sequenciais	Planta	PPW ^a	NWEI	p ^b	WDI	p ^b	WDE	p ^b
Não-prova	Não infectada	23/23	65,95 $\pm$ 6,44 (130 - 18)	<u>$\leq 0,000$</u>	416,38 $\pm$ 18,39 (554,12 - 272,80)	0,398	6,31 $\pm$ 0,46 (379,61 - 0,028)	<u>$\leq 0,000$</u>
	ToCV-infectada	23/23	31,61 $\pm$ 5,06 (110 - 6)		429,38 $\pm$ 25,82 (575,55 - 50,05)		13,58 $\pm$ 1,24 (358,31 - 0,12)	
Prova	Não infectada	23/23	65,35 $\pm$ 6,44 (130 - 18)	<u>$\leq 0,000$</u>	183,62 $\pm$ 18,39 (327,19 - 45,87)	0,387	2,81 $\pm$ 0,25 (156,57 - 0,17)	<u>0,008</u>
	ToCV-infectada	23/23	31,04 $\pm$ 5,04 (109 - 5)		170,62 $\pm$ 25,82 (549,95 - 24,45)		5,50 $\pm$ 0,94 (526,09 - 0,18)	
C	Não infectada	23/23	66,82 $\pm$ 6,51 (132 - 19)	<u>$\leq 0,000$</u>	125,00 $\pm$ 13,24 (229,31 - 45,87)	0,125	1,87 $\pm$ 0,10 (60,15 - 0,02)	<u>0,006</u>
	ToCV-infectada	23/23	32,70 $\pm$ 5,22 (114 - 6)		106,13 $\pm$ 22,25 (547,88 - 24,25)		3,27 $\pm$ 0,69 (495,91 - 0,006)	
<i>pd</i> ^c	Não infectada	13/23	2,56 $\pm$ 0,64 (11 - 0)	0,991	10,55 $\pm$ 2,76 (46,95 - 0,00)	0,917	4,11 $\pm$ 0,20 (9,36 - 2,55)	0,811
	ToCV-infectada	12/23	3,30 $\pm$ 1,13 (24 - 0)		13,51 $\pm$ 4,46 (92,37 - 0,00)		4,09 $\pm$ 0,17 (8,58 - 2,53)	
G	Não infectada	12/23	0,89 $\pm$ 0,21 (3 - 0)	0,944	41,21 $\pm$ 11,48 (204,22 - 0,00)	0,907	47,39 $\pm$ 6,70 (123,48 - 15,77)	0,974
	ToCV-infectada	12/23	0,82 $\pm$ 0,19 (3 - 0)		40,30 $\pm$ 11,28 (165,22 - 0,00)		48,79 $\pm$ 7,76 (138,51 - 15,99)	
E	Não infectada	10/23	-	-	17,407 $\pm$ 8,77 (166,57 - 0,00)	0,839	-	-
	ToCV-infectada	11/23	-		24,18 $\pm$ 13,03 (287,37 - 0,00)		-	
E1	Não infectada	10/23	0,78 $\pm$ 0,22 (3 - 0)	0,726	1,05 $\pm$ 0,55 (6,40 - 0,00)	0,623	1,34 $\pm$ 0,35 (6,31 - 0,29)	0,801
	ToCV-infectada	11/23	1,17 $\pm$ 0,42 (9 - 0)		1,58 $\pm$ 0,548 (10,44 - 0,00)		1,35 $\pm$ 0,23 (5,94 - 0,21)	
E2	Não infectada	07/23	0,43 $\pm$ 0,16 (3 - 0)	0,588	16,36 $\pm$ 8,62 (164,12 - 0,00)	0,639	37,62 $\pm$ 13,49 (112,79 - 1,38)	0,336
	ToCV-infectada	05/23	0,34 $\pm$ 0,15 (2 - 0)		22,59 $\pm$ 12,85 (284,67 - 0,00)		64,95 $\pm$ 20,78 (191,58 - 1,39)	
sE2	Não infectada	04/23	0,26 $\pm$ 0,14 (3 - 0)	0,703	-	-	58,99 $\pm$ 17,79 (112,79 - 19,58)	0,609
	ToCV-infectada	05/23	0,30 $\pm$ 0,13 (2 - 0)		-		74,03 $\pm$ 21,59 (191,59 - 12,15)	

^a **PPW**, proporção de indivíduos que produziram determinado tipo de onda; **NWEI**, número de ondas produzida por inseto; **WDI**, duração da onda (min) por inseto; **WDE**, duração da onda (minuto) por evento (Backus et al., 2007). Prova: atividade de prova da mosca-branca; *pd*: penetração intracelular dos estiletos.

^b Comparação estatística entre os dois tratamentos para cada parâmetro foram feitos por: teste de *t*-Student (Variáveis que seguiram distribuição normal) e teste não-paramétrico de *U. Mann-Whitney* (Variáveis que não seguiram uma distribuição normal). Dado sublinhado indica diferença significativa ($p < 0,05$).

^c Duração de *Potential drop* (*pd*) é expressa em segundos.

Tabela 9. Média ($\pm$ EPM) dos valores sequenciais de EPG (valores máximo e mínimo entre parênteses) para o comportamento alimentar de moscas-brancas não-viruíferas *B. tabaci* MEAM 1 em plantas de tomate infectadas com o crinivírus *Tomato chlororsis virus* (ToCV-infectada) e não infectadas durante 10 h de registro^a.

Variáveis sequenciais	Plantas	PPW ^a	NWEI	p ^b	WDI	p ^b
Duração da 1 ^a prova	Não infectada	23/23	-	-	2,95 $\pm$ 2,00 (46,62 – 0,19)	0,462
	ToCV-infectada	23/23	-		3,04 $\pm$ 1,75 (40,75 – 0,18)	
Duração da 2 ^a prova	Não infectada	23/23	-	-	0,64 $\pm$ 0,10 (1,92 – 1,17)	0,111
	ToCV-infectada	23/23	-		1,01 $\pm$ 0,25 (5,96 – 0,20)	
Tempo do início da 1 ^a prova à 1 ^a pd	Não infectada	13/23	-	-	387,30 $\pm$ 42,71 (600,00 – 96,51)	0,652
	ToCV-infectada	12/23	-		430,24 $\pm$ 44,45 (600,00 – 30,37)	
Tempo do início da prova à 1 ^a E	Não infectada	10/23	-	-	11,09 $\pm$ 1,70 (20,65 – 3,34)	0,092
	ToCV-infectada	11/23	-		15,67 $\pm$ 1,92 (27,03 – 7,16)	
Tempo da 1 ^a prova à 1 ^a E ₂ prolongada (10 min)	Não infectada	4/23	-	-	494,93 $\pm$ 24,01 (599,67 – 180,60)	0,156
	ToCV-infectada	5/23	-		450,68 $\pm$ 24,55 (599,87 – 174,42)	
Tempo do início da prova à 1 ^a E ₂ prolongada (10 min)	Não infectada	4/23	-	-	11,73 $\pm$ 0,75 (13,08 – 9,81)	0,238
	ToCV-infectada	5/23	-		15,68 $\pm$ 2,63 (23,89 – 8,05)	
Tempo da 1 ^a prova à 1 ^a E	Não infectada	10/23	-	-	411,60 $\pm$ 33,68 (599,37 – 139,80)	0,318
	ToCV-infectada	11/23	-		375,69 $\pm$ 32,56 (599,44 – 31,38)	
Tempo desde o começo da prova para a 1 ^a E ₂	Não infectada	7/23	-	-	12,25 $\pm$ 1,44 (20,59 – 9,58)	0,368
	ToCV-infectada	5/23	-		14,42 $\pm$ 0,85 (18,01 – 8,05)	
Número de provas para a 1 ^a E	Não infectada	10/23	19,82 $\pm$ 7,24 (123 - 9)	0,829	-	-
	ToCV-infectada	11/23	11,13 $\pm$ 3,52 (65 - 4)		-	
Número de provas após a 1 ^a E	Não infectada	10/23	10,87 $\pm$ 3,61 (57 – 0)	0,403	-	-
	ToCV-infectada	11/23	7,35 $\pm$ 3,95 (86 – 0)		-	
Número de provas (< 3 min) após a 1 ^a E	Não infectada	10/23	9,09 $\pm$ 3,08 (51 – 0)	0,382	-	-
	ToCV-infectada	08/23	6,51 $\pm$ 3,70 (82 – 0)		-	
Duração total de E ₁ seguida por E ₂	Não infectada	07/23	-	-	0,44 $\pm$ 0,20 (4,00 – 0,00)	0,680
	ToCV-infectada	05/23	-		0,39 $\pm$ 0,18 (2,72 – 0,00)	

Duração total de E₁ seguida por E₂ prolongada (>10 min)	Não infectada	04/23	-	-	0,34 ± 0,20 (4,00 – 0,00)	0,692
	ToCV-infectada	05/23	-		0,36 ± 0,16 (2,66 – 0,00)	
Duração total da fase não-floemática	Não infectada	23/23	-	-	243,46 ± 59,70 (599,53-0,00)	0,728
	ToCV-infectada	23/23	-		262,78 ± 59,70 (599,79 – 0,00)	

^a **PPW**, proporção de indivíduos que produziram determinado tipo de onda; **NWEI**, número de ondas produzida por inseto; **WDI**, duração da onda (min) por inseto; **WDE**, duração da onda (minuto) por evento (Backus et al., 2007). Prova: atividade de prova da mosca-branva; *pd*: penetração intracelular dos estiletes.

^b Comparação estatística entre os dois tratamentos para cada parâmetro foram feitos por: teste de *t*-Student (Variáveis que seguiram distribuição normal) e teste não-paramétrico de *U*. Mann-Whitney (Variáveis que não seguiram uma distribuição normal). Dado sublinhado indica diferença significativa ($p < 0,05$).

4.3.2. Efeito indireto do begomovírus ToSRV no comportamento alimentar de *B. tabaci* MEAM 1

Os valores das variáveis não-sequenciais obtidos durante 10 horas de registro (0-600 min) através da penetração dos estiletes de *B. tabaci* MEAM 1 em plantas não infectadas e ToSRV-infectadas mostraram diferenças significativas apenas na duração da onda por evento (WDE) para as variáveis não sequenciais: Não-prova, Prova, onda C e onda G (Fig. 9).

Sendo assim a duração por evento de Não-prova foi maior nas plantas ToSRV-infectadas ($7,53 \pm 0,61$ min) que nas plantas não infectadas ($5,70 \pm 0,43$ min) ($U = 908427,500$; $p = 0,001$), sendo o mesmo foi observado para a duração por evento do parâmetro Prova ($3,39 \pm 0,27$ min e $2,49 \pm 0,21$ min em plantas ToSRV-infectadas e não infectadas respectivamente) ($U = 904726,000$; $p = 0,009$). Em relação à duração por evento da onda C, verificou-se que também foi maior em plantas ToSRV-infectadas ($2,59 \pm 0,15$ min) que em plantas não infectadas ($1,93 \pm 0,09$ min) ($U = 943870,000$; $p = 0,016$), sendo o mesmo observado para a duração por evento de G, ou seja, os insetos realizaram eventos de xilema mais longos quando estavam nas plantas ToSRV-infectadas ($51,59 \pm 6,18$ min) que quando estavam nas plantas não infectadas ($28,90 \pm 2,79$ min) ($t = -2,901$; $p = 0,008$) (Fig. 9).

No caso do begomovírus ToSRV, não foi observada nenhuma diferença no que se refere aos parâmetros relacionados ao floema, nem número (NWEI), nem duração (WDI). Em relação as variáveis sequenciais também não foram observadas diferenças entre os tratamentos (Tabela 11).

Figura 9. Variáveis EPG não-sequenciais (Média $\pm$ EPM) utilizadas para avaliar o comportamento alimentar de *B. tabaci* MEAM 1 em plantas de tomate não infectadas e ToSRV-infectadas durante 10 h de registro. (A) Duração (minutos) da onda por evento (WDE); (B) Duração (minutos) por evento da onda G (xilema). *Diferenças significativas ($p < 0,05$) segundo o teste *t*-Student (Variáveis que seguiram distribuição normal) ou teste de *U. Mann-Whitney* (Variáveis que não seguiram uma distribuição normal).

Tabela 10. Média min ou seg ($\pm$ EPM) dos valores não-sequenciais de EPG (valores máximo e mínimo entre parênteses min ou seg) para o comportamento alimentar de moscas-brancas não-viríferas *B. tabaci* MEAM 1 em plantas de tomate infectadas com o begomovírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV-infectada) e não infectadas durante 10 h de registro ^a.

Variáveis não sequenciais	Planta	PPW ^a	NWEI	P ^b	WDI	p ^b	WDE	p ^b
Não-prova	Não infectada	22/22	73,45 $\pm$ 10,62 (187 - 17)	0,315	418,82 $\pm$ 25,39 (585,11 – 194,92)	0,909	5,70 $\pm$ 0,43 (353,11 – 0,06)	<u>0,001</u>
	ToSRV-infectada	22/22	55,14 $\pm$ 6,75 (120 – 7)		415,20 $\pm$ 18,72 (566,60 – 218,58)		7,53 $\pm$ 0,61 (311,42 – 0,02)	
Prova	Não infectada	22/22	73,77 $\pm$ 10,62 (186 – 15)	0,315	181,17 $\pm$ 25,39 (405,08 – 14,89)	0,909	2,49 $\pm$ 0,21 (198,13 – 0,17)	<u>0,009</u>
	ToSRV-infectada	22/22	54,50 $\pm$ 6,78 (120 – 6)		184,80 $\pm$ 18,72 (381,42 – 33,40)		3,39 $\pm$ 0,27 (123,11 – 0,09)	
C	Não infectada	22/22	73,86 $\pm$ 10,63 (188 – 15)	0,324	142,41 $\pm$ 19,36 (354,25 – 14,89)	0,936	1,93 $\pm$ 0,09 (58,60 – 0,09)	<u>0,0016</u>
	ToSRV-infectada	22/22	55,73 $\pm$ 6,80 (121 – 7)		144,35 $\pm$ 13,96 (271,12 – 33,40)		2,59 $\pm$ 0,15 (68,12 – 0,01)	
pd^c	Não infectada	10/22	3,45 $\pm$ 1,13 (18 – 0)	0,249	15,31 $\pm$ 5,02 (65,15 – 0,00)	0,240	4,43 $\pm$ 0,20 (10,48 – 2,56)	0,963
	ToSRV-infectada	15/22	5,95 $\pm$ 2,32 (49 – 0)		27,03 $\pm$ 9,75 (193,02 – 0,00)		4,54 $\pm$ 0,17 (10,46 – 2,57)	
G	Não infectada	08/22	0,45 $\pm$ 0,14 (2 – 0)	0,784	13,14 $\pm$ 4,35 (72,95 – 0,00)	0,605	28,90 $\pm$ 2,79 (40,45 – 19,75)	<u>0,008</u>
	ToSRV-infectada	08/22	0,64 $\pm$ 0,21 (3 – 0)		32,83 $\pm$ 13,05 (203,84-0,00)		51,59 $\pm$ 6,18 (94,92 – 18,21)	
E	Não infectada	08/22	-	-	25,63 7,62 $\pm$ 11,49 (197,23-0,00)	0,748		-
	ToSRV-infectada	09/22	-		7,62 $\pm$ 3,41 (51,09-0,00)			
E1	Não infectada	08/22	0,91 $\pm$ 0,35 (7 – 0)	0,872	1,58 $\pm$ 0,65 (12,32 – 0,00)	0,915	1,74 $\pm$ 0,34 (5,39 – 0,18)	0,621
	ToSRV-infectada	09/22	0,82 $\pm$ 0,26 (4 – 0)		1,25 $\pm$ 0,43 (6,70 – 0,00)		1,54 $\pm$ 0,32 (4,78 – 0,19)	
E2	Não infectada	08/22	0,60 $\pm$ 0,19 (3 – 0)	0,293	24,05 $\pm$ 10,91 (184,91 – 0,00)	0,206	40,70 $\pm$ 10,50 (123,73 – 1,95)	0,210
	ToSRV-infectada	05/22	0,32 $\pm$ 0,14 (2 – 0)		6,36 $\pm$ 3,31 (47,24 – 0,00)		19,98 $\pm$ 6,66 (42,92 – 1,54)	
sE2	Não infectada	06/22	0,5 $\pm$ 0,19 (3 – 0)	0,224	-	-	47,57 $\pm$ 11,21 (123,73 – 10,77)	0,754
	ToSRV-infectada	03/22	0,18 $\pm$ 0,11 (2 – 0)		-		32,61 $\pm$ 5,53 (42,92 – 19,12)	

^a **PPW**, proporção de indivíduos que produziram determinado tipo de onda; **NWEI**, número de ondas produzida por inseto; **WDI**, duração da onda (min) por inseto; **WDE**, duração da onda (minuto) por evento (Backus et al., 2007). Prova: atividade de prova da mosca-branca; **pd**: penetração intracelular dos estiletes.

^b Comparação estatística entre os dois tratamentos para cada parâmetro foram feitos por: teste de *t*-Student (para variáveis com distribuição normal) e teste não-paramétrico de *U. Mann-Whitney* (para variáveis não normais). Dado sublinhado indica diferença significativa ($p < 0,05$).

^c Duração de *Potential drop* (*pd*) é expressa em segundos.

Tabela 11. Média ($\pm$ EPM) dos valores sequenciais de EPG (valores máximo e mínimo entre parênteses) para o comportamento alimentar de moscas-brancas não-viríferas *Bemisia tabaci* MEAM 1 em plantas de tomate infectadas com o begomovírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV-infectada) e não infectadas durante 10 h de registro^a.

Variáveis sequenciais	Planta	PPW ^a	NWEI	p ^b	WDI	p ^b
Tempo até 1° prova do início do EPG	Não infectada	22/22	-	-	31,79 $\pm$ 8,88 (125,77 – 0,25)	0,851
	ToSRV-infectada	22/22	-		35,71 $\pm$ 8,75 (116,70 – 0,14)	
Duração da 1ª prova	Não infectada	22/22	-	-	1,03 $\pm$ 0,19 (4,50 – 0,28)	0,181
	ToSRV-infectada	22/22	-		3,94 $\pm$ 3,06 (68,19 – 0,18)	
Duração da 2ª prova	Não infectada	22/22	-	-	1,18 $\pm$ 0,26 (4,62 – 0,23)	0,925
	ToSRV-infectada	22/22	-		8,26 $\pm$ 5,61 (123,10 – 0,20)	
Tempo do início da prova à 1ª pd	Não infectada	10/22	-	-	435,34 $\pm$ 43,20 (600,00 – 32,52)	0,271
	ToSRV-infectada	15/22	-		377,43 $\pm$ 40,56 (600,00 – 6,30)	
Tempo do início da 1ª prova à 1ª E	Não infectada	08/22	-	-	13,98 $\pm$ 4,86 (46,87 – 5,19)	0,495
	ToSRV-infectada	09/22	-		10,14 $\pm$ 2,36 (27,78 – 3,82)	
Tempo da 1ª prova à 1ª E ₂ prolongada (10 min)	Não infectada	06/22	-	-	492,97 $\pm$ 33,22 (599,75 – 133,34)	1,000
	ToSRV-infectada	03/22	-		517,46 $\pm$ 27,02 (599,85 – 159,45)	
Tempo do início da prova à 1ª E ₂ prolongada (10 min)	Não infectada	06/22	-	-	10,82 $\pm$ 1,35 (16,64 – 7,13)	0,688
	ToSRV-infectada	03/22	-		15,09 $\pm$ 6,83 (28,40 – 5,72)	
Tempo da 1ª prova à 1ª E	Não infectada	08/22	-	-	476,76 $\pm$ 34,08 (599,75 – 125,59)	0,411
	ToSRV-infectada	09/22	-		483,93 $\pm$ 34,13 (600,00 – 121,05)	
Tempo desde o começo da prova para a 1ª E ₂	Não infectada	08/22	-	-	11,23 $\pm$ 1,38 (17,35 – 7,13)	0,936
	ToSRV-infectada	05/22	-		12,52 $\pm$ 4,14 (28,40 – 5,72)	
Número de provas para a 1ª E	Não infectada	08/22	18,22 $\pm$ 7,29 (106 – 8)	0,979	-	-
	ToSRV-infectada	09/22	12,63 $\pm$ 4,17 (55 – 0)		-	
Número de provas após a 1ª E	Não infectada	08/22	9,54 $\pm$ 4,94 (99 – 0)	0,650	-	-
	ToSRV-infectada	09/22	7,36 $\pm$ 2,81 (50 – 0)		-	
Número de provas (< 3 min) após a 1ª E	Não infectada	08/22	7,59 $\pm$ 4,00 (79 – 0)	0,619	-	-
	ToSRV-infectada	09/22	5,86 $\pm$ 2,32 (42 – 0)		-	
Duração total de E ₁ seguida por E ₂	Não infectada	08/22	-	-	0,99 $\pm$ 0,40 (6,85 – 0,00)	0,233
	ToSRV-infectada	05/22	-		0,32 $\pm$ 0,15 (2,66 – 0,00)	

Duração total de E₁ seguida por E₂ prolongada (>10 min)	Não infectada	06/22	-	-	0,91 ± 0,40 (6,85 – 0,00)	0,206
	ToSRV-infectada	03/22	-		0,19 ± 0,13 (2,66 – 0,00)	
Duração total da fase não-floemática	Não infectada	22/22	-	-	192,55 ± 56,28 (594,60 – 0,00)	0,363
	ToSRV-infectada	22/22	-		237,84 ± 62,44 (597,65 – 0,00)	

^a **PPW**, proporção de indivíduos que produziram determinado tipo de onda; **NWEI**, número de ondas produzida por inseto; **WDI**, duração da onda (min) por inseto; **WDE**, duração da onda (minuto) por evento (Backus et al., 2007). Prova: atividade de prova da mosca-branca; *pd*: penetração intracelular dos estiletes.

^b Comparação estatística entre os dois tratamentos para cada parâmetro foram feitos por: teste de *t*-Student (para variáveis com distribuição normal) e teste não-paramétrico de *U*. Mann-Whitney (para variáveis não normais). Dado sublinhado indica diferença significativa ($p < 0,05$).

4.4. Discussão

A transmissão de vírus para novos hospedeiros é dependente das relações entre vírus-vetor-planta, e pode ser modulada pelos vírus a fim de obter vantagens adaptativas. No caso do patossistema vírus-vetor-planta hospedeira, o elemento ‘planta’ é sessil (se não considerarmos o processo de dispersão de sementes e pólen), e assim a manipulação por parte dos patógenos ocorre principalmente sobre seu vetor, que é o constituinte móvel deste patossistema. Uma vez que estes patógenos tem a capacidade de alterar o comportamento e desempenho biológico de seus vetores, otimizam a chance de disseminação e transmissão para outros hospedeiros (Ingwell et al., 2012; He et al. 2015).

De modo geral, plantas infectadas com vírus transmitidos de modo persistente tendem a ser mais atrativas e nutricionalmente melhores que as não infectadas, para que o vetor se alimente de maneira prolongada adquirindo ou inoculando o vírus. (Bosque-Pérez & Eigenbrode, 2011; Mauck et al., 2012; Carmo-Sousa et al., 2016). Em contrapartida, os vírus de transmissão não-persistentes tendem a possuir qualidade nutricional inferior, para que a relação entre planta-vetor seja rápida, uma vez que estes vírus são adquiridos em breves picadas de prova ou em períodos mais curtos de alimentação (Mauck et al., 2012; Carmo-Sousa et al., 2014).

Observou-se efeito indireto de ToCV sobre o comportamento alimentar de *B. tabaci* MEAM 1 nas fases não-floemáticas, uma vez que os insetos realizaram menor número de provas e caminhamento intercelular (onda C) nas plantas ToCV-infectadas, porém com maior duração por evento das provas, não-provas e onda C. Ademais, os insetos demoraram mais tempo para iniciar a primeira prova nas plantas ToCV-infectadas, sugerindo um atraso para iniciar a primeira prova nessas plantas.

Sendo ToCV um vírus limitado aos vasos do floema (Wisler et al., 1998), e ToSRV um begomovírus encontrado principalmente nas células floemáticas mas também em células companheiras, bem como em células da epiderme (Toloy, 2015), pode-se dizer que no presente trabalho não foram observados efeitos indiretos de ambos os vírus no que se refere à parâmetros diretamente relacionados à transmissão destes vírus, uma vez que não se observaram efeitos sobre parâmetros floemáticos (E , E_1 e E_2) nem no número e duração de pds (Tabela 4).

Nas condições em que o estudo foi realizado, os insetos estavam confinados sobre as plantas, e embora houvesse atraso no início da alimentação em plantas ToCV-infectadas, após o inseto realizar a primeira prova não se observaram efeitos relevantes no que se refere à parâmetros relacionados à transmissão de vírus (pd , E , E_1 e E_2). Entretanto, em condições de

campo onde o inseto possui livre escolha, provavelmente ele rejeitaria a planta infectada e partiria rumo a uma planta sadia, assim como foi demonstrado no experimento com chance de escolha descrito no *Capítulo 2*, onde observou-se que insetos não-virulíferos preferem pousar e se manter sobre plantas não infectadas com ToCV 6 e 24 h após a liberação em arena em condições de livre-escolha.

No caso de ToSRV os insetos não tiveram o comportamento alimentar indiretamente afetado pela infecção do vírus durante as 10 h de registro, concordando com o comportamento observado nos experimentos com chance de escolha descrito no *Capítulo 2*, onde indivíduos não-virulíferos não demonstraram preferência para pousar em plantas infectadas e não infectadas até a 6ª h após a liberação em teste de livre-escolha, sendo que houve preferência significativa apenas 24 h após a liberação, onde insetos preferiram pousar em plantas não infectadas do que em plantas ToSRV-infectadas.

Fereres et al. (2016) observaram que moscas-brancas não-virulíferas foram atraídas por voláteis emitidos por plantas de tomate não infectadas em comparação com voláteis de plantas ToCV-infectadas; já no caso do begomovírus ToSRV, indivíduos não-virulíferos não apresentaram nenhuma preferência, sendo atraídos por voláteis de plantas não infectadas e ToSRV-infectadas. Os mesmos autores detectaram que plantas ToSRV-infectadas apresentaram supressão na emissão de alguns terpenos; ao contrário, as plantas ToCV-infectadas apresentam aumento na emissão. Em outro estudo, observou-se que clones de batata ‘Ágata’ e Bach-4 infectados com ToCV tinham alguns voláteis suprimidos ou emitidos em menor quantidade quando comparado com clones sadios das mesmas variedades (Pereira, 2016).

Os terpenos parecem ser substâncias envolvidas na defesa das plantas contra fitófagos (Bleeker et al., 2009; Fang et al., 2013; Luan et al., 2013; Fereres et al., 2016). Deste modo, uma demora no início da primeira prova em plantas ToCV-infectadas pode ser devido à maior quantidade de terpenos emitidos por estas plantas, porém, como os insetos estavam confinados às plantas infectadas, deram início ao processo de alimentação horas após o início do registro de EPG. Já nas plantas infectadas com o begomovírus, os indivíduos rapidamente (aproximadamente 30 min após o início do registro EPG) iniciaram o processo de alimentação, provavelmente porque a emissão de voláteis de defesa nas plantas infectadas estavam reduzidos.

Em estudo realizado com as espécies MEAM 1 e MED de *B. tabaci* em plantas não infectadas e infectadas com o begomovírus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), observou-se que ambas espécies de *B. tabaci* preferiam plantas infectadas em relação às plantas não

infectadas com TYLCV, sendo que levaram menos tempo para realizar a primeira prova nas plantas infectadas; maior número de provas; além de gastarem mais tempo salivando (E₁) e ingerindo seiva floemática (E₂), o que aumenta a eficiência de transmissão nestas plantas (Liu et al., 2013). Outros estudos demonstraram que plantas infectadas com TYLCV (Fang et al., 2013) e *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV) (Luan et al., 2013) - apresentaram supressão de alguns terpenos, o que parece tornar a planta mais suscetível a *B. tabaci*, diferentemente do observado para ToCV, o qual nas análises de voláteis apresentou aumento na quantidade de alguns terpenos emitidos (Ferreira et al., 2016). Embora não tenha atuado com deterrente de alimentação, as plantas ToCV-infectadas levaram os insetos a demorarem o dobro de tempo para iniciar a primeira prova.

Plantas de citros infectadas com a fitobactéria *Xylella fastidiosa* e com claros sintomas de infecção foram menos aceitas por seu vetor a cigarrinha *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) (Hemiptera: Cicadellidae) que plantas não infectadas ou assintomáticas, uma vez que o tempo entre a primeira prova e o início da ingestão sustentada (> 5min) nos vasos de xilema foi muito mais longo em plantas com sintomas de CVC (Clorose Variegada dos Citros) (Miranda et al., 2013).

Já o psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) gastou mais tempo em fases floemáticas e menos em caminhar estilete nas plantas não infectadas que naquelas infectadas com “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (Cen et al., 2012).

Pode-se observar na bibliografia existente, que embora em alguns casos insetos vetores preferiram plantas não infectadas frente às plantas infectadas, muitas vezes os fitopatógenos podem manipular o comportamento alimentar de seu vetor em seu próprio benefício, como observado por Alvarez et al. (2007), que sugeriram um efeito indireto do vírus *Potato leaf roll virus* (PLRV) (gênero *Potyvirus*) em plantas de batata infectadas, sobre o comportamento alimentar de *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Nas plantas PLRV-infectadas sintomáticas, os pulgões realizaram menor número de provas curtas (<3 min), maior número de E₁ extracelular (E_{1e}) e maior número de E₁ quando comparado a plantas não infectadas. *Potato virus Y* (PVY) (gênero *Potyvirus*) também foi capaz de modular o comportamento alimentar do seu vetor *M. persicae*, uma vez que este causou aumento na penetração estilete em plantas PVY-infectadas, o que está associado com aumento da transmissão deste vírus (Ren et al., 2015).

Lei et al. (2016) observaram efeito direto do vírus *Southern rice black-streaked dwarf virus* (SRBSDV) (gênero *Fijivirus*) sobre o comportamento alimentar de cigarrinhas virulíferas *Sogatella furcifera* (Hovath) (Hemiptera: Delphacidae). Os autores verificaram que

indivíduos virulíferos gastavam mais tempo salivando (E_1) e ingerindo (E_2) nos vasos de floema de plantas não infectadas, que indivíduos não-virulíferos.

Carmo-Sousa et al. (2016) observaram efeito indireto do vírus persistente *Curcubit aphid-borne yellow virus* (CABV) (gênero *Poleovirus*), onde afídeos *Aphis gossypii* Glover permaneceram por mais tempo em contato com o floema (onda E) e mais tempo ingerindo seiva floemática (onda E_2) em plantas CABYV-infectadas que em plantas não infectadas, bem como o número de vezes que os indivíduos realizaram E_1 e E_2 foram maiores. Tal fato favorece a transmissão deste vírus, uma vez que estando mais tempo em contato com o floema ingerindo seiva, maior será a eficiência de aquisição.

He et al., (2015), ao estudarem os efeitos de TYLCCNV observaram um efeito direto do vírus sobre parâmetros não-floemáticos, quando os insetos se alimentavam em plantas de algodão (não hospedeira de TYLCCNV), porém não detectaram efeito sobre parâmetros relacionados ao floema, assim como observado no presente trabalho, onde foi observado efeito indireto do crinivírus ToCV sobre parâmetros não-floemáticos.

Moreno-Delafuente et al., (2013) observaram efeito direto de TYLCV no comportamento alimentar de *B. tabaci* MED, uma vez que indivíduos virulíferos atingiram os vasos do floema em plantas de berinjela mais frequentemente que os não-virulíferos.

Efeito direto também foi observado por Stafford et al. (2011) os quais verificaram que machos virulíferos do tripses *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) realizavam mais provas sem ingestão em plantas não infectadas (que são provas onde os insetos salivam, deixando grande parte das células não danificadas) o que acaba aumentando a eficiência na inoculação de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (gênero *Bunyaviridae*) o qual é transmitido de forma persistente-propagativa.

Sendo assim, levando-se em conta apenas o experimento de comportamento alimentar, pode-se dizer que o vírus semipersistente ToCV não foi capaz de modular o comportamento de seu vetor como estratégia para otimizar sua disseminação no campo, pois não afetou parâmetros relacionados ao floema. Ademais, houve uma não preferência de *B. tabaci* por plantas ToCV-infectadas.

Por ser ToSRV um vírus transmitido de modo persistente-circulativo, postula-se que tenha uma relação mais íntima com seu vetor, assim não foram observados efeitos indiretos significativos que poderiam afetar a transmissão deste vírus, de modo que pode-se dizer que, embora ToCV e ToSRV tenham afetado alguns parâmetros não-floemáticos, não modularam o comportamento alimentar de seu vetor *B. tabaci* MEAM 1 de modo a otimizar sua disseminação para novos hospedeiros, pois parâmetros floemáticos não foram afetados.

4.5. Conclusões

- Plantas de tomate ToCV-infectadas induzem atraso no comportamento da primeira prova de *B. tabaci* MEAM 1;
- Plantas de tomate infectadas com ToCV ou ToSRV não afetam parâmetros floemáticos durante o comportamento alimentar de *B. tabaci* MEAM 1.

Referencias

- ÁLVAREZ, A. E.; GARZO, E.; VERBEEK, M.; VOSMAN, B.; DICKE, M.; TJALLINGII, W. F. Infection of potato plants with *Potato leafroll virus* changes attraction and feeding behaviour of *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 125, p. 135-144, 2007.
- ÁLVAREZ, A. E.; TJALLINGII, W. F.; GARZO, E.; VLEESHOUWERS, V.; DICKE M.; VOSMAN B. Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 121, p. 145-157, 2006.
- BACKUS, E. A.; CLINE, A. R.; ELLERSEICK, M. R.; SERRANO, M. S. *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton: new methods and parameters for analysis of non-sequential electrical penetration graph data. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 100, p. 296-310, 2007.
- BLEEKER, P. M.; DIERGAARDE, P. J.; AMENT, K.; GUERRA, J.; WEIDNER, M.; SCHUTZ, S.; BOTH, M.T. J.; HARING, M. A.; SCHUURINK, R. C. The role of specific tomato volatiles in tomato-whitefly interaction. **Plant Physiology**, v. 151, p. 925-935, 2009.
- BONANI, J. P.; FERERES, A.; GARZO, E.; MIRANDA, M. P.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; LOPES, J. R. S. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 134, p. 35-49, 2010.
- BOSQUE-PÉREZ, N.A., EIGENBRODE, S.D. The influence of virus-induced changes in plants on aphid vectors: Insights from luteovirus pathosystems. **Virus Research**, v. 159, p. 201-205, 2011.
- CARMO-SOUSA, M.; MORENO, A.; GARZO, E., FERERES, A. A non-persistently transmitted-virus induces a pull-push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. **Virus Research**, p.1-9, 2014.
- CARMO-SOUSA, M.; MORENO, A.; PLAZA, M.; GARZO, E.; FERERES, A. *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) modifies the alighting, settling and probing behaviour of its vector *Aphis gossypii* favouring its own spread. **Annals of Applied Biology**, v. 169, p. 284-297, 2016.
- CASSONE, B. J.; WIJERATNE, S.; MICHEL, A. P.; STEWART, L. R.; CHEN, Y.; YAN, P.; REDINBAUGH, M. G. Virus-independent and common transcriptome responses of leafhopper vectors feeding on maize infected with semi-persistently and persistent propagatively transmitted viruses. **Genomics**, v. 15, p. 2-13, 2014.
- CASTLE, S. J.; MOWRY, T. M.; BERGER, P. H. Differential settling by *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) on various virus infected host plants. **Annals of the Entomological Society of America**, v.91, p. 661-667, 1998.
- CEN, Y.; YANG, C.; HOLFORD, P.; BEATTIE, G. A. C.; SPOONER-HART, R. N.; LIANG, G.; DENG, X. Feeding behaviour of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri*, on healthy

- and huanglongbing-infected citrus. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 143, p. 13-22, 2012.
- COLLAR, J.L., AVILLA, C., FERERES, A. New correlations between aphid stylet paths and nonpersistent virus transmission. **Environmental Entomology**, v. 26, P. 537-544, 1997.
- COLLAR, J. L.; FERERES, A. Nonpersistent virus transmission efficiency determined by aphid probing behaviour during intracellular punctures. **Environmental Entomology**, v. 27, p. 583-591, 1998.
- CZOSNEK, H.; GHANIM, M.; GHANIM, M. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci*- insights from studies with *Tomato yellow leaf curl virus*. **Annals of Applied Biology**, v. 140, p. 215-231, 2002.
- EIGENBRODE, S. D.; DING, H.; SHIEL, P.; BERGER, P. H. Volatiles from potato plants infected with potato leafroll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). **Proceedings of the Royal Society of London B-Biological Sciences**, v. 269, p. 2603-2603, 2002.
- FANG, Y.; JIAO, X.; XIE, W.; WANG, S.; WU, Q.; SHI, X.; CHEN, G.; SU, Q.; YANG, H.; PAN, H.; ZHANG, Y. *Tomato yellow leaf curl virus* alters the host preferences of its vector *Bemisia tabaci*. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1-5, 2013. DOI: 10.1038/srep02876
- FERERES, A.; MORENO, A. Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. **Virus Research**, v.141, p.158-168, 2009.
- FERERES, A.; PEÑAFLORES, M. F. G.; FAVARO, C. F.; AZEVEDO, K. E. X.; LANDI, C. H.; MALUTA, N. K. P.; BENTO, J. M. S.; LOPES, J. R.S. Tomato infection by whitefly-transmitted circulative and non-circulative viruses induce contrasting changes in plant volatiles and vector behaviour. **Viruses**, v. 8, p. 225, 2016. DOI:10.3390/v8080225
- HAMMOND, A. M.; HARDY, T. N. Quality of diseased plants as hosts for insects. In: HEINRICHS, E. E. A. (Ed.). **Plant Stress-Insect Interactions**. New York: Wiley. 1988. p. 381-431.
- HE, W. B.; LI, J.; LIU, S. S. Differential profiles of direct and indirect modification of vector feeding behavior by a plant virus. **Scientific Reports**, v. 5, p.7682; 2015. DOI:10.1038/srep07682.
- HOGENHOUT, S. A.; AMMAR, E. D.; WHITFLIED, A. E.; REDINBAUGH, M. G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annual Review of Phytopathology*, v. 46, p. 327-359, 2008.
- INGWELL, L. L.; EIGENBRODE, S. D.; BOSQUE-PÉREZ, N. A. Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. **Scientific Reports**, v. 2, p. 578, 2012. DOI:10.1038/srep00578.
- JASSEN, J. A. M.; TJALLINGII, W. F.; LENTEREN, J. C. Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 52, p. 69-81, 1989.

- JIANG, Y. X.; LEI, H.; COLLAR, J. L.; MARTIN, B.; MUÑIZ, M.; FERERES, A. Probing and feeding behavior of two distinct biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera : Aleyrodidae) on tomato plants. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 357-366, 1999.
- 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 Entomological Society of America**, v. 93, p. 573-579, 2000.
- JOHNSON, D. D.; WALKER, G. P. Intracellular punctures by the adult whitefly *Bemisia argentifolii* on DC and AC electronic feeding monitors. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 92, p. 257-270, 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**, v. 102, p. 115-123, 2002.
- KIMMINS, F. M.; TJALLINGII, W. F. Ultrastructure of sieve element penetration by aphid stylets during electrical recording. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 39, p. 135-141, 1985.
- LEI, W.; LI, P.; HAN, Y.; GONG, S.; YANG, L.; HOU, M. EPG recordings reveal differential feeding behaviors in *Sogatella furcifera* in response to plant virus infection and transmission success. **Scientific Reports**, v. 6, p. 30240, 2016. DOI: 10.1038/srep30240.
- LIU, B.; PREISSER, E. L.; CHU, D.; PAN, H.; XIE, W.; WANG, S.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. Multiple forms of vector manipulation by a plant-infecting virus: *Bemisia tabac* and *Tomato yellow leaf curl virus*. **Journal of Virology**, v. 87, p. 4929-4937, 2013.
- LUAN, J. B.; YAO, D. M.; ZHANG, T.; WALLING, L. L.; YANG, M.; WANG, Y.J.; LIU, S. S. Suppression of terpenoid synthesis in plants by a virus promotes its mutualism with vectors. **Ecology Letters**, v. 16, p. 390-398, 2013.
- MARTÍN, B.; COLLAR, J. L.; TJALLINGII, W. F.; FERERES, A. Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2701-2705, 1997.
- MAS, F.; VEREIJSEN, J.; SUCKLING, D. M. Influence of the pathogen *Candidatus Liberibacter Solanacearum* on tomato host plant volatiles and psyllid vector settlement. **Journal of Chemical Ecology**, p. 40, p. 1197-1202, 2014
- MAUCK, K. E.; De MORAES, C. M.; MESCHER, M. C. Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 3600-3605, 2010.
- MAUCK, K. E.; BOSQUE-PÉREZ, N. A.; EIGENBRODE, S. D.; De MORAES, C. M.; MESCHER, M. C. Transmission mechanisms shape pathogen effects on host-vector interactions: evidence from plant viruses. **Functional Ecology**, v. 26, p. 1162-1175, 2012.
- MIRANDA, M. P. D.; VILLADA, E. S.; LOPES, S. A.; FERERES, A.; LOPES, J. R. S. Influence of citrus plants infected with *Xylella fastidiosa* on stylet penetration activities of

- Bucephalogonia xanthophis* (Hemiptera: Cicadellidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 106, p. 610-618, 2013.
- MIRANDA, M. P.; YAMAMOTO, P. T.; GARCIA, R. B.; LOPES, J. P. A.; LOPES, J. R. S. Thiamethoxam and imidacloprid drench applications on sweet orange nursery trees disrupt the feeding and settling behaviour of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Pest Management Science**, v. 9, p. 1785-93, 2016.
- MORENO, A.; PALACIOS, I.; BLANC, S.; FERERES, A. Intracellular salivation is the mechanism involved in the inoculation of *Cauliflower mosaic virus* by its major vectors, *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, p. 763-769, 2005.
- MORENO, A.; TJALLINGII, W. F.; FERNANDEZ-MATA, G.; FERERES, A. Differences in the mechanism of inoculation between a semi-persistent and a non-persistent aphid-transmitted plant virus. **Journal of General Virology**, v. 93, p. 662-667, 2012.
- MORENO-DELAFUENTE, A.; GARZO, E.; MORENO, A.; FERERES, A. A plant manipulation the behavior of its whitefly vector to enhance its transmission efficiency and spread. **PLoS One**, v.8, p.1-10, 2013.
- NAULT L. R. Arthropod transmission of plant viruses, a new synthesis. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 90, p. 521-541, 1997.
- NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 219-248, 2011.
- NG, J.C.K.; FALK, B. Virus-vector interactions mediating non-persistent and semi-persistent transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v.44, p.183-212, 2006
- OHNISHI, J.; KITAMURA, T.; TERAMI, F.; HONDA, K. A selective barrier in the midgut epithelial cell membrane of the nonvector whitefly *Trialeurodes vaporariorum* to *Tomato yellow leaf curl virus* uptake. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, p.131-139, 2009.
- PALACIOS, I.; DRUCKER, M.; BLANC, S.; LEITE, S.; MORENO, A.; FERERES, A. *Cauliflower mosaic virus* is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 3163-3171, 2002.
- PAN, H. P.; CHU, D.; LIU, B.; SHI, X.; GUI, L.; XIE, W.; CARRIERE, Y.; LI, X.; ZHANG, Y. Differential effects of an exotic plant virus on its two closely related vectors. **Science Reports**, v.3, p. 1-6, 2013.
- PEREIRA, L. S. **Interações *Bemisia tabaci* biótipo B e *Tomato chlorosis virus* em clones de batata**. 2016. 66P. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo de Campinas, 2016.
- POWELL, G.; PIRONE, T.; HARDIE, J. Aphid stylet activities during potyvirus acquisition from plants and an *in vitro* system that correlate with subsequent transmission. **European Journal of Plant Pathology**, v. 101, p. 411-420, 1995.

- PRADO, E.; TJALLINGII, W. F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 72, p. 157-166, 1994.
- REN, G. W.; WANG, X. F.; CHEN, D.; WANG, X. W.; FAN, X. J.; LIU, X. D. *Potato virus Y*-infected tobacco affects the growth, reproduction, and feeding behavior of a vector aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 50, p. 239-243, 2015.
- RODRÍGUEZ-LOPES, M. J.; GARZO, E.; BONANI, J. P.; FERERES, A.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MORIONES, E. Whitefly resistance traits derived from the wild tomato *Solanum pimpinellifolium* affect the preference and feeding behavior of *Bemisia tabaci* and reduce the spread of *Tomato yellow leaf curl virus*. **Phytopathology**, v. 101, p. 1191-1201, 2011.
- RUBINSTEIN, G.; CZOSNEK, H. Long-term association of *Tomato yellow leaf curl virus* with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2683–2689, 1997.
- SARRIA, E.; CID, M.; Garzo, E.; FERERES, A. Excel Workbook for automatic parameter calculation of EPG data. **Computers and Electronics in Agriculture** v. 67, p. 35-42, 2009.
- SPILLER, N. J.; KOENDERS, L.; TJALLINGII, W. F. Xylem ingestion by aphids a strategy for maintaining water balance. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 55, p. 101-104, 1990.
- SPSS INC** (2010) IBM Statistics SPSS 19.0 Package for Windows. Chicago:USA.
- STAFFORD, C. A.; WALKER, G. P.; ULLMAN, D. E. Infection with a plant viruses modifies vector feeding behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, p.9350-9355, 2011.
- TJALLINGII, W. F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 24, p. 721-730, 1978.
- TJALLINGII, W. F. (1988). Electrical recording of stylet penetration activities. In: A. K. Minks & P. Harrewign (eds), *Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control*, vol. B. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 95–108.
- TOLOY, R. S. **Período mínimo para a aquisição do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) por *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiro e identificação de sítios de aquisição do vírus.** 2015. 94p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ/USP, Piracicaba. 2015.
- VIDA VERDE LTDA:** Acesso em: <http://www.vidaverde.agr.br/produtos.htm>
- WERNER, B. J.; MOWRY, T. M.; BOSQUE-PÉREZ, N. A.; DING, H.; EIGENBRODE, S. D. Changes in green peach aphid responses to potato leafroll virus-induced volatiles emitted during disease progression. **Environmental Entomology**, v. 38, p. 1429-1438, 2009.

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**, v. 88, p.402-409, 1998.

5. ATIVIDADES DE PENETRAÇÃO ESTILETAR DE *Bemisia tabaci* (GENN.) (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) ASSOCIADAS À INOCULAÇÃO DO CRINIVÍRUS *Tomato chlorosis virus* (ToCV)

Resumo

A mosca-branca *Bemisia tabaci* é um importante vetor de inúmeros fitovírus, incluindo o vírus transmitido de modo semipersistente *Tomato chlorosis virus* (ToCV). A relação entre moscas-brancas e os vírus transmitidos são complexas e estas interações variam consideravelmente. Aspectos comportamentais, especialmente o comportamento de prova e de alimentação associados com a transmissão de fitovírus são ainda pouco compreendidos. O comportamento alimentar do vetor é uma característica plástica, que pode ser influenciada por muitos fatores, com importantes implicações na transmissão de vírus, epidemiologia e controle. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar o comportamento alimentar e estiletar de *B. tabaci* MED (Mediterranean) associados à inoculação de ToCV em tomateiro. Para isso, moscas-brancas virulíferas foram monitoradas individualmente usando a técnica de *Electrical Penetration Graph* (EPG) em plantas testes de tomate, e removidas quando comportamentos alimentares específicos foram realizados. Os registros de EPG foram classificados em seis grupos dependendo da onda observada: I) caminhamento estiletar (< 5 min); II) caminhamento estiletar + 1 ou mais *pds*; III) caminhamento estiletar + onda E₁; IV) caminhamento estiletar + fase de transição E₁ / E₂; V) caminhamento estiletar e um único evento de E₁ + E₂; VI) caminhamento estiletar e vários episódios de E₁ + E₂. Plantas fontes de ToCV, plantas testes e receptores foram confirmadas por hibridização molecular. Verificou-se apresentaram que a inoculação de ToCV está principalmente associada com a forma de onda E₁, com taxa de transmissão de 52,2%. Não houve aumento significativo na taxa de transmissão quando insetos foram interrompidos na fase de transição de E₁ / E₂ (73,3%), porém aumento foi observado após a realização de vários eventos de E₁ + E₂. Também foi observado alguns casos onde ocorreu transmissão antes das moscas-brancas realizarem 'E₁' sugerindo que a transmissão de ToCV pode ocorrer em taxa baixa antes de os insetos atingirem os vasos do floema.

Palavras-chave: *Electrical Penetration Graph*; Mosca-branca; Transmissão de fitovírus.

Abstract

The whitefly *Bemisia tabaci* is an important vector of numerous plant viruses, including the emergent semipersistently-transmitted *Tomato chlorosis virus* (ToCV). The relationships between whiteflies and transmitted viruses are complex and these interactions vary considerably. Behavioral aspects, especially the probing and feeding behavior associated with virus transmission, are poorly understood. Vector feeding behavior is a plastic character that can be influenced by many factors, with important implications on virus transmission, epidemiology and control. Thus, the objective of this study was to reveal the probing and feeding behavior of *B. tabaci* MED (Mediterranean) associated to the inoculation of ToCV in tomato. Single viruliferous whiteflies were monitored using the Electrical Penetration Graph (EPG) technique on tomato test plants, and removed when specific behavioral events were recorded. EPG recordings were classified into six categories depending on the waveforms observed: I) stylet pathway (< 5 min); II) Stylet pathway + 1 or more pds; III) stylet pathway + waveform E₁; IV) stylet pathway + a single transition E₁/ E₂ phase; V) stylet pathway + a single E₁ + E₂ phase and VI) stylet pathway followed by several E₁ + E₂ phases. ToCV infection on source, receptor and test plants were confirmed by tissue blot molecular hybridization using a coat protein gene probe. The results showed that ToCV inoculation is mainly associated with the waveform E₁, as there was a significant increase in the rate of transmission when whiteflies reached the E₁ phase (52,2%). There was no significant increase in transmission rate when whiteflies were interrupted during the E₁ / E₂ transition phase (73,3%), but there was a significant increase in transmission after several E₁+ E₂ episodes. We also observed few cases where inoculation occurred before the whiteflies were able to reach 'E₁', suggesting that transmission may occur at a low rate before whiteflies reach the phloem sieve elements.

Keywords: Electrical Penetration Graph; Whitefly; Phytovirus transmission.

5.1. Introdução

A relação entre mosca-branca (Hemiptera: Aleyrodidae) e os fitovírus transmitidos são extremamente complexas, e alguns parâmetros biológicos e comportamentais desta interação podem variar consideravelmente dependendo da espécie de vírus, vetor e planta hospedeira, bem como com as condições ambientais e o modo de transmissão.

Alterações no processo de seleção hospedeira e comportamento alimentar podem significativamente influenciar a probabilidade de transmissão dos vírus com consequências na taxa de disseminação da doença. Alguns estudos já foram realizados relatando os efeitos de patógenos no comportamento de mosca-branca, sendo que grande parte foi realizado com vírus do gênero *Begomovirus* particularmente *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (gênero *Begomovirus*) (Rubinstein & Czosnek, 1997; McKenzie, 2002; Pusag et al., 2012; Fang et al., 2013; Moreno-Delafuente et al., 2013; Shi et al., 2013), no entanto, ainda é desconhecido se alterações no comportamento podem ocorrer com outros vírus transmitidos por moscas-brancas.

Uma clara avaliação dos impactos decorrentes de alterações do comportamento na transmissão requer um entendimento de atividades estiletares e alimentares específicas envolvidas na aquisição e inoculação de vírus, e em que tecido da planta estas atividades ocorrem. O comportamento alimentar de mosca-branca e locais associados à transmissão de vírus foi estudado apenas para TYLCV (Jiang et al., 2000) e para o *Lettuce chlorosis virus* (LCV) (gênero *Closterovirus*) (Johnson et al., 2002). Nestes estudos, utilizou-se a técnica de *Electrical Penetration Graph* (EPG) para correlacionar eventos associados com a inoculação de vírus com a ocorrência de ondas específicas de EPG observadas durante atividades alimentares de mosca-branca.

EPG é uma importante ferramenta para estudar a penetração estiletar e comportamento alimentar, onde o inseto e planta são conectados através de eletrodos em um circuito elétrico e as oscilações no sistema de voltagem devido as atividades alimentares específicas do inseto na planta são registrados pelo equipamento de EPG, e então digitalizados em tempo real como formas de onda e projetados na tela do computador. A correlação da inoculação de vírus com ondas de EPG nos estudos foram feitas interrompendo as atividades estiletares durante cada padrão de onda nas plantas testes e então avaliando a ocorrência de infecção nestas plantas (Jiang et al., 2000; Johnson et al. 2002).

Dentre os inúmeros vírus transmitidos por moscas-brancas do complexo *Bemisia tabaci* (Genn.), o crinivírus *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (gênero *Crinivirus*) é

particularmente importante pois é exemplo de um vírus emergente em diversos países (Navas-Castillo et al., 2011). ToCV é um vírus limitado aos vasos de floema, no entanto, em contraste com outras espécies de crinivírus, é transmitido de modo semipersistente por dois diferentes gêneros de mosca-branca, sendo *Bemisia* e *Trialeurodes*. Dentro do complexo *B. tabaci* três espécies são relatadas como vetoras de ToCV: espécie New World (NW, formada pelo biótipo A), Middle East-Asia Minor 1 (MEAM 1, formada pelo biótipo B) (Wisler et al, 1998.), e a espécie Mediterranean (MED, formada pelo biótipo Q) (Navas-Castillo et al, 2000; Wintermantel & Wisler, 2006). Ademais, ToCV é transmitido por *T. vaporariorum* e *T. abutilonea*. (Wisler et al. 1998).

Esta espécie de vírus vem causando inúmeras perdas de produção em culturas de várias partes do mundo (Navas-Castillo et al., 2011) e embora afete principalmente plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), em algumas regiões foi encontrado infectando pimentão (*Capsicum annuum* L.) (Lozano et al., 2004; Barbosa et al., 2010; Fortes et al., 2012), batata (*S. tuberosum* L.) (Freitas et al., 2012; Fortes & Navas-Castillo, 2012), tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Fiallo-Olive et al., 2014) e outros vegetais e cultivos ornamentais (Wintermantel & Wisler, 2006).

Dada a importância de *B. tabaci* como vetora de fitovírus e a crescente importância de ToCV em âmbito mundial, o conhecimento dos mecanismos de transmissão de vírus tornam-se valiosos, particularmente porque o comportamento alimentar de mosca-branca é crítico na transmissão e disseminação de fitovirose.

Assim foi conduzido um estudo utilizando a técnica de EPG para determinar atividades de penetração estiletar e tecidos vegetais envolvidos na inoculação de ToCV em tomateiro. O conhecimento do comportamento alimentar de moscas-brancas associadas com a transmissão de ToCV pode ser estratégico para definir métodos de controle (modos de ação de inseticidas e/ou mecanismos de resistência de plantas) que podem interferir com fases específicas da penetração estiletar do vetor de modo a prevenir a transmissão e manejo de doenças causadas por ToCV.

5.2. Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (CSIC) em Madri, Espanha onde avaliou-se a correlação entre o comportamento alimentar e atividades estiletas de *B. tabaci* MED e a inoculação de ToCV.

5.2.1. Material biológico: insetos, plantas e isolado de vírus.

Para o experimento utilizou-se o isolado PI-1-2 de ToCV, o qual foi obtido infectando naturalmente tomateiro em amostras coletadas em Málaga, Espanha e mantidos em plantas de tomate (*S. lycopersicum* cv. Moneymaker).

Para obtenção de plantas fonte do vírus para o experimento, foram colocados grupos de 25 moscas-brancas *B. tabaci* MED adultas e não sexadas dentro de uma gaiola estilo *clip-cage* em folhas de tomateiro infectado e expressando claros sintomas de infecção por ToCV por um Período de Acesso à Aquisição (PAA) de 72 h. Após este período as moscas-brancas foram transferidas para tomateiro sadio no estágio de 3-4 folhas (cv. Moneymaker) por um Período de Acesso à Inoculação (PAI) de 7 dias, sendo que após este período tanto insetos como a folha onde estavam localizados foram removidos para eliminar ninfas e ovos remanescentes. As plantas foram mantidas dentro de gaiolas teladas em casa-de-vegetação (Temperatura: 25:21° C (dia: noite), UR 80% e fotoperíodo 14:10 (luz: escuro)).

Foi estabelecida uma criação livre de vírus de *B. tabaci* MED com indivíduos obtidos na colônia de manutenção do *Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', Universidad de Málaga - Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (IHSM-UMA-CSIC). A criação foi mantida em plantas de berinjela (*S. melongena*) em casa-de-vegetação no *Instituto de Ciencias Agrarias-CSIC*, Madrid, Espanha. Sendo que a identificação genética para confirmação da identidade da espécie de *B. tabaci* foi realizada periodicamente por amplificação da sequência do gene citocromo oxidase mitocondrial I de acordo com o protocolo de Frolich et al. (1999).

Para o experimento de inoculação de ToCV, foram utilizadas plantas de tomate sadias no estágio de 2-3 folhas (cv. Moneymaker) como plantas testes (planta A) e receptoras (planta B). Para os registros de EPG, utilizou-se fêmeas não-virulíferas (1-10 dias de idade) aclimatados por 72 h em tomateiro sadio, seguido por um PAA em plantas fontes de ToCV de 24 h para posterior uso no experimento.

5.2.2. Associação de formas de onde de EPG com a inoculação de ToCV

Para a obtenção dos registros de EPG, foram utilizadas fêmeas de mosca-branca *B. tabaci* MED virulíferas (PAA de 24 h em planta infectada com ToCV), as quais foram adormecidas em gelo por aproximadamente 5 - 10 minutos, e após colocados sobre uma placa de Petri contendo gelo moído no interior sob um microscópio estereoscópico. Os insetos foram

posicionados com a região dorsal voltada para cima, onde foi colado com cola de prata condutora (com base de solvente) (Ted Pella, Inc, Colloidal Silver Liquid) um fio de ouro (12 μm de diâmetro, aproximadamente 2 cm de comprimento) na região do pronoto do inseto o qual foi ligado a um eletrodo de cobre (2 cm de comprimento).

Após uma hora de jejum, cada inseto foi conectado a um eletrodo de cobre acoplado ao equipamento de EPG, e posicionados sobre a superfície abaxial de folhas de tomateiro sadio (plantas testes A). Para a obtenção dos registros utilizou-se um monitor de Corrente-Direta com 8 canais (modelo Giga-8d, com *software* Stylet+ para Windows (EPG Systems, Wageningen, Holanda)) (Tjallingii, 1978; 1988). O equipamento, insetos e plantas foram mantidos dentro de uma gaiola de Faraday para evitar interferências elétricas externas, em sala com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Fig. 10).

Figura 10. Plantas de tomate (2 - 3 folhas verdadeiras) dentro de gaiola de Faraday (esquerda), mosca-branca colada ao fio de ouro posicionado na face abaxial de folha de tomateiro (direita).

O experimento teve por finalidade determinar quais fases da penetração estiletar e quais as formas de onda de EPG estão associadas à inoculação de ToCV por *B.tabaci* MED.

A penetração estiletar nas plantas testes foram classificadas em seis grupos dependendo da forma de onda observada: **I)** caminharmento estiletar (onda C) (< 5 min); **II)** caminharmento estiletar + 1 ou mais penetrações intracelulares (*pds*); **III)** caminharmento estiletar + onda E₁; **IV)** caminharmento estiletar + fase de transição E₁ / E₂; **V)** caminharmento

estiletar e um único evento de $E_1 + E_2$; **VI**) caminharmento estiletar e vários episódios de $E_1 + E_2$ (Fig. 11). Sendo que caminharmento estiletar corresponde ao caminharmento dos estiletes entre-células (onda C); no caminharmento estiletar longo além de caminharmento intercelular pode ocorrer *pds* a qual refere-se à penetração intracelular (onda *pd-potential drop*); onda E_1 correlacionada à salivação nos vasos de floema no início da fase floemática; onda E_2 está correlacionada com a ingestão passiva de seiva nos vasos de floema; fase de transição E_1 / E_2 refere-se ao final da fase de salivação e início da fase de ingestão de seiva do floema, evidenciado por ondas com picos para cima e para baixo (Tjallingii, 1988; Janssen et al., 1989; Johnson & Walker, 1999; Jiang et al., 1999).

Após ondas de EPG específicas serem realizadas, cada inseto foi removido do eletrodo e descolado do fio de ouro com o auxílio de um pincel ou cortado rente ao dorso do inseto, e transferido individualmente para uma planta receptora (planta B), igualmente sadia de mesma idade da planta A. Os indivíduos permaneceram na planta B por um PAI de 72 h confinados individualmente dentro de gaiolas *clip-cage* a fim de confirmar a infectividade do inseto. (Fig 12).

Grupo I: caminhada estiletar (≤ 5 min)

Grupo II: caminhada estiletar longo (> 5 min)

Grupo III: caminhada estiletar + E_1

Grupo IV: caminhada estiletar + fase de transição de E_1+E_2

Grupo V: caminhada estiletar + um episódio de E_1+E_2

Grupo VI: caminhada estiletar + mais de um episódio de E_1+E_2

Figura 11. Ondas de EPG obtidas nos 6 diferentes grupos (I-VI) utilizados para correlacionar atividades específicas de comportamento estiletar de *B. tabaci* com a transmissão de ToCV.

Tabela 12. Plantas de tomate (2-3 folhas verdadeiras) (Plantas B) as quais os insetos eram transferidos após o registro de EPG e mantidos individualmente em gaiolas (*clip-cage*) durante 72h para confirmar se o inseto estava virulíferos.

As plantas A e B foram avaliadas por hibridização molecular (item 5.2.3), para verificar a presença de ToCV. Se as plantas A e B forem negativas sugere que o inseto não estava virulífero e ambos devem ser descartados das análises; se a planta receptora (planta B) for positiva e a planta A negativa, indica que provavelmente ToCV não foi inoculado naquela forma de onda onde ocorreu a interrupção, mas o inseto estava virulífero pois foi capaz de inocular quando submetido a um PAI de 72 h. Se a planta A for positiva e a B negativa indica que o vírus pôde ser transmitido naquela forma de onda, mas que provavelmente o inseto possuía um título viral baixo e não foi capaz de inocular na planta B, ou o inseto pode ter morrido na planta B após ser descolado do fio de ouro. Se as plantas A e B forem positivas indica que ToCV pode ser transmitido na forma de onda interrompida e que o inseto ainda foi capaz de inocular a planta B confirmando sua infectividade.

5.2.3. Análise da infecção por ToCV

As plantas utilizadas no experimento de inoculação de ToCV foram analisadas 4-5 semanas após a realização dos registros de EPG por hibridização molecular de sessões transversais do pecíolo de acordo com o protocolo descrito em Fortes et al. (2012).

Para as impressões (*printing*), cortou-se transversalmente o pecíolo de folhas dos tomateiros (4ª folha composta contada de baixo para cima) e carimbado ou feito um *printing* em uma membrana de nylon carregada positivamente (Roche Diagnostics) (Fig 13A), fazendo-se duas impressões por pecíolo em cada quadrado da membrana, e após a coleta de todas as impressões dos pecíolos a membrana foi fixada em luz ultravioleta (*Crosslinker* RPN 2500, Amersham Life Science) e hibridizada com sonda específica para gene da capa proteica, como descrito por Fortes et al. (2012).

As membranas foram colocadas dentro de tubos de vidro cilíndricos contendo solução de pré-hibridização (5x SSC [750 mM NaCl e 75 mM citrato de sódio, pH 7,0], 1% *N*-Lauroylsarcosine, 0,02% SDS e 2% agente bloqueador [Roche]) e 50% formamida. Após 2 h de incubação, uma sonda específica foi adicionada e as membranas foram incubadas a 65° C por toda a noite (Fig 13B).

A hibridização foi rigorosamente conduzida, e após a pernoite de incubação foram realizados os passos de lavagem das membranas (a 65°C em 0,1 x SSC [15mM NaCl e 1,5mM citrato de sódio] e 0,1% dodecil sulfato de sódio) (Fig 13C). Os sinais de hibridização foram detectados por filme de raio X (X-Omat AR, Kodak), após tratamento com CDP-Star (Roche) e seguido por procedimento convencional na revelação fotográfica (Fig 13D).

Figura 12. A) Membrana utilizada para coletar impressões (*printing*) dos pecíolos; B) Forno para hibridização onde as membranas foram tratadas com sondas específicas e tampões; C) Membranas embebidas em tampão específico sendo agitadas; D) Revelado de uma membrana evidenciando amostras positivas para *Tomato chlorosis virus* (pontos negros).

5.2.4. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados, as taxas de transmissão foram calculadas como porcentagem (n° de plantas teste infectadas (A+)) / (n° de plantas (A+) + (A-B+)), e foram comparadas entre os diferentes grupos usando o teste de qui-quadrado e pelo teste de Fisher quando os valores esperados foram menores que 5 (Statview II, Abacus concepts, 1987).

5.3. Resultados

Os resultados dos registros de EPG (Tabela 12) a respeito do comportamento alimentar e estiletar de *B. tabaci* MED em plantas de tomate demonstraram que a inoculação de ToCV está associada principalmente a forma de onda E₁, a qual é correlacionada com salivação nos elementos de floema (que é precedido por vários episódios não-floemáticos), uma vez que foi observado um drástico aumento na taxa de transmissão quando moscas-brancas realizaram E₁ (52,2%) (Grupo III).

No entanto, não houve aumento significativo quando os insetos foram interrompidos durante a fase de transição entre E_1/E_2 (73,3%) (Group IV), ou quando os insetos realizaram apenas um episódio de $E_1 + E_2$ (76,0%) (Grupo V). Porém, observou-se um aumento significativo na taxa de transmissão quando insetos realizaram mais de um episódio de $E_1 + E_2$ (100%) (Grupo VI) (Tabela 12).

Além de transmissão associada à salivação e/ou alimentação passiva nos elementos de floema, foi observada inoculação de ToCV antes de moscas-brancas realizarem E_1 (Grupo II) (Tabela 12). Os resultados sugerem que a infecção viral pode ocorrer em baixa proporção (menor que 2%) penetrações nas células acompanhantes, células parenquimáticas ou mesmo durante breves picadas de provas em células do floema, culminando com a infecção da planta com ToCV. No entanto, os resultados demonstram que a atividade estiletar nos elementos de floema é o principal comportamento alimentar envolvido na inoculação deste crinivírus.

Tabela 13. Relação entre atividades estiletas de *B. tabaci* MED e a eficiência de transmissão de *Tomato chlorosis virus* para plantas de tomate

Grupo	Onda de EPG	N° de plantas teste		Total	Dados descartados (A- B-) ^(a)	Eficiência de transmissão (%)*
		Plantas A+ (A+B+ ou A+B-)	Apenas B+ (A- B+)			
I	Caminhamento estiletar (< 5 min)	0	32	0/32	29	0,00 a
II	Caminhamento estiletar – 1 ou mais <i>pds</i>	1	50	1/51	62	1,96 a
III	Caminhamento estiletar + E_1	12	11	12/23	15	52,2 b
IV	Caminhamento estiletar + fase de transição (E_1/E_2) ^(b)	11	4	11/15	8	73,3 bc
V	Caminhamento estiletar + um episódio de (E_1+E_2)	19	6	19/25	8	76,0 bc
VI	Caminhamento estiletar + mais de um episódio de (E_1+E_2)	11	0	11/11	12	100,0 c

(*)Diferenças significativas foram testados por teste de Qui-quadrado e Teste de Fisher, quando os valores esperados foram menores que 5 (Statview II, Abacus concepts, 1987). ^(a) Insetos que foram incapazes de infectar plantas testes e receptoras (A e B) foram considerados não-virulíferos e descartados da análise. Para completo esclarecimento do procedimento utilizado ver Material e Métodos;

^(b) Moscas-brancas foram removidas da planta teste ao menos 15 segundos após o início do período de transição de E_1/E_2 ;

5.4. Discussão

Os resultados do presente estudo demonstram que a fase floemática, onda E₁ realizada por *B. tabaci* em células do floema é a principal atividade estiletar envolvida na inoculação de ToCV. Já nas fases não-floemáticas (caminhamento intercelular e *pds*) pode ocorrer inoculação, porém com menor importância.

Resultados similares aos obtidos no presente trabalho foram observados por Johnson et al. (2002), os quais encontraram um alto percentual de plantas infectadas com o crinivírus LCV quando adultos de *B. tabaci* MEAM 1 se alimentaram de elementos de floema (taxa de inoculação de 44-50%). Os autores também observaram baixa taxa de transmissão de LCV antes de moscas-brancas exibirem quaisquer fases floemáticas (taxa de inoculação de 7-9%). Os autores sugerem que as moscas-brancas realizam penetrações intracelulares (*pds*) em células do floema. No estudo com ToCV considerou-se *pds* com duração entre 3 – 10 segundos, no entanto Johnson et al. (2002) consideraram *pds* com duração de até 44 segundos. Deste modo, penetrações intracelulares tão longas poderiam ser ondas E₁ curtas e não *pds* propriamente ditas, fato que poderia justificar a elevada taxa de inoculação encontrada por estes autores antes das fases floemáticas (7 – 9%).

O principal resultado obtido foi que, crinivírus são preferencialmente transmitidos durante a fase de salivação no floema (E₁), no entanto a transmissão pode ocorrer em uma taxa baixa quando as moscas-brancas realizam caminhamento estiletar, antes de atingirem os vasos de floema e iniciarem salivação (Tabela 12).

De modo geral, vírus transmitidos de modo semipersistente, como os dos gêneros *Waikavirus*, *Crinivirus* e *Closterovirus* são adquiridos e inoculados no floema (Esau et al., 1967; Johnson et al., 2002; Ng & Zhou, 2015). Entretanto, há alguns casos especiais, como *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) (gênero *Caulimovirus*), que pode ser adquirido e inoculado em vários tecidos vegetais. Diferentemente de ToCV, o qual é retido no estomodeu das moscas-brancas vetores, as partículas de CaMV são retidas numa região denominada *acrostyle*, no canal comum na porção terminal dos estiletos maxilares (Uzest et al., 2010). Em outro estudo envolvendo CaMV e as mesmas espécies de afídeos, Moreno et al. (2005) concluíram que a salivação dos afídeos durante sucessivas penetrações intracelulares nas células da epiderme e mesófilo, antes de atingirem a fase floemática, é crítico para a inoculação de CaMV; os autores observaram um aumento na transmissão quando os afídeos realizaram 5-10 *pds* quando comparado a uma única *pd*. Os afídeos *Brevicoryne brassicae* (L.) e *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) podem adquirir o *helper component* (HC) P2 de CaMV durante

penetrações intracelulares na epiderme, mesófilo e células acompanhantes e são capazes de transmitir em baixa proporção antes de realizarem atividades floemáticas (Palacios et al., 2002; Drucker et al., 2002).

A principal diferença entre as penetrações intracelulares de afídeos e moscas-brancas, é que as de mosca-branca ocorrem numa frequência muito menor que as de afídeos, e raramente ocorrem no início de uma prova, e não ocorrem em breves provas (Johnson & Walker, 1999; Jiang et al., 1999; Ng & Walker, 2016). Segundo Jassen et al. (1989), breves penetrações intracelulares são muito raras para a mosca-branca *T. vaporariorum*, uma vez que os autores registraram no máximo 3 *pds* antes do início das atividades floemáticas (ondas E), já Jiang et al. (1999) observaram aproximadamente 1,5 *pds* por hora realizada por *B. tabaci* em tomateiro.

Civolani et al. (2014) observaram em média 8,5 *pds* em tomateiro (cv. Pearson) não-tratado durante 8 h de registro por indivíduos não-virulíferos da espécie MED. Já Moreno-Delafuente et al. (2013) registraram um número médio de 5,24 *pds* em 8 h de registro realizados por indivíduos TYLCV-virulíferos e 2,5 *pds* por indivíduos não-virulíferos da espécie MED em plantas de berinjela, a qual não é hospedeira de TYLCV. Em contraste, sucessivas penetrações intracelulares são registradas em alta frequência (aprox. 0,5 *pd/min*) por afídeos até atingirem o floema (Montllor & Tjallingii, 1989). Sendo que os afídeos podem realizar mais de 30 *pds* em uma única penetração estiletar antes de atingir os elementos floemáticos (Tjallingii, 1985).

As moscas-brancas, assim como os afídeos comumente realizam penetrações intracelulares (onda *pd*) antes da fase floemática, porém em uma frequência muito menor. No entanto, essas *pds* em células do floema ou em outros tipos de células são indistinguíveis usando apenas a técnica de EPG (Tjallingii & Hogen Esch, 1993), uma vez que no monitor apenas se evidencia uma caída de potencial quando o inseto insere o estilete em uma determinada célula.

No presente estudo envolvendo a inoculação de ToCV por *B. tabaci*, 84% dos indivíduos ToCV-virulíferos incluídos no Grupo II realizaram de 1 a 4 *pds*, no entanto o único caso onde ToCV foi transmitido para plantas de tomate foi quando *B. tabaci* realizou 6 *pds*. Penetrações intracelulares são associadas principalmente à transmissão de vírus não-persistentes por afídeos (Powell, 1991; Powel et al., 1992; Carmo-Sousa et al., 2014), mas o papel das penetrações intracelulares na transmissão de vírus por mosca-branca ainda é desconhecido.

A transmissão do begomovírus TYLCV, um vírus circulativo limitado aos vasos do floema, ocorreu quando *B. tabaci* atingiu os vasos do floema, mas as moscas-brancas foram capazes de transmitir o vírus durante a fase de penetração estiletar (Jiang et al., 2000). Os autores encontraram uma baixa taxa de transmissão antes de os insetos atingirem a fase de

salivação no floema (2,4%), dados consistentes com a baixa transmissão encontrada para ToCV no presente trabalho. Similarmente, os autores observaram que a eficiência de transmissão de TYLCV foi de apenas 23,4% quando os insetos realizaram apenas caminhar estilete seguido por apenas um episódio de $E_1 + E_2$, mas que houve um aumento para 37,5% quando os insetos realizaram mais de um episódio de $E_1 + E_2$.

Resultados similares também foram relatados por Sandanayaka et al. (2014) os quais observaram que a inoculação da bactéria fitopatogênica “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” pelo psílideo *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Trioziidae) também está associada as fases floemáticas, e está principalmente associada à salivação nos elementos crivados (E_1). Wu et al. (2016) também observaram que a inoculação da bactéria fitopatogênica “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, agente causal do Huanglongbing (HLB) em citros transmitida pelo psílideo-asiático-dos-citros *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), também está associada principalmente à salivação no floema. No entanto os autores também observaram uma planta infectada quando o psílideo realizou apenas onda C e G.

Wayadande & Nault (1993) observaram que *Graminella nigrifrons* (Forbes) (Hemiptera: Cicadellidae) deve provar em células do floema para transmitir o vírus semipersistente *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV) (*Secoviridae: Waikavirus*), mas que nem todas as cigarrinhas que se alimentaram no floema foram capazes de transmitir o vírus.

Em conclusão, o presente trabalho mostrou que moscas-brancas *B. tabaci* MED transmitem ToCV para plantas de tomate quando realizam onda E_1 nos elementos do floema, mas atividades específicas e a posição dos estiletes drante os eventos de inoculação ainda são desconhecidos. Em prévio estudo, Johnson et al. (2002) associou a inoculação do crinivírus LCV com a fase floemática, mas não associou a inoculação com a forma de onda EPG E_1 . Os autores compararam a transmissão de LCV classificando em apenas dois tratamentos: um com fase floemática e outro apenas com fase não-floemática. Em contrapartida, no presente trabalho foi capaz de comparar insetos que realizaram forma de onda E_1 (Grupo III) com aqueles removidos durante a fase de transição E_1/E_2 (Grupo IV) e aqueles que realizaram um ou mais episódios de contatos com os vasos do floema ($E_1 + E_2$). (Grupos V e VI), demonstrando que a inoculação ocorre principalmente durante a forma de onda E_1 , a qual é correlacionada com a salivação nos elementos de floema.

O presente estudo não suporta a hipótese de ingestão-egestão como sugerido por Chen et al. (2011), no entanto sinais de EPG específicos associados à ingestão ainda são desconhecidos. No entanto, não se pode dizer ou excluir que o processo de ingestão (ou extravasão) de líquidos presentes no estomodeu ocorra adicionalmente a salivação durante

E₁ ou durante E₁/E₂ durante as atividades estiletares realizadas por moscas-brancas. Isto poderia explicar como os viriões retidos no estomodeu são liberados nas células do floema.

No entanto, todos histológicos correlacionando ondas específicas de EPG e posição dos estiletos nos tecidos vegetais devem ser conduzidos para determinar qual (is) células são penetradas pelos estiletos de moscas-brancas, eventualmente resultando na inoculação e infecção de plantas de tomate com ToCV. Estudos histológicos correlacionando ondas específicas de EPG e a posição dos estiletos de afídeos já foram conduzidos utilizando-se microscopia eletrônica conjuntamente com amputação dos estiletos (Tjallingii & Hogen Esch, 1993; Hogen Esch & Tjallingii, 1992; Jassen et al., 1989). Estudos similares usando histologia conjuntamente com microscopia serão necessários para determinar se a transmissão do crinivírus pode também ocorrer durante breves penetrações intracelulares no mesófilo e células acompanhantes.

5.5. Conclusões

-A inoculação do crinivírus ToCV por *B. tabaci* MED está associada principalmente à onda E₁ nos vasos do floema.

- A inoculação de ToCV pode ocorrer em baixa proporção antes de os insetos iniciarem a fase floemática.

Referencias

Abacus Concepts, (1987). Statview II. Abacus Concepts, Inc. Berkeley, CA

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**, v. 94, p. 374, 2010.

CARMO-SOUSA, M.; MORENO, A.; GARZO, E., FERERES, A. A non-persistently transmitted-virus induces a pull–push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. **Virus Research**, Amsterdam, p.1-9, 2014.

CHEN, A. Y. S., WALKER, G. P., CARTER, D., NG, J. C. K. A virus capsid component mediates virion retention and transmission by its insect vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 16777-16782, 2011.

CIVOLANI, S.; CASSANELLI, S.; CHICCA, M.; RISON, J. L.; BASSI, A.; ALVAREZ, J. M.; ANNAN, I. B.; PARRELLA, G.; GIORGINI, M.; FANO, E. A. An EPG study of the probing behavior of adult *Bemisia tabaci* Biotype Q (Hemiptera: Aleyrodidae) following exposure to cyantraniliprole. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, p. 910-919, 2014.

DRUCKER, M.; FROISSART, R.; HÉBRARD, E.; UZEST, M.; RAVALLEC, M.; ESPÉRANDIEU, P.; MANI, J. C.; PUGNIÈRE, M.; ROQUET, F.; FERERES, A.; BLANC, S. Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of *Cauliflower mosaic virus* acquisition by its aphid vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 2422-2427, 2002.

ESAU, K.; CRONSHAW, J.; HOEFERT, L. L. Organization of beet yellows virus inclusions in leaf cells of beta. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 55, p. 486–493, 1967.

FANG, Y.; JIAO, X.; XIE, W.; WANG, S.; WU, Q.; SHI, X.; CHEN, G.; SU, Q.; YANG, H.; PAN, H.; ZHANG, Y. *Tomato yellow leaf curl virus* alters the host preferences of its vector *Bemisia tabaci*. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1-5, 2013. DOI: 10.1038/srep02876.

FIALLO-OLIVÉ, E., ESPINO, A.; 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**, v. 98, p. 1162, 2014.

FORTES, I. M.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. *Tomato chlorosis virus* in pepper: prevalence in commercial crops in south-eastern Spain and symptomatology under experimental conditions. **Plant Pathology**, v. 61, p. 994-1001, 2012.

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

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**, v. 96, p. 593-593, 2012.

- FROLICH, D. R.; TORRES-JEREZ, I.; BEDFORD, I. D.; MARKHAM, P. G.; BROWN, J. K. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based in mitochondrial DNA markers. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1593–1602, 1999.
- HOGEN ESCH, TH; TJALLINGII, W. F. Ultrastructure and electrical recording of sieve element punctures by aphid stylets. **Proceedings of the 8th International Symposium on Insect-Plant Relationships**, v. 49, p 283-285, 1992.
- JANSSEN, J. A. M.; TJALLINGII, W. F.; van LENTEREN, J. C. Electronic recording and ultrastructure of the stylet penetration by the greenhouse whitefly. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 52, p. 69–81, 1989.
- 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**, v. 92, p. 357-366, 1999.
- 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 Entomological Society of America**, v. 93, p. 573-579, 2000.
- JOHNSON, D. D.; WALKER, G. P. Intracellular punctures by the adult whitefly *Bemisia argentifolii* on DC and AC electronic feeding monitors. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 92, p. 257-270, 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**, v. 102, p. 115-123, 2002.
- 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**, v. 88, p. 224, 2004.
- McKENZIE, C.L. Effect of *Tomato mottle virus* (ToMoV) on *Bemisia tabaci* biotype B (Homoptera: Aleyrodidae) oviposition and adult survivorship on healthy tomato. **Florida Entomologist**, v. 85, p. 367–368, 2002.
- MONTLLOR, C. B.; TJALLINGII, W. F. Stylet penetration by two aphid species on susceptible and resistant lettuce. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 52, p. 103-111, 1989.
- MORENO, A.; PALACIOS, I.; BLANC, S.; FERERES, A. Intracellular salivation is the mechanism involved in the inoculation of cauliflower mosaic virus by its major vectors *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae*. **Annals of the Entomological Society of America**, 98, v. 763-769, 2005.
- MORENO-DELAFUENTE, A.; GARZO, E.; MORENO, A.; FERERES, A. A plant virus manipulates the behaviour of its whitefly vector to enhance its transmission efficiency and spread. **PLos One**, v. 8, p. 1-10, 2013.

- 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**, v. 84, p. 835–837, 2000.
- NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ E.; SÁNCHEZ-CAMPOS S. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 219-248, 2011.
- NG, J. C. K.; ZHOU, J. S. Insect vector–plant virus interactions associated with non-circulative, semi-persistent transmission: current perspectives and future challenges. **Current Opinion in Virology**, v. 15, p. 48-55, 2015.
- PALACIOS, I.; DRUCKER, M.; BLANC, S.; LEITE, S.; MORENO, A.; FERERES, A. *Cauliflower mosaic virus* is preferentially acquired from the phloem by its aphid vector. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 3163-3171, 2002.
- POWELL, G. Cell membrane punctures during epidermal penetrations by aphids: consequences for the transmission of two potyviruses. **Annals of Applied Biology** v. 119, p. 313–321, 1991.
- POWELL, G., R. HARRINGTON & N. J. SPILLER. Stylet activities and potato virus Y vector efficiencies by the aphids *Brachycaudus helichrysi* and *Drepanosiphum platanoidis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** v. 62, p.293–300, 1992
- PUSAG, J.C.A.; JAHAN, S.M.H.; LEE, K.S.; LEE, S.; LEE, K.Y. Upregulation of temperature susceptibility in *Bemisia tabaci* upon acquisition of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 58, p. 1343-1348, 2012.
- RUBINSTEIN, G.; CZOSNEK, H. Long-term association of *Tomato yellow leaf curl virus* with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 2683–2689, 1997.
- SANDANAYAKA, W. R. M.; MORENO, A.; TOOMAN, L. K.; PAGE-WEIR, N. E. M.; FERERES, A. Stylet penetration activities linked to the acquisition and inoculation of *Candidatus Liberibacter solanacearum* by its vector tomato potato psyllid. **Entomologia et Applicata**, v. 151, p. 170-181, 2014.
- SHI, X.; PAN, H.; XIE, W.; WU, Q.; WANG, S.; LIU, Y.; FANG, Y.; CHEN, G.; GAO, X.; ZHANG, Y. Plant virus differentially alters the plant's defense response to its closely related vectors. **PLoS One**, v. 8, p. 1-8, 2013.
- TJALLINGII, W. F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 24, p. 721-730, 1978.
- TJALLINGII, W. F. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 38, p. 187–193, 1985.
- TJALLINGII, W. F. (1988). Electrical recording of stylet penetration activities. In: A. K. Minks & P. Harrewign (eds), **Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control**, vol. B. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 95–108.

- TJALLINGII, W. F.; HOGEN ESCH, TH. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. **Physiological Entomology** v.18, p.317–328, 1993.
- UZEST, M.; GARGANI, D.; DOMBROVSKY, A.; CAZEVIEILLE, C.; COT, D.; BLANC, S. The "acrostyle": A newly described anatomical structure in aphid stylets. **Arthropod Structure & Development**, v. 39, p. 221-229, 2010.
- WAYADANDE, A. C.; NAULT, L. R. Leafhopper probing behavior associated with maize chlorotic dwarf virus transmission. **Phytopathology**, v. 83, p. 522-526, 1993.
- WINTERMANTEL, W. M.; WISLER, G. C. Vector Specificity, Host Range, and Genetic Diversity of *Tomato chlorosis virus*. **Plant Disease**, v. 90, p.814-819, 2006.
- 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**, v. 88, p.402-409, 1998.
- WU, T.; LUO, X.; XU, C.; WU, F.; QURESHI, J. A.; CEN, Y. Feeding behavior of *Diaphorina citri* and its transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ to citrus. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.161, p. 104-111, 2016.

EPÍLOGO

As pesquisas apresentadas nesta tese melhoram nossa compreensão a respeito dos efeitos ocasionados por dois vírus transmitidos de modo distinto, o crinivírus *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (transmissão semipersistente) e o begomovírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (persistente), sobre a seleção hospedeira, comportamento alimentar e desempenho biológico do inseto vetor, a mosca-branca *Bemisia tabaci* MEAM 1 (Middle East Asia Minor 1).

Os dados obtidos nos experimentos de livre-escolha (*Capítulo 2*) indicam que moscas-brancas não-virulíferas preferem pousar e realizar postura em plantas de tomate não infectadas em relação a plantas infectadas com ToCV (ToCV-infectadas). No entanto, moscas-brancas carregando o vírus (ToCV-virulíferas) não demonstram preferência, pousando e realizando postura indistintamente em ambas as plantas. Tal comportamento não favorece a disseminação do patógeno no campo. Assim, embora ToCV altere o comportamento de escolha de seu vetor, não o faz de modo a favorecer a aquisição e inoculação deste vírus.

Em contraste, o vírus de transmissão persistente ToSRV induziu uma mudança comportamental que favorece a sua disseminação para novos hospedeiros, uma vez que moscas-brancas não-virulíferas inicialmente mostraram-se neutras quanto à escolha entre plantas infectadas ou não infectadas com o vírus, passando a preferir plantas não infectadas somente após um período de 24 h de exposição a ambos os tratamentos. Já os insetos ToSRV-virulíferos apresentaram clara preferência por plantas de tomate não infectadas desde as primeiras horas de avaliação no experimento de livre-escolha. Diferentemente dos ensaios de escolha, nos quais indivíduos virulíferos e não-virulíferos se comportaram de maneira distinta, os dados obtidos nos ensaios de comportamento arrestante sugeriram maior permanência nas plantas de tomate não infectadas frente a infectadas.

Quando foram avaliados os efeitos diretos de ToCV sobre o desempenho biológico de *B. tabaci* (*Capítulo 3*), verificou-se que este crinivírus afeta apenas a duração do 1º ínstar ninfal, o que se explica pelo fato de o vírus ser retido no vetor por poucos dias, e ser perdido após a ecdise. No entanto, o efeito indireto, por meio da infecção viral na planta, foi pronunciado: houve maior duração do período ninfal e maior mortalidade de ninfas nas plantas ToCV-infectadas.

Nos experimentos relatados no *Capítulo 4* verificaram-se os efeitos dos dois vírus sobre o comportamento alimentar de *B. tabaci* MEAM 1, utilizando-se a técnica de *Electrical Penetration Graph* (EPG).

Observou-se que em plantas ToCV-infectadas o número de eventos de prova, não-prova (np) e formas de onda C foi menor que em plantas não infectadas, porém a duração média por evento dessas formas de onda foi maior. Revelou-se, também, um atraso de moscas-brancas não-virulíferas para iniciarem a alimentação em plantas ToCV-infectadas, pois os indivíduos levaram o dobro de tempo para realizar a primeira prova nestas plantas. Em contrapartida os efeitos no comportamento alimentar em plantas ToSRV-infectadas foram mais sutis, ocorrendo apenas um aumento na duração média de eventos de prova, não-prova (np), e formas de onda C e G. Não se observou nenhum efeito de ambos os vírus sobre atividades estiletares em tecidos floemáticos, onde hipoteticamente ocorre a aquisição e inoculação desses vírus.

O experimento de inoculação de ToCV por *B. tabaci* MED (*Capítulo 5*) foi desenvolvido no ICA-CSIC em Madri, Espanha, durante o doutorado-sanduíche da aluna, fornecendo informações importantes a respeito das atividades estiletares envolvidas na inoculação de ToCV, por *B. tabaci* que é um vírus emergente em diversos países. Os dados demonstraram que a inoculação deste crinivírus está associada principalmente à salivação nos vasos do floema, mas que pode ocorrer em baixas proporções antes dos estiletes atingirem os vasos condutores.

Com base nos resultados obtidos na presente tese, pode-se inferir que as alterações comportamentais em *B. tabaci* MEAM 1 ocasionadas por ToCV não beneficiam a disseminação desse vírus, possivelmente pela sua transmissão ser do tipo semipersistente, caracterizada por uma relação-vírus vetor mais superficial (vírus não circulativo no vetor). Além disso, verificou-se um efeito indireto negativo desse vírus sobre o desenvolvimento do inseto vetor, gerando maior mortalidade ninfal em indivíduos que se desenvolveram em plantas infectadas. Assim, os resultados mostram que plantas ToCV-infectadas não são boas hospedeiras para *B. tabaci*, não favorecendo seu vetor e nem a disseminação do vírus para novos hospedeiros.

Em contrapartida, o begomovírus ToSRV influenciou diretamente seu vetor em seu próprio benefício, uma vez que moscas-brancas virulíferas demonstraram preferência por plantas não infectadas. Porém, com base nos resultados obtidos por Maluta (2012), assim com ToCV, este begomovírus também acarreta uma elevada mortalidade das ninfas quando estas se desenvolveram em plantas ToSRV-infectadas.

Assim, a presente tese contribui com novas informações a respeito do patossistema *B. tabaci* – vírus – planta hospedeira, abordando os efeitos de vírus sobre vários aspectos

biológicos e comportamentais do inseto vetor durante o processo de seleção hospedeira e colonização de plantas hospedeiras, utilizando para isso espécies virais que estão em crescente expansão nos cultivos de solanáceas no Brasil. Para ToCV, também foram reveladas as atividades estiletares de *B. tabaci* envolvidas na inoculação em plantas de tomate.