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

**Efeitos de *Tomato chlorosis virus* (ToCV) na seleção de plantas hospedeiras
por *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)**

Karen Missy Aki Komada

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2019**

Karen Missy Aki Komada
Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas

**Efeitos de *Tomato chlorosis virus* (ToCV) na seleção de plantas hospedeiras por
Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)**

versão revisada de acordo com a resolução do CoPGr 6018 de 2011

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2019

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

Komada, Karen Missy Aki

Efeitos de *Tomato chlorosis virus* (ToCV) na seleção de plantas hospedeiras por *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) / Karen Missy Aki Komada. - - versão revisada de acordo com a resolução do CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

64 p.

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

1. Crinivirus 2. Mosca-branca 3. Transmissão 3. Fontes de inóculo I.
Título

Ao meu orientador,
Prof. João Roberto Spotti Lopes,

OFEREÇO

Aos meus pais,
Nelson Mithio Komada e
Eliane Terumi Yoshida Komada

Com amor,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Eliane Komada e Nelson Komada, por serem inspiradores, por todo o incentivo, por sempre terem dado de tudo pela minha formação pessoal e profissional mesmo entre tantas complicações, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo amor. Aos meus irmãos Amanda Komada e Alexandre Komada porque caminhar com vocês, mesmo que de longe, sempre me impulsiona ao melhor.

Ao prof.º Dr.º João Roberto Spotti Lopes, pela orientação, paciência, apoio, por resgatar sempre o brilho nos olhos dos seus orientados e por ser um dos maiores exemplos de pessoa e profissional que eu poderia ter conhecido.

Ao prof.º Dr.º Jorge Alberto Marques Rezende e à toda a equipe do Laboratório de Virologia Vegetal, pela solicitude durante todo o processo, pelos ensinamentos e espaço cedido em diversas atividades e pela gentileza de ter fornecido o isolado viral.

Aos amigos, Fernando Sujimoto, Amanda Campos, Mayerli Tatiana, Fernanda Polastre, Petra Ferronato, Dayana Sousa, Marcela Barbosa, Maria Cristina Canale, Luis Bonanim, John, Talita Zocca, Cintia Crespam, Felipe Franco, Vanessa Takeshita, Tatiana Mituti, Daiana Bampi, Viviana Camelo, Heron Kraide, David Spadotti, Mara Cardoso, Maria Nogueira, Ricardo Sesso, Mariana Bossi, Thalita Albuquerque, Camila Haddad, Carla Detoni, Anderson Ramos, agradeço todo o apoio profissional, psicológico e emocional.

Tiago Sales, Allan Douglas, Taciana Melissa, Gabriel Favara e Arnaldo Esquivel, não poderia ter mentores melhores. Obrigada por toda atenção, franqueza, pelo carinho, empenho e por toda energia que dedicam a mim.

Aos estagiários Leandro Salto e Caroline Freire, que foram fundamentais em diversas atividades para a conclusão do trabalho.

À equipe do Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, especialmente à Nathalie Maluta por todos os cuidados com a criação de insetos.

Ao sensei Roney Rodrigues e ao Aikidô. “Mente e corpo devem ser um só, unificados com a atividade do Universo.”- Kisshomaru Ueshiba

Aos funcionários e professores do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP pela excelência e dedicação em todos os aspectos que visam a melhor formação aos alunos do programa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Science is organized knowledge.
Hebert Spencer

Wisdom is organized life.
Will Durant

Se está difícil, é porque você ainda não sabe.
Eliane Komada

If I have seen further, it is by standing upon the shoulders of giants.
Isaac Newton

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. <i>Bemisia tabaci</i>	12
2.2. Danos e importância econômica de <i>Bemisia tabaci</i>	13
2.3. <i>Tomato chlorosis virus</i> (ToCV)	14
2.4. Plantas hospedeiras de ToCV	16
2.5. Interação vírus-vetor-planta hospedeira.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Material vegetal.....	20
3.2. Criação de <i>Bemisia tabaci</i>	20
3.3. Isolado e manutenção de <i>Tomato chlorosis virus</i> (ToCV).....	21
3.4. Transmissão de ToCV para as plantas.....	21
3.5. Detecção de ToCV	22
3.5.1. Extração de RNA.....	22
3.5.2. Detecção de ToCV por RT-PCR	22
3.5.3. Detecção do ToCV por RT-qPCR.....	23
3.6. Preferência para pouso e oviposição de <i>B. tabaci</i> em diferentes partes de plantas de tomate	24
3.7. Eficiência de transmissão de ToCV a partir da aquisição em folhas sintomáticas ou não, de diferentes partes de tomateiro infectado	25
3.8. Efeito dos sintomas na seleção de plantas infectadas por <i>B. tabaci</i>	26
3.9. Efeito de ToCV na seleção de diferentes espécies vegetais para pouso e oviposição por <i>B. tabaci</i>	28
3.10. Eficiência de transmissão de ToCV para plantas de tomate utilizando-se diferentes espécies vegetais como fontes de inóculo.....	29
3.11. Análises estatísticas	30
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Preferência para pouso e oviposição de <i>B. tabaci</i> em diferentes locais de plantas de tomate	32
4.2. Eficiência de transmissão a partir de diferentes partes de tomateiro infectado.....	36
4.1. Efeito dos sintomas na seleção de plantas de tomate infectadas.....	37
4.2. Efeito de ToCV na seleção de diferentes espécies vegetais para pouso e oviposição por <i>B.</i> <i>tabaci</i>	39
4.3. Eficiência de transmissão de ToCV para tomateiro utilizando-se diferentes espécies vegetais como fontes de inóculo.....	45
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS.....	55

RESUMO

Efeitos de *Tomato chlorosis virus* (ToCV) na seleção de plantas hospedeiras por *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)

Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) constitui um complexo de espécies de mosca-brancas que são pragas em várias culturas de importância econômica, especialmente pelo alto potencial biótico e capacidade de transmitir vírus de plantas, como *Tomato chlorosis virus* (ToCV). A transmissão de vírus por insetos vetores é um processo biológico complexo, pois depende de múltiplas interações envolvendo o patógeno, vetor e plantas hospedeiras. Vírus de plantas podem afetar direta ou indiretamente o comportamento do inseto vetor a fim de favorecer sua disseminação. Postula-se que o efeito da infecção viral na seleção de plantas hospedeiras por moscas-branca pode variar com a expressão de sintomas e com a espécie vegetal, podendo favorecer a aceitação de algumas espécies de plantas para alimentação e colonização, aumentando a sua importância na epidemiologia. Neste trabalho foram investigados os efeitos de ToCV na preferência da espécie Middle East Asia Minor 1 (MEAM1; anteriormente conhecida como biótipo B) de *B. tabaci* por diferentes espécies vegetais. Utilizaram-se adultos da mosca-branca que previamente adquiriram ToCV em folhas de tomate infectadas (virulíferos) e adultos não expostos ao vírus (avirulíferos). Os experimentos consistiram em analisar a preferência para pouso e oviposição dos insetos virulíferos e avirulíferos em diferentes partes de plantas saudáveis e infectadas de tomate (ápice, terço médio e baixeiro); entre tomateiros infectados com ou sem sintomas da virose; e entre espécies vegetais, infectadas ou não, sendo duas de vegetação espontânea, *Physalis angulata* L. (joá-de-capote) e *Solanum americanum* L. (maria-pretinha) e uma cultivada, *Solanum lycopersicum* L., o tomateiro. Além disso, avaliou-se a eficiência de transmissão de ToCV para plantas de tomate utilizando-se tais espécies vegetais como fontes de inóculo. Observou-se que os insetos preferem predominantemente a parte apical das plantas tanto para pouso quanto para oviposição. A concentração de ToCV é maior no terço médio de plantas de tomate, seguido pelos terços apical e basal, embora a eficiência de transmissão por *B. tabaci* MEAM1 seja semelhante quando o inseto adquire o vírus em folhas de diferentes partes da planta. Adultos avirulíferos preferem pousar e colocar mais ovos em folhas de tomateiro assintomáticas (em fase latente da infecção por ToCV) do que em folhas sintomáticas, evidenciando a importância de infecções latentes na disseminação do vírus, enquanto que adultos virulíferos não discriminam entre folhas com ou sem sintomas. Insetos virulíferos preferem, em ordem decrescente, pousar em *S. americanum* (maria-pretinha), tomateiro e *P. angulata*, independentemente de estarem ou não infectadas por ToCV. Já insetos avirulíferos preferem tomateiro em relação à maria-pretinha no caso de plantas saudáveis, mas não exibem diferenças em preferência entre as duas espécies quando infectadas pelo vírus. A eficiência de transmissão de ToCV para tomateiro foi semelhante após a aquisição em maria-pretinha, tomateiro e *P. angulata*; ou seja, as três espécies podem servir como fontes de inóculo para a disseminação do vírus, com destaque para maria-pretinha, por ser uma planta preferida para pouso e oviposição por *B. tabaci* MEAM1.

Palavras-chave: Crinivirus; Mosca-branca; Transmissão; Fontes de inóculo

ABSTRACT

Effects of *Tomato chlorosis virus* (ToCV) on host plant selection by *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)

Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) is a complex of whitefly species that are pests in several crops of economic importance, especially for its high biotic potential and ability to transmit plant viruses, such as *Tomato chlorosis virus* (ToCV). Virus transmission by insect vectors is a complex biological process because it depends on multiple interactions between the pathogen, vector and host plants. Plant viruses can directly or indirectly affect the behavior of the insect vector in order to optimize its spread. It is postulated that the effect of the viral infection on host plant selection by whiteflies may vary with plant species and age of infection, which may favor the acceptance of particular host plants for feeding and colonization, increasing their importance in epidemiology. This work was aimed at investigating the effects of ToCV on the preference of *B. tabaci* Middle East Asia Minor 1 (MEAM1; formerly known as B biotype) for different host plants. Whitefly adults that previously acquired ToCV from infected tomato leaves (viruliferous) and adults not exposed to the virus (non-viruliferous) were used in the choice assays. The experiments consisted of analyzing the preference for settling and oviposition of *B. tabaci* MEAM1 on different parts of healthy and infected tomato plants (apical, middle and lower portions); among infected tomato plants with or without virus symptoms (time of viral infection); and among different host plants, including two weeds *Physalis angulata* L. (joá-de-capote) and *Solanum americanum* L. (maria-pretinha) and one crop plant, *Solanum lycopersicum* L. (tomato). In addition, we investigated whether there is a difference in the efficiency of transmission of ToCV to tomato plants using such plant species as sources. It was found that the whiteflies prefer the apical part of tomato plants for both landing and oviposition. ToCV concentration is higher in the middle third of tomato plants, followed by the apical and basal thirds, but transmission efficiency by *B. tabaci* MEAM1 is similar when the insect acquires the virus from leaves of different parts of the plant. Non-viruliferous adults prefer to settle and lay eggs on asymptomatic (in latent phase of ToCV infection) than on symptomatic leaves, indicating the importance of latent infections on virus spread, whereas viruliferous adults do not discriminate between leaves showing symptoms or not. Viruliferous insects prefer to settle (in decreasing order) on *S. americanum*, tomato and *P. angulata*, regardless of the plant infection or not by ToCV, whereas non-viruliferous insects prefer tomato to *S. americanum* in the case of healthy plants, but do not discriminate between the two plant species when they are infected. Transmission efficiency of ToCV to tomato plants was similar after acquisition on *S. americanum*, tomato and *P. angulata*, showing that the three species may serve as inoculum sources for virus spread; *S. americanum* appears to be particularly important, since it is a preferred host for settling and oviposition by *B. tabaci* MEAM1.

Keywords: Crinivirus; Whitefly; Transmission; Sources of inoculum

1. INTRODUÇÃO

A mosca-branca, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) é um inseto sugador, que se alimenta no floema de várias culturas de importância econômica e que causa grandes prejuízos mundialmente, sendo introduzida em novas áreas anualmente em função do tráfego de material vegetal (Henneberry & Castle, 2001). A primeira descrição da espécie ocorreu em 1889 como *Aleyrodes tabaci*, sendo descrita com diferentes nomes, em diferentes regiões do mundo ao longo de mais de 70 anos (Perring, 2001).

A espécie *B. tabaci* é um inseto conhecido por ser de difícil controle, com relatos de resistência a muitos inseticidas utilizados em seu controle (Lima et al., 2001). Um fator agravante no manejo deste inseto é a existência de populações que, embora não apresentem diferenças morfológicas, possuem características genéticas distintas, resultando em características adaptativas diferentes, como fecundidade, resistência a inseticidas, capacidade de transmissão de vírus, incompatibilidade reprodutiva, entre outras (Perring, 2001; Chu et al., 2010). Essas diferentes populações, referidas pelo termo ‘biótipo’, atualmente têm sido consideradas como um complexo de espécies distintas (de Barro et al., 2011). Dentre as espécies do complexo, foram relatadas no Brasil até o momento a presença de quatro, Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), Mediterranean (MED), New World (NW) e New World 2 (NW2) (Marubayashi et al., 2013; Barbosa et al., 2014). Esse fato dificulta o controle desses insetos quando se tornam pragas, visto que muitas vezes um método de controle eficiente para uma determinada espécie de *B. tabaci* pode não funcionar com a mesma eficiência contra outra (Perring, 2001).

Os principais hospedeiros de *B. tabaci* são espécies pertencentes às famílias Brassicaceae, Cucurbitaceae e Solanaceae, com destaque para o tomateiro [*Solanum lycopersicum* (L.)], espécie com grande número de fitovírus transmitidos por mosca branca (Butin et al., 1993). Este inseto provoca danos diretos às plantas, devido à sucção de seiva e injeção de substâncias tóxicas, e indiretos, devido à excreção do “honeydew” (que permite o desenvolvimento de fungos do gênero *Capnodium*) e a transmissão de fitopatógenos, sendo este último tipo de dano o maior problema associado à espécie. (Hull, 2004; Perring, 2001).

Atualmente os vírus de maior importância no cultivo do tomateiro no Brasil são transmitidos por mosca-branca e pertencem às famílias *Closteroviridae*, de transmissão semipersistente, e *Geminiviridae*, cujo gênero *Begomovirus* é transmitido exclusivamente por *B. tabaci*, em sua maioria de modo persistente circulativo (Hull, 2004). Dentre os crinivírus, pertencentes a família *Closteroviridae*, a única espécie relatada no Brasil até o momento é o

Tomato chlorosis virus (ToCV) (Barbosa, 2008). O ToCV é um dos principais vírus emergentes de plantas e regiões tropicais e subtropicais, infectando mais de 50 espécies de plantas hospedeiras, dentre estas algumas de importância econômica, como o tomate, berinjela, batata e pimentão (Navas-Castillo et al., 2011; Kil et al., 2015; Freitas, 2012; Barbosa, 2008). O fato de ToCV possuir uma grande diversidade de espécies de plantas hospedeiras, incluindo plantas de vegetação espontânea, dificulta o manejo da doença no campo, uma vez que estas podem servir como reservatórios de vírus na ausência dos hospedeiros principais (Tzanatekis et al., 2013; Esquivel, 2015).

Na natureza o ToCV é disseminado por moscas-brancas dos gêneros *Bemisia* e *Trialeurodes* de maneira semi-persistente (Wintermantel & Wisler, 2006). Estão presentes no Brasil diferentes espécies de moscas-brancas vetoras de ToCV, algumas destas espécies amplamente disseminadas pelo país e que apresentam uma alta eficiência de transmissão do vírus, como por exemplo, *B. tabaci* MEAM1, um dos fatos que possibilitou a rápida expansão do vírus no país (Freitas, 2012; Inoue-Nagata et al., 2016).

A transmissão de vírus por insetos é um processo biológico complexo, pois depende de interações existentes entre o patógeno, vetor e planta hospedeira (Mauck, 2012). Vírus de plantas podem afetar direta ou indiretamente o comportamento do inseto vetor a fim de favorecer sua disseminação. Infecções por vírus podem induzir mudanças em aspectos como morfologia, fisiologia, coloração e até mesmo alterações no perfil de voláteis emitidos pelas plantas, podendo torna-la mais atrativa ou não. Alguns estudos já exploraram as alterações ocasionadas em moscas-brancas, bem como em suas plantas hospedeiras devido à presença de vírus (Moreno-Delafuente et al., 2013; Maluta et al., 2014). Nestes estudos, as plantas hospedeiras analisadas são plantas cultivadas bastante afetadas por ToCV, como o tomateiro e a batata (Maluta et al., 2014; Maluta, 2016; Pereira, 2016).

Neste contexto, já foi constatado que o comportamento de escolha de *B. tabaci* MEAM1 é alterado pela infecção por ToCV em plantas de tomate ou pela presença do vírus no inseto. Insetos avirulíferos preferem plantas de tomate sadias, enquanto indivíduos virulíferos não discriminam entre plantas sadias e infectadas quanto a preferência para pouso e oviposição (Maluta, 2016). Em estudos de olfatometria, verificou-se que a infecção de tomateiro por este vírus ocasionou uma indução do aumento na emissão de alguns terpenos que parecem reduzir a atratividade da planta ao vetor (Feres et al., 2016). Por outro lado, Feres et al. (2016) observaram que a coloração amarelada de folhas com sintomas típicos da virose foi atrativa para pouso da moscas-branca, indicando que as pistas visuais de plantas infectadas sintomáticas exercem um importante papel na atratividade. Em outro estudo, Pereira (2016) observou uma

supressão na emissão de compostos terpenos em plantas de batata infectados por ToCV, as quais foram mais atrativas aos adultos de *B. tabaci* MEAM1 quando comparadas com as plantas sadias. Desta forma, é notável que a interação vírus-planta tem efeito marcante na seleção hospedeira, sendo que tais interações podem variar de uma espécie vegetal para outra, como observado entre plantas de tomate e de batata infectadas pelo mesmo vírus.

É importante considerar que além de plantas cultivadas como tomate e batata, ToCV possui uma ampla gama de plantas hospedeiras, incluindo várias plantas da vegetação espontânea, algumas delas assintomáticas, mas que podem servir como fontes de inóculo, promovendo a manutenção e disseminação do vírus no campo, apresentando assim, importância na epidemiologia da doença. Portanto, levanta-se a hipótese de que o efeito da infecção viral na seleção de plantas hospedeiras por moscas-branca pode variar com a espécie vegetal e com a expressão de sintomas, podendo favorecer a aceitação de algumas espécies de plantas para alimentação e oviposição, aumentando a sua importância como fonte de inóculo. Hospedeiros infectados assintomáticos podem ser mais atrativos que hospedeiros sintomáticos. Assim, plantas infectadas de tomate durante o período de incubação da virose, com sintomas ainda não evidentes, podem ser mais atrativas em relação a plantas com sintomas avançados, ou mesmo em relação a plantas sadias. Ou seja, o nível de infecção viral também poderia influenciar na seleção hospedeira pelo inseto vetor.

Nesta pesquisa foram investigados diferentes aspectos relacionados à escolha de plantas hospedeiras e se existem efeitos diretos (presença do vírus no inseto vetor) e indiretos (infecção da planta pelo vírus) de ToCV na preferência de *Bemisia tabaci* MEAM1 para pouso e oviposição em diferentes condições para plantas de tomate e também se outras espécies de vegetação espontânea (daninhas) que são hospedeiras desse vírus, possuem importância no processo de disseminação do vírus.

Portanto, os objetivos foram avaliar a preferência para pouso e oviposição de *B. tabaci* MEAM1 em diferentes partes de plantas de tomate (infectadas ou sadias), o efeito do tempo de infecção viral e dos sintomas na seleção da planta hospedeira pelo inseto, bem como avaliar a preferência para pouso e oviposição de insetos virulíferos e avirulíferos de *B. tabaci* MEAM1 em testes de escolha com diferentes espécies vegetais sadias e infectadas. Finalmente, investigou-se a eficiência de transmissão de ToCV para plantas de tomate utilizando-se diferentes espécies vegetais como fonte.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Bemisia tabaci*

A família Aleyrodidae abriga cerca de 1200 espécies, dentre as quais 37 pertencem ao gênero *Bemisia*. A mosca-branca, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) é um inseto sugador, cosmopolita e polífago, associado a grandes prejuízos em diversas culturas (Lima et al., 2001).

Bemisia tabaci foi descrito pela primeira vez como *Aleurodes tabaci* em 1889, infestando tabaco, na Grécia (Gennadius, 1889), sendo referida pelos próximos 40 anos com diferentes nomes até a classificação como *B. tabaci* em 1936 (Perring, 2001).

A classificação de muitas das diferentes espécies de moscas-brancas descritas ao longo dos anos se baseava em características morfológicas distintas das ninfas em diferentes hospedeiros. Contudo, muitas dessas espécies descritas eram na verdade sinônimas de *B. tabaci*, cujas ninfas podem apresentar alterações morfológicas em função do hospedeiro no qual se desenvolvem, levando a ideia errônea de se tratarem de espécies distintas (Mound, 1963 *Apud* Perring, 2001).

Ao longo dos anos, 40 populações distintas de *B. tabaci* já foram estudadas, das quais 24 foram designadas como biótipos (Perring, 2001). Essas diferentes populações, referidas pelo termo ‘biótipo’, por vezes têm sido consideradas como espécies distintas. Estudos recentes têm corroborado essa teoria, sendo mais aceito hoje que *B. tabaci* se trata, na verdade, de um complexo de espécies crípticas (de Barro et al., 2011; Dinsdale et al., 2010). A nova proposta de classificação de *B. tabaci* é baseada na análise molecular do gene mitocondrial *citocromo oxidase I* (mtCOI), e de acordo com ela, *B. tabaci* atualmente corresponde a um complexo de pelo menos 37 espécies crípticas (de Barro et al., 2011; Dinsdale et al., 2010; Firdaus et al., 2013; Alemandri et al., 2012; Chowda-Reddy et al., 2012; Esterhuizen, 2013; Hu et al., 2011; Parrella et al., 2012). A classificação de *B. tabaci* em espécies crípticas, baseada no sequenciamento do gene mtCOI vem sendo suportada por estudos que demonstram a existência de isolamento reprodutivo completo ou incompleto entre os indivíduos de diferentes espécies crípticas, o que acaba resultando em ausência de reprodução sexuada ou na redução do número de fêmeas na progênie e/ou fêmeas estéreis (Xu et al., 2010; Elbaz et al., 2010; Wang et al., 2010, 2011; Sun et al., 2011).

Um fator de grande importância no manejo de *B. tabaci* é a existência destas populações ou espécies que, embora não apresentem diferenças morfológicas, possuem um polimorfismo genético, resultando em características adaptativas diferentes, como fecundidade,

resistência a inseticidas, capacidade de transmissão de vírus, incompatibilidade reprodutiva, entre outras (Chu et al., 2010; Perring, 2001).

Essas diferenças genéticas ocasionam, por exemplo, a existência de populações de *B. tabaci* aparentemente monófagas, apesar da espécie ser normalmente referida como altamente polífaga (Brown, J.K., Frohlich, D.R., Rosell, 1995). Além disso, casos de maior susceptibilidade ou resistência a medidas de controle também são relatadas na literatura, como a maior resistência de *B. tabaci* Mediterranean (MED ou biótipo Q) a inseticidas neonicotinóides, em comparação a *B. tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (MEAM 1 ou biótipo B) (Dennehy et al., 2010). Essas diferenças podem levar a maior sucesso adaptativo de certas populações, levando a mudanças na composição das espécies de *B. tabaci* em certas regiões. (Brown, J.K., Frohlich, D.R., Rosell, 1995; Chu et al., 2010; Pan et al., 2011). Esse fato dificulta o controle destas pragas, visto que muitas vezes um método de controle eficiente para uma determinada população de *B. tabaci* pode não funcionar com a mesma eficiência contra outra (Perring, 2001).

2.2. Danos e importância econômica de *Bemisia tabaci*

B. tabaci é uma praga agrícola de importância mundial, presente em todos os continentes do mundo, com exceção da Antártida (Martim et al., 2000). Seus principais hospedeiros são espécies pertencentes às famílias Brassicaceae, Cucurbitaceae e Solanaceae, com destaque para o tomateiro [*Solanum lycopersicum* (L.)], espécie com grande número de fitovírus transmitidos por *B. tabaci* (Butin et al., 1993).

Moscas-brancas normalmente são encontradas na face abaxial das folhas e, em menor proporção, na face adaxial. Em razão de sua alimentação, *B. tabaci* pode provocar danos diretos, como redução no vigor das plantas, clorose foliar e indução de desordens fisiológicas, como o prateamento de folhas de cucurbitáceas (Jones, 2003; Eppo, 2004). Além disso, ocorrem danos indiretos da alimentação deste inseto, como a excreção açucarada (*honeydew*) das ninfas, que quando depositada sobre as folhas, serve como substrato para o desenvolvimento de fungos do gênero *Capnodium*, resultando em sintomas conhecidos por fumagina, que prejudicam a capacidade fotossintética das plantas. Outro dano indireto, o qual é o problema mais significativo é a da transmissão de fitovírus por *B. tabaci* (Hull, 2004; Perring, 2001), fato que faz com que *B. tabaci* seja reconhecida como uma das 100 piores espécies invasoras em todo o mundo (Lowe et al., 2000).

B. tabaci transmite vírus das famílias *Betaflexiviridae* (gênero: *Carlavirus*), *Secoviridae* (gênero: *Torradovirus*), *Potyviridae* (gênero: *Ipomovirus*), *Closteroviridae* (gênero: *Crinivirus*) e *Geminiviridae* (gênero: *Begomovirus*) (Navas-Castillo, 2011). Devido a sua capacidade de transmissão de vírus, aliado a outras características como alta taxa de reprodução, desenvolvimento de grandes populações em plantas, habilidade de dispersão tanto a curta como longa distância, extrema polifagia e pela capacidade de alterar os mecanismos de defesa de seus hospedeiros, *B. tabaci* é considerada uma “super-vetora” de vírus de plantas (Gilbertson et al., 2015). Das 114 espécies de fitovírus transmitidas por insetos da família Aleyrodidae, *B. tabaci* é capaz de transmitir pelo menos 111, sendo 90% do gênero *Begomovirus*, 6% *Crinivirus* e 4% distribuídos nos gêneros *Closterovirus*, *Ipomovirus* ou *Carlavirus* (Jones, 2003). Dentre estes, os begomovirus e crinivirus são considerados os mais importantes vírus de plantas emergentes em regiões tropicais e subtropicais do mundo, provocando grande impacto econômico em diversas culturas (Navas-Castillo et al., 2011).

Com relação ao gênero *Crinivirus*, existem dois vírus importantes economicamente, principalmente para a cultura do tomateiro, o *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) e o *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (Navas-Castillo, 2011). Até o momento, apenas o ToCV foi relatado no Brasil.

2.3. *Tomato chlorosis virus* (ToCV)

Tomato chlorosis virus (ToCV), pertence à família *Closteroviridae*, gênero *Crinivirus*, possui genoma bipartido, com duas moléculas de RNA fita simples senso positivo. O ToCV possui partículas alongadas e flexuosas, que medem de 650-800 a 700-900 nm (Wisler & Duffus, 2001). O ToCV já teve seu genoma completamente sequenciado, sendo que o isolado brasileiro (ToCV-Br) possui 8594 nucleotídeos no RNA 1 8242 nucleotídeos no RNA 2 (Albuquerque et al., 2013). O RNA 1 codifica proteínas associadas principalmente com a replicação viral, enquanto o RNA 2 codifica uma ampla gama de proteínas envolvidas na proteção do genoma, movimento, e outras funções ainda não identificadas (Karasev, 2000; Wisler & Duffus, 2001).

O ToCV é um vírus limitado ao floema e transmitido de forma semi-persistente por espécies de moscas-brancas pertencentes aos gêneros *Bemisia* e *Trialeurodes*, sendo esta uma das características que diferencia o ToCV das demais espécies do gênero *Crinivirus*, uma vez que os crinivirus são transmitidos por *Bemisia* ou *Trialeurodes*, mas não por ambos

(Wintermantel & Wisler, 2006). Dentro do gênero *Bemisia*, já foram relatadas como vetores do ToCV as espécies de *Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (biótipo B), Mediterranean (biótipo Q), New World 1 e New World 2 (biótipo A) e com relação ao gênero *Trialeurodes*, as espécies *Trialeurodes abutilonea* e *Trialeurodes vaporariorum* (Navas-Castillo et al., 2000; Wintermantel & Wisler, 2006; de Marchi 2014, Orfanidou et al., 2016). As espécies *B. tabaci* MEAM 1 e MED, assim como, *T. abutilonea* são os vetores mais eficientes de ToCV. O vírus persiste por 3 dias em *B. tabaci* MEAM 1, 5 dias em *T. abutilonea* e 6 dias em *B. tabaci* MED (Wintermantel & Wisler, 2006; Orfanidou et al., 2016). O ToCV pode ser adquirido e inoculado por *B. tabaci* MEAM 1 em tomateiro, após períodos de acesso à aquisição e inoculação de 5 minutos, contudo, a eficiência de transmissão aumenta conforme a alimentação no hospedeiro é prolongada (Freitas, 2012). Dentre as espécies de moscas-brancas capazes de transmitir o ToCV, apenas *Trialeurodes abutilonea* não ocorre no Brasil, desta forma, devido à grande diversidade de insetos vetores, e por alguns destes estarem muito bem adaptados às condições ambientais e aos sistemas de cultivo do Brasil, como por exemplo a espécie *B. tabaci* MEAM 1, o ToCV se disseminou rapidamente pelo país e se tornou uma das principais viroses em cultivos de solanáceas como o tomateiro e a batateira (Michereff Filho, 2016).

A primeira detecção de ToCV no Brasil, bem como na América do Sul, foi em 2006, no município de Sumaré, onde o vírus foi encontrado em três campos de produção de tomate, com a incidência variando entre 0,25% a 3,42% (Barbosa et al., 2008). Nos anos seguintes, o vírus foi detectado em tomateiros provenientes de diferentes estados, sendo eles: Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Barbosa et al., 2011) e mais recentemente no Rio Grande do Sul (de Marchi, 2014). Além do tomateiro, o ToCV passou a ser encontrado infectando naturalmente outras espécies de Solanáceas cultivadas no Brasil, como o pimentão (*Capsicum annuum*), batata (*Solanum tuberosum*), berinjela (*S. melongena*) e jiló (*S. aethiopicum*) (Barbosa et al., 2010; Freitas et al., 2012; Fonseca et al., 2015), confirmando a ampla disseminação deste vírus no país. Além disso, recentemente, Boiteux et al. (2016) detectaram ToCV infectando rabanete (*Raphanus* spp.) e rúcula (*Eruca sativa*), duas espécies da família Brassicaceae.

Os sintomas induzidos por ToCV em tomateiro não ocorrem em flores e frutos, apenas nas folhas, sendo que estes incluem uma clorose entre as nervuras que tem início nas folhas do baixeiro, que com o desenvolvimento da doença pode atingir as folhas superiores. Os tomateiros infectados também podem apresentar os bordos foliares curvados para cima, engrossamento do limbo foliar, que adquire um aspecto quebradiço, e nos estágios mais avançados da doença ocorre o aparecimento de bronzeamentos e manchas avermelhadas nas

folhas (Wisler et al., 1998). A clorose internerval induzida por ToCV em tomateiro compromete o processo fotossintético da planta, resultando em queda de vigor, redução no número e tamanho dos frutos, os quais também demoram mais para amadurecer (Eppo, 2005, 2013). Em estudo realizado avaliando a resistência/tolerância de diferentes genótipos de tomateiro ao ToCV, foi observado uma redução do peso dos frutos colhidos de plantas infectadas variando de 21 a 52 %, quando comparados com os das plantas sadias, o que indica o grande potencial de dano que esse crinivírus pode acarretar ao tomateiro quando infectado ainda jovem. Plantas de batata e pimentão infectadas por ToCV também apresentam sintomas do tipo clorose internerval com enrolamento foliar (Barbosa et al., 2010; Freitas et al., 2012), sendo que em pimentão foram encontradas diferenças significativas de 45-75% na produção de frutos de plantas infectadas e sadias (Fortes et al., 2012). Os danos provocados pelo ToCV em outras solanáceas cultivadas ainda não foram quantificados.

2.4. Plantas hospedeiras de ToCV

O ToCV possui uma ampla gama de hospedeiros, podendo infectar 52 espécies de plantas distribuídas em 18 famílias botânicas (Kil et al., 2015). Dentre os hospedeiros do ToCV, estão diversas espécies de plantas daninhas que podem contribuir para a manutenção do vírus no campo na ausência do hospedeiro principal, fato que dificulta o controle da doença, uma vez que a fonte de inóculo se mantém constante (Tzanetakis et al., 2013). Estudos realizados por Esquivel (2015) e Orfanidou et al. (2016) comprovam o potencial de plantas daninhas atuarem como fonte de inóculo de ToCV. Em ensaios de transmissão do vírus para tomateiro utilizando como fonte de inóculo as plantas daninhas *Solanum nigrum*, *Sonchus oleraceus*, *Amaranthus retroflexus* e *Chenopodium album*, a eficiência de transmissão de ToCV variou de 22 a 68%.

A presença de plantas daninhas que atuem como reservatórios do vírus e fontes de inóculo para novas infecções influencia, também, a dinâmica das epidemias de fitovírus. Nesse sentido, Tang et al. (2017) verificaram que altas incidências de infecções de plantas de tomate e pepino por ToCV e *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV), na região de Hainan, China, estavam associados à presença de infecções mistas desses vírus na planta daninha *Alternanthera philoxeroides*.

Devido à grande variedade de hospedeiros conhecidos, uma das medidas recomendadas para o manejo do ToCV em tomateiro, bem como em outras plantas cultivadas, é a eliminação de plantios velhos de solanáceas e de outros hospedeiros alternativos do vírus,

antes da realização de um novo plantio, com a finalidade de reduzir as fontes de inóculo do vírus no campo (Tzanetakis et al., 2013). Tais medidas de manejo são extremamente necessárias, uma vez que não existem variedades de tomateiro e nem de outras espécies cultivadas que apresentem resistência ao vírus ou mesmo tolerância à doença (García-Cano et al., 2010). Outro fator que deve ser levado em consideração é que o manejo de ToCV baseado apenas no controle químico do inseto vetor, por meio de pulverizações com inseticidas, não é eficiente para reduzir a incidência da doença, pois, apesar de diminuir a população do vetor, não impede que estes insetos transmitam o vírus antes de morrerem (Inoue-Nagata et al., 2016).

2.5. Interação vírus-vetor-planta hospedeira

Vírus de plantas que são transmitidos por insetos vetores estão envolvidos em um patossistema bastante complexo devido as interações existentes entre três componentes: vírus, vetor e planta hospedeira. Tais interações podem ser diretas, ou seja, quando a presença do vírus no inseto altera seus parâmetros biológicos como longevidade, viabilidade e fecundidade, e indiretas quando a infecção viral causa alterações nas plantas hospedeiras que podem influenciar na orientação, alimentação e dispersão de insetos vetores (Blua & Perring, 1992; Ingwell et al., 2012; Mauck, 2016).

Um mesmo vírus infectando diferentes plantas hospedeiras pode provocar respostas fisiológicas diferentes nestas e causar combinações vírus-hospedeiro únicas em relação à patogenicidade e eficiência como fonte de inóculo, como no caso da infecção de *Tomato spotted wilt virus*, em duas solanáceas, *Nicotiana benthamiana* e *S. lycopersicum*, onde o vírus induz, em cada hospedeiro, diferentes perfis de expressão de componentes de silenciamento de RNA (Mitter et al., 2013).

Alguns vírus podem causar alterações fenotípicas em suas plantas hospedeiras influenciando as interações com seus insetos vetores de diferentes maneiras. Por exemplo, infecções causadas por vírus podem modificar a fisiologia e, conseqüentemente, pistas visuais, olfativas, gustativas e até mesmo a composição bioquímica das plantas infectadas. Tais aspectos podem alterar parâmetros comportamentais como a preferência do vetor, a aquisição e transmissão de vírus para seus hospedeiros (Feres & Moreno, 2009; Bosque-Pérez, et al., 2011; Mauck et al., 2012).

Como exemplo de efeito direto de vírus sobre o comportamento do inseto foi demonstrado por Moreno-Delafuente et al. (2013), no qual foi observado através da técnica de *Electrical penetration graph* (EPG), que insetos quando adquirem *Tomato yellow leaf curl virus*

(TYLCV) se alimentam com maior frequência e realizam maior número de contatos com o floema quando comparados com insetos não virulíferos, manipulando assim o comportamento de *B. tabaci*, aprimorando a eficiência de transmissão do vírus e sua disseminação. Stafford et al. (2011), em trabalho com tripses *Frankliniella occidentalis*, inseto vetor de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), também com a técnica de EPG, constataram que a presença do vírus nos insetos altera seu comportamento alimentar principalmente para machos, sendo que machos virulíferos além de se alimentarem mais que avirulíferos, apresentam a frequência dos comportamentos alimentares triplicada, incluindo os de curta duração ou prova, nos quais, devido à salivação, há grandes chances de inoculação. Além disso, observa que tais comportamentos de prova mais breves mantêm a integridade das células, fator essencial para a movimentação das partículas virais.

Avaliando os efeitos do ToCV sobre *B. tabaci* MEAM1, Maluta (2016) observou que os insetos avirulíferos tinham preferência para plantas de tomate sadias, enquanto que os insetos virulíferos foram indiferentes quanto a seleção da hospedeira pousando tanto em tomateiros sadios quanto em infectados por ToCV. Com relação a comportamento arrestante, foi verificado que independente da presença ou não do vírus no inseto vetor, as moscas-brancas quando liberadas nas plantas de tomate infectadas com ToCV tenderam sempre a se deslocar para as plantas sadias.

No caso de efeitos indiretos de vírus manipulando comportamento do seu inseto vetor através de alterações na planta hospedeira, foi constatado que houve aumento da quantidade de ovos depositados por *B. tabaci* MED em plantas de tomate infectadas com o vírus quando comparado com plantas não infectadas. Este fato elucida que o vírus ao provocar aumento da fecundidade do inseto vetor, leva ao acréscimo da densidade populacional e, conseqüentemente intensifica sua probabilidade de disseminação (Maluta et al., 2014).

Watanabe et al. (2018) compararam efeitos de plantas sadias e infectadas de tomate com ToCV em duas espécies de moscas-brancas, *B. tabaci* MEAM1 e *T. vaporariorum*. Para isso, acompanharam o número de ovos colocados, a viabilidade dos ovos e a emergência de insetos adultos das duas espécies. Foi observado que plantas infectadas com ToCV não influenciaram sobre os ovos de *T. vaporariorum* tanto em quantidade, quanto viabilidade. Já a emergência de adultos para esta espécie teve influência, sendo reduzida em cerca de 37% nas plantas infectadas quando comparado às plantas sadias. Por outro lado, neste trabalho, constatou-se que *B. tabaci* MEAM1 sofreu forte influência da condição das plantas, ou seja, em plantas infectadas, a viabilidade dos ovos diminuiu em quase 42% e a emergência de adultos teve uma redução de 92% comparando-se às plantas sadias.

Em estudo realizado também com ToCV, Shi et al. (2018) avaliaram além da performance, a aquisição, persistência e eficiência de transmissão comparando-se as espécies *B. tabaci* MEAM1 e *B. tabaci* MED. Foi observado que embora a aquisição não tenha sido diferente entre 6 e 24h para as duas espécies, entre 48 e 96h, houve títulos virais expressivamente maiores em fêmeas de *B. tabaci* MED do que em machos da mesma espécie e machos ou fêmeas de *B. tabaci* MEAM1. Constatou-se também, a transmissão por *B. tabaci* MED foi maior, além da persistência do vírus foi o dobro com relação em MEAM1. Quanto a preferência, notou-se que embora a performance de *B. tabaci* MED tenha sido melhor em plantas infectadas, os insetos escolheram plantas não infectadas, predominantemente.

Há uma grande diversidade de publicações em que há efeitos diretos e indiretos de patógenos nos vetores, entre diversos aspectos, há influências sobre comportamentos de escolha, desempenho e viabilidade dos vetores e alterações ocasionadas pós aquisição do patógeno, demonstrando relações com fortes vínculos, que podem estar diretamente correlacionadas com a disseminação de doenças (Eigenbrode et al, 2018). E para vírus não circulativos, de transmissão semi-persistente, há uma grande demanda de informações para elucidar melhor estas relações e compreender melhor sobre patossistemas e disseminação de doenças (Zhou et al, 2018).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram realizados no Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, do Departamento de Entomologia e Acarologia, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq/USP), em Piracicaba (SP).

3.1. Material vegetal

Foram utilizadas as espécies de plantas *Solanum lycopersicum* (tomateiro tipo Santa cruz, cv. Kada), *Solanum americanum* (maria-pretinha), e *Physalis angulata* obtidas a partir de sementes. Realizou-se semeadura semanal em bandejas de isopor e as plântulas obtidas foram transplantadas para vasos com capacidade de 1 L, contendo substrato esterilizado próprio para hortaliças (Tropstrato HT Hortaliças®). Todas as plantas usadas nos estudos foram produzidas em casa de vegetação com tela antiafídeos e antecâmara telada para impedir a entrada de insetos vetores, sendo irrigadas diariamente e fertirrigadas semanalmente com aproximadamente 120 ml de solução nutritiva (Sulfato de magnésio = 0,83; nitrato de potássio = 0,36; MAP = 0,14; zinco = 0,02; cobre = 0,03; ferro = 0,09; nitrato de amônia = 0,08; nitrato de cálcio = 0,91 g/L) por vaso.

3.2. Criação de *Bemisia tabaci*

A população de *B. tabaci* MEAM1 usada no presente estudo foi obtida junto ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). A colônia de insetos foi conduzida em uma casa de vegetação modelo IAC e mantida livre de vírus em plantas de couve (*Brasica oleracea* L. var. *acephala*, cv. Manteiga), que é uma espécie vegetal não hospedeira de ToCV. As plantas de couve foram produzidas em vasos de 2,5 L com substrato esterilizado (Tropstrato HT Hortaliças®). As plantas infestadas foram mantidas por períodos de aproximadamente dois meses e depois descartadas. Plantas novas eram adicionadas conforme as plantas mais antigas começavam a ficar sobrecarregadas com relação a quantidade de ninfas e adultos. Não houve padronização na idade e sexo dos insetos utilizados nos experimentos.

3.3. Isolado e manutenção de *Tomato chlorosis virus* (ToCV)

O isolado de ToCV utilizado nos experimentos foi cedido pelo Prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP. O isolado foi coletado em tomateiro no município de Sumaré em 2017, e teve sua identidade confirmada através de sequenciamento parcial do seu genoma.

As plantas infectadas pelo isolado de ToCV foram mantidas em casa de vegetação com tela antiafídeos, dentro de gaiolas com armação metálica e coberta com tecido *voile*, sendo fertirrigadas conforme descrito em 3.1. Mensalmente realizou-se a transmissão do isolado pelo vetor *B. tabaci* MEAM1 para plantas sadias de tomate, conforme descrito em 3.4, objetivando-se a manutenção da fonte de inóculo.

3.4. Transmissão de ToCV para as plantas

Adultos avirulíferos de *B. tabaci* MEAM1 obtidos da criação do Departamento de Entomologia e Acarologia foram confinados sobre folhas de tomateiro destacadas de plantas infectadas por ToCV (plantas-fonte), em recipientes de vidro com capacidade de 300 ml e cobertos com tecido *voil*, por um período de acesso à aquisição (PAA) do vírus de 48h. Posteriormente, os insetos foram subdivididos em grupos de 25 indivíduos, os quais foram confinados em plântulas sadias de tomate no estágio de 2-3 folhas compostas (cerca de 15 dias após a germinação) (plantas-teste), usando-se gaiolas de folha do tipo *clipcage*, para um período de acesso à inoculação (PAI) de 120 h, tempo suficiente para invasão sistêmica do vírus na planta inoculada (Favara, 2017). Após esse período, as gaiolas contendo os insetos foram removidas juntamente com as folhas inoculadas, para evitar a presença de insetos e ovos remanescentes nas plantas. A detecção do vírus em plantas inoculadas foi feita através da extração de RNA de amostras foliares, seguida de reação de RT-PCR, além da observação visual de sintomas.

As plantas sadias utilizadas nos experimentos de preferência para pouso e oviposição foram previamente expostas a insetos conforme descrito na inoculação de ToCV, porém usando-se insetos livres de vírus. Foram utilizadas plantas-teste de tomate com 15 dias após a germinação, nas quais, com o uso de gaiolas do tipo *clipcage*, grupos de 25 insetos avirulíferos (coletados diretamente da criação de *B. tabaci* MEAM1) foram confinados em cada planta por

um período de 120 h. Ao fim do período, as gaiolas foram removidas, juntamente com as folhas nas quais os insetos ficaram acondicionados.

Tanto as plantas-teste inoculadas com ToCV (“infectadas”) como aquelas expostas à alimentação por insetos livres de vírus (sadias ou “*mock-inoculated*”) foram mantidas no interior de gaiolas metálicas (110 cm de altura e 80 cm x 60 cm de base) cobertas com tecido *voile*, em compartimentos distintos dentro de uma mesma casa de vegetação com tela antiafídeos, sendo fertirrigada como descrito em 3.1.

3.5. Detecção de ToCV

3.5.1. Extração de RNA

As amostras utilizadas para a extração do RNA foram obtidas em folhas de diferentes partes das plantas. A extração do RNA total foi realizada utilizando Trizol® LS (Invitrogen) de acordo com protocolo do fabricante. Quatro discos foliares foram acondicionados em microtubos de 1,5 mL e macerados, com auxílio de pistilos plásticos, na presença de nitrogênio líquido. Para cada 50-100 mg de tecido foram adicionados 800µL de Trizol®. Após agitação vigorosa a mistura foi incubada durante 5 minutos em temperatura ambiente. Duzentos microlitros de clorofórmio foram adicionados em cada tubo. Foi feita agitação manual por 15 segundos e incubação sob temperatura ambiente por 5 minutos. A suspensão foi centrifugada a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol e conseguinte agitação lenta e incubação durante 10 minutos em temperatura ambiente. Para precipitação do RNA a mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado lavado com 800 µL de etanol 75%, e centrifugado a 7.500 g por 5 minutos a 4°C. O etanol foi descartado cuidadosamente. Após a secagem do precipitado, foram adicionados 30 µL de água livre de RNase ou água “DEPC”, para ressuspender o RNA. O RNA total extraído foi utilizado nas reações de RT-PCR para a detecção do ToCV.

3.5.2. Detecção de ToCV por RT-PCR

A detecção do ToCV foi feita a partir do RNA total extraído das amostras foliares utilizando o protocolo do fabricante do Trizol LS (Invitrogen). O RNA total extraído de plantas

sadias e infectadas com o ToCV foram usados nas reações de RT-PCR como controles negativo e positivo, respectivamente. Para a síntese da primeira fita de cDNA (RT= Reverse Transcription) foram utilizados: 3 µL de RNA; 0,25 µL de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs a 10 mM); 1 µL do oligonucleotídeo iniciador específico (anti-senso) HS-12 (5'-CC(G/T)CCACCAAA (A/G)TCGTA-3') a 20 mM (Dovas et al., 2002), e 9,75 µL de água livre de RNases. A mistura foi colocada em termociclador e mantida por 5 min a 65 °C e em seguida resfriada por 5 min a 4 °C. Posteriormente foram adicionados 5 µL do AMV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer e 0,2 µL da enzima transcriptase reversa AMV (Avian myeloblastosis virus, marca Promega, a 15 unidades/ µL). A mistura foi incubada a 37 °C por 50 min e a 65 °C por 15 min, sendo mantida a 4 °C até a sua utilização na reação de PCR. A PCR foi realizada utilizando o kit de PCR Master Mix (Promega). Para um volume de 25 µL foram adicionados: 12,5 µL de tampão Master Mix; 0,8 µL dos oligonucleotídeos iniciadores específicos ToC-5 (5'-GGTTTGGAT TTTGGTACTACATTTCAGT-3') e ToC-6 (5' –AAACTGCCTGCATGAAAAGTCTC-3') a 20 mM (Dovas et al., 2002), 3 µL de cDNA e 7,9 µL de água livre de RNases. As condições do termociclador foram: 95 °C por 1 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 20 s, 60 °C por 15 s, 72 °C por 10 s e uma extensão final de 72 °C por 10 min. Os amplicons obtidos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen) e visualizados em um transiluminador de luz UV. O marcador de peso 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) foi utilizado para determinar o tamanho dos amplicons obtidos.

3.5.3. Detecção do ToCV por RT-qPCR

A detecção do ToCV foi feita a partir do RNA total extraído das amostras foliares, respectivamente, utilizando o PureLink Viral RNA/DNA mini Kit (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Para as reações foram utilizados os oligonucleotídeos específicos ToCV-F (5'- GACCGAAGTGACACCAACCC-3') e ToCV-R (5'- TGGGACCGAGTACATTCCAAC-3') na concentração de 500 nM (Mansilla-Córdova et al., 2017). As reações de RT-qPCR foram realizadas em placas com 96 poços “MicroAmp” (Life Technologies), com volume final de 12,5 µL, utilizando GoTaq® 1-Step RT-qPCR (PROMEGA) para o ToCV, seguindo as instruções do fabricante. As reações foram realizadas e analisadas no termociclador 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). As condições

de amplificação foram: 37 °C por 15 min, 95 °C por 10 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 10 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s. Cada uma das amostras foi analisada em duplicata.

3.6. Preferência para pouso e oviposição de *B. tabaci* em diferentes partes de plantas de tomate

Avaliou-se a preferência de adultos de *B. tabaci* MEAM1 para pouso e oviposição nos terços superior, mediano e inferior de plantas de tomate, em função de fatores como a presença de vírus nos insetos (insetos virulíferos ou avirulíferos) e a condição da planta (infectada por ToCV ou sadia). Os ensaios foram realizados 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, no interior das quais foi introduzida uma planta de tomate infectada com ToCV ou sadia. Em cada gaiola foram introduzidos insetos virulíferos ou avirulíferos, estabelecendo-se os seguintes tratamentos: i) inseto avirulífero x planta sadia; ii) insetos virulíferos x planta sadia; iii) inseto avirulífero x planta infectada; e iv) inseto virulífero x planta infectada. As plantas utilizadas possuíam cerca de 45 dias após a inoculação ou falsa inoculação ('mock-inoculated').

Os insetos avirulíferos foram coletados diretamente da criação. Os insetos virulíferos, por sua vez, foram obtidos confinando-os sobre folhas sintomáticas de plantas-fonte de ToCV por um PAA de 48 h, conforme descrito no item 3.4. Os insetos virulíferos ou avirulíferos foram transferidos com o auxílio de um aspirador bucal para quatro tubos de 25 ml (um tubo por gaiola), revestidos com fita isolante preta, em número de 100 indivíduos/tubo, totalizando 400 indivíduos. Cada um dos quatro tubos foi posicionado em uma plataforma de voo na parte superior e central da gaiola contendo as plantas, sendo destampados às 9:00 h da manhã para a liberação dos insetos. Foram realizadas contagens do número de insetos pousados em cada terço da planta após 2, 5, 8 e 24h da liberação. Ao fim das 24h, os insetos foram retirados das plantas com auxílio de um aspirador entomológico e foi feita a contagem de ovos depositados em cada terço, sob microscópio estereoscópio.

O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, com três fatores: parte da planta, condição da planta e condição do inseto. O fator parte da planta apresentou três níveis (terço superior, médio e inferior), enquanto que a condição da planta (infectada ou sadia) e a condição do inseto (virulíferos e avirulíferos) apresentaram dois níveis. Cada tratamento

consistiu da combinação entre os fatores e seus níveis. Foram realizadas oito repetições deste experimento, sendo cada parcela representada por uma gaiola de observação.

3.7. Eficiência de transmissão de ToCV a partir da aquisição em folhas sintomáticas ou não, de diferentes partes de tomateiro infectado

Foram utilizadas plantas de tomate infectadas e sintomáticas com 60 dias após a inoculação. Uma única planta foi utilizada como fonte para cada repetição do experimento. Para a aquisição do vírus pelo inseto, foram destacados folíolos provenientes de folhas dos terços apical (sem sintomas), médio (sintomas atenuados) e basal do baixeiro (sintomas bem evidentes) (Figura 1) de cada planta-fonte. Cada folíolo foi posicionado em tubo tipo falcon de capacidade 50 ml, com algodão umedecido no pecíolo para evitar sua desidratação. Cinquenta insetos foram colocados em cada tubo por um PAA de 12h e, posteriormente, foram transferidos em grupos de cinco para plantas-teste de tomate, com 20 dias após a germinação, por um PAI de 24h em gaiolas de copos plásticos (500 ml) com aberturas laterais cobertas com tecido *voile*. Ao fim das 24h, os insetos foram removidos das plantas-teste com o auxílio de um aspirador entomológico e estas foram pulverizadas para evitar a presença de possíveis insetos e ovos remanescentes. Para cada folíolo testado como fonte, cinco plantas-teste foram inoculadas. Como controle negativo em cada repetição do experimento, três plantas-teste foram expostas a um PAI de 24 h por insetos provenientes da criação e que não foram previamente submetidos ao PAA de 12 h. O experimento foi repetido quatro vezes no tempo.

Amostras de folhas nas quais os insetos foram confinados para aquisição foram submetidas à extração de RNA e RT-qPCR para quantificar o título de ToCV nas diferentes partes das plantas-fonte de inóculo. As plantas-teste inoculadas foram acondicionadas em casa de vegetação com tela antiafídeos e protegidas contra a entrada de insetos vetores, sob condições de temperatura ambiente, para desenvolvimento de sintomas após um período de 30-45 dias após a inoculação.

Figura 1. Folhas destacadas de diferentes partes de uma mesma planta de tomate infectada com ToCV: a. terço apical (sem sintomas); b. terço médio (sintomas atenuados); c. terço inferior (sintomas bem evidentes)

3.8. Efeito dos sintomas na seleção de plantas infectadas por *B. tabaci*

Para investigar o efeito dos sintomas de ToCV na seleção hospedeira pelo inseto, foram realizados ensaios de livre escolha variando-se a idade da infecção da planta pelo vírus. Assim, avaliou-se a preferência para pouso e oviposição entre plantas de tomate infectadas de dois tratamentos: com sintomas evidentes (45 dias após a inoculação) e assintomáticas (30 dias após a inoculação)

Para os ensaios de livre escolha utilizaram-se gaiolas do tipo arena desenvolvidas por Anderson Ramos (não publicado) a partir de um modelo descrito previamente (Ingwell et al., 2012), construídas em acrílico e com formato cúbico de 30 x 30 x 30 cm com aberturas retangulares (0,5cm x 8,0 cm) nas laterais para inserção apenas de folhas das plantas a serem testadas (Figura 2). Este tipo de gaiola permitiu a avaliação da preferência dos insetos por folhas com ou sem sintomas, as quais não foram destacadas de suas respectivas plantas, mas sem que eventuais diferenças no porte dessas plantas (com potencial de influenciar a escolha) pudessem ser visualizadas pelos insetos no interior das arenas. As folhas de plantas dos dois tratamentos foram inseridas em lados opostos da arena, sendo os insetos foram liberados ao centro, na parte superior da gaiola (Figura 2). Inseriram-se cinco folíolos de uma folha da região mediana de cada planta.

O experimento foi conduzido em sala climatizada com temperatura de 25°C e fotoperíodo 14:10h (claro: escuro). Antes da liberação, grupos de 80 insetos expostos a baixa

temperatura (gelo) por 4 min para diminuição do metabolismo e imobilização. Posteriormente foram transferidos para tubos de vidro envoltos por fita isolante preta e posicionados no topo da gaiola, na região central entre as folhas. Cada repetição do experimento contou com duas gaiolas, sendo que em uma foram liberados 80 insetos virulíferos e em outra, 80 avirulíferos, às 9:00 h. Foram realizadas avaliações quanto ao pouso e permanência dos insetos nas folhas dos dois tratamentos, por meio da contagem dos insetos sobre cada folha após 2, 5, 8 e 24h da liberação. Também foi realizada a contagem de ovos em cada folha, ao fim das 24h.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, com dois fatores (e dois níveis): presença de sintomas nas folhas (sintomática e assintomática) e a presença do vírus no inseto (virulíferos e avirulíferos). Cada tratamento consistiu da combinação entre os fatores e seus níveis. Foram realizadas 11 repetições deste experimento.

Figura 2. Arena de escolha utilizada no experimento de efeito de sintoma. (a) Vista lateral: planta sintomática de um lado e assintomática de outro. (b) Vista superior: plataforma de liberação dos insetos – seta vermelha; disposição das folhas dentro da gaiola.

3.9. Efeito de ToCV na seleção de diferentes espécies vegetais para pouso e oviposição por *B. tabaci*

Neste estudo foi comparada a preferência de insetos virulíferos e avirulíferos na seleção de diferentes espécies vegetais para pouso e oviposição em ensaios de escolha. As espécies vegetais foram *Solanum lycopersicum* (tomate), *Solanum americanum* (maria-pretinha), e *Physalis angulata*.

Quatro gaiolas contendo as seguintes combinações de plantas e insetos foram montadas para a execução de cada repetição deste experimento: (i) plantas saudas e insetos avirulíferos; (ii) plantas saudas e insetos virulíferos; (iii) plantas infectadas e insetos avirulíferos; (iv) plantas infectadas e insetos virulíferos. Os tratamentos foram avaliados segundo a preferência para pouso e oviposição dos insetos no decorrer de um período de 24h.

As plantas não infectadas ou infectadas com ToCV apresentaram idade de 60 dias após a germinação (produzidas conforme descrito em 3.1) e 45 dias após a inoculação. Plantas saudas e infectadas de cada espécie vegetal foram inoculadas conforme descrito em 3.4, confirmando-se a presença de ToCV nas plantas infectadas por análise molecular e presença de sintomas. Os insetos avirulíferos foram coletados diretamente da criação. Os insetos virulíferos, por sua vez, foram colocados para alimentação em plantas-fonte para aquisição dos vírus por um PAA de 48h, segundo o procedimento descrito em 3.4.

Os ensaios de escolha para avaliar a preferência para pouso e oviposição de *B. tabaci* foram realizados 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, nas quais as três plantas, uma de cada espécie, foram posicionadas de maneira equidistante, formando uma arena. Em quatro tubos falcon, de capacidade 25 ml, revestidos com fita isolante preta, foram colocadas 300 moscas-brancas por tubo, com o auxílio de um aspirador bucal, totalizando 1200 insetos para as quatro gaiolas. Os tubos foram posicionados em uma plataforma de voo na parte superior e central da gaiola, sendo destampados às 9:00h para a liberação dos insetos. Foram realizadas contagens da quantidade de insetos pousados em cada planta após 1, 5, 8 e 24 h da liberação. Ao fim das 24h, os insetos foram retirados das plantas com auxílio de um sugador entomológico e foi feita a contagem de ovos depositados em cada planta, sob microscópio estereoscópico.

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com três fatores: espécie da planta, com três níveis (tomate, maria-pretinha e *P. angulata*); a condição da planta com dois níveis (planta infectada ou sadia); e a condição do inseto, também com dois

níveis (virulíferos e avirulíferos). Cada tratamento consistiu da combinação entre os fatores e seus níveis. Foram realizadas 12 repetições deste experimento.

Figura 3. Esquema da disposição das plantas para uma repetição dos testes de preferência de *B. tabaci* MEAM1 por diferentes espécies vegetais. As posições das gaiolas, das plantas dentro das gaiolas, as condições das plantas (mock ou infectadas) e a condição dos insetos (virulíferos ou avirulíferos) foram sorteadas para cada repetição do experimento.

3.10. Eficiência de transmissão de ToCV para plantas de tomate utilizando-se diferentes espécies vegetais como fontes de inóculo

Foram utilizadas como fontes plantas infectadas de *Solanum lycopersicum* (tomate), *Solanum americanum* (maria-pretinha) e *Physalis angulata*. Folhas sintomáticas de cada espécie foram destacadas das plantas, com algodão umedecido em seu pecíolo, posicionadas individualmente em recipientes de vidro com capacidade de 200 ml e vedados com tecido voile para ventilação. Grupos de cerca de 150 adultos de *B. tabaci* MEAM1 provenientes da colônia sadia foram confinados sobre as folhas em cada tubo por um PAA de 24h.

Para a inoculação, foram utilizadas gaiolas de copos plásticos de capacidade 500ml, dos quais os fundos foram substituídos por tecido voile para evitar condensação, com abertura lateral para a introdução dos insetos. As gaiolas foram posicionadas sobre mudas de tomate saudáveis com 10 dias após a germinação (plantas-teste), nas quais foram liberados 10 insetos para um PAI de 24 h. Para cada espécie vegetal avaliada como fonte, foram inoculadas 10 plantas-teste por repetição do experimento. Ao fim do PAI, os insetos foram retirados das plantas e foi feita uma aplicação dos inseticidas Tiger 100 EC (Piriproxifem) e Cartap BR 500 (Cloridrato de Cartape) para evitar indivíduos remanescentes nas plantas. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação protegida contra a entrada de insetos vetores (tela antiafídeos), como descrito em 3.4, para o crescimento e desenvolvimento de sintomas de ToCV. As

avaliações da proporção de plantas infectadas com base nos sintomas foram feitas aos 45 dias após a inoculação.

3.11. Análises estatísticas

Os dados provenientes dos experimentos descritos nos itens 4.6. e 4.9. foram ajustados a modelos lineares generalizados (GLM) e submetidos à análise de variância e teste de qui-quadrado, em nível de 5% de significância, para verificar a existência de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Nos casos em que foram observadas diferenças significativas, procedeu-se à comparação de médias pelo teste de Tukey, em nível de 5% de significância.

Para as análises descritas nos itens 4.7. e 4.10., os dados de proporção foram transformados pela fórmula $\arccos(\sqrt{x})$ e submetidos à análise de variância, em nível de 5% de significância, para detectar diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.

Os resultados da quantificação de partículas virais das quatro repetições avaliadas, em folhas amostradas dos diferentes terços das plantas, foram analisados com os Modelos Lineares Generalizados (GLM), utilizando-se o teste de Chi-quadrado (5%) para identificar se havia diferenças significativas entre os tratamentos, e o teste de Tukey (5%) para comparações múltiplas das médias.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional RStudio (RStudio Team, 2016).

4. RESULTADOS

4.1. Preferência para pouso e oviposição de *B. tabaci* em diferentes locais de plantas de tomate

Considerando-se a avaliação de 2h após a liberação dos adultos de *B. tabaci* MEAM1, que reflete a escolha inicial dos insetos para pouso sobre as plantas, houve efeito significativo dos fatores local da planta, presença do vírus ToCV nos insetos (virulíferos ou avirulíferos) e condição da planta [infectada por ToCV (inoculada por insetos virulíferos) ou sadia (exposta a insetos livres de vírus)], sem interação significativa entre eles (Tabela 1). Os insetos foram observados em números mais elevados sobre a parte apical da planta ($12,0 \pm 2,6$) em relação aos terços médio e baixo, que não diferiram quanto ao número de insetos ($2,4 \pm 0,7$ e $0,6 \pm 0,3$, respectivamente). Quanto ao efeito da presença do vírus no inseto, observou-se que insetos virulíferos pousaram em maior número sobre as plantas ($7,1 \pm 1,7$) do que insetos avirulíferos ($3,0 \pm 1,1$). A condição das plantas também influenciou no processo inicial de escolha pelos insetos, os quais pousaram em maior número em plantas sadias ($6,4 \pm 1,8$) do que em plantas infectadas ($3,6 \pm 0,9$).

Quanto às avaliações de 24 h, que indicam maior aceitação dos insetos quanto à permanência sobre as plantas, houve efeito significativo da parte da planta e presença de vírus no inseto (Tabela 1). Considerando-se o fator local da planta isoladamente, observou-se diferenças significativas no número de insetos pousados entre todas as partes da planta de tomate, com maiores números na porção apical ($38,5 \pm 4,9$), seguido pelo terço médio ($13,2 \pm 2,2$) e folhas do baixo (2,2 $\pm$ 0,6). Com relação à presença do vírus nos insetos, constatou-se que havia mais insetos virulíferos ($20,1 \pm 3,8$) pousados nas plantas do que avirulíferos ($16,3 \pm 2,8$). Quando o fator avaliado foi o vírus na planta, não houve diferença estatística significativa.

Avaliando-se os fatores dois a dois na avaliação de 24 h, houve interação significativa entre local da planta e condição dela (infectada ou sadia) (Tabela 1). Houve diferença quanto à porção da planta em que os insetos foram contabilizados, sendo que mais insetos preferiram o ápice, tanto de plantas infectadas quanto de sadias, seguido pelo terço médio e baixo (Figura 4). A condição das plantas nesta interação apresentou diferença significativa apenas no terço médio, no qual houve maior quantidade de insetos em plantas sadias ($15,3 \pm 3,2$) do que em plantas infectadas ($11,1 \pm 3,0$). Na interação dos três fatores, observou-se efeito significativo para número de insetos sobre as plantas (Tabela 1). A preferência dos insetos pela porção apical das plantas ficou consolidada sendo que, nesta região de plantas infectadas, insetos virulíferos pousam em maior quantidade que insetos avirulíferos. Além disso, dentre os insetos que

preferiram as folhas do baixeiro das plantas, os virulíferos foram encontrados em maior quantidade que avirulíferos (Tabela 2).

Quanto à oviposição de *B. tabaci* MEAM1, observaram-se efeitos significativos dos três fatores estudados, bem como das interações duplas entre eles (Tabela 1). No fator local da planta, isoladamente, observaram-se maiores números de ovos na região apical das plantas ($98,5 \pm 19,8$), seguido pelo terço médio ($45,5 \pm 10,0$) e, finalmente, pelo baixeiro ($6,62 \pm 1,3$). Os insetos virulíferos ovipositaram mais que avirulíferos ($58,8 \pm 14,9$ e $41,4 \pm 7,2$, respectivamente), com maior oviposição em plantas infectadas ($54,1 \pm 13,9$) do que em sadias ($46,10 \pm 9,2$). Quanto às interações duplas, insetos virulíferos ovipositaram mais no ápice e no terço médio do que insetos avirulíferos. No baixeiro, independente da condição do inseto, não houve diferenças (Tabela 3). Analisando-se a interação entre o local da planta e a presença do vírus na planta, verificou-se que o padrão da oviposição seguiu o da preferência dos adultos pelas diferentes regiões da planta, mas houve maior número de ovos encontrados em ápices de plantas infectadas do que em sadias. Na região mediana, não houve diferença entre as duas condições de plantas, enquanto que no baixeiro houve maior oviposição em plantas sadias do que em infectadas. (Tabela 4)

Tabela 1. Parâmetros das análises estatísticas para os experimentos de efeitos de local da planta, presença de sintomas de *Tomato chlorosis virus* (ToCV) e espécies hospedeiras sobre a preferência de *Bemisia tabaci* MEAM1 para pouso (número de insetos) e oviposição (número de ovos)

Fator	Nº de insetos após 2h ^x			Nº de insetos após 24h ^x			Nº de ovos		
	χ^2	G.L.	P	χ^2	G.L.	P	χ^2	G.L.	P
Experimento 1. Diferentes locais da planta de tomate									
Local da planta	480,5	2	<0,0001	1224,6	2	<0,0001	3103,3	2	<0,0001
Presença do vírus na planta (VP)	39,6	1	<0,0001	3,7	1	0,056	30,54	1	<0,0001
Presença do vírus no inseto (VI)	83,1	1	<0,0001	19,4	1	<0,0001	144,32	1	<0,0001
Local x VI	2,1	2	0,36	1,8	2	0,41	32,52	2	<0,0001
Local x VP	3,2	2	0,21	7,8	2	0,020	25,33	2	<0,0001
VI x VP	0,3	1	0,60	1,0	1	0,32	84,22	1	<0,0001
Local x VP x VI	2,7	2	0,26	20,7	2	<0,0001	4,47	2	0,11
Experimento 2. Presença de sintomas em tomateiro infectado									
Presença do vírus no inseto (VI)	27,8	1	<0,0001	19,2	1	<0,0001	341,0	1	<0,0001
Sintomas	3,2	1	0,70	0,6	1	0,44	92,5	1	<0,0001
VI x Sintomas	5,0	1	0,025	22,1	1	<0,0001	66,4	1	<0,0001
Experimento 3. Diferentes espécies vegetais									
Hospedeiro	1014,6	2	<0,0001	1613,3	2	<0,0001	8622,1	2	<0,0001
Presença do vírus no inseto (VI)	81,5	1	<0,0001	15,7	1	<0,0001	537,5	1	<0,0001
Presença do vírus na planta (VP)	54,8	1	<0,0001	28,2	1	<0,0001	0,5	1	0,49
Hospedeiro x VI	234,4	2	<0,0001	116,4	2	<0,0001	195,1	2	<0,0001
Hospedeiro x VP	43,9	2	<0,0001	108,6	2	<0,0001	628,7	2	<0,0001
Hospedeiro x VI x VP	109,3	3	<0,0001	155,8	3	<0,0001	1870,7	3	<0,0001

^xTempo após a liberação dos insetos nas gaiolas de observação. Parâmetros estatísticos: χ^2 = valor do teste qui-quadrado;

G.L. = graus de liberdade; P = significância do teste.

Figura 4. Preferência para pouso de adultos de *Bemisia tabaci* MEAM1 em diferentes partes da planta de tomate, após 24 horas da liberação, em função da presença de *Tomato chlorosis virus* nas plantas. Médias de número de insetos com as mesmas letras (maiúsculas para comparação entre locais e minúsculas para comparação entre condições da planta) não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média (n=8).

Tabela 2. Preferência para pouso de adultos de *Bemisia tabaci* MEAM1 em diferentes partes da planta de tomate em função da presença do *Tomato chlorosis virus* na planta e nos insetos

Local da planta	Número médio de insetos ± EPM			
	Plantas Infectadas		Plantas sadias	
	Inseto virulífero	Inseto avirulífero	Inseto virulífero	Inseto avirulífero
Ápice	45,0 ± 12,1 Aa ¹	30,9 ± 6,3 Ab	40,2 ± 11,9 Aab	37,8 ± 9,3 Aab
Terço médio	11,2 ± 5,6 Bab	10,9 ± 2,9 Bb	17,0 ± 4,5 Ba	13,2 ± 4,6 Bab
Baixeiro	0,8 ± 1,5 Cab	3,5 ± 1,1 Cab	4,5 ± 1,2 Ca	1,1 ± 0,4 Cb

¹Médias (± EPM) (n=8) seguidas de letras iguais maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 3. Preferência para oviposição de *Bemisia tabaci* MEAM1 em diferentes partes da planta de tomate em função da presença de *Tomato chlorosis virus* nos insetos

Local da planta	Número médio de ovos $\pm$ EPM	
	Insetos virulíferos	Insetos avirulíferos
Ápice	120,9 $\pm$ 36,4 Aa ¹	76,0 $\pm$ 15,3 Ab
Terço médio	49,1 $\pm$ 17,9 Ba	41,3 $\pm$ 9,5 Bb
Baixeiro	6,2 $\pm$ 1,9 Ca	7,0 $\pm$ 1,8 Ca

¹Médias ($\pm$ EPM) (n=8) seguidas de letras iguais maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 4. Preferência para oviposição de *Bemisia tabaci* MEAM1 em diferentes partes da planta de tomate em função da presença de *Tomato chlorosis virus* nas plantas

Local da planta	Número médio de ovos $\pm$ EPM	
	Plantas Infectadas	Plantas sadias
Ápice	110,0 $\pm$ 33,1 Aa ¹	86,9 $\pm$ 22,8 Ab
Terço médio	47,1 $\pm$ 18,7 Ba	43,3 $\pm$ 7,9 Ba
Baixeiro	5,2 $\pm$ 1,7 Cb	8,1 $\pm$ 2,0 Ca

¹ Médias ($\pm$ EPM) (n=8) seguidas de letras iguais maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

4.2. Eficiência de transmissão a partir de diferentes partes de tomateiro infectado

Houve diferenças estatísticas significativas na concentração de ToCV nas diferentes porções da planta ($X^2 = 79565$; G.L. = 2, $P < 0,001$), verificando-se maior quantidade em amostras coletadas a partir de folhas do terço médio das plantas, seguidas pelas amostras provenientes das porções apicais e por fim, as folhas dos baixeiros apresentaram os menores valores na quantificação (Tabela 5).

Não houve diferença significativa ($F = 0,024$; G.L.= 2; $P = 0,976$) na eficiência de transmissão de ToCV em função da porção da planta em que os insetos adquirem os vírus (Tabela 6), a despeito das variações observadas na concentração viral entre as folhas dos terços apical, médio e basal da planta de tomate. Nenhum dos insetos do controle negativo transmitiram ToCV para plantas-testes.

Tabela 5. Quantificação por RT-qPCR de *Tomato chlorosis virus* em diferentes partes de plantas de tomate infectadas

Parte da planta	Médias do número das cópias virais
Ápice	17733,3±4036,0 B ¹
Terço médio	32927,9±6672,1 A
Baixeiro	6319,6±485,4 C

¹ Médias (± EPM) (n=4) seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Tabela 6. Eficiência de transmissão de *Tomato chlorosis virus* por *Bemisia tabaci* MEAM1 após aquisição em folíolos de diferentes locais de plantas de tomate infectadas

Local de aquisição	Proporção de plantas infectadas (%) ¹ por repetição						Média (%)
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	Rep. 6	
Ponteiro	2/5 (40)	2/5 (40)	2/5 (40)	4/5 (80)	3/5 (60)	0/5 (0)	43,3 ±10,8
Mediana	3/5 (60)	1/5 (20)	2/5 (40)	3/5 (60)	3/5 (60)	0/5 (0)	40,0 ±10,3
Baixeiro	4/5 (80)	2/5 (40)	3/5 (60)	2/5 (40)	0/5 (0)	2/5 (40)	43,3 ±10,8

¹ Proporção de plantas infectadas sobre o total de plantas inoculadas (e percentuais entre parêntesis) em seis repetições do experimento. Em cada repetição, insetos foram submetidos a um período de acesso à aquisição do vírus de 12h nos folíolos e em seguida submetidos a um período de acesso à inoculação de 24h em plantas sadias de tomate (5 insetos/planta)

4.1. Efeito dos sintomas na seleção de plantas de tomate infectadas

Nas avaliações realizadas 2 h após a liberação dos insetos, observou-se que a insetos virulíferos pousaram em maior número ($3,2 \pm 1,0$) sobre as folhas de tomateiro que os avirulíferos ($1,0 \pm 0,4$), ou seja, houve efeito da presença do vírus no inseto no número total de indivíduos pousados (Tabela 1). Não houve efeito significativo da presença de sintomas sobre o número de insetos pousados nas folhas, mas este fator interagiu significativamente com a presença de vírus nos insetos, havendo preferência por folhas sintomáticas no caso de insetos virulíferos (Figura 5).

Resultados semelhantes foram obtidos nas avaliações de 24h após a liberação dos insetos, quando os fatores foram analisados individualmente (Tabela 1); observou-se maior número de insetos virulíferos pousados sobre as folhas ($21,1 \pm 2,0$) do que insetos avirulíferos ($15,5 \pm 2,0$), mas não houve diferença significativa no número total de insetos entre folhas infectadas sintomáticas e assintomáticas. No entanto, houve interação significativa entre os fatores presença de vírus nos insetos e sintomas nas folhas; para os insetos avirulíferos houve maior número de indivíduos pousados sobre folhas assintomáticas em relação às sintomáticas, não havendo diferença no caso de insetos virulíferos (Figura 5). Além disso, houve diferença

entre insetos virulíferos e avirulíferos quanto ao número de adultos pousados sobre folhas sintomáticas, mas não em folhas assintomáticas.

Quanto à oviposição de *B. tabaci* MEAM1, houve efeito significativo dos fatores presença de vírus nos insetos e condição da planta (presença ou ausência de sintomas), bem como da interação entre ambos (Tabela 1). Insetos virulíferos ovipositaram mais ($82,0 \pm 15,8$) que insetos avirulíferos ($39,1 \pm 7,8$) e foram encontrados mais ovos de ambos em folhas assintomáticas ($71,8 \pm 11,3$) do que em sintomáticas ($49,3 \pm 14,6$). Na interação dos dois fatores, os insetos ovipositaram mais em plantas assintomáticas. Contudo, independente da condição da planta, a maior quantidade de ovos depositados, foi de insetos virulíferos (Figura 6).

Figura 5. Preferência de adultos de *Bemisia tabaci* MEAM1 por folhas sintomáticas ou assintomáticas de tomateiro infectadas por *Tomato chlorosis virus*, em função da presença desse vírus nos insetos, após 2h e 24h da liberação. Médias de número de insetos com as mesmas letras (maiúsculas para comparação entre presença ou ausência de sintomas e minúsculas para condição do inseto) não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média (n=11).

Figura 6. Preferência de *Bemisia tabaci* MEAM1 para oviposição em folhas sintomáticas ou assintomáticas de tomateiro infectadas por *Tomato chlorosis virus*, em função da presença desse vírus nos insetos. Médias de número de ovos com as mesmas letras (maiúsculas para comparação entre condição da planta e minúsculas para condição de insetos) não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média (n=11).

4.2. Efeito de ToCV na seleção de diferentes espécies vegetais para pouso e oviposição por *B. tabaci*

Os três fatores avaliados (espécie vegetal, presença do ToCV no inseto e infecção da planta pelo vírus tiveram efeito individual altamente significativo ($P < 0,0001$) sobre a preferência de *B. tabaci* MEAM1 para pouso nas plantas após 2 e 24 h da liberação, e todas as interações foram significativas (Tabela 1).

Considerando-se o número médio de insetos sobre as diferentes espécies vegetais após 2 h da liberação, observou-se semelhanças entre maria-pretinha e tomateiro ($33,7 \pm 5,1$ e $34,5 \pm 6,0$, respectivamente) e números inferiores em *Physalis angulata* ($8,2 \pm 1,8$). No que se diz respeito à presença de vírus nos insetos, houve maior número de insetos virulíferos ($29,3 \pm 4,2$) pousados nas plantas do que avirulíferos ($21,7 \pm 3,9$). Plantas saudáveis, por sua vez, tiveram mais insetos contabilizados ($28,6 \pm 4,5$) do que plantas infectadas ($22,4 \pm 3,5$). Quando analisadas as interações, observou-se que insetos virulíferos pousaram em maiores números entre as espécies, sendo a maior quantidade encontrada em plantas de maria-pretinha, seguida por tomateiro e *P. angulata* com menor número de insetos. Quanto a insetos avirulíferos, houve uma inversão nas espécies maria-pretinha e tomate, pois nesta condição, os insetos pousaram em sua maioria em

plantas de tomate. (Figura 7). Na interação da espécie hospedeira e a condição da planta, ordem de preferência foi maria-pretinha, tomateiro e *P. angulata*, quando as plantas estavam infectadas, invertendo-se as duas primeiras quando sadias. Nas plantas de maria-pretinha e *P. angulata*, não houve diferença se estavam infectadas ou sadias, enquanto que para o tomate, contabilizou-se maiores quantidades em plantas sadias (Figura 8). A interação entre os três fatores permitiu observar que tanto em plantas infectadas quanto sadias de maria-pretinha, insetos virulíferos pousaram mais do que os avirulíferos (Tabela 7). Em tomate, houve maior número de insetos virulíferos em plantas sadias, enquanto que os avirulíferos ocorreram em números semelhantes em plantas sadias e infectadas; dentre os que foram encontrados em plantas infectadas, moscas-brancas avirulíferas estiveram em maior quantidade do que as virulíferas. Em *P. angulata*, indivíduos virulíferos pousaram mais em plantas infectadas, enquanto que os avirulíferos preferiram em plantas sadias (Tabela 7)

Analisando-se o número de insetos sobre as plantas após 24 h da liberação, quanto aos fatores analisados separadamente, ocorreu o mesmo padrão observado na avaliação de 2h (Tabela 1). Portanto, a escolha por maria-pretinha e tomateiro continuou semelhante entre elas ($85,7 \pm 8,3$ e $73,9 \pm 8,8$) e *P. angulata* apresentou menor número de insetos ($28,1 \pm 4,3$) para o fator planta hospedeira. Além disso, insetos virulíferos continuaram pousando mais ($65,2 \pm 6,4$) do que avirulíferos ($60,0 \pm 7,0$), no fator condição dos insetos e mais em plantas sadias ($66,1 \pm 6,8$) do que em infectadas ($59,1 \pm 6,6$) no fator condição da planta.

As interações duplas para as análises de 24h evidenciaram diferenças (Tabela 1) que não ocorreram para o período de 2h. Na interação entre espécies hospedeiras e presença do vírus no inseto, os insetos virulíferos preferiram, em ordem decrescente, maria-pretinha, tomate e *P. angulata*, enquanto que os avirulíferos preferiram tomateiro, seguido de maria-pretinha e *P. angulata* (Figura 7). Adicionalmente, nas plantas de maria-pretinha os insetos virulíferos permaneceram em maior quantidade que os avirulíferos, enquanto que em tomateiro os avirulíferos prevaleceram e não houve diferença em *P. angulata* (Figura 7). Na interação entre espécies vegetais e condição da planta, o padrão de preferência de insetos por plantas de maria-pretinha, tomate e *P. angulata* nesta ordem, continuou quando essas espécies vegetais estavam infectadas por ToCV (Figura 8). Para plantas sadias, no entanto, a quantidade de insetos em maria-pretinha e tomateiro foi semelhante. Comparando-se insetos entre plantas sadias e infectadas de uma mesma espécie vegetal, houve preferência pela planta infectada no caso de maria-pretinha e pela planta sadia no caso de tomateiro e *P. angulata* (Figura 8).

A interação tripla evidenciou a preferência de insetos virulíferos, em ordem decrescente, por plantas de maria-pretinha, tomateiro e *P. angulata*, independente de elas estarem ou não

infectadas (Tabela 7). No caso de insetos avirulíferos em plantas saudias, houve preferência por tomateiro em relação à maria-pretinha, mas não houve diferença entre as duas espécies vegetais quanto estas estavam infectadas pelo vírus. Em maria-pretinha, observou-se menor número de insetos avirulíferos em plantas infectadas do que em saudias, não havendo diferença entre demais combinações. Em tomateiro, a diferença ocorreu somente para insetos virulíferos em plantas infectadas, em que a quantidade foi menor. Para *P. angulata*, houve maior preferência de insetos avirulíferos por plantas saudias, enquanto que números semelhantes de virulíferos foram observados em plantas saudias e infectadas. (Tabela 7)

Figura 7. Preferência de adultos de *Bemisia tabaci* MEAM1 por diferentes espécies vegetais em função da presença de *Tomato chlorosis virus* nos insetos, após 2h e 24h da liberação. Médias de número de insetos com as mesmas letras (maiúsculas para comparação entre espécies vegetais e minúsculas para condição do inseto) não diferiram entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média (n=12).

Figura 8. Preferência de adultos de *Bemisia tabaci* MEAM1 por diferentes espécies vegetais hospedeiras em função da presença de *Tomato chlorosis virus* nas plantas, após 2h e 24h da liberação dos insetos. Médias de número de insetos com as mesmas letras (maiúsculas para comparação entre espécies vegetais e minúsculas para condição da planta) não diferiram entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média (n=12).

Tabela 7. Preferência de adultos de *Bemisia tabaci* MEAM1 por diferentes espécies vegetais em função da presença de *Tomato chlorosis virus* na planta e nos insetos, em diferentes tempos de avaliação

Local da planta	Número médio de insetos $\pm$ EPM			
	Plantas Infectadas		Plantas sadias	
	Inseto virulífero	Inseto avirulífero	Inseto virulífero	Inseto avirulífero
Avaliação 2h após liberação				
Maria Pretinha	44,8 $\pm$ 13,6 Aa ¹	21,2 $\pm$ 04,6 Bb	51,3 $\pm$ 10,7 Aa	17,4 $\pm$ 07,2 Bb
Tomate	17,4 $\pm$ 03,4 Bc	35,0 $\pm$ 11,7 Ab	45,9 $\pm$ 12,5 Aa	39,8 $\pm$ 16,4 Aab
<i>Physalis angulata</i>	10,2 $\pm$ 4,0 Ca	5,7 $\pm$ 02,8 Cb	6,0 $\pm$ 1,7 Bb	11,1 $\pm$ 05,2 Ca
Avaliação 24h após liberação				
Maria Pretinha	95,3 $\pm$ 19,0 Aab	85,1 $\pm$ 15,6 Ab	104,2 $\pm$ 16,8 Aa	58,2 $\pm$ 14,0 Bc
Tomate	52,0 $\pm$ 9,0 Bb	79,7 $\pm$ 21,5 Aa	84,8 $\pm$ 14,7 Ba	79,1 $\pm$ 22,7 Aa
<i>Physalis angulata</i>	25,7 $\pm$ 6,2 Cb	16,6 $\pm$ 4,7 Bc	28,9 $\pm$ 8,8 Cb	41,1 $\pm$ 12,2 Ca

¹Médias ($\pm$ EPM) (n=12) seguidas de letras iguais maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Para oviposição de *B. tabaci* MEAM1, verificaram-se efeitos altamente significativos individuais dos fatores espécie hospedeira e presença de ToCV no inseto, mas não de presença do vírus na planta, enquanto que todas as interações entre os fatores foram significativas (Tabela 1). A maior quantidade de ovos ocorreu em plantas de maria-pretinha ($324,7 \pm 51,0$), seguida de tomate ($219,3 \pm 34,1$) e por fim, *P. angulata* ($70,1 \pm 11,8$). Constatou-se que insetos virulíferos ovipositam mais ($232,3 \pm 32,4$) que insetos avirulíferos ($177,1 \pm 31,0$).

Nas interações dois a dois, entre espécie hospedeira e a presença de vírus nos insetos, o número de ovos foi decrescente em plantas de maria-pretinha, tomate e *P. angulata*, tanto para insetos virulíferos como para avirulíferos (Figura 9). Em tomateiro não há diferença em número de ovos entre insetos virulíferos e avirulíferos, enquanto que em maria-pretinha e *P. angulata*, há maior oviposição por insetos virulíferos (Figura 9). Espécie hospedeira interagindo com a presença no vírus na planta resultou na mesma ordem de oviposição, com números decrescentes de ovos na seguinte ordem: maria-pretinha, tomateiro e *P. angulata* (Figura 10). Entre plantas sadias e infectadas de uma mesma espécie, observou-se maior número de ovos em plantas infectadas para maria-pretinha, enquanto que em tomateiro e *P. angulata*, houve mais ovos em plantas sadias (Figura 10).

Na interação dos três fatores, a quantidade de ovos, independentemente das outras condições, foi maior em maria-pretinha, seguida pelo tomateiro, exceto na combinação entre plantas sadias e insetos virulíferos, na qual os valores foram os mesmos para estas duas espécies vegetais (Tabela 8). Em plantas de maria-pretinha, a oviposição foi maior por insetos virulíferos, sendo que em plantas infectadas houve maior quantidade que em plantas sadias. Entre os avirulíferos, também houve maior quantidade em plantas infectadas. Em tomateiro, a maior quantidade de ovos foi depositada por insetos virulíferos em plantas sadias, seguido por avirulíferos em plantas infectadas e sadias e, por fim, de insetos virulíferos em plantas infectadas. Em *P. angulata*, também houve maior quantidade de ovos colocados por insetos virulíferos em plantas sadias desta espécie; as menores quantidades foram de insetos avirulíferos em plantas infectadas (Tabela 8).

Figura 9. Preferência para oviposição de *Bemisia tabaci* MEAM1 em diferentes espécies vegetais em função da presença de *Tomato chlorosis virus* nos insetos. Médias de número de ovos com as mesmas letras (maiúsculas para comparação entre espécies vegetais e minúsculas para condição do inseto) não diferiram entre si pelo teste de Tukey, 5% de significância. Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média (n=12).

Figura 10. Preferência para oviposição de *Bemisia tabaci* MEAM1 em diferentes espécies vegetais em função da presença de *Tomato chlorosis virus* nas plantas. Médias de número de ovos com as mesmas letras (maiúsculas para comparação entre espécies vegetais e minúsculas para condição da planta) não diferiram entre si pelo teste de Tukey, 5% de significância. Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média (n=12).

Tabela 8. Preferência para oviposição de *Bemisia tabaci* MEAM1 em diferentes espécies vegetais em função da presença de *Tomato chlorosis virus* nas plantas e nos insetos

Espécie Hospedeira	Número médio de ovos $\pm$ EPM			
	Plantas Infectadas		Plantas mock	
	Inseto virulífero	Inseto avirulífero	Inseto virulífero	Inseto avirulífero
Maria Pretinha	406,3 $\pm$ 96,8 Aa	329,7 $\pm$ 138,7 Ac	369,6 $\pm$ 97,8 Ab	193,1 $\pm$ 63,0 Ad
Tomate	105,8 $\pm$ 19,1 Bd	265,1 $\pm$ 79,5 Bb	344,4 $\pm$ 93,7 Aa	161,8 $\pm$ 36,2 Bc
<i>Physalis angulata</i>	77,2 $\pm$ 29,4 Cb	38,9 $\pm$ 18,9 Cc	90,2 $\pm$ 25,1 Ba	73,8 $\pm$ 19,4 Cb

¹Médias ($\pm$ EPM) (n=12) seguidas de letras iguais maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

4.3. Eficiência de transmissão de ToCV para tomateiro utilizando-se diferentes espécies vegetais como fontes de inóculo

Não houve diferenças estatísticas significativas ($F = 0,043$; G.L. = 2; $P = 0,958$) na eficiência de transmissão do vírus por *B. tabaci*, medida pelo percentual médio de plantas-teste de tomate infectadas, em função da utilização de diferentes espécies vegetais como fonte de inóculo para aquisição MEAM1 (Tabela 9).

Tabela 9. Eficiência de transmissão de *Tomato chlorosis virus* por *Bemisia tabaci* MEAM1 após aquisição em diferentes espécies vegetais

Planta fonte	Proporção de plantas infectadas (%) ¹ por repetição				Média (%)
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	
Tomate	3/10 (30)	3/9 (33,3)	3/11 (27,3)	8/10 (80)	42,5%
Maria-pretinha	3/11 (27,3)	4/7 (57,1)	4/11 (36,4)	5/10 (50)	41,0%
<i>Physalis angulata</i>	1/10 (10)	5/9 (55,5)	5/11 (45,4)	5/10 (50)	40,0%

¹Proporção de plantas infectadas sobre o total de plantas inoculadas (e percentuais entre parêntesis) em quatro repetições do experimento. Em cada repetição, insetos foram submetidos a um período de acesso à aquisição do vírus de 24h nas folhas e em seguida submetidos a um período de acesso à inoculação de 24h em plantas sadias de tomate (10 insetos/planta)

5. DISCUSSÃO

O processo de transmissão de fitopatógenos por insetos sugadores inicia-se com escolha da planta hospedeira por insetos vetores que, de maneira geral, é constituído por diversas etapas que dependem principalmente pistas olfativas e visuais (Mauck, 2012). Sabe-se que a orientação durante o processo de escolha da planta hospedeira pode ser alterada devido à presença do patógeno (Mauck et al., 2012, Eigendrode et al, 2018), aumentando o potencial de dispersão através de efeitos sobre seu hospedeiro, alteração da composição de voláteis e coloração, por exemplo (Pereira, 2016, Fereres et al., 2016) e sobre o inseto vetor, podendo alterar sua performance, como por exemplo em aspectos de desenvolvimento, reprodução e sobrevivência (Costa et al., 1991, Guo et al., 2012, Jiu et al., 2007).

Na avaliação de preferência para pouso em diferentes partes de plantas de tomateiro, observou-se que o ápice foi o local com maior número de indivíduos virulíferos de *B. tabaci* MEAM1, seguido do terço médio e, finalmente, da parte inferior, em todos os fatores avaliados e em também, quando houve interações entre eles.

A preferência de *B. tabaci* e algumas outras espécies de moscas-brancas por folhas jovens tem sido relatada em diversos trabalhos realizados em diferentes espécies de plantas (Gameel 1974, Ohnesorge et al. 1980, van Lenteren & Noldus 1990, Campos et al., 2005, Walker & Zareh 1990, Nodul et al. 1986). A preferência dos insetos por tecidos mais jovens tem sido relacionada à qualidade nutricional que varia entre folhas de diferentes idades. Por exemplo, Nodul et al. (1986) constataram que o teor de nitrogênio das folhas velhas é significativamente menor do que nas folhas jovens de algodão, além de observarem que houve preferência de indivíduos de *T. vaporariorum* pelas folhas novas. Os autores concluem que se abrigar nas folhas mais altas pode resultar em uma maior aptidão geral (sobrevivência, quantidade e qualidade da prole), além disso, estas são as folhas que permanecerão em bom estado por mais tempo para permitir o desenvolvimento dos indivíduos.

Ademais, Van Lenteren & Noldus (1990), realizaram trabalho com a espécie *T. vaporariorum*, e destacaram o fato de que a oviposição ocorre predominantemente em folhas jovens, as quais passam a ser parte do terço médio da planta após cerca de três semanas, o tempo aproximado para os insetos adultos emergirem.

Os dados de oviposição seguiram o mesmo modelo dos de preferência para pouso, sendo que insetos virulíferos apresentaram maior fecundidade, colocando mais ovos em ápice

e terço médio de plantas, havendo interação com a condição da planta, ou seja, maior número de ovos contabilizados em plantas infectadas. A preferência por folhas do ápice pode estar relacionada à presença de folhas mais jovens nesses locais, como foi observado por Ohnesorge et al. (1981) quando monitoraram o desenvolvimento de plantas de tomateiro no campo, acompanhando a presença de diferentes fases de *B. tabaci*, e constataram que houve uma propensão para oviposição em plantas jovens.

O experimento de eficiência de transmissão utilizando-se folhas de diferentes regiões das plantas como fontes de inóculo e a quantificação de RNA viral foram realizados com a finalidade de complementar os dados de preferência por diferentes partes da planta e também para orientar os experimentos de influência de sintomas.

Ng e Falk (2006) estudaram a eficiência de transmissão do crinivirus *Lettuce infectious yellows* por *B. tabaci* utilizando LIYV, purificados de plantas infectadas e diluídos em série e resuspendidos em meio dietético artificial, para aquisição por insetos de *B. tabaci* aprisionados em uma gaiola de alimentação e posterior transferência para inoculação em plantas teste. Os autores observaram que a eficiência de transmissão está correlacionada com a concentração do vírus no momento da aquisição. Os dados do presente trabalho, contudo, não concordam com a condição de maior eficiência de transmissão segundo o título viral. Por outro lado, Orfanidou et al. (2016) e Wintermantel et al. (2016), também constataram casos nos quais a eficiência de transmissão foi similar quando foram usadas como fontes de inóculo plantas da mesma espécie cujos títulos virais que diferiram significativamente.

A preferência para pouso de *B. tabaci* MEAM1 em diferentes partes da planta de tomateiro parece ser pouco influenciada pela infecção da planta por ToCV; somente foram observadas diferenças após 24 horas, no número de insetos pousados no terço médio das plantas e, nas avaliações após 2 horas, não foram observadas diferenças nos números de insetos pousadas em cada parte da planta, em função da presença de ToCV nas plantas, para uma mesma condição do inseto.

Em relação à preferência de pouso em plantas sadias e infectadas sintomáticas ou não, sintomas de vírus são considerados fatores que contribuem para a atração visual dos insetos vetores para promover sua disseminação e mudanças induzidas na coloração das plantas como o amarelecimento podem aumentar a atratividade visual (Mauck et al., 2012). Estudos têm demonstrado que os vírus de plantas podem manipular direta ou indiretamente o comportamento do inseto vetor de forma a aumentar a sua transmissão, assim plantas infectadas podem se mostrar mais atraentes para os vetores, os quais após adquirir o vírus, podem preferir plantas sadias. Esse é o caso do vírus BYDV e seu vetor, o afídeo *Rhopalosiphum padi*, em plantas de

trigo, e do vírus PLRV e seu vetor, *Myzus persicae*, em plantas de batata (Ingwell et al. 2012, Rajabaskar et al. 2014).

Neste estudo, contudo, a presença de sintomas nas plantas não foi fator que influenciou, isoladamente, a colonização das plantas de tomateiros. Novamente, confirmando resultados observados nos experimentos de preferência por diferentes locais da planta, insetos virulíferos pousaram em maiores números nas plantas. A presença de sintomas parece ser um fator determinante apenas nas primeiras horas, tendo em vista que indivíduos de *B. tabaci* MEAM1 virulíferos preferiram plantas sintomáticas apenas na avaliação de 2 horas, ao passo que passadas 24 horas já não havia diferenças significativas.

Estudos feitos por Maluta et al. (2017) com indivíduos de *B. tabaci* ToRSV virulíferos demonstraram que os insetos são mais atraídos por plantas saudáveis, favorecendo a transmissão do vírus. Segundo os mesmos autores as alterações observadas no comportamento de insetos de *B. tabaci* MEAM1 não parecem beneficiar a propagação de ToCV, já que insetos não avirulíferos, pousaram preferencialmente em plantas saudáveis, enquanto os insetos virulíferos pousaram em plantas saudáveis ou infectadas indistintamente. Levando-se em consideração que no presente estudo utilizaram-se apenas plantas infectadas, reafirma-se a importância do período de latência do vírus nas plantas. Insetos avirulíferos são evidentemente atraídos por plantas assintomáticas infectadas, então podem estar provavelmente contribuindo para a disseminação da doença, uma vez que poderiam adquirir o vírus de tais plantas.

Considerando-se os fatores de forma isolada, insetos virulíferos ovipositam mais que os avirulíferos, confirmando observações de outros experimentos e, considerando apenas a presença ou não de sintomas, mais ovos são observados em plantas assintomáticas. Pode-se analisar de forma conjunta esses resultados com os observados nos testes de preferência por diferentes locais da planta. Em plantas infectadas, folhas do ápice, mais novas, tendem a se apresentar assintomáticas. Dessa forma, esses dois fatores combinados, a ausência de sintomas e a maior colonização de folhas do ápice, podem favorecer o pouso de indivíduos de *B. tabaci* MEAM1 em plantas infectadas por ToCV. Conforme se verificou que a eficiência de transmissão de ToCV não é afetada pela expressão de sintomas ou concentração viral, folhas do ápice, assintomáticas e preferidas pelos insetos, se mostram como locais mais importantes para aquisição do vírus pelos insetos.

Plantas infectadas, porém, assintomáticas, podem agir como importantes fontes de inóculo, principalmente quando se observa a preferência do inseto por essa condição. Favara (2017), em estudo com infecções simples e mista de ToCV e ToSRV, observou diferenças importantes na duração dos períodos de incubação e latência destes vírus em tomateiro.

Segundo este autor, o período latente de ToSRV é, em média, 11 dias mais curto que o período de incubação, enquanto que para ToCV esse tempo é de 17 dias, em média.

Garcia-Gonzalez (2016), para entender melhor sobre efeitos do fitoplasma maize bushy stunt phytoplasma (MBSP) no comportamento de insetos, avaliou a preferência de *Dalbulus maidis*, a cigarrinha-do-milho por plantas de milho infectadas ou sadias. O autor observou que insetos preferiram plantas infectadas por MBSP na fase assintomática e rejeitou plantas com sintomas avançados. Além disso, observou que o inseto vetor adquiriu o patógeno em plantas assintomáticas a partir de 3 dias após a inoculação e a eficiência de transmissão aumentou após 14 dias de incubação do patógeno, sugerindo que o MBSP influencia a preferência do vetor para plantas infectadas no estágio inicial da cultura para permitir sua rápida disseminação.

Calaça (2011) constatou que infecções primárias são predominantes com forte efeito de bordos nos padrões temporal e espacial da doença causada por ToCV, atribuindo isto a fontes de inóculo externas à lavoura. No Brasil, a prevalência e importância das infecções primárias para a disseminação de begomovirus foi relatada também por Della Vecchia et al., (2007), Barbosa et al. (2016) e Macedo et al., (2017), os quais estudaram a dinâmica temporal e espacial das doenças de tomateiro causada pelos begomovírus *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), ambos transmitidos por *B. tabaci* biótipo B de maneira persistente circulativa.

A identificação de fontes de inóculo primárias na epidemiologia ToCV em cultivos tomate, em regiões em que há migração constante de insetos transportando o vírus, continua sendo especulativa. O presente estudo visa elucidar a importância relativa de plantas daninhas, especificamente maria-pretinha e *P. angulata* como fontes de inóculo do ToCV, espécies que já foram encontradas infectadas naturalmente com ToCV no Brasil (Fonseca et al., 2013) e, além de serem plantas de ocorrência frequente em quase todo o território brasileiro (LORENZI, 2006) são comumente encontradas em campos de produção de tomate.

Os resultados obtidos das análises dos fatores individualizados nos ensaios de preferência de pouso em diferentes hospedeiras do ToCV, mostraram que entre as espécies hospedeiras, a preferência para pouso em maria-pretinha e tomate é muito semelhante, enquanto para *P. angulata* é menor. É interessante notar que as interações das espécies hospedeira com os fatores presença do vírus no inseto ou na planta alteraram os padrões de colonização do inseto. Houve variabilidade nas interações entre os tratamentos, dependendo da espécie hospedeira e da presença dos vírus nas plantas ou nos insetos. Para plantas de maria-pretinha, quando sadias, houve maior quantidade de insetos virulíferos pousados e, quando infectadas, o

comportamento inicial foi de preferência por insetos virulíferos, mas após 24h, a condição dos insetos já não apresentou diferenças. Além disso, a oviposição, independente se as plantas estavam sadias ou infectadas, foi maior por insetos virulíferos. Sendo assim, pode-se notar que a espécie é de grande importância na disseminação do vírus.

P. angulata, mesmo que seja uma espécie não preferida entre as testadas, apresentou mais insetos virulíferos em plantas infectadas e avirulíferos em plantas sadias. A oviposição também foi maior por insetos virulíferos.

De maneira geral, a oviposição dos insetos indicou a preferência por maria-pretinha, que diferiu de tomateiro e não preferência por *P. angulata*, nas quais foram contabilizados menores números de ovos. Resultados similares em termos de oviposição foram encontrados no trabalho feito por Esquivel (2015) em experimentos com chance de escolha, com médias de 3,5; 2,7 e 1,9 ovos/cm² para maria-pretinha, tomate e *P. angulata*, respectivamente. A preferência do inseto para oviposição em relação à planta hospedeira podem ser influenciadas por características físicas das superfícies das folhas, como pilosidade, cor e forma, microclima da folha, além da presença de tricomas glandulares, além das características químicas internas da folha, como o pH da seiva, por exemplo (Berlinger, 1986).

Maria-pretinha tem sido encontrada infectada naturalmente com begomovirus na Espanha (Bedford et al., 1998, García-Andrés et al., 2006). A espécie já foi encontrada infectada com o ToCV nos campos de tomateiro amostrados na Coreia, Arábia Saudita, Costa Rica, na Espanha e no Brasil. (Kil et al., 2015, Shakeel et al., 2017, Font 2014, Arruabarrena et al., 2015). Ademais, estudos mostraram a preferência de moscas-brancas nesta espécie em relação a outras ervas daninhas comuns. Muñiz et al. (2000) em experimentos de escolha com plantas daninhas, os biótipos B e Q preferiram *Datura stramonium* L. e *Solanum nigrum* L. a *Amaranthus retroflexus* L., *Chenopodium album* L. e *Echinochloa crus-galli* L.

P. agulata, foi a primeira espécie de planta de vegetação espontânea encontrada infectada naturalmente com o ToCV no Brasil e autores mencionaram o fato de que as plantas apresentaram altas populações de moscas-brancas (Fonseca et al., 2013). No Panamá, Zachrisson et al. (2017) encontraram 16 espécies agrupadas em 11 famílias, que foram amostradas e coletadas em áreas adjacentes às parcelas de produção de tomate, sendo uma das maiores incidências de ovos e ninfas, encontrada em *P. angulata*.

Diferenças significativas na eficiência de transmissão do ToCV por *B. tabaci* Biótipo Q a partir de ervas daninhas foram encontraram por Orfanidou et al. (2016). Sendo o tomate a fonte mais eficiente, seguido por *Solanum nigrum* atingindo 96%, seguido de *Sonchus oleraceus* (86%), *A. retroflexus* (68%) e *C. album* (56%). Os autores concluíram que a

preferência do vetor foi o principal fator que influenciou na aquisição do vírus afetando a posterior transmissão, uma vez que foram utilizadas como fontes para aquisição dos vírus, plantas com título viral.

Em estudo feito com o crinivirus *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) e de *B. tabaci* Biótipo B, foi avaliada a importância de ervas daninhas hospedeiras do vírus e observou-se que a eficiência de transmissão variou significativamente entre elas, sendo que espécies de cucurbitáceas foram fontes mais eficientes para aquisição de vírus do que espécies não-cucurbitáceas (Wintermantel et al., 2016). No entanto, em trabalhos com o isolado brasileiro do ToCV, Esquivel (2015) não encontrou diferenças na eficiência de transmissão entre o tomateiro, maria-pretinha e *P. angulata* quando a transmissão foi feita pelo confinamento de insetos sem chance de escolha tanto para aquisição e inoculação, dados que concordam com o presente trabalho.

A presença de ToCV nas plantas e/ou no inseto pode alterar as preferências de *B. tabaci*, provocando implicações na epidemiologia da doença e na performance das diferentes espécies de *B. tabaci*. Shi et al. (2018) observaram que indivíduos avirulíferos de *B. tabaci* MED e MEAM1 preferem plantas de tomate infectadas por ToCV, mas quando os insetos são virulíferos, MED prefere plantas saudáveis, enquanto MEAM1 não apresenta diferenças entre plantas saudáveis ou infectadas. Além disso, indivíduos avirulíferos de MED apresentam maior fecundidade em tomateiros infectados por ToCV, enquanto MEAM1 não apresentou diferenças entre plantas saudáveis e infectadas. Neste estudo, em função da espécie hospedeira, houve diferenças na fecundidade de *B. tabaci* MEAM1. Enquanto que os insetos ovipositaram em mais em plantas maria-pretinha infectadas por ToCV, em comparação com saudáveis, quando considerado tomateiro observou-se comportamento oposto, com maior número de ovos em plantas saudáveis.

Considerando-se a condição do inseto, nota-se que maria-pretinha é uma espécie hospedeira de *B. tabaci* MEAM1 importante, principalmente para os indivíduos virulíferos, o que pode significar que esta espécie tenha papel importante como reservatório de ToCV, uma vez que os insetos virulíferos que migram para novas áreas, possivelmente, colonizam plantas desta espécie, quando estas se encontram nas proximidades de plantios de tomate. A maior fecundidade de insetos virulíferos em nesta hospedeira reforça o papel desta planta como importante no processo de disseminação de ToCV.

A migração constante de vetores virulíferos nas plantações de tomate requer o estabelecimento de um manejo integrado em escala regional, como proposto por Macedo et al. (2016), é necessário reduzir as fontes externas de inóculo, das quais os insetos virulíferos são

originários, antes de iniciar novas plantações, conforme proposto por Barbosa et al. (2011, 2016). Adicionalmente, o estabelecimento de um período de vazio sanitário, como recomendado por Inoue-Nagata et al. (2016b) e Barbosa et al. (2016), pode também contribuir para a redução da população de vetores.

Orfanidou (2016) testou espécies de plantas daninhas (*Solanum nigrum*, *Sonchus oleraceus*, *Amaranthus retroflexus* e *Chenopodium album*) como fontes de ToCV em experimentos de transmissão por *B. tabaci* biótipo Q e constatou que todas as espécies serviram como fonte de inóculo, mesmo que nenhuma delas tenha sido tão eficiente quanto o tomate. Entretanto, a epidemiologia da doença pode variar segundo a diferença das condições em que se encontram e também segundo as espécies de insetos vetores. Sabe-se que no Brasil, as mesmas espécies de plantas serviram como boas fontes para aquisição de ToCV quando houve confinamento do vetor, mesmo que as taxas de oviposição tenham sido baixas, o que sugere a não preferência para colonização (Esquivel, 2015). O presente estudo explora o potencial de duas diferentes espécies de plantas daninhas de ocorrência contínua em campo como fontes de inóculo para a doença.

Por outro lado, insetos ToCV-virulíferos foram encontrados em maior quantidade nas plantas e ovipositaram em todos os experimentos avaliados, sugerindo uma alteração no comportamento do vetor causada pelo vírus, com exceção apenas para o tomateiro, o qual é escolhido predominantemente por insetos avirulíferos e, ainda assim, igualando aos virulíferos em algumas condições. Kaur et al. (2017) demonstraram uma regulação diferencial de genes em insetos de *B. tabaci* MEAM 1 alimentadas com plantas de tomate infectadas com ToCV em comparação com moscas-brancas alimentadas com tomates não infectados, o que poderia explicar dita alteração no comportamento dos insetos ToCV-virulíferos.

No presente trabalho, pode-se considerar que houve efeitos dos vírus sobre o comportamento do inseto em todos os experimentos executados. É importante ressaltar que tais efeitos são provavelmente indiretos, uma vez que, embora tenham sido utilizados insetos virulíferos, tal condição foi alcançada pela alimentação durante 48h em folhas de plantas infectadas para os testes de preferência. Para verificar a ocorrência de efeito direto do vírus sobre o inseto, sugere-se que novos estudos utilizem a aquisição *in vitro* (em dieta artificial) de vírus purificado, evitando-se assim, a exposição dos insetos a plantas infectadas pelo vírus. E por fim, mesmo que os insetos muitas vezes não prefiram algum tecido (folha mais antiga, sintomática) ou espécie de planta como *P. angulata*, não se deve descartar o potencial desses elementos na disseminação pois são fontes de inóculo tão adequadas quanto as outras.

6. CONCLUSÕES

- O terço apical das plantas de tomate é o local preferido por *Bemisia tabaci* MEAM1 para pouso e oviposição, independentemente da presença do *Tomato chlorosis virus* (ToCV) nas plantas ou nos insetos.
- A concentração de ToCV é maior no terço médio da planta de tomate, seguido dos terços apical e basal, mas a eficiência de transmissão por *B. tabaci* não varia quando este vetor adquire em folhas de diferentes partes da planta.
- Adultos avirulíferos preferem pousar e colocar mais ovos em folhas de tomateiro assintomáticas (em fase latente da infecção por ToCV) do que em folhas sintomáticas.
- Adultos virulíferos não discriminam entre folhas com ou sem sintomas. Insetos virulíferos ovipositam mais que os os avirulíferos, independentemente da presença de sintomas de ToCV nas folhas.
- A preferência de *B. tabaci* MEAM1 por diferentes espécies vegetais é influenciada pela infecção por ToCV e exposição prévia dos insetos a tomateiro infectado pelo vírus.
- Insetos virulíferos preferem, em ordem decrescente, pousar em maria-pretinha, tomateiro e *Physalis angulata*, independentemente de estarem ou não infectadas por ToCV.
- Insetos avirulíferos preferem tomateiro em relação à maria-pretinha no caso de plantas sadias, mas não exibem diferenças em preferência entre as duas espécies quando infectadas pelo vírus.
- A eficiência de transmissão de ToCV para tomateiro quando utilizadas maria-pretinha, tomate e *Physalis angulata* como fontes de inóculo foi a mesma, ou seja, as três espécies são fontes com mesmo potencial para aquisição e transmissão do vírus.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, L. C.; VILLANUEVA, F.; RESENDE, R. O.; NAVAS-CASTILLO, J.; BARBOSA, C.; INOUE-NAGATA, A. K. Molecular characterization reveals Brazilian *Tomato chlorosis virus* to be closely related to a Greek isolate. *Tropical Plant Pathology*, Brasília, v. 38, n. 4, p. 332–336, 2013.
- ALEMANDRI, V.; MARTINO, J. A.; DI FEO, L.; TRUOL, G. Indigenous and introduced species of the *Bemisia tabaci* complex in sweet potato crops from Argentina. *Agriscientia*, v. 31, n. 2, p. 103-107, 2014.
- ARRUABARRENA, A.; RUBIO L.; GONZÁLEZ-ARCOS, M.; SÁNCHEZ CAMPOS, S.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S. First report of *Solanum sisymbriifolium* and *S. americanum* as a natural weed Hosts of *Tomato chlorosis virus* (genus Crinivirus) in South America. *Plant disease*, v. 99, p. 895-895, 2015.
- BARBOSA, J. C.; TEIXEIRA, A. P. M.; MOREIRA, A. G.; CAMARGO, L. E. A.; BERGAMIN FILHO, A.; KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A. M. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Brazil. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 92, n. 12, p. 1709, 2008.
- BARBOSA, J.C.; TEIXEIRA, L. D. D.; REZENDE, J. A. M. First report on the susceptibility of sweet pepper crops to *Tomato chlorosis virus* in Brazil. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 94, n. 3, p. 374, 2010.
- BARBOSA, J. C.; COSTA, H.; GIORIA, R.; REZENDE, J. A. M. Occurrence of *Tomato chlorosis virus* in tomato crops in five Brazilian states. *Tropical Plant Pathology*, Brasília, v. 36, n. 4, p. 256–258, 2011.
- BARBOSA, L. F.; YUKI, V. A.; MARUBAYASHI, J. M.; DE MARCHI, B. R.; PAVAN, M. A.; BARROS, D. R.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. KRAUSE-SAKATE, R. First report of *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. *Pest Management Science*, v. 71, p. 501-504, 2014.
- BARBOSA, J. C., REZENDE, J. A., & AMORIM, L. Temporal dynamics of *Tomato severe rugose virus* and *Bemisia tabaci* in tomato fields in São Paulo, Brazil. *Journal of Phytopathology*, v. 164, n. 1, p. 1-10. 2016.
- BEDFORD, I. D.; KELLY, A.; BANKS, G. K.; BRIDDON, R. W.; CENIS, J. L.; MARKHAM, P. G. *Solanum nigrum*: an indigenous weed reservoir for a tomato yellow leaf curl geminivirus in southern Spain. *European Journal of Plant Pathology*, v. 104, p. 221-222, 1998.

- BELINGER, M. J. Host plant resistance to *Bemisia tabaci*. Agriculture, Ecosystems and Environment, v. 17, p. 69-82, 1986.
- BLUA, M. J.; PERRING, M. T. Alate Production and Population Increase of Aphid Vectors on Virus-Infected Host Plants. Oecologia, v.92, p. 65-70, 1992.
- BOITEUX, L. S.; FONSECA, M. E. N.; REIS, A.; COSTA, A. F. Wild Radish (*Raphanus* spp.) and Garden Rocket (*Eruca sativa*) as New Brassicaceae Hosts of *Tomato chlorosis virus* in South America. Plant disease, v. 100, p. 1027, 2016.
- 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.
- BROWN, J. K., FROHLICH, D. R., ROSELL, R. C. The sweet potato or silver leaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* (Genn.), or a species complex? Annual Review of Entomology, v. 40, p. 511–534, 1995.
- 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.
- CALAÇA, H. A. Dinâmica temporal e espacial da virose causada por *Tomato chlorosis virus* (ToCV) em tomateiro. 123 p. Tese (Doutorado em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- CAMPOS, Z. R.; BOICA JR., A. L.; LOUREÇÃO, A. L.; CAMPOS, A. R. Fatores que afetam a oviposição de *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) na cultura algodoeira. Neotropical Entomology, v. 34, n. 5, p. 823-827, 2005.
- CHERMENSKAYA, T. D.; PETROVA, M. O.; SVELIEVA, E. I. Laboratory and field evaluation of biological active substances of plant origin against greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* Westw (Homoptera: Aleyrodidae). Archives of Phytopathology Plant Protection, v.42, n. 9, p. 864-873, 2009.
- CHOWDA-REDDY, R. V.; KIRANKUMAR, M.; SEAL, S. E.; MUNIYAPPA, V.; VALAND, G. B.; GOVINDAPPAJ. M. R.; COLVIN, J. *Bemisia tabaci* phylogenetic groups in India and the relative transmission efficacy of *Tomato leaf curl Bangalore virus* by an indigenous and an exotic population. Journal of Integrative Agriculture, v. 11, p. 235–248, 2012.
- CHU, D.; WAN, F.H.; ZHANG, Y.J.; BROWN, J.K. Change in the biotype composition of *Bemisia tabaci* in Shandong Province of China from 2005 to 2008. Environmental entomology, v. 39, n. 3, p. 1028–36, 2010.

- DE BARRO, P. J. et al. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. Annual review of entomology, v. 56, p. 1–19, 2011.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA miniprep: version II. Plant Molecular Biology Reporter, v. 1, p. 19-21, 1983.
- DELLA-VECCHIA, M. G. S.; ROSA, D. D.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; REZENDE J. A. M.; RIBEIRO, A. Dinâmica temporal e espacial da begomovirose causada por *Tomato yellow vein streak virus* em tomateiro na região de Campinas-SP. Summa Phytopathologica, v. 33, p. 388–395, 2007.
- DENNEHY, T. J. et al. Extraordinary resistance to insecticides reveals exotic Q biotype of *Bemisia tabaci* in the new world. Journal of Economic Entomology, v. 103, n. 6, p. 2174–2186, 2010.
- DINSDALE, A.; COOK, L.; RIGINOS, C.; BUCKLEY, Y. M.; BARRO, P. D. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. Annals of Entomological Society of America, v. 103, p. 196–208, 2010.
- DE MARCHI, B.R. Associação de begomovírus e crinivírus com *Bemisia tabaci* espécie New World 2 e *Trialeurodes vaporariorum*. 71 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2014.
- EIGENBRODE, S. D., BOSQUE-PÉREZ, N., DAVIS, T. S. Insect-borne plant pathogens and their vectors: Ecology, Evolution, and Complex Interactions. Annual Review of Entomology, v. 63, p. 169-191, 2018.
- ELBAZ, M., N. LAHAV, S. MORIN. Evidence for prezygotic reproductive barrier between the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci*. Bulletin of Entomological Research, v. 100, p. 581 - 590, 2010.
- ESQUIVEL, F. A. Identificação de hospedeiros alternativos do *Tomato chlorosis virus*. 49 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.
- ESTERHUIZEN, L. L.; MABASA, K. G.; van HEERDEN, S. W.; CZOSNEK, H.; BROWN, J. K.; van HEERDEN, H.; REY, M. E. C. Genetic identification of members of the *Bemisia tabaci* cryptic species complex from South Africa reveals native and introduced haplotypes. Journal of Applied Entomology, v. 137, p. 122–135, 2013.
- EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION - EPPO. *Bemisia tabaci*. EPPO Bulletin, v. 34, n. 1, p. 281–288, 2004.

- EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. Data sheets on quarantine pests - *Tomato chlorosis crinivirus*. Bulletin OEPP/EPPO, n. 35, p. 439–441, 2005.
- EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION PM 7/118 (1) - *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus*. Bulletin OEPP/EPPO, n.3, p. 462–4, 2013.
- FERERES, A.; MORENO, A. Behavioral 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.
- FIRDAUS, S.; VOSMAN, B.; HIDAYATI, N., SUPENA, E. D. J.; VISSER, R. G. F., HEUSDEN, A. W. V. The *Bemisia tabaci* species complex: Additions from different parts of the world. *Insect Science*, v. 20, n. 6, p. 723-733, 2013.
- FONSECA, M. E. N., BOITEUX, L. S., ABREU, H., NOGUEIRA, I., & PEREIRA-CARVALHO, R. C. *Physalis angulata*: a new natural host of Tomato chlorosis virus in Brazil. *Plant Disease*, v. 97, n. 5, p. 692-692, 2013.
- FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, S. L.; LIMA, M. F., MENDONÇA, J. L.; COSTA, A. F.; FONTES, M. G., COSTA, H.; GONZÁLEZ-ARCOS, M. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting eggplant and scarlet eggplant in Brazil. *Plant Disease*, v. 100, p. 867, 2015.
- FONT. M.I.; JUAREZ M.; MARTINEX, O.; JORDA, C. Current status and newly discovered natural hosts of *Tomato infectious chlorosis virus* and *Tomato Chlorosis virus* in Spain. *Plant disease*, v. 88, p. 92, 2002.
- FORTES, I. M.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. *Tomato chlorosis virus* in pepper: prevalence in commercial crops in southeastern Spain and symptomatology under experimental conditions. *Plant Pathology*, v. 61, n. 5, p. 994–1001, 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. 74 p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 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*, Saint Paul, v. 96, n. 4, p. 593, 2012.

- GAMEEL, O. I. Some aspects of the mating and oviposition behaviour of the cotton whitefly *Bemisia tabaci* (Genn.). Rev. Zoo!. Afr, v. 88, n. 4, p. 784-788, 1974.
- GARCÍA-ANDRÉS, S., MONCI, F., NAVAS-CASTILLO, J., & MORIONES, E. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. Virology, v. 350, n. 2, p. 433-442, 2006.
- GARCÍA-CANO, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. Resistance to *Tomato chlorosis virus* in wild tomato species that impair virus accumulation and disease symptom expression. Phytopathology, v. 100, n. 6, p. 582-592, 2010.
- GARCÍA GONZALEZ, J. Interactions of maize bushy stunt phytoplasma with the leafhopper vector, *Dalbulus maidis* (Delong and Wolcoll)(Hemiptera: Cicadellidae) and associated microbiota. 113p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2016.
- GENNADIUS, P. Disease of tobacco plantations in the Trikonía. The aleurodid of tobacco. Ellenike Georgia, v. 5, p. 1-3, 1889.
- GILBERTSON, R. L.; BATUMAN, O.; WEBSTER, C. G.; ADKINS S. Role of the insect supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. Annual Review of Virology, v. 2, p. 67-93, 2015.
- GOUVÊA, M. M. Efeito de inseticidas no controle das transmissões primária e secundária do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) para tomateiro por *Bemisia tabaci* biótipo B. 62 p. Tese (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2015.
- HENNEBERRY, T. J.; CASTLE, S. J. *Bemisia*: Pest status, economics, biology and population dynamics. In Harris K., Smith O. P, Duffus J. E., eds., Virus-Insect-plant Interactions, p. 247-278. Academic Press, New York, 2001
- HU, J.; DE BARRO, P.; ZHAO H.; WANG, J.; NARDI, F; et al. An extensive field survey combined with a phylogenetic analysis reveals rapid and widespread invasion of two alien whiteflies in China. PLoS ONE, v. 6:, e16061, 2011.
- HULL, R. Matthew’s plant virology. Elsevier Academic Press, 4th ed. San Diego, California, 2004.
- INGWELL, L. L.; EIGENBRODE, S. D.; BOSQUE-PÉREZ, N. A. Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. Science Report, v. 2, p. 1-6, 2012.
- INOUE-NAGATA, A. K.; ÁVILA, A. C.; VILLAS BOAS, G. L. Os geminivirus em sistema de produção integrada de tomate indústria. Embrapa hortaliças, Brasília, 12 p, 2009.

- INOUE-NAGATA, A. K.; CARVAHO, M. C.; ZERBINI, F. M.; REZENDE, J. A. M.; SAKATE, R. K.; NAGATA, T. Vírus transmitidos por moscas-brancas no Brasil: vetores, principais doenças e manejo. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 24, p. 7-29, 2016.
- JONES, D. R. Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology*, v. 109, p. 195–219, 2003.
- KARASEV, A. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annual Review of Phytopathology*, v. 38, p. 293–324, 2000.
- KAUR, N., CHEN, W., ZHENG, Y., HASEGAWA, D. K., LING, K. S., FEI, Z., WINTERMANTEL, W. M. Transcriptome analysis of the whitefly, *Bemisia tabaci* MEAM1 during feeding on tomato infected with the crinivirus, Tomato chlorosis virus, identifies a temporal shift in gene expression and differential regulation of novel orphan genes. *BMC Genomics*, v. 18, n. 1, p. 370, 2017.
- KIL, E.; YE-JI LEE, Y.; CHO, S.; AUH, C.; KIM, D.; LEE, K.; KIM, M.; CHOI, H.; KIM, C.; Identification of natural weed hosts of in Korea by RT-PCR with root tissues. *European Journal of Plant Pathology*, v. 142, n. 2, p. 419-426, 2015.
- LIMA, C. S. A.; LARA, M. F.; DOS SANTOS, E. J. M. Morfologia da mosca branca , *Bemisia tabaci* biótipo “B” (Hemiptera: Aleyrodidae), encontrada em Jaboticabal, SP, com base em eletron-micrografias de varredura. *Boletim de Sanidade Vegetal Plagas*, v. 27, p. 315–322, 2001.
- LOWE, S.; BROWNE, M.; BOUDJELAS, S.; DE POORTER, M. 100 of the World’s Worst Invasive Alien Species A selection from the Global Invasive Species Database. 12p. 2004
- MACEDO, M. A., COSTA, T. M., BARBOSA, J. C., PEREIRA, J. L., MICHEREFF-FILHO, M., GILBERTSON, R. L., & BERGAMIN FILHO, A. Temporal and spatial dynamics of begomovirus disease in tomatoes in central Brazil. *Plant Pathology*, v. 66, n. 4, p. 529-538, 2016.
- 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.
- MALUTA, N. K. P. 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. 123 p. Tese (Doutorado em Ciências. Área de concentração:

- Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.
- MARTIM, J.H.; MIFSUD, D.; RAPISARDA, C. The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of Europe and the Mediterranean basin. *Bulletin of Entomological Research*. v. 90, p. 407-409, 2000.
- MARUBAYASHI, J. M.; YUKI, V. A.; WUTKE, E. B. Transmissão do *Cowpea mild mottle virus* pela mosca branca *Bemisia tabaci* biótipo B para plantas de feijão e soja. *Summa Phytopathologica*, v.36, p.158-160, 2010.
- MAUCK, K.; 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.
- MICHEREFF FILHO, M.; LIMA, M. F. Manejo da mosca-branca, de geminivirus e crinivirus na cultura da batata. Brasília, Embrapa Hortaliças, 12 p., 2016.
- MITTER, N.; KOUNDAL, V.; WILLIAMS, S.; PAPPU, H. Differential expression of *Tomato spotted wilt virus*-derived viral small RNAs in infected commercial and experimental host plants. *PLoS ONE*, v. 8, e76276, 2013.
- 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.
- MOUND, L.A. Studies in the olfaction and colour sensitivity of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *Entomol. Exp. Appl.*, v. 5, p. 99-104, 1962.
- MUÑIZ, M. Host suitability of two biotypes of *Bemisia tabaci* on some common weeds. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 95, n. 1, p. 63-70, 2000.
- NAVAS-CASTILLO, J.; CAMERO, R.; BUENO, M.; MORIONES, E. Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain associated with infections of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 84, n. 8, p. 835–837, 2000.
- NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 49, p. 219–248, 2011.
- NG, J. C. K.; FALK, B. W. Virus-vector interactions mediating non-persistent and semi-persistent transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v. 44, p.183-212, 2006.
- NOLDUS, L. P. J. J.; RUMEL, X.; VAN LENTEREN, J. C. The parasite-host relationship between *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera, Aphelinidae) and *Trialeurodes*

- vaporariorum* (Westwood)(Homoptera, Aleyrodidae) XIX. Feeding-site selection by the greenhouse whitefly. *Journal of Applied Entomology*, v. 101, p. 492-507, 1986..
- OHNESORGE, B.; SHARAF, N.; ALLAWI, T. Population studies on the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* Genn. (Homoptera; Aleyrodidae) during the winter season. I. The spatial distribution on some plants. *Z. Angew. Entomol.*, v. 90, p. 226-232, 1980.
- ORFANIDOU, C. G.; PAPPI, P. G.; EFTHIMIOU, K. E.; KATIS, N. I.; MALIOGKA, V. I. Transmission of *Tomato chlorosis virus* (ToCV) by *Bemisia tabaci* biotype Q and evaluation of four weed species as viral sources. *Plant Disease*, v. 100, n. 10, p. 2043-2049, 2016.
- 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.; CHU, D.; GE, D.; WANG, S.; WU, Q.; XIE, W.; JIAO, X.; LIU, B.; YANG, X.; YANG, N.; SU, Q.; XU, B.; ZHANG, Y. Further Spread of and Domination by *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Biotype Q on Field Crops in China. *Journal of Economic Entomology*, v. 104, n. 3, p. 978–985, 2011.
- PARRELLA, G.; SCASSILLO, L.; GIORGINI, M. Evidence for a new genetic variant in the *Bemisia tabaci* species complex and the prevalence of the biotype Q in southern Italy. *Journal of Pest Science*, v. 85, p. 227–238, 2012.
- PEREIRA, L. S. Interações *Bemisia tabaci* Biótipo B e *Tomato chlorosis virus* em clones de batata. 75 p. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical e subtropical, Área de concentração: Tecnologia da produção Agrícola) – Instituto Agrônômico de Pós-Graduação. Campinas, 2016.
- PERRING, T. M. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection*, v. 20, p. 725–737, 2001.
- RAJABASKAR, D.; BOSQUE-PEREZ, N. A.; EIGENBRODE, S. D. Preference by a virus vector for infected plants is reversed after virus acquisition. *Virus research*, v. 186, p. 32-37, 2014.
- RSTUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>. 2016
- SHAKEEL, M. T.; AL-SALEH, M. A.; AMER, M. A.; AL-SHAHWAN, I.M.; UMAR, M.; DIMOU, N.; ORFANIDOU, C.G.; ZAKRI, A. M.; KATIS, N.I. Molecular characterization and natural host range of *Tomato chlorosis virus* in Saudi Arabia. *J.Plant Pathol*, v. 99, p. 415-421, 2017.

- SHI, X.; TANG, X.; ZHANG, X.; ZHANG, D.; LI, F.; YAN, F.; ZHANG, Y.; ZHOU, X.; LIU, Y. Transmission efficiency, preference and behavior of *Bemisia tabaci* MEAM1 and MED under the influence of *Tomato Chlorosis Virus*. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, 2018.
- STAFFORD, C. A.; WALKER, G. P.; ULLMAN, D. E. Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior. *PNAS*, v. 108, n. 23, p. 9350-9355, 2011.
- SUN, D. B.; XU, J.; LUAN, J. B.; LIU, S. S. Reproductive incompatibility between the B and Q biotypes of the whitefly *Bemisia tabaci*: genetic and behavioural evidence. *Bulletin Entomological Research*, v. 101, p. 211 – 220, 2011.
- TANG, X.; SHI, X.; ZHANG, D.; LI, F.; YAN, F.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; ZHOU, X. Detection and epidemic dynamic of ToCV and CCYV with *Bemisia tabaci* and weed in Hainan of China. *Virology Journal*, v. 14, p. 2–8, 2017.
- TZANETAKIS, I. E.; MARTIN, R. R.; WINTERMANTEL, W. M. Epidemiology of criniviruses: an emerging problem in world agriculture. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, p. 119, 2013.
- VAN LENTEREN, J. V.; NOLDUS, L. P. J. J. Whitefly-plant relationships: behavioural and ecological aspects. In: GERLING, D. (Ed.). *Whiteflies: their bionomics, pest status and management*, p. 47-89, 1990.
- WALKER, G. P.; ZAREH, N. Leaf age preference for opposition by three species of whitefly on lemon. *Entomologia experimentalis et applicata*, v. 56, n. 1, p. 31-45, 1990.
- WANG, P.; SUN, D. B.; QIU, B. L.; LIU, S. S. The presence of six putative species of the whitefly *Bemisia tabaci* complex in China as revealed by crossing experiments. *Insect Science*, v. 18, p. 67–77, 2011.
- WATANABE, L. F. M.; BELLO, V. H.; DE MARCHI, B. R.; SARTORI, M. M. P.; PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R. Performance of *Bemisia tabaci* MEAM1 and *Trialeurodes vaporariorum* on *Tomato chlorosis virus* (ToCV) infested plants. *Journal of Applied Entomology*, p.1 – 8. 2018.
- WINTERMANTEL, W. M.; GILBERTSON, R. L.; MCCREIGHT, J. D.; & NATWICK, E. T. Host-specific relationship between virus titer and whitefly transmission of Cucurbit yellow stunting disorder virus. *Plant Disease*, v. 100, n. 1, p. 92-98, 2016.
- WINTERMANTEL, W. M.; WISLER, G. C. Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 90, n. 6, p. 814–819, 2006.
- WISLER, G. C.; DUFFUS, J. E. Transmission properties of whitefly-borne criniviruses and their impact on virus epidemiology. In: HARRIS, K.F.; SMITH, O.P.; DUFFUS, J.E. (Ed.). *Virus-insect-plant interactions*. San Diego, Academic Press, p. 293–308, 2001.

- WISLER, G. C.; LO, R. H.; LIU, H. Y.; LOWRY, D. S.; DUFFUS, J. E. *Tomato chlorosis virus*: A new whitefly-transmitted, phloem limited, bipartite closteovirus of tomato. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 88, p. 402-409, 1998.
- XU, J.; LIU, S. S.; DE BARRO, P. Reproductive incompatibility among genetic groups of *Bemisia tabaci* supports the proposition that the whitefly is a cryptic species complex. *Bulletin of Entomological Research*, v. 100, p. 359 – 366, 2010.
- ZACHRISSON, B.; HERRERA-VÁSQUEZ, J. Á.; BERNAL, J. Hosts plants of *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Hemiptera: Aleyrodidae), in adjacent areas of the tomato crop, in the east region of Panama. *IDESIA*, v. 35, n. 1, p. 119-122, 2017.
- ZHOU, J. S.; DRUCKER, M.; NG, J. C. K. Direct and indirect influences of virus-insect vector-plant interactions on non-circulative, semi-persistent virus transmission. *Current Opinion in Virology*, v. 33, p. 129-136, 2018.