

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

Estudo da interação do Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) e seu vetor
***Bemisia tabaci* biótipo B e identificação de hospedeiras alternativas do vírus**

Ana Carolina Firmino

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

Piracicaba

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ana Carolina Firmino
Engenheiro Agrônomo

Estudo da interação do Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) e seu vetor *Bemisia tabaci* biótipo B e identificação de hospedeiras alternativas do vírus

Orientador:

Prof. Dr. JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE

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

Piracicaba

2007

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Firmino, Ana Carolina

Estudo da interação do Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) e seu vetor *Bemisia tabaci* biótipo B e identificação de hospedeiras alternativas do vírus / Ana Carolina Firmino.
- - Piracicaba, 2007.

59 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Mosca-branca 2. Tomate 3. Vetores de doenças de plantas 4. Vírus de plantas
I. Título

CDD 635.642

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

A meus pais, Ana Elisabeth e Marco Antonio, e minha avó Maria de Lourdes, que me ensinaram a percorrer o caminho da vida com dignidade e a vencer os desafios que podemos encontrar ao longo dela. Obrigado por ter me ensinado a melhor lição de todas, aquela que não se aprende na escola. Obrigado por ter me ensinado a viver. E é com o mesmo amor e carinho que vocês me dão que eu dedico este trabalho a vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela constante presença em minha vida. Por ter me dado força e paciência nos momentos mais difíceis da minha vida e também por ter me dado momentos alegres no decorrer desta.

Ao Prof. Dr. Jorge A. M. Rezende, pela orientação, confiança e conhecimentos compartilhados, que contribuíram muito na minha formação como pesquisadora.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo e ajuda financeira.

Ao Dr. Valdir A. Yuki (Instituto Agrônomo de Campinas-IAC) pela grande colaboração para realização deste trabalho e também pela amizade.

Ao Dr. André L. Lourenção (IAC), pelas colônias de *B. tabaci* biótipo B cedidas para realização deste trabalho e ao Dr. José A. C. Souza Dias (IAC) pelos tubérculos de batata semente cedidos.

As Dras. Geni L. Villas Bôas e Maria Esther de Noronha (EMBRAPA) por terem confirmado o biótipo da espécie de *B. tabaci* usadas para realização deste trabalho.

Dra. Haiko E. Sawazaki (IAC) e Dr. Renato O. Rezende (Universidade de Brasília), pela concessão de protocolos utilizados neste trabalho.

Ao técnico do Laboratório de Virologia Vegetal do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, José Edivaldo Buriolla.

Ao Sr. Pedro C. Arthuso, pelo auxílio na manutenção dos trabalhos desenvolvidos em casa de vegetação.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, em especial aos colegas de Laboratório: Adriana Moreira, Adriana Jadão, Ana Paula, Luciano, Eliane, Joice e Júlio.

As minhas amigas Vivine L. Biazon e Denize Nozake.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Hugo José Tozze Júnior, pelo companheirismo, carinho e paciência.

Finalmente, agradeço a toda minha família, em especial meus tios, que sempre se preocuparam comigo, meus avós, que sempre me ajudaram da melhor forma possível, e meus pais, que sempre me incentivam a nunca desistir de minhas metas, me ajudando sempre que podem a alcançá-las.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1 Revisão Bibliográfica.....	11
2.1.1 Taxonomia dos Geminivirus.....	11
2.1.2 Características do gênero <i>Begomovirus</i>	12
2.1.3 Transmissão dos begomovírus.....	14
2.1.4 Hospedeiras de begomovírus.....	18
2.1.5 Begomovírus em tomateiro	21
2.2 Material e Métodos.....	23
2.2.1 Local.....	23
2.2.2 Origem do isolado do ToYVSV	23
2.2.3 Plantas-teste.....	24
2.2.4 Colônia de <i>B. tabaci</i> biótipo B e manuseio dos insetos.....	24
2.2.5 Aquisição e transmissão do vírus pelo vetor.	24
2.2.6 Detecção do vírus	25
2.2.6.1 Extração de DNA.....	25
2.2.6.2 PCR.....	26
2.2.7 Estudo da interação do ToYVSV com a <i>B. tabaci</i> biótipo B	27
2.2.7.1 Determinação do período de acesso à aquisição (PAA) do vírus.....	27
2.2.7.2 Determinação do período de acesso à inoculação (PAI) do vírus	27
2.2.7.3 Determinação do período de latência (PL) do vírus no vetor.....	27
2.2.7.4 Determinação do período de retenção do vírus pelo vetor.....	28
2.2.7.5 Detecção do ToYVSV na progênie de <i>B. tabaci</i>	28
2.2.8 Identificação de plantas hospedeiras do ToYVSV	29
2.3 Resultados e Discussões	31

2.3.1 Períodos de acesso à aquisição (PAA) e de acesso à inoculação (PAI)	31
2.3.2 Período de latência (PL) do ToYVSV na <i>B. tabaci</i>	34
2.3.3 Período de retenção do vírus pelo vetor	36
2.3.4 Detecção do ToYVSV na progênie de <i>B. tabaci</i>	38
2.3.5 Espécies hospedeiras do ToYVSV	40
2.3.5.1 Transmissão por <i>B. tabaci</i>	40
2.3.5.2 Transmissão mecânica e com <i>Cuscuta campestris</i>	46
3 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52

RESUMO

Estudo da interação do Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) e seu vetor *Bemisia tabaci* biótipo B e identificação de hospedeiras alternativas do vírus

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) é cultivado em várias regiões durante todo o ano, propiciando assim condições favoráveis ao surgimento de inúmeras doenças incluindo as causadas por vírus. Dentre as viroses consideradas como limitantes a esta cultura destacam-se as causadas por begomovírus, que pertencem à família *Geminiviridae*. Sua transmissão se dá pelo aleirodídeo *Bemisia tabaci* biótipo B. A partir da década de 90 tornaram-se freqüentes os relatos da disseminação desse aleirodídeo e de begomovírus causando perdas que variam de 40% a 100%. No Estado de São Paulo, o Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV), até 2005, estava predominando nos campos de tomateiro, onde foram constatadas incidências de plantas com sintomas deste begomovírus variando de 58% a 100%. O presente trabalho teve como objetivos estudar a interação do ToYVSV com o vetor *Bemisia tabaci* biótipo B e identificar hospedeiras alternativas deste vírus. Na relação do vírus com o vetor constatou-se que os períodos de acesso mínimo de aquisição (PAA) e de inoculação (PAI) foram de 30 min e 10 min, respectivamente. A porcentagem de plantas infectadas chegou até cerca de 75% após um PAA e PAI de 24 h. O período de latência do vírus no vetor foi de 16 horas. O ToYVSV foi retido pela *B. tabaci* 20 dias após a aquisição deste. Não foi detectada a transmissão do vírus para progênie da *B. tabaci* biótipo B oriundas de insetos virulíferos. Das 34 espécies de plantas testadas como hospedeiras somente *C. annuum*, *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *D. stramonium*, *G. globosa*, *N. tabacum* cv. TNN e *N. clevelandii* foram suscetíveis à infecção com o ToYVSV, por meio de inoculação com a *B. tabaci*. As transmissões do ToYVSV por *Cuscuta campestris* e mecanicamente foram ineficientes. As espécies susceptíveis ao ToYVSV serviram de fonte de inóculo para a transmissão do vírus para tomateiros por meio de *B. tabaci* biótipo B.

Palavras-chave: *Lycopersicon esculentum*; Geminivirus; Begomovírus; Transmissão

ABSTRACT

Study on the interaction between Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) and *Bemisia tabaci* biotype B and identification of alternative hosts for the virus.

Tomato (*Lycopersicon esculentum*) has been cultivated in various parts of Brazil almost during the entire year, which provides favorable conditions for the incidence of innumerable diseases, including those caused by viruses. Among the virus diseases responsible for yield losses on tomato crops are those caused by species in the genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*. These viruses are transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* biotype B. Yield losses associated with begomovirus infection varying from 40% to 100% have been frequently reported since early 90's. Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV), a putative species of begomovirus, was prevalent on tomato crops in São Paulo State until 2005, causing yield losses varying from 58% to 100%. The objectives of this work were to study the interaction between ToYVSV and its vector *B. tabaci* biotype B and to identify alternative host for the virus. The results indicated that the minimum acquisition and inoculation access periods of ToYVSV by *B. tabaci* were 30 min and 10 min, respectively. Seventy five percent of tomato-test plants were infected when the acquisition and inoculation access periods were 24 h. The latent period of the virus in the insect was 16 h. The ToYVSV was retained by *B. tabaci* for 20 days after acquisition. First generation of adult whiteflies obtained from viruliferous females did not have the virus as shown by PCR analysis and did not transmit the virus to tomato plants. Out of 34 species of test-plants inoculated with ToYVSV by means of *B. tabaci* biotype B, only *C. annuum*, *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *D. stramonium*, *G. globosa*, *N. tabacum* cv. TNN and *N. clevelandii* were susceptible to infection. Attempts to transmit ToYVSV to susceptible hosts mechanically and with *Cuscuta campestris* failed. *B. tabaci* biotype B was able to acquire the virus from all susceptible species, transmitting it to tomato test-plants.

Keywords: *Lycopersicon esculentum*; Geminivirus; Begomovirus; Transmission

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* também designado *Solanum lycopersicon*) é cultivado em regiões tropicais e subtropicais durante todo o ano, tanto para o consumo *in natura* como para a indústria de processamento. Cultiva-se cerca de 55 mil hectares de tomateiro dentro do território brasileiro, com uma produção de 3,1 milhões de toneladas e um rendimento médio de 57.3 mil quilos/ha. Goiás é a principal região produtora do país, seguida por São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Bahia (FNP, 2007).

No Brasil, o cultivo de tomateiro durante praticamente o ano inteiro propicia condições favoráveis ao surgimento de doenças causadas por fungos, bactérias e, principalmente por vírus. Dentre as viroses que podem ser consideradas como limitantes à produção de tomate destacam-se as causadas por espécies dos gêneros *Begomovirus* e *Tospovirus* (KUROZAWA; PAVAN, 2005). O gênero *Begomovirus* pertence à família *Geminiviridae*, que ainda contém os gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*, e *Topocuvirus*. A maioria dos begomovírus possui o genoma dividido em dois componentes de DNA circular denominados DNA-A e DNA-B. As espécies de vírus pertencentes a este gênero são transmitidas pela *Bemisia tabaci* biótipo B (Homóptera: Aleyrodidae), vulgarmente chamada de mosca branca (FAUQUET et al., 2005). A *B. tabaci* é um inseto polífago, com pelo menos 506 espécies de plantas hospedeiras em 74 famílias, entre monocotiledônea e dicotiledônea (BROWN; BIRD, 1992). A modalidade de transmissão de begomovírus por *B. tabaci* é do tipo circulativa, não propagativa (COSTA, L., 1998).

No Estado de São Paulo, a partir de 1990/91, observou-se a substituição da *B. tabaci* biótipo A pela *B. tabaci* biótipo B (FRANÇA; VILLAS-BOÂS; BRANCO, 1996). Esse biótipo por apresentar um gama de hospedeiras muito mais ampla do que o biótipo A e um grau de dispersão muito maior parece ter criado condições para que os begomovírus que infectam plantas selvagens se proliferassem dentro de determinadas culturas, como a do tomateiro (BEDFORD et al., 1994).

Com o decorrer dos anos, incidências de begomovírus em tomateiro foram relatadas no Estado do Rio de Janeiro, por Galvão et al. (1998) e na região Nordeste por Ribeiro et al. (1996), Bezzerra et al. (1997) e Ribeiro et al. (1998). Em São Paulo, já foram relatadas infectando o tomateiro o Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) (SOUZA-DIAS et al., 1996; FARIA et al., 1997; COLARICCIO et al., 2001; EIRAS et al., 2002), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV)

e uma possível nova espécie ainda não caracterizada (COLARICCIO et al., 2001). Perdas associadas a begomovírus variando de 40% a 100% na produção de tomate já foram registradas no país. Muitas vezes a begomovirose foi apontada como limitante para a produção do tomate em varias áreas de cultivo (BEZZERRA et al., 1996; FARIA et al., 2000).

De acordo com estudos de incidência de viroses em tomateiro realizado na região de Campinas-SP, o begomovírus predominante no período de 2004 e 2005 foi o ToYVSV, denominado em português por vírus da risca amarela da nervura do tomateiro. Estes estudos apontaram que este begomovírus vinha causando danos consideráveis na produção de tomate nesta região (DELLA VECCHIA, 2006).

Assim, levando-se em consideração a importância do ToYVSV o presente trabalho teve como objetivo estudar a interação de um isolado do ToYVSV de tomateiro com o aleirodídeo *B. tabaci* biótipo B e identificar possíveis hospedeiras alternativas do vírus, para oferecer subsídios para estudos epidemiológicos e manejo fitossanitário da doença em campo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Taxonomia dos Geminivirus

Os geminivirus pertencem a família *Geminiviridae*. Os vírus desta família caracterizam-se por possuir partículas do tipo geminada com aproximadamente 22 x 38 nm, constituída por dois icosaedros incompletos, contendo 110 unidades de proteínas capsidiais, organizadas em 22 capsômeros pentaédricos. Cada partícula geminada contém uma única cópia de um DNA circular, de fita simples, cujo tamanho varia de 2,5 a 3,0 Kb. No caso dos geminivirus com o genoma bipartido, cada partícula geminada contém um componente genômico (FAUQUET et al., 2005).

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus a família *Geminiviridae* é subdividida em quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus* (FAUQUET et al., 2005).

Os mastrevirus possuem apenas um componente genômico. A maioria das espécies deste gênero infecta monocotiledôneas e são transmitidas por cigarrinhas (Homóptera: Cicadellidae). Este gênero inclui alguns patógenos importantes de culturas como o milho e o trigo. O *Maize streak virus* (MSV) é a espécie tipo deste gênero.

O gênero *Curtovirus* engloba espécies com as mesmas características genômicas e de transmissão do gênero *Mastrevirus*, porém infectam dicotiledôneas. O *Beet curly top virus* (BCTV) é a espécie tipo.

O gênero *Begomovirus*, diferente dos outros gêneros, inclui os vírus cujo genoma é caracterizado por ser dividido em dois componentes de DNA circular, o DNA-A e o DNA-B (com exceção do *Tomato yellow leaf curl virus* - TYLCV, do *Agertum yellow vein virus* – AYVV e do *Tomato leaf curl virus* – TLCV, que possuem somente um DNA) (FAUQUET et al., 2005). As espécies de vírus pertencentes a este gênero são transmitidas pelo aleirodídeo *Bemisia tabaci* biótipo B. A espécie tipo deste gênero é o *Bean golden mosaic virus* (BGMV). Entre os begomovírus de maior importância econômica pode-se citar o TYLCV em tomateiro e o *African cassava mosaic virus* (ACMV) em mandioca (RYBICKI, 1994).

O gênero *Topocuvirus* tem como membro tipo e único representante o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), que possui um único componente genômico e infecta dicotiledôneas. Este gênero também é transmitido por cigarrinha (Homóptera: Auchenorrhyncha).

Os critérios de demarcação taxonômica das espécies dentro do gênero *Begomovirus* e possível confirmação de novas espécies são: número de componentes genômicos; organização do genoma; valores de identidade de seqüências de nucleotídeos menores que 89%; replicação *trans* dos componentes genômicos; produção de pseudorecombinantes viáveis; caracterização da proteína capsidial; valor de identidade da seqüência de aminoácidos da proteína capsidial menor que 90%; diferenças sorológicas substanciais; gama de hospedeiros e sintomas (FAUQUET et al., 2005).

Atualmente são reconhecidas 133 espécies de geminivirus sendo que 117 pertencem ao gênero *Begomovirus*, enfatizando assim a importância desse gênero dentro dessa família (FAUQUET et al., 2005).

2.1.2 Características do gênero *Begomovirus*

Os vírus representantes do gênero *Begomovirus* têm na sua maioria o genoma dividido em dois componentes de DNA circular de fita simples, denominados DNA A e DNA B, cada um com aproximadamente 2.6 kbp (Figura 1). O DNA-A é responsável pela replicação e encapsidamento do genoma viral, enquanto o DNA-B é responsável pelo movimento célula-a-célula e a longa distância (FAUQUET et al., 2005).

O DNA A e o DNA B não possuem homologia na seqüência de nucleotídeos, exceto por uma região intergênica de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (RC), que é altamente conservada entre os dois componentes de uma determinada espécie viral (acima de 90% de homologia). A partir desta região os genes virais divergem nos sentidos viral e complementar.

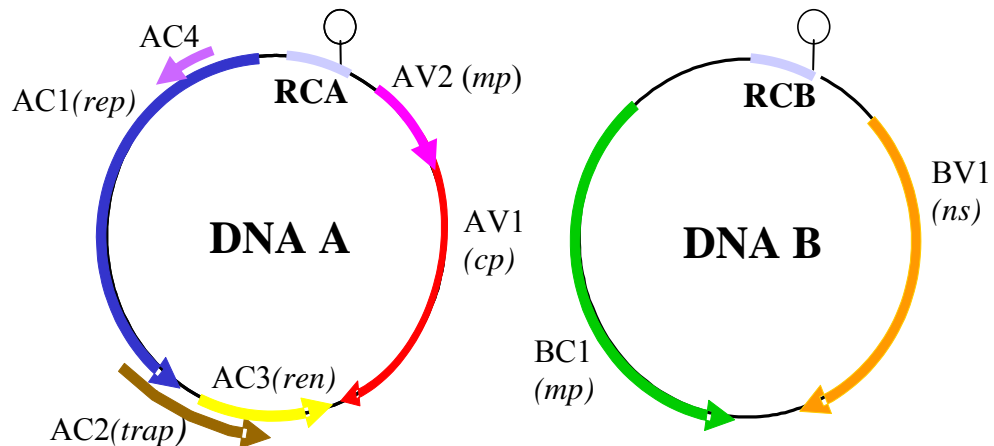


Figura 1 - Esquema representativo do genoma de um begomovírus. RCA e RCB: região comum; Gene *cp* e *mp* (ORFs AV1 e AV2, respectivamente) = proteína da capa protéica e movimento; gene *rep* (ORFs AC1 e AC4) = proteína associada à replicação; gene *trap* (ORF AC2) = proteína de transativação; gene *ren* (ORF AC3) = proteína ativadora da replicação; gene *mp* (ORF BC1) = proteína de movimento célula-a-célula e gene *ns* (ORF BV1) = proteína de transporte (FAUQUET et al., 2005)

No componente A, dois genes são transcritos no sentido viral (genes *cp* e *mp*). O gene *cp*, que contém a ORF AV1, é essencial para formação da capa protéica e pode estar envolvida na movimentação do vírus e transmissão deste pelo vetor, e o gene *mp* com a ORF AV2, que também pode estar ligada a movimentação do vírus (HÖFER et al., 1997; FAUQUET et al., 2005). Nos geminivirus bipartidos ditos do novo mundo não se encontram a ORF AV2 (FAUQUET et al., 2005).

No sentido complementar são transcritos três genes: *rep*, *trap* e *ren*. O gene *rep*, que contém a ORF AC1, é responsável pela produção da proteína Rep, que se liga ao sítio de iniciação da replicação viral e corta a fita de DNA, iniciando o processo de replicação. Neste gene ainda encontra-se inserida a ORF AC4, que codifica a proteína C4, que é importante na determinação de sintomas no hospedeiro e pode reprimir a expressão da proteína Rep. O gene *trap*, que contém a ORF AC2, codifica proteína TrAP, transativadora da transcrição, que atua *in trans* nos promotores dos genes de sentido viral (*cp* do DNA a e *ns* do DNA B) e também está envolvida no silenciamento gênico, agindo como supressora deste. O gene *ren*, contém a ORF AC3 e codifica a proteína REn, que é um fator de amplificação do vírus (FAUQUET et al., 2005).

No DNA B encontram-se os genes *mp*, com ORF BC1 (sentido complementar) e *ns*, com a ORF BV1 (sentido viral), que codificam as proteínas MP (“movement protein”), responsável pelo movimento célula-a-célula do vírus através do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas, e NS (“nuclear shuttle”), que faz o transporte do DNA através do envelope nuclear, respectivamente (FAUQUET et al., 2005).

Após a introdução do vírus no hospedeiro pelo vetor ocorre o desencapsulamento e o início do processo de replicação. O sítio de replicação dos geminivirus está confinado ao núcleo da célula infectada e a replicação do genoma viral é totalmente dependente da maquinaria do hospedeiro. Os geminivirus replicam o seu genoma circular de fita simples de DNA por meio de um intermediário de fita dupla, denominado forma replicativa (RF), utilizando o mecanismo de círculo rolante. Neste caso as proteínas do hospedeiro convertem a fita simples em fita dupla, que é amplificada e serve como molde para transcrição e síntese do DNA de fita simples (STANLEY, 1995). A origem da replicação está localizada na região intergênica comum entre os dois componentes genômicos. Nela encontra-se um elemento de 30 nucleotídeos essenciais para replicação. Este elemento, contendo uma seqüência repetida e invertida composta predominantemente por guanina e citosina, forma uma estrutura conservada em forma de grampo (“stem and loop”), com uma seqüência constante (5’- TAATATTAC – 3’) encontrada em todos os geminivirus e que se constitui em um domínio funcional da origem da replicação. É neste local que ocorre a clivagem para início do processo de replicação por círculo rolante. Esta clivagem é realizada pela proteína Rep que funciona como uma endonuclease sítio-específica (LAZAROWITZ, 1992).

Na replicação dos begomovírus, a fita complementar serve de molde para a síntese de várias cópias do DNA genômico, que formam uma longa fita simples de DNA linear contendo vários genomas unitários (multímeros ou concatômeros). O multímero é clivado gerando monômeros (os DNAs genômicos), que serão religados gerando moléculas circulares de ssDNA correspondentes ao genoma viral, as quais por sua vez serão encapsuladas formando os vírions.

2.1.3 Transmissão dos begomovírus

Os begomovírus geralmente não são transmitidos naturalmente por semente ou mecanicamente. A dispersão natural dos begomovírus ocorre via inseto vetor, mais especificamente pelo aleirodídeo *B. tabaci*. Atualmente o complexo *B. tabaci* é constituído por

mais de 40 biótipos, sendo que no Brasil a partir de 1990/91 somente o biótipo B vem sendo predominante (RABELLO et al., 2005). Isso pode ser explicado devido ao fato de que este biótipo quando comparado ao biótipo A, anteriormente predominante, possui maior taxa de oviposição, alta capacidade reprodutiva e uma gama de hospedeiros muito mais ampla, incluindo o tomateiro e outras solanáceas (BEDFORD et al., 1994). A *B. tabaci* pode ter de 11 a 15 gerações em um ano e as fêmeas podem depositar de 100 a 300 ovos em 3 a 6 semanas de vida. Após a eclosão dos ovos o inseto passa por cinco estádios de ninfa, sendo o último chamado de pupa (GÁLVEZ; MORALES, 1989). O ciclo de vida da *B. tabaci* está ligado diretamente com a temperatura ambiente e espécie de hospedeiro, sendo que em baixas temperaturas seu ciclo de vida diminui bastante (VILLAS-BÔAS; FRANÇA; MACEDO, 2002).

Essas características indicam uma grande capacidade de adaptação e elevada taxa de dispersão deste biótipo, principalmente em áreas quentes, podendo assim se tornar predominante nas áreas onde é introduzido (BEDFORD et al., 1994). Segundo Polston e Anderson (1997), o surgimento de novas espécies de begomovírus infectando tomateiro é decorrente da distribuição do biótipo B por áreas cada vez maiores das Américas.

A *B. tabaci* biótipo B é um inseto polífago que se alimenta do floema da planta. Assim, além de atuar como vetor de vírus, pode causar danos diretos na planta como: redução de nutrientes ao sugarem a seiva; alterações fisiológicas, como o amadurecimento irregular dos frutos de tomate; e liberação de excreções açucaradas que favorecem o crescimento de fungos causadores de fumagina na superfície foliar, interferindo assim na fotossíntese da planta (VILLAS-BÔAS et al., 1997).

A modalidade de transmissão dos geminivírus pelos vetores é do tipo circulativa não propagativa, sendo que a proteína da capa protéica determina a espécie do inseto vetor. A substituição do gene da capa protéica do begomovírus *African cassava mosaic virus* (ACMV), transmitido por *B. tabaci* biótipo B, pelo gene da capa protéica do *Beet curly top virus* (BCTV), transmitido por cigarrinha, produziu um vírus quimérico do ACMV com a capa protéica do BCTV que foi transmitido por cigarrinha (BRIDDON et al., 1990). Mudanças na seqüência de aminoácidos da proteína capsidial desses vírus também podem alterar a transmissão por meio da falha na aquisição pela *B. tabaci* dos geminivírus (AZZAM et al., 1994). Höfer et al. (1997) substituíram o gene da capa protéica de um isolado do *Abutilon mosaic virus* (AbMV) não

transmitido por *B. tabaci* pelo gene da capa protéica do *Sida golden mosaic virus* (SiGMV) e obtiveram um vírus quimérico transmitido por esse inseto.

Hidayat e Rahmayani (2007) constataram que uma espécie de begomovírus pode ser transmitida por mais de uma espécie de aleirodídeo, em estudo realizado na Indonésia. Os autores estudaram a relação do *Tomato leaf curl virus* (TLCV) e as espécies de aleirodídeos *B. tabaci* e *Trialeurodes vaporariorum*. Ambas foram capazes de transmitir o vírus para tomateiro e pimentão, embora *B. tabaci* foi mais eficiente. Um único inseto de *B. tabaci* foi capaz de transmitir o vírus com períodos mínimos de acessos a aquisição e transmissão de 10 h. Para a transmissão do TLCV por *T. vaporariorum* necessitaram-se de pelo menos 10 insetos por planta e períodos de acessos a aquisição e inoculação de 24 h.

Hunter et al. (1998) parecem ter sido os primeiros a estudarem a localização de dois begomovírus (*Tomato mottle virus* – ToMoV e *Cabbage leaf curl virus* – CabLCV) no vetor *B. tabaci* biótipo B e a apresentarem um modelo para o movimento do vírus no inseto. Ao se alimentar em uma planta infectada as partículas virais ingeridas juntamente com a saliva são encaminhadas para o esôfago e intestino. Nutrientes e partículas virais concentram-se na câmara filtro. As partículas podem ser adsorvidas na membrana alimentar ou na região anterior do intestino médio, de onde passam para a hemolinfa do inseto e eventualmente invadem a glândula salivar de onde podem ser transmitidas para outras plantas durante o processo de alimentação do inseto. Esse percurso tem duração de aproximadamente 8 h para o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (GHANIM ; MORIN; CZOSNEK, 2001). Morin et al. (2000) mostraram que o vírus que circula no corpo do inseto é protegido pela proteína GroEL (“chaperone”) produzida por um endossimbionte. Essa proteína tem a função de proteger a capa protéica do TYLCV de degradação.

Os períodos de aquisição, de transmissão, de latência e de retenção dos begomovírus no vetor *B. tabaci* biótipo B apresenta algumas variações em função da espécie estudada. A interação do biótipo B de *B. tabaci* com o begomovírus está bem caracterizada para o TYLCV. Sabe-se que neste caso tanto as ninfas como os adultos podem adquirir o vírus das plantas infectadas, sendo que as fêmeas desse aleirodídeo são mais eficientes que os machos na transmissão. Os períodos mínimos para a aquisição e a inoculação do TYLCV pela *B. tabaci* biótipo B são de 15 e 30 minutos, respectivamente, sendo que a eficiência de transmissão aumenta à medida que esses tempos também aumentam. O período de latência é de 21 a 24 horas

e os adultos virulíferos têm capacidade de reter o vírus por um período de 10 a 20 dias após o término da aquisição (MANSOUR; AL-MUSA, 1992; MEHTA et al., 1994). Estas características da relação do TYLCV com a *B. tabaci* tem pouca diferença quando se trata de isolados deste vírus pertencentes a diferentes regiões geográficas. Por exemplo, o isolado de Israel tem um período de aquisição mínimo de 15 minutos enquanto o isolado da Jordania é de 1 hora (COHEN; NITZANY, 1966; MANSOUR; AL-MUSA, 1992). Esta diferença não é considerada significativa porque ela pode ser decorrente da variação das condições do experimento ou, em alguns casos, refletir a adaptação do isolado para transmissão por diferentes populações de *B. tabaci* (PICÓ; DIEZ; NUEZ, 1996).

O *Squash leaf curl virus* também teve sua relação com a *B. tabaci* biótipo B caracterizada. Este vírus apresentou um período mínimo de aquisição de 30 minutos chegando até 100% de plantas infectadas com 6 horas de aquisição. O período mínimo de acesso a inoculação deste vírus pelo vetor foi de 30 minutos apresentando 65% de plantas infectadas (COHEN et al., 1983). O período de latência do vírus no vetor foi de 19 horas e este foi retido na *B. tabaci* por 26 dias. O mesmo tipo de estudo foi realizado por Idris e Brown (1998), porém com o *Sinaloa tomato leaf curl virus*. Neste caso o estudo foi realizado com base na interação deste vírus com a *B. tabaci* biótipo A. O período mínimo de acesso a aquisição do vírus por este biótipo foi de 24h e o período mínimo de inoculação foi de 30 min. A persistência do vírus no vetor foi de 9 dias. Não houve passagem transovariana do vírus neste caso.

No Brasil, Santos, Ávila e Resende (2003) estudaram o relacionamento do *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) com o biótipo B da *B. tabaci* em tomateiro ‘Santa Clara’. Neste estudo constataram-se tempos mínimos de aquisição e inoculação de 15 e 30 minutos, respectivamente, e latência de 16 horas.

A transmissão transovariana também já foi investigada para as espécies de begomovírus TYLCV e *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) em gerações de *B. tabaci* biótipos B e Q oriundas de fêmeas virulíferas (BOSCO; MASON; ACCOTTO, 2004). Constataram que o DNA do TYLCSV foi detectado em ovos, ninfas e em menor proporção em adultos das progênes de três gerações subseqüentes dos insetos. No entanto, os adultos dessas progênes não transmitiram o vírus. No caso do TYLCV, não foi detectado o DNA nas progênes oriundas de fêmeas virulíferas. Os adultos dessas progênes também não transmitiram o vírus. No Brasil, Santos, Ávila e Resende (2003) já haviam relatado a detecção do *Tomato rugose mosaic virus*

(ToRMV) em ovos, ninfas e adultos oriundos de fêmeas virulíferas de *B. tabaci*, mas não constataram a transmissão do vírus pelos adultos.

Também já foi demonstrado experimentalmente que o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), isolado de Israel, pode ser transmitido entre adultos de *B. tabaci* por meio de relação sexual, na ausência de fontes de inóculo. Machos virulíferos foram capazes de transmitir o vírus para fêmeas sadias, quando mantidos em plantas de algodão, que são resistentes ao TYLCV. Posteriormente as fêmeas foram capazes de transmitir o vírus para plantas de tomate (GHANIM; CZOSNEK, 2000).

A presença do vírus no vetor *B. tabaci*, por sua vez, pode afetar a capacidade de transmissão, longevidade e fecundidade do inseto, conforme constataram Rubinstein e Czosnek (1997) em estudos realizados com o TYLCV isolado de Israel. Adultos virulíferos de *B. tabaci* mantidos em plantas de berinjela, resistentes ao vírus, retiveram o TYLCV por toda a vida, conforme comprovado pela presença do DNA viral. A habilidade de transmitir o vírus para plantas de tomate diminuiu com o tempo, mas não desapareceu completamente. A expectativa de vida dos insetos virulíferos adultos foi reduzida em 17-23%, enquanto que a oviposição teve redução de 40-50%. Diante desses resultados os autores sugeriram que o TYLCV parece ter algumas características remanescentes de um patógeno de inseto.

2.1.4 Hospedeiras de begomovírus

Informações sobre gama de hospedeiros e sintomatologia de plantas infectadas por begomovírus são de grande valia para caracterização biológica, podendo contribuir para distinção entre espécies e isolados de diversos gêneros de vírus. Aspectos como estes já foram constatados para o *Squash leaf curl virus* e para o *Tomato goden mosaic virus* (LAZAROWITK, 1992; BROWN, 1997). Santos et al. (2004) também comprovaram distinção entre dois isolados de begomovírus que apresentaram elevada identidade entre seus genomas e com o do ToRMV. Estes isolados foram obtidos de lavouras de tomateiro na região de Anápolis-GO (isolado GO-ANPL) e do Distrito Federal (isolado DF-BR2). Quando estes foram inoculados em plantas de mesma espécie induziram reações diferentes nestas plantas, sugerindo que estes begomovírus sejam biologicamente diferentes. Isolados do TYLCV também apresentam diferenças quanto a gama de hospedeiros. Os isolados da Jordânia e do Yemen não infectam *P. vulgaris*, diferente do isolado de Israel (MANSOUR; AL-MUSA; 1992).

Apesar das diferenças que podem haver não só entre isolados mas também entre espécies de begomovírus, dados relativos a caracterização biológica destes, ainda são escassos, havendo poucas informações sobre suas hospedeiras preferenciais e sintomas induzidos pelo vírus nas plantas (SANTOS et al., 2004).

A identificação de espécies cultivadas e não cultivadas hospedeiras de begomovírus também têm grande significância para a epidemiologia. Resultados prévios indicam que, a exemplo do que ocorre com plantas cultivadas, a variabilidade entre os begomovírus que infectam plantas invasoras é muito grande (AMBROZEVICIUS et al., 2002; CALEGARIO et al., 2005). Há varias indicações de que plantas invasoras podem ser susceptíveis a diferentes espécies de geminivirus, atuando como possíveis fontes de inóculo do vírus para plantas cultivadas (AMBROZEVICIUS et al., 2002; ASSUNÇÃO et al., 2004). Deste modo a erradicação dessas plantas das áreas de cultivo deve ser uma medida adotada visando a redução da incidência dessas viroses (FARIA et al., 2000).

Stonor et al. (2003) ao estudarem a gama de hospedeiras do TLCV da Austrália constataram que das 58 espécies testadas, somente 11 foram susceptíveis a este vírus. Entre essas, apenas *P. vulgaris*, que se mostrou susceptível à infecção e assintomático, não pertence a família das *Solanaceae*s. Entre as solanáceas, *Capsicum frutescons*, *Cyphomandra betacea*, *Solanum pseudocapsicum* e *S. seaforthianum* não exibiram sintomas. Dentre as plantas que se mostraram susceptíveis ao TLCV somente *Physalis virginiana* ocorrem naturalmente naquele país.

Em Israel há evidências de que o TYLCV pode estar presente em diferentes plantas não cultivadas como *D. stramonium* e *Euphorbia sp.*, que servem como reservatório do vírus, fazendo com que essas plantas desempenhem um papel importante na disseminação deste vírus (PICÓ; DIEZ; NUEZ, 1996; COHEN; ANTIGNUS; 1994). Segundo Holt, Colvin e Muniyappa (1999), *Hibiscus rosa-sinensis*, pode ser hospedeira não só do TLCV mas também do seu vetor, *B. tabaci*. Segundo Ramappa, Muniyappa e Colvin (1998), na Índia, o grupo mais importante de hospedeira deste vírus seja *Acanthospermum hispidum.*, *Ageratum conyzoides*, *Euphorbia geniculata.*, *Parthenium hysterophorus*, *Malvastrum coromancalianum* e *Phylanthus asperulatus*. Estas espécies são extremamente comuns no país e freqüentemente encontradas nas áreas de produção de tomate. Esse conhecimento é de grande importância, visto que já há relatos de que *H. rosa-sinensis*, *E. geniculata*, *P. hysterophorus*, como hospedeiras de um novo begomovírus,

intitulado Hibiscus leaf curl disease (HLCuD), capaz de infectar tomate (RAJESHWARI et al., 2005).

Em condições experimentais, Al-Aqeel (2004) demonstrou que um begomovírus isolado de *Sida santaremensis*, o Sida golden mottle virus (SiGMoV) pode ser transmitido por “moscas brancas” para o cultivar V20 de *N. tabacum*. Idris e Brown (1998) ao estudarem características biológicas e moleculares do *Sinaloa tomato leaf curl virus* identificaram *Malva parviflora*, *C. annuum*, *D. metel* e *D. stramonium* como hospedeiras deste vírus, visto que os autores comprovaram a passagem do vírus para tomateiro a partir destas plantas.

No Brasil espécies de plantas pertencente à família das *Malvaceae*, principalmente do gênero *Sida*, são importantes reservatórios do *Bean golden mosaic virus*. Costa, A. (1976) constatou que este vírus foi transmitido, a partir de *Sida*, para outras plantas como feijoeiro, soja e algodoeiro. Costa e Carvalho (1960 apud COSTA, A., 1976) relataram que o *Abutilon mosaic virus* (que ocorria em malváceas) e o Euphorbia mosaic virus (EuMV) (obtido de *Euphorbia prunifolia*) podiam ser transmitidos para o tomateiro, utilizando-se o inseto-vetor. Pesquisa recente conduzida por Cotrim et al. (2004) determinou que cerca de 10% das amostras de tomateiros com sintomas de mosaico coletadas na região Centro-Oeste do Estado de São Paulo estavam infectadas com o *Sida mottle virus* (SiMoV), enquanto Calegario et al. (2005), em Minas Gerais, verificaram infecção natural do tomateiro com um isolado do Sida nicandra mosaic virus (SimMV). Há relatos também de begomovírus em espécies de plantas pertencentes a família *Sterculiaceae*, *Capparaceae* e *Asteraceae* (ASSUNÇÃO et al., 2006; LIMA et al., 2002).

A passagem de begomovírus entre plantas cultivadas também é importante, visto que muitas vezes a *B. tabaci* pode migrar entre lavouras de espécies distintas. Polston et al. (2006), ao estudarem os sintomas induzidos por dois isolados do *Tomato leaf curl virus* (TLCV) em diferentes espécies e cultivares de *Capsicum*, contataram a passagem de ambos para plantas de tomate a partir de inoculação com *B. tabaci*. No Brasil, Nosaki (2006), ao caracterizar biologicamente um isolado do *Tomato severe rugose virus* (TSRV) de pimentão também comprovou experimentalmente a passagem deste para plantas de tomate. Em condições naturais há relatos da passagem do BGMV de lavouras de *Phaseolus sp.* para plantações de *Glycine Max* (FARIA; MAXWELL, 1999).

2.1.5 Begomovírus em tomateiro

Tomateiros infectados por begomovírus apresentam, geralmente, amarelecimento na base dos folíolos e clareamento das nervuras, evoluindo para mosaico amarelo. Estes sintomas se generalizam por toda a planta, seguidos de rugosidade, redução de tamanho e enrolamento dos bordos das folhas. A planta apresenta redução na floração e paralisação do crescimento, com conseqüente perda na produção, principalmente se a infecção ocorrer nos estádios iniciais de desenvolvimento (REZENDE et al., 1996).

No Brasil, um dos primeiros relatos de geminivirus em tomateiro foi feito por Costa, A. (1975 apud DELLA VECCHIA, 2006). Logo depois Matyis et al. (1975) purificaram o *Tomato golden mosaic virus* - TGMV (vírus do mosaico dourado do tomateiro), que estava entre aqueles relatados por Costa, A. (1975 apud DELLA VECCHIA, 2006) e estudaram os aspectos morfológicos das partículas e confirmaram tratar-se de um vírus de partículas geminadas. Mais tarde Costa, Oliveira e Silva (1977) transmitiram o TGMV mecanicamente para *Nicotiana tabacum* cv. Turkish, *N. glutinosa*, *D. stramonium* e *Physalis* sp., a partir de outras solanáceas, mas não a partir de tomateiro. Após este relato inicial, a incidência de TGMV não aumentou, e este vírus não se tornou importante. Porém, após vinte anos de seu primeiro relato, o TGMV foi novamente encontrado na região de Campos, no Rio de Janeiro, causando problemas na produção de tomate (GALVÃO et al., 1998)

Atualmente, regiões produtoras de tomate tanto no Brasil como na Venezuela, América Central, México, Caribe, Flórida, Espanha e Itália têm sofrido os efeitos de uma alta incidência de begomovírus, acarretando grandes perdas na produção (POLSTON; ANDERSON, 1997). Esta intensificação da incidência de begomovírus em tomates a partir da década de 90 está associada com a prevalência do biótipo B de *B. tabaci*. No Brasil, este biótipo foi provavelmente introduzido via planta ornamental (*Euphorbia pulcherrima*) e há registros de sua ocorrência na maioria dos estados brasileiros (MELO, 1992).

Os aumentos nos relatos de begomovírus são decorrentes, também, dos avanços das técnicas moleculares para caracterização destes vírus, que têm permitido a identificação e caracterização das espécies ou pseudorecombinações entre os vírus presentes nas plantações de tomateiro.

O seqüenciamento parcial da extremidade 5' do gene que expressa a proteína da capa protéica, uma região representativa da variabilidade do genôma viral, confirmou a grande

diversidade genética de begomovírus em tomateiro no Brasil (RIBEIRO et al., 1998). No Distrito Federal há relatos da ocorrência do Tomato golden vein virus (TGVV), Tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV) e Tomato yellow spot virus (ToYSV) (FERREIRA et al., 2007; FRANCO et al., 2007; ANDRADE et al., 2007). Em levantamentos realizados em plantios de tomateiro nos estados de Minas Gerais, Espírito Santos e Rio de Janeiro foram encontrados o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) e mais quatro espécies não identificadas (AMBROZEVICIUS et al., 2002). Nos estados do nordeste já foram encontrados o Tomato curl mottle virus (ToCMoV), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) e o Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) (RIBEIRO et al., 2003). Nos estados de Pernambuco e da Bahia há relatos da identificação de quatro novas espécies ainda não descritas no Brasil, provisoriamente chamadas de TGV-PE1, TGV-PE2, TGV-PE3 e TGV-BA1, sendo que estas quando comparadas a outros geminivirus mostram similaridade com o Venezuela tomato virus (VenTGV), *Potato yellow mosaic virus* (PYMV/TT), *Tomato leaf curl virus* (TLCV/PN) e *Sida golden mosaic virus* (SiGMV) (FARIA et al., 2000). No estado de São Paulo há relatos do ToYVSV, do *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) e uma possível nova espécie ainda não caracterizada (COLARICCIO et al., 2001; EIRAS et al., 2002; FARIA et al., 1997; SOUZA-DIAS et al., 1996).

Apesar dos avanços na caracterização dos begomovírus que infectam tomateiro no Brasil ainda é constante a preocupação com este patógeno, visto que há freqüentes relatos de incidência destes variando de 20 a 100% nos campos de produção de tomateiros (FARIA et al., 1997; COLARICCIO et al., 2001), podendo acarretar perdas na produção de 40 a 100% (BEZERRA et al., 1996; REZENDE et al., 1996).

Nenhuma estratégia de controle, quando usada isoladamente, tem demonstrado ser efetiva para doenças causadas por geminivirus. Assim, para o controle das doenças causadas por estes vírus geralmente recomenda-se o manejo integrado, que envolve o uso de plantas resistentes, eliminação de plantas hospedeiras do vírus e do vetor e o controle químico da *B. tabaci* (FARIA et al., 2000).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Local

Os ensaios foram conduzidos na área experimental do Setor de Fitopatologia e no laboratório de Virologia Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, localizada na cidade de Piracicaba-SP.

2.2.2 Origem do isolado do ToYVSV

O isolado do ToYVSV empregado nesse estudo foi cedido pelo Dr. Valdir A. Yuki, Instituto Agronômico de Campinas. A planta de tomate apresentava sintomas típicos de amarelecimento de nervuras (Figura 2). A identidade deste isolado foi confirmada por seqüenciamento parcial do seu DNA A e comparação com outros isolados já seqüenciados de ToYVSV (FARIA et al., 1997; COLARICIO, et al., 2007). Com isso comprovou-se que o isolado trabalhado tratava-se realmente do Tomato yellow vein streak virus. A fonte de inóculo foi mantida isolada em gaiolas individuais para evitar contaminações. Frequentemente, esse isolado foi transmitido para plantas de tomates mais jovens para renovação da fonte de inóculo.



Figura 2 - Sintomas típicos de ToYVSV em folha de tomateiro

2.2.3 Plantas-teste

Para a realização dos estudos da relação vírus/vetor foram utilizadas mudas de tomateiro sadio, do tipo Santa Cruz Kada Gigante, no estágio de duas folhas verdadeiras. Estas mudas foram obtidas em bandeja e posteriormente transplantadas para vasos, contendo uma mistura de solo e esterco esterilizados. As plantas foram periodicamente adubadas com a formulação N-P-K (10-10-10).

Para estudo de plantas hospedeiras do vírus, as diferentes espécies testadas (Tabela 7), foram obtidas a partir de sementes armazenadas no laboratório de Virologia Vegetal, com exceção dos tubérculos de batata que foram cedidos pelo Dr. José Alberto Caran de Souza Dias, Instituto Agronômico de Campinas.

2.2.4 Colônia de *B. tabaci* biótipo B e manuseio dos insetos

Nos experimentos de transmissão foram empregados insetos adultos, livres de vírus, criados principalmente em couve (*Brassica oleraceae*), soja (*Glycine max*) e tomateiro. As plantas foram trocadas periodicamente, por outras mais novas para a manutenção da colônia. Estas plantas foram mantidas em casa de vegetação telada. Os insetos utilizados neste trabalho foram identificados pelas Dras. Geni L. Villas Boas e Maria Esther de Noronha como pertencentes à espécie *B. tabaci* biótipo B.

Nos ensaios de transmissão os insetos foram coletados e transferidos das plantas com o auxílio de um aspirador composto de um tubo de vidro, por onde os insetos foram aspirados e transferidos até um tubo de maior diâmetro, no qual ficaram aprisionados. O tubo de maior diâmetro foi ligado a uma mangueira plástica dotada de um filtro, utilizada para aspiração e expiração dos adultos de *B. tabaci* biótipo B, sendo estes procedimentos realizados com a boca.

2.2.5 Aquisição e transmissão do vírus pelo vetor.

A aquisição do vírus pelo vetor foi realizada em folhas destacadas de tomateiro infectado com ToYVSV, dispostas em tubos de polipropileno de 50 mL (uma folha de tomateiro por tubo). Adultos de *B. tabaci* livres de vírus foram coletados da colônia e transferidos para os tubos (Figura 3A), numa proporção de 150 insetos por tubo. Após períodos de acesso a aquisição (PAA) determinados, os aleirodídeos foram transferidos em grupos pré determinados para vasos

contendo as plantas-teste. Estas foram cobertas por gaiolas confeccionadas com copos plásticos descartáveis, cujo fundo foi substituído por tecido escaline para conter os insetos e permitir a ventilação (Figura 3B). Após determinado período de acesso a inoculação (PAI) nas plantas-teste, as gaiolas foram retiradas e os insetos foram imediatamente eliminados por meio da pulverização das plantas com inseticida da classe dos piretróides (princípio ativo cifluthrin e tetrametrina). Em seguida foram pulverizadas com inseticida sistêmico (imidacloprid) e mantidas em casa de vegetação para avaliações periódicas de sintomas.

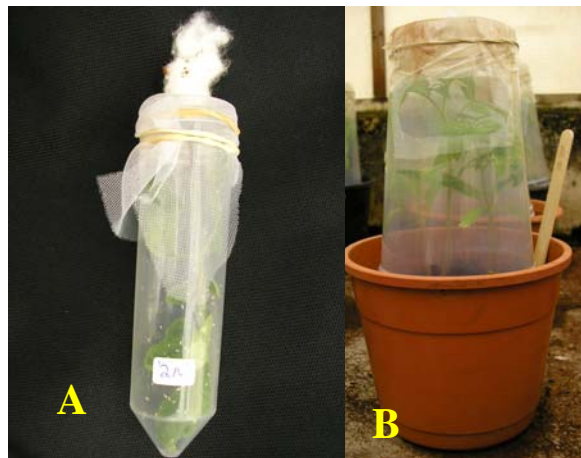


Figura 3 - **A:** Folha de tomateiro infectado com ToYVSV disposta em tubo de polipropileno de 50 mL para aquisição de vírus pela *B. tabaci*. **B:** Plantas-teste de tomateiro no interior de gaiola confeccionada com copos descartáveis, cujo fundo foi substituído por tecido escaline

2.2.6 Detecção do vírus

2.2.6.1 Extração de DNA

A extração de DNA a partir de folhas de tomateiro foi realizada conforme o método desenvolvido por Dellaporta, Wood, e Hicks (1983). Fragmentos foliares foram macerados em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, contendo 500 μ L de tampão de extração (NaCl 0,5 M; EDTA 0,05 M; Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; β -mercapoetanol 0,2%). Após a maceração foram adicionados 33 μ L de SDS 20%. Os tubos foram agitados por 30 seg. e incubados a 65°C por 30 min. Em seguida foram adicionados 160 μ L de acetato de potássio 5 M e a mistura foi centrifugada a 7000 g durante 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante e a este foi adicionado metade do volume da amostra de isopropanol gelado. Após agitação lenta da mistura procedeu-se centrifugação a 7000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado

com 500 µL de etanol 70%. Novamente a suspensão foi submetida a centrifugação a 7.000 g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante. O precipitado obtido foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 150 µL de água Milli-Q.

A extração de DNA a partir de aleirodídeos adultos foi baseada na metodologia empregada por Metha et al. (1994), porém com alguns ajustes. Cerca de 5 a 10 insetos, adultos ou ninfas, congelados em 200 µL de TE (Tris-EDTA 0,1M, pH 9,0, 1% SDS) foram macerados em microtubos com auxílio de pistilos plásticos, com adição de 1 µL de proteinase K (50 µg/mL) e incubados a 65°C por 30 minutos. Após incubação adicionaram-se 3,5 µL de acetato de potássio 8M e as amostras foram colocadas em gelo por 30 minutos. Decorrido este tempo as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 15 minutos. O sobrenadante recolhido foi tratado com 200 µL de clorofórmio/fenol (1:1) e novamente centrifugado. À fase aquosa obtida acrescentaram-se 500 mL de etanol absoluto e em seguida os tubos foram levados a -20°C por 15 minutos. Logo após as amostras foram novamente centrifugadas a 10000 g por 15 minutos e o DNA precipitado foi lavado com etanol 70%. O precipitado obtido foi seco em temperatura ambiente e ressuspendido em água milli-Q. Como controle positivo da extração de DNA do begomovírus do inseto foram usadas ninfas e adultos oriundos de uma colônia virulífera. O controle negativo para todas as reações proveio de uma colônia de insetos sadios.

2.2.6.2 PCR

O DNA total extraído de folhas de plantas infectadas, de ninfas e adultos de *B. tabaci* foi usado em reação de PCR (polimerase chain reaction), usando-se o par de oligonucleotídeos degenerados PAR1c715 (5'- GATTTCTGCAGTTDATRTTYTCRTCCATCCA-3') e PAL1v1978 (5'-GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT-3'), que amplifica um fragmento de aproximadamente 1,3 pb do DNA A (ROJAS et al., 1993) e o par de oligonucleotídeos degenerados PBL1v2040 (5'- GCCTCTGCAGCARTGRTCKATCTTCATACA-3') e PCRc1 (5'- CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCCA-3'), que amplifica um fragmento de aproximadamente 500 a 650 pb do DNA B (ROJAS et al., 1993). O regime utilizado no termociclador foi: 94°C por 3 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 2 min, 72°C por 2 min, finalizando-se o processo com 72°C por 5 min. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose corado com SYBER Safe DNA gel stain. A detecção do ToYVSV usando os dois pares

de oligonucleotídeos só foi realizada nos experimentos para estudar a suscetibilidade de diferentes espécies vegetais a esse vírus.

2.2.7 Estudo da interação do ToYVSV com a *B. tabaci* biótipo B

2.2.7.1 Determinação do período de acesso à aquisição (PAA) do vírus

Foram avaliados nove PAA do vírus pelo vetor: 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h e 24 h. Após cada PAA os insetos foram transferidos, em grupos de 15, para vasos contendo duas plantas-teste de tomate sadio, onde permaneceram por um período de 24 h para alimentação. Foram utilizadas 10 plantas por tratamento e o experimento foi repetido uma vez. Amostras de tecidos foliares de todas as plantas inoculadas foram coletadas e testadas individualmente por meio de PCR para confirmação da infecção. Uma amostra de planta sadia e outra, sabidamente infectada, foram incluídas como controle negativo e positivo do PCR, respectivamente.

2.2.7.2 Determinação do período de acesso à inoculação (PAI) do vírus

Para avaliar o PAI os insetos livres de vírus foram inicialmente submetidos a um período de acesso para aquisição do vírus de 24 h. Os insetos foram transferidos, em grupos de 15, para vasos contendo duas plantas-teste de tomate sadio, cobertas com as mesmas gaiolas dos testes anteriores. Foram avaliados nove PAI do vírus pelo vetor: 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h e 24 h. Foram utilizadas 10 plantas por tratamento e o experimento foi repetido uma vez. A análise final da infecção foi feita como descrita para o experimento de PAA.

2.2.7.3 Determinação do período de latência (PL) do vírus no vetor

O período de latência do ToYVSV na *B. tabaci* biótipo B foi determinado adotando-se como período mínimo de acesso a aquisição (PAA) aquele obtido nos experimentos realizados anteriormente. Após o período mínimo (30 min.) de aquisição do ToYVSV em folhas de tomateiro infectados, seguindo o mesmo procedimento já descrito, os insetos foram transferidos para vasos contendo duas plantas-teste de tomate sadio. Foram usados 15 insetos por vaso. Eles permaneceram em contato com as plantas-teste sadias durante nove períodos diferentes para inoculação: 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h e 24 h. Decorrido cada período os insetos foram imediatamente eliminados como descrito anteriormente e as plantas mantidas em casa de

vegetação. Foram utilizadas 10 plantas por tratamento. Os procedimentos para avaliação foram os mesmos executados nos testes do PAA e PAI.

2.2.7.4 Determinação do período de retenção do vírus pelo vetor

Adultos livres de vírus foram colocados em contato com tomateiro infectado contidos em tubos de polipropileno de 50 mL durante um período de 48 horas para aquisição do vírus. Foram usados 10 tubos com cerca de 100 moscas cada. Passado esse período, cerca de 1000 insetos foram transferidos para uma planta de couve (*Brassica oleraceae*). Quinze dias depois estes insetos foram novamente transferidos para uma nova planta de couve, para evitar que possíveis adultos da nova geração se misturassem com os insetos virulíferos anteriormente transferidos. A análise da retenção do vírus pelo vetor foi feita de duas maneiras: detectando a presença do ToYVSV no vetor por meio de PCR para o DNA A e verificando a capacidade da *B. tabaci* transmitir o vírus para tomateiros depois de vários dias da aquisição. A coleta dos insetos para análise por PCR foi realizada até a morte completa da colônia. No total foram feitas 8 coletas. Em cada uma foram coletadas quatro amostras constituídas de cinco insetos cada. Para a verificação da capacidade de transmissão da *B. tabaci* foram coletados grupos de insetos, que foram transferidos para dois vasos contendo duas plantas-teste de tomate sadio. Foram usados 10 insetos por vaso. Estes insetos permaneceram em contato com as plantas de tomate por um período de acesso a inoculação de 48h. Decorrido este tempo os insetos foram eliminados das plantas como descrito anteriormente. Esses tomateiros foram mantidos em casa de vegetação para avaliações periódicas de sintomas e confirmação da infecção por PCR.

2.2.7.5 Detecção do ToYVSV na progênie de *B. tabaci*

Inicialmente os insetos livres de vírus foram colocados em contato com tomateiro infectado, durante um período de 24 horas, para a aquisição do vírus. Depois disso, cerca de 50 insetos foram imediatamente transferidos para dois vasos contendo duas plantas-teste de tomate, para o teste de transmissão e confirmação da infectividade dos insetos. Outros 50 insetos foram transferidos para uma planta de berinjela (*Solanum melongena*). Estas plantas foram mantidas separadamente em gaiolas com cerca de 50 cm de altura e 50 cm de largura confeccionadas com tecido escaline para conter os insetos e permitir a ventilação. Os insetos permaneceram durante 12 dias nas plantas de tomate e de berinjela, tempo suficiente para iniciarem a oviposição.

Quando as ninfas provenientes desses insetos virulíferos estavam no quarto instar, tanto em berinjela quanto em tomateiro, amostras destas foram coletadas e submetidas à detecção do vírus via PCR. Foram coletadas cerca de 50 ninfas, que foram divididas em grupos de dez, para realização da extração de DNA, como descrito anteriormente.

A transmissão do vírus à progênie do vetor foi avaliada com os adultos emergidos das ninfas nas folhas da berinjela. Estes adultos foram transferidos para quatro mudas de tomateiro sadio, sendo que a quantidade de insetos por planta-teste variou de 20 a 30. Os insetos permaneceram em contato com os tomateiros por um período de 24 horas para possível transmissão do vírus e em seguida foram eliminados por pulverização. Alguns destes adultos foram coletados para detecção do vírus por PCR.

Todas as plantas-teste de tomate foram mantidas em casa de vegetação para avaliações periódicas de sintomas e confirmação da infecção por PCR.

2.2.8 Identificação de plantas hospedeiras do ToYVSV

Para o estudo da gama de hospedeiras para o isolado de ToYVSV foram avaliadas as espécies vegetais listadas na tabela 7.

Foram utilizados três métodos de inoculação: com vetor, mecânica e com cuscuta (*Cuscuta campestris*). Em todos os métodos as plantas-teste foram inoculadas no estágio de três folhas verdadeiras. Na inoculação com vetor foram usados dois procedimentos. No primeiro, adotou-se o mesmo utilizado nos estudos para determinar os tempos de acesso para aquisição e transmissão. Os insetos provenientes de colônia livre de vírus foram submetidos a um período de aquisição do vírus em folha de tomateiro de 24 h. Após este período, grupos de 20 insetos foram transferidos para vasos contendo 3 plantas da espécie a ser testada, no interior de gaiolas confeccionadas com copos plásticos. Os insetos foram mantidos nas plantas-teste por um período de inoculação de 48 h. Depois disso foram imediatamente eliminados como descrito anteriormente. As plantas-teste foram mantidas na casa de vegetação e avaliadas periodicamente quanto à expressão de sintomas. No segundo procedimento de inoculação as plantas-teste das diferentes espécies foram acondicionadas em uma única gaiola contendo uma colônia virulífera do aleirodídeo. As plantas-teste permaneceram expostas aos insetos virulíferos durante 48 h. Passado esse tempo as plantas-teste foram retiradas da gaiola, pulverizadas com inseticida sistêmico (imidacloprid) e mantidas em casa de vegetação para avaliação periódica de sintomas.

Em ambos os testes amostras foliares de brotações de plantas sintomáticas e assintomáticas foram coletadas 30 e 90 dias após a inoculação para realização de análise molecular (PCR) para confirmação da infecção.

Somente as espécies de plantas que foram identificadas como infectadas com o ToYVSV por meio da inoculação com *B. tabaci* foram submetidas aos testes de transmissão mecânica e por cuscuta.

Para a inoculação mecânica das plantas-teste usou-se extrato de tomateiro infectado com o ToYVSV, diluído 1:10 em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio 0,02 M. O inóculo foi aplicado nas folhas previamente polvilhadas com o abrasivo carborundum (carbureto de silício). Foram inoculadas 12 plantas-teste de cada espécie. As plantas foram mantidas em casa de vegetação para avaliação periódica de sintomas. Após trinta dias da inoculação amostras de tecidos foliares das plantas inoculadas foram coletadas para verificação da presença do vírus via PCR. O teste foi repetido duas vezes.

No teste de transmissão com cuscuta utilizaram-se três plantas de cada espécie e três de tomateiros sadios (controle). A cuscuta que já estava estabelecida em uma planta de tomate infectada com o ToYVSV foi posteriormente estabelecida nessas plantas. Trinta dias após o estabelecimento da cuscuta nas plantas-teste foram realizadas análises de PCR para verificar a infecção. Foram analisados tecidos da cuscuta e das plantas-teste.

As plantas-teste dos ensaios de transmissão mecânica e com cuscuta foram pulverizadas periodicamente com inseticidas sistêmicos (imidacloprid), para eliminar qualquer possibilidade de contaminação com o ToYVSV via *B. tabaci*.

Para verificar se as plantas identificadas como susceptíveis ao ToYVSV são também fonte de inóculo foram realizados ensaios de aquisição e transmissão com *B. tabaci*. Insetos livres de vírus foram acondicionados em pequenas gaiolas presas às folhas das plantas infectadas com ToYVSV (Figura 4) para aquisição do vírus por um período de 48h. Decorrido este período, grupos de 30 insetos foram transferidos para vasos contendo 2 plantas-teste de tomate, no interior de gaiolas confeccionadas com copos plásticos. Foram inoculadas 10 plantas-teste de tomate por planta-teste fonte de inóculo. Os insetos foram mantidos nos tomateiros por um período de 48 h para inoculação do vírus. Passado esse tempo as plantas-teste foram retiradas das gaiolas e os insetos foram imediatamente eliminados. As plantas foram mantidas em casa de vegetação para avaliação periódica de sintomas. Amostras foliares de brotações de todas as plantas-teste de

tomate foram coletadas aos 30 dias após a inoculação para realização de análise molecular (PCR) para confirmação da infecção. Cerca de 20 insetos de cada planta usada como fonte de inóculo foram coletados para análise por PCR para detecção do ToYVSV.



Figura 4 – **A:** Gaiola usada para aquisição do ToYVSV nas plantas identificadas como susceptíveis; **B:** Gaiola presa às folhas de *N. tabacum* cv. TNN infectada

2.3 Resultados e Discussões

2.3.1 Períodos de acesso à aquisição (PAA) e de acesso à inoculação (PAI)

Com base nos dois experimentos realizados, nos quais o período de acesso de inoculação foi sempre de 24 h, foi constatado que a *B. tabaci* biótipo B foi capaz de adquirir o ToYVSV a partir de 30 minutos de alimentação, obtendo-se neste caso uma média de 20% de plantas infectadas. Este percentual aumentou conforme o PAA do vírus pelos insetos foi estendido, alcançando media de 70% quando este foi de 24 h (Tabela 1).

Conforme pode ser observado na tabela 2, a *B. tabaci*, após 24 h de alimentação na fonte de inóculo para aquisição do vírus, foi capaz de transmiti-lo com apenas 10 minutos de PAI, para uma média de 35% plantas de tomate. Como verificado antes nos testes para identificar o PAA, o percentual médio de transmissão também aumentou conforme o PAI foi estendido, constatando-se uma media de 75% de plantas infectadas com um PAI de 24 h.

A infecção das plantas nos testes para identificar o PAA e o PAI foi confirmada via PCR, conforme ilustrado nas figuras 5 e 6, respectivamente. Com isso foi possível constatar que algumas plantas que não exibiram sintomas no período de 30 dias deram reação positiva em PCR,

ou seja, com possível infecção latente. Estas plantas foram acompanhadas durante um período de tempo mais longo, para possível visualização de sintomas, o que ocorreu quase 90 dias após a inoculação. Este tipo de observação sobre a reação da planta à infecção é importante visto que em campo algumas plantas podem servir de fonte de inóculo sem serem percebidas. Este resultado pode também estar associado ao fato destas plantas terem se desenvolvido em vaso dentro de casa de vegetação.

Os períodos mínimos de aquisição e de inoculação do ToYVSV pela *B. tabaci* obtidos foram semelhantes aos relatados por Mehta et al. (1994) para o TYLCV e por Santos, Ávila e Rezende (2003) para o ToRMV. Resultados similares também foram obtidos com o *Cotton leaf curl virus* (CLCV) e com o *Squash leaf curl virus* (SLCV) (COHEN et al., 1983; NATESHAN et al., 1996). Brown e Nelson (1988), ao estudarem a interação do *Chino del tomate virus* (CdTV) com a *B. tabaci* detectaram períodos mínimos de acesso de aquisição e de inoculação de 1 h e 2 h, respectivamente, sendo estes tempos superiores aos obtidos no presente trabalho.

A constatação de curtos períodos de tempo de aquisição e inoculação do vírus pela *B. tabaci* evidencia que a disseminação rápida do ToYVSV em plantações de tomate pode ocorrer mesmo com a aplicação de inseticidas, como tem sido verificado. Mason, Racanti e Bosco (2000), ao estudarem o efeito de thiamethoxam na prevenção da transmissão do TLCV por *B. tabaci* biótipo B, constataram que mesmo após a aplicação deste inseticida em tomateiros, ainda era possível encontrar alguns insetos vivos e algumas plantas infectadas. Os autores constataram que os insetos sobreviventes, quando virulíferos, mesmo após entrarem em contato com o inseticida, ainda eram capazes de transmitir o vírus para outras plantas, porém com baixa eficiência. Isso mostra a importância da eliminação de qualquer fonte de inóculo que esteja próxima da área de plantio, evitando assim a aquisição do vírus pelo vetor e sua disseminação pelo campo. Estudos apontam que o uso de plásticos em cultivos protegidos que absorvem a luz UV podem interferir no comportamento da *B. tabaci*. Segundo Antgnus et al. (2001), estes materiais podem interferir na orientação de vôo do inseto, afetando diretamente na atividade de dispersão do vírus por ele.

Tabela 1 - Transmissão do ToYVSV pela *B. tabaci* biótipo B após diferentes períodos de acesso para aquisição (PAA) do vírus 24 horas de acesso para inoculação

PAA	Primeiro experimento		Segundo experimento		Média de plantas infectadas (%)
	Nº de plantas infectadas/inoculadas	% plantas infectadas	Nº de plantas infectadas/inoculadas	% plantas infectadas	
10 min	0/10	0	0/10	0	0
20 min	0/10	0	0/10	0	0
30 min	2/10	20	2/10	20	20
1 h	2/10	20	3/10	30	25
2 h	2/10	20	5/10	50	35
4 h	4/10	40	3/10	30	35
8 h	2/10	20	3/10	30	25
16 h	8/10	80	5/10	50	65
24 h	8/10	80	6/10	60	70

Tabela 2 - Transmissão do ToYVSV pelo *B. tabaci* biótipo B após diferentes períodos de acesso para inoculação (PAI) do vírus após 24 horas de acesso para aquisição

PAI	Primeiro experimento		Segundo experimento		Média de plantas infectadas (%)
	Nº de plantas infectadas/inoculadas	% de plantas infectadas	Nº de plantas infectadas/inoculadas	% de plantas infectadas	
10 min	4/10	40	3/10	30	35
20 min	5/10	50	4/10	40	45
30 min	4/10	40	4/10	40	40
1 h	4/8	50	5/10	50	50
2 h	4/8	50	5/10	50	50
4 h	4/10	40	4/10	40	40
8 h	4/10	40	4/10	40	40
16 h	6/10	60	8/10	80	70
24 h	8/10	80	7/10	70	75

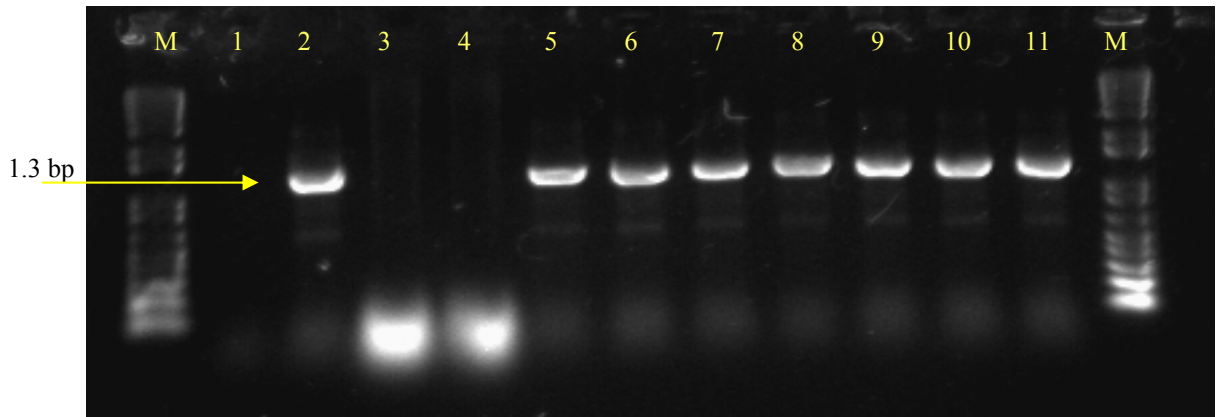


Figura 5 - Detecção do DNA-A do ToYVSV de algumas plantas de tomate do primeiro experimento de PAA. M: marcador molecular de 1Kb; 1: planta sadia; 2: controle positivo; 3-11: PAA de 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h e 24 h, respectivamente

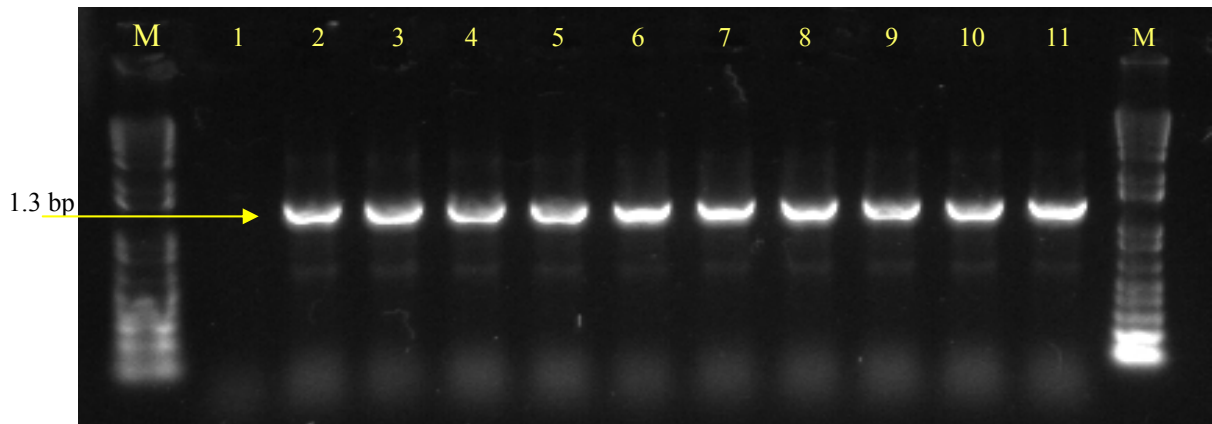


Figura 6 - Detecção do DNA-A do ToYVSV por PCR de algumas plantas de tomate do primeiro experimento de PAI. M: marcador molecular de 1Kb; 1: planta sadia; 2: controle positivo; 3-11: PAI de 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h e 24 h, respectivamente

2.3.2 Período de latência (PL) do ToYVSV na *B. tabaci*

Uma vez identificados os PAA e PAI foi possível identificar o período de latência do ToYVSV na *B. tabaci*. Assim, usando-se um período de aquisição mínimo de 30 minutos, em conjunto com diferentes tempos de acesso a inoculação, foi possível determinar o período aproximado de latência deste vírus no vetor (Tabela 3). De acordo com os resultados do primeiro experimento realizado, observou-se que o início da transmissão, ou seja, término do período de latência, ocorreu a partir de 16 horas e 30 minutos, quando duas, das dez plantas inoculadas exibiram sintomas típicos de amarelecimento das nervuras. A porcentagem de plantas infectadas

não foi alterada quando o tempo de inoculação foi de 24 h. A presença do vírus nas plantas sintomáticas foi confirmado por PCR para o DNA-A, conforme ilustrado na figura 7.

O teste para identificar o período de latência do ToYVSV foi repetido mais duas vezes, com pequenas alterações nos tempos do PAA, que foi de 1h, e do PAI que foram de 7h, 9h, 11h, 13h, 15h e 23h. Os resultados desses experimentos não indicaram variações em relação ao anterior, mostrando assim que o tempo de latência do ToYVSV na *B. tabaci* está próximo de 16 horas (Tabela 4).

Esses resultados mostraram que o isolado do ToYVSV em estudo se aproximou ao de outros begomovírus, como ToRMV (isolado de Brasília), que também teve um período de latência de 16 horas (SANTOS; ÁVILA, REZENDE, 2003). Brown e Nelson (1988) ao estudarem a relação do *Chino del tomate vírus* (CdTV) com a *B. tabaci* contataram períodos de latência de 17h. O SCLV e o TYLCV, que também tiveram sua relação com a *B. tabaci* estudada, mostraram valores de latência de 19 e 21h, respectivamente, sendo um pouco maiores do obtido com o ToYVSV (COHEN et al., 1983; MANSOUR; AL-MUSA, 1992). Mehta et al. (1994) estudando um outro isolado do TYLCV constataram um período de latência de 24 horas, mostrando assim que pode haver variações da interação vírus/vetor dentro de uma mesma espécie. Segundo Harrison (1985) a maioria dos geminivirus requerem um período de latência no vetor de mais de quatro horas, para serem capazes de serem transmitidos, a que não mostrou-se verdadeira nesse estudo e em outros comentados.

Tabela 3 - Transmissão do ToYVSV por *B. tabaci* biótipo B após um período de acesso a aquisição (PAA) do vírus de 30 minutos e diferentes períodos de acesso para inoculação (PAI)

Combinação dos tempos (PAA + PAI)	Período de latência (horas)	Número de plantas infectadas/ inoculadas	% de plantas infectadas
30 + 10min	0,66	0/10	0
30 + 30min	1	0/10	0
30 + 1h	1,5	0/10	0
30 + 2h	2,5	0/10	0
30 + 4h	4,5	0/10	0
30 + 6h	6,5	0/10	0
30 + 8h	8,5	0/10	0
30 + 16h	16,5	2/10	20
30 + 24h	24,5	2/10	20

Tabela 4 - Transmissão do ToYVSV por *B. tabaci* biótipo B após um período de acesso a aquisição (PAA) do vírus de 1 hora e diferentes períodos de acesso para inoculação (PAI)

Combinação dos tempos (PAA + PAI)	Período de latência (horas)	Número de plantas infectadas/ inoculadas	
		Experimento 1	Experimento 2
1h + 7h	8	0/12	0/12
1h+ 9h	10	0/12	0/12
1h + 11h	12	0/12	0/12
1h + 13h	14	0/12	0/12
1h+ 15h	16	1/12	1/12
1h + 23h	24	2/12	1/12

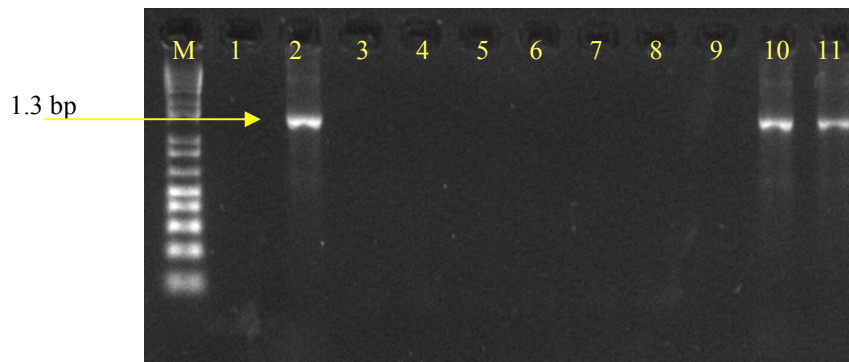


Figura 7 - Detecção do DNA-A do ToYVSV em algumas plantas de tomate do primeiro experimento de PL. M: marcador molecular de 1Kb; 1: planta sadia; 2: controle positivo; 3-11: PL de 0,66 h, 1 h, 1,5 h, 2,5 h, 4,5 h, 6,5 h, 8,5 h, 16,5 h e 24,5 h, respectivamente

2.3.3 Período de retenção do vírus pelo vetor

Os resultados para identificar o tempo de retenção do ToYVSV na *B. tabaci* biótipo B estão na tabela 5. Nota-se que depois de um período de aquisição do vírus de 48h e mantendo-se os insetos em uma planta vegetal imune ao vírus, aqueles que se mantiveram vivos foram capazes de transmitir o vírus até 20 dias após a aquisição no primeiro experimento e 15 dias no segundo experimento, embora a detecção do vírus nos insetos, por meio de PCR, ocorreu em período de tempo superior. Com o passar do tempo, todavia, o número de plantas infectadas foi reduzido, chegando a zero. É possível que essa redução tenha ocorrido porque o vírus não se multiplica no vetor e conseqüentemente a sua concentração reduz com o tempo. Na figura 8 é possível ver a detecção do ToYVSV por PCR em insetos coletados três dias após a aquisição do vírus.

Baseando-se somente no desenvolvimento de sintomas em plantas inoculadas através de *B. tabaci*, Idris e Brown (1998) detectaram a persistência do *Sinaloa tomato leaf curl virus* (STLCV) em adultos deste aleirodídeo por no máximo 9 dias, enquanto Cohen et al. (1983) detectaram a retenção do *Squash leaf curl virus* (SLCV) por 26 dias, sendo este resultado parecido com o obtido no presente trabalho. A persistência do vírus no vetor, por volta de 20 dias, também foi constatada por Cohen e Nitzany (1966) para o TYLCV, e por Costa e Bennett (1950) com um begomovírus que infecta *Euphorbia prunifolia*, que é transmitido por *B. tabaci*. No caso do *Chino del tomate virus* (CdTV), o período de retenção variou de 4 a 7 dias, sendo que esta variação foi proporcional ao tempo de aquisição deste vírus pelo seu vetor (BROWN; NELSON, 1988). Segundo Brown e Bird (1992) após a aquisição, no geral a *B. tabaci* pode transmitir um begomovírus por um período de 5 a 20 dias, com uma gradual perda de eficiência de transmissão ao longo do tempo, sendo que pouco se sabe sobre os mecanismos que envolvem esta interação entre o vírus e seu vetor. Muitas vezes a persistência do vírus no vetor pode durar por toda a vida do inseto (HARRISON, 1985).

Tabela 5 - Detecção do ToYVSV em adultos de *B. tabaci* biótipo B e número de plantas infectadas com o vírus, 26 dias após a aquisição do vírus pelos insetos

Total de dias	Amostras positivas no PCR		Número de plantas infectadas**	
	/Amostras coletadas*		/plantas inoculadas	
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 1	Experimento 2
0	3/4	3/4	4/4	4/4
3	3/4	4/4	3/4	3/4
6	2/4	4/4	2/2	2/3
9	4/4	4/4	2/4	2/2
12	4/4	4/4	1/3	1/4
15	4/4	4/4	1/3	1/4
20	3/4	3/4	1/4	0/4
25	4/4	M	0/4	-
26	M	M	-	-

* Cada amostra foi constituída por cinco adultos de *B. tabaci*; ** Infecção confirmada via PCR; **M**: Morte de todos os insetos

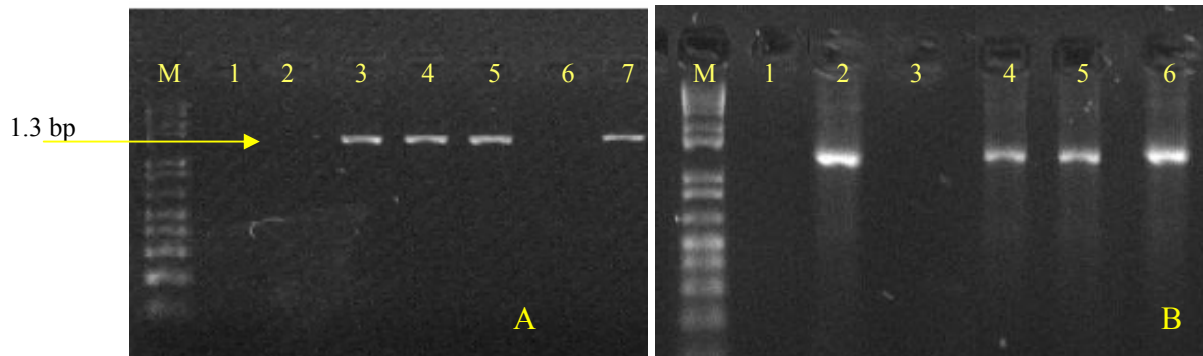


Figura 8 - **A:** Detecção do DNA-A do ToYVSV em amostras de *B. tabaci* biótipo B coletadas 3 dias após a aquisição do vírus no primeiro experimento. M: marcador molecular de 1Kb; 1 e 6: *B. tabaci* biótipo B sadia; 2 a 5: amostras de *B. tabaci* coletadas; 7: *B. tabaci* biótipo B positivas (controle), respectivamente. **B:** Detecção do DNA-A do ToYVSV em plantas de tomate do primeiro experimento, referente ao teste de infectividade das *B. tabaci* biótipo B coletadas 3 dias após a aquisição do vírus. 1: tomate sadio; 2: planta de tomate infectada usada como controle positivo da extração; 3 a 6: Tomates inoculados com *B. tabaci* biótipo B

2.3.4 Detecção do ToYVSV na progênie de *B. tabaci*

Os resultados dos testes realizados não indicaram a passagem do ToYVSV de adultos virulíferos para sua progênie. Nenhuma das amostras de ninfas e adultos da primeira geração oriunda de adultos virulíferos mantidos em berinjela indicou a presença do vírus por meio de análise de PCR. Nenhuma das plantas de tomate, nas quais os adultos da primeira geração se alimentaram por 24 h, exibiu sintomas de infecção com o ToYVSV. Também não foi detectado o vírus por PCR (Figura 9). Os resultados obtidos nos cinco experimentos realizados podem ser visualizados na tabela 6.

Os resultados desses testes devem ser interpretados com cautela, pois a não detecção do vírus por PCR pode estar associada à baixa concentração deste no inseto ou estar presente somente em alguns indivíduos, podendo o método de extração e detecção não serem eficientes para este caso. Polston et al. (1990) ao estudarem a associação do ácido nucléico do SLCV com *B. tabaci* biótipo A, comprovaram a baixa eficiência da passagem do vírus de insetos virulíferos para sua progênie. Os autores detectaram o DNA viral somente em uma ninfa dentre as 196 testadas individualmente, e em nenhuma das 335 testadas em grupos. Estes autores também não detectaram os SLCV em 63 adultos emergidos da oviposição de insetos virulíferos. Estudos realizados com o Euphorbia mosaic virus (EuMV), com o *Sinaloa tomato leaf curl virus* (STLCV) também deram resultados negativos de transmissão pela progênie (COSTA, A., 1976;

IDRIS; BROWN, 1998). Contrastando com estes resultados, Santos, Ávila e Rezende (2003) comprovaram a passagem trasestadial do ToRMV, detectando o ácido nucléico viral em ninfas (em todos os estádios de desenvolvimento) e adultos oriundos de insetos virulíferos, porém os adultos não foram capazes de transmitir o vírus para tomateiro.

Tabela 6 - Detecção do ToYVSV na progênie de *B. tabaci* biótipo B oriunda de adultos virulíferos

Experimento	Data de realização	% de tomateiros infectados/testados ^A	Total de amostras de ninfas positivas / amostras testadas ^B	Total de amostras de adultos positivas / amostras testadas ^C	% de tomateiros infectados/testados ^D
1	08/12/2006	3/4	0/5	0/5	0/4
2	08/12/2006	3/4	0/5	0/5	0/4
3	08/12/2006	4/4	0/5	0/5	0/4
4	29/01/2007	1/4	0/5	0/5	0/4
5	16/02/2007	3/4	0/5	0/5	0/4

A: Tomateiros usados como controle para verificar se adultos de *B. tabaci* estavam virulíferos; **B:** ninfas de 4^o instar coletadas de berinjela, providas de insetos virulíferos, para realização de PCR. Cada amostra testada corresponde a um conjunto de 10 ninfas. **C:** Insetos adultos da primeira progênie coletados de berinjela, para realização de PCR. Cada amostra testada corresponde a um conjunto de 10 insetos; **D:** Tomateiros usados nos testes de transmissão do ToYVSV por adultos de *B. tabaci* da primeira geração de insetos virulíferos.

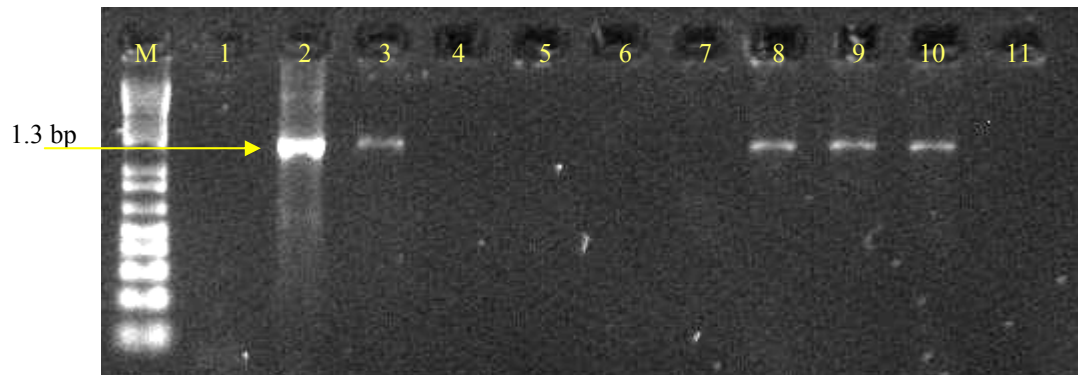


Figura 9 - Detecção do DNA-A do ToYVSV em ninfas e insetos adultos provenientes de *B. tabaci* virulíferas. M: marcador molecular de 1Kb; 1: planta de tomate sadia; 2: planta de tomate inoculada com *B. tabaci* virulífera; 3: *B. tabaci* virulífera usada para ovipositar em berinjela; 4: Ninfas oriundas de insetos virulíferos coletadas de berinjela; 5: Insetos adultos, da primeira geração, coletados na berinjela; 6: Planta de tomate inoculada com insetos adultos coletados na berinjela; 7: *B. tabaci* coletada de colônia sadia (controle negativo); 8 e 9: *B. tabaci* controle positivo (provinha de colônia virulífera); 10: ninfa coletada de colônia de *B. tabaci* virulífera; 11: ninfa coletada de colônia sadia

2.3.5 Espécies hospedeiras do ToYVSV

2.3.5.1 Transmissão por *B. tabaci*

Dentre as 34 espécies testadas (Tabela 7), somente *C. annuum*, *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *D. stramonium*, *G. globosa*, *N. tabacum* cv. TNN e *N. clevelandii* foram identificadas como infectadas com o ToYVSV, exibindo menor desenvolvimento em relação as plantas sadias. Destas plantas, apenas *C. annuum*, *D. stramonium*, *N. tabacum* cv. TNN e *N. clevelandii* mostraram sintomas, sendo que *C. annuum* e *D. stramonium* exibiram sintomas mais expressivos de mosaico, e *N. tabacum* cv. TNN e *N. clevelandii* apenas um leve clareamento das nervuras e certo enrugamento foliar (Figura 10). Todos esses sintomas foram observados nas plantas cerca de 20 dias após a inoculação e atenuados conforme o crescimento destas ao ponto de quase não serem percebidos 90 dias após a inoculação. Segundo Brown (1997), os efeitos de begomovírus em plantas daninhas hospedeiras, apesar de essas desenvolverem sintomas foliares e redução de crescimento, são menos severos que nas plantas cultivadas.

Stonor et al. (2003) estudando a gama de hospedeiros de um isolado de TLCV da Austrália, também notaram baixa porcentagem de plantas susceptíveis ao vírus, das 58 somente 11 foram capazes de contrair o TLCV, sendo que cinco destas plantas não exibiram sintomas. Idris e Brown (1998) ao realizarem testes para identificação de plantas susceptíveis ao STLCV obtiveram um número bem baixo de plantas infectadas. Segundo os autores, das 21 espécies testadas somente 5 mostraram ser suscetíveis ao STLCV.

Decorrido 90 dias após a inoculação, as amostras coletadas de plantas identificadas como susceptíveis ao ToYVSV ainda deram reações positivas para a presença do DNA A, mas não para o DNA B (Figura 11 e 12), que também não foi detectado na análise anterior, quando as plantas eram mais jovens. A hipótese de que a reação de PCR para detecção do DNA B tenha falhado foi descartada visto que este componente foi amplificado a partir do tomate infectado usado como controle da reação. A idéia de que este não esteja presente na planta também não é válida, pois segundo Fauquet et al. (2005), o DNA B é requerido para infecção sistêmica do hospedeiro, sendo isto observado nas plantas que se mostraram susceptíveis. Assim a não detecção pode estar associada a baixa concentração do DNA B nas plantas, visto que sua replicação é independente do DNA A.

Tabela 7 - Reação de diferentes espécies vegetais inoculadas com o ToYVSV por meio da *B. tabaci* biótipo B
(Continua)

Espécies testadas	Nº de plantas positivas em PCR/ Nº de plantas inoculadas			
	Exp. 1 ^b	Exp. 2 ^b	Exp. 3 ^c	Sintomas
<i>Abelmoschus esculentus</i>	0/6	0/6	0/6	-
<i>Amaranthus viridis</i>	0/6	0/6	0/6	-
<i>Capsicum annuum</i> Magali R	3/6	3/6	4/6	M
<i>C. baccatum</i>	0/6	0/6	NT	-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	2/6	1/6	2/6	SS
<i>Chenopodium quinoa</i>	1/6	1/6	1/6	SS
<i>Commelina benghalensis</i>	0/6	0/6	0/6	-
<i>Curcubita pepo</i> cv. Caserta	0/6	0/6	0/6	-
<i>Datura metel</i>	0/6	0/6	NT	-
<i>D. stramonium</i>	3/6	2/6	3/6	M
<i>Euphorbia heterophylla</i>	0/6	0/6	0/6	-
<i>Glycine Max</i> cv Conquista	0/6	0/6	0/6	-
<i>Gomphrena globosa</i>	1/6	1/6	1/6	SS
<i>Gossypium hirsutum</i>	0/6	0/6	0/6	-
<i>Ipomoea grandifolia</i>	0/6	0/6	0/6	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	0/6	0/6	0/6	-
<i>N. clevelandii</i>	3/6	1/6	2/6	CN, E
<i>N. edwardson</i>	0/6	0/6	NT	-
<i>N. rustica</i>	0/6	0/6	NT	-
<i>N. tabacum</i> cv Xanty	0/6	0/6	NT	-
<i>N. tabacum</i> cv. Havana	0/6	0/6	0/6	-
<i>N. tabacum</i> cv. TNN	2/6	1/6	3/6	CN, E
<i>N. tabacum</i> cv. Turkish	0/6	0/6	0/6	-
<i>Nicandra physaloides</i>	0/6	0/6	0/6	-
<i>Oxalis latifolia</i>	0/6	0/6	0/6	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	0/6	0/6	0/6	-
<i>Physalis floridana</i>	0/6	0/6	0/6	-
<i>Raphanus raphanistrum</i>	0/6	0/6	0/6	-

Tabela 7 - Reação de diferentes espécies vegetais inoculadas com o ToYVSV por meio da *B. tabaci* biótipo B (Conclusão)

Espécie testada	Nº de plantas positiva sem PCR/ Nº de plantas inoculadas			Sintomas
	Exp. 1 ^b	Exp. 2 ^b	Exp. 3 ^c	
<i>Senna obtusifolia</i>	0/6	0/6	0/6	-
<i>Sida rhombifolia</i>	0/6	0/6	0/6	-
<i>Solanum americanum</i>	0/6	0/6	0/6	-
<i>S. sisymbriifolium</i>	0/6	0/6	0/6	-
<i>S. tuberosum</i> vr Culpido	0/6	0/6	NT	-
<i>Sonchus oleraceus</i>	0/6	0/6	0/6	-

M: Mosaico; **CN:** Clareamento de nervuras; **E:** Enrugamento; **SS:** Sem sintoma; **NT:** Não testada; **Exp. 3 e 4:** realizado com confinamento dos insetos virulíferos em gaiolas individuais; **Exp. 5:** realizado com exposição das plantas à colônia virulífera; **-:** Ausência de infecção.

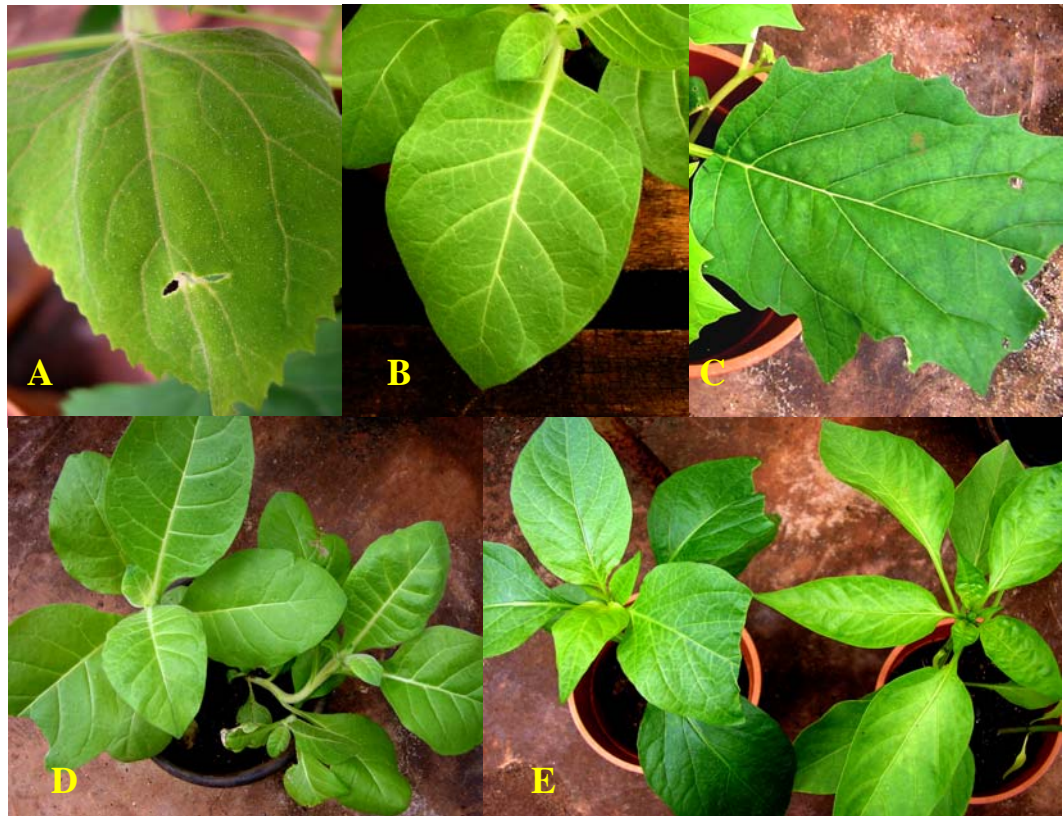


Figura 10 - (A) Planta de *C. amaranticolor* infectada com ToYVSV, sem sintomas; (B) Planta de *N. tabacum* cv. TNN com sintomas de clareamento de nervuras; (C) Planta de *D. stramonium*, com mosaico leve; (D) Planta de *N. clevelandii* com sintomas de clareamento de nervuras e leve bolhosidade (a direita planta infectada e a esquerda planta sadia); (E) Planta de *C. annuum* com sintomas de mosaico (a direita planta sadia e a esquerda planta infectada)

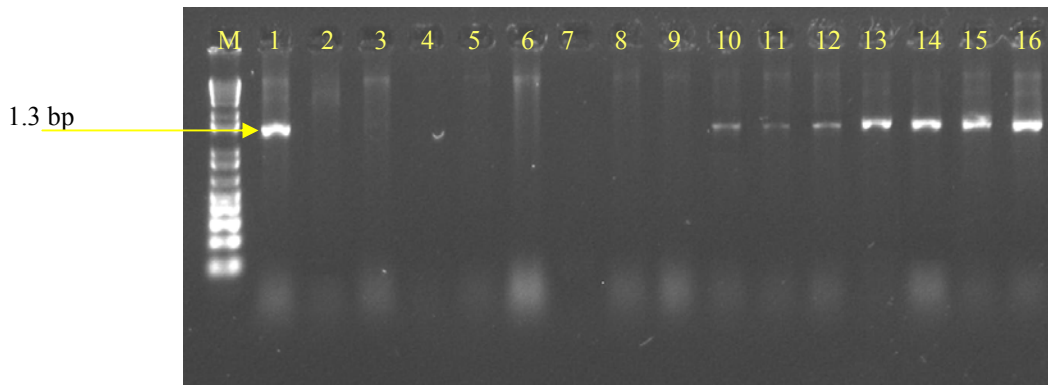


Figura 11 -Detecção do DNA-A do ToYVSV em plantas inoculadas com *B. tabaci*. M: marcador molecular de 1Kb; 1: planta tomate infectada com ToYVSV (controle); 2: planta de tomate sadia (controle negativo); 3 a 9: plantas sadias de *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *G. globosa*, *D. stramonium*, *C. annuum*, *N. tabacum* cv. TNN e *N. clevelandii*, respectivamente; 10 a 16: plantas infectadas de *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *G. globosa*, *D. stramonium*, *C. annuum*, *N. tabacum* cv. TNN e *N. clevelandii*, respectivamente

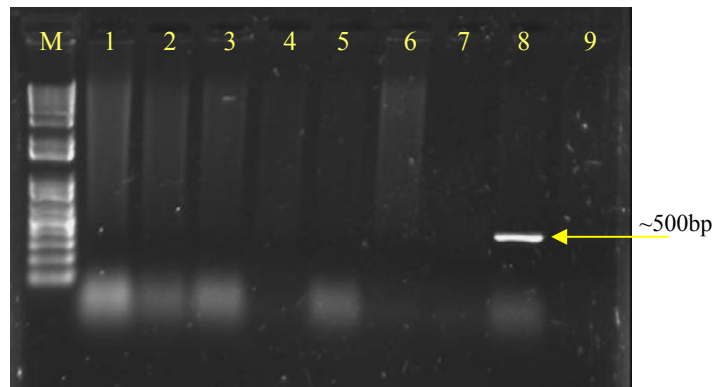


Figura 12 -Detecção do DNA-B do ToYVSV em plantas inoculadas com *B. tabaci*. M: marcador molecular de 1Kb; 1 a 7: plantas infectadas de *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *G. globosa*, *D. stramonium*, *C. annuum*, *N. tabacum* cv. TNN e *N. clevelandii*, respectivamente; 8: planta tomate infectada com o ToYVSV (controle); 9: planta de tomate sadia (controle negativo)

Relatos de infecções naturais por begomovírus em pimentão já foram feitos por Lima et al. (2001) em Pernambuco, e mais recentemente por Krause-Sakate et al. (2007) em São Paulo. Infecções causadas por begomovírus em *D. stramonium* também são freqüentemente relatadas na literatura (PICÓ; DIEZ; NUEZ, 1996, SANTOS et al., 2004). A predominância de solanáceas dentre as hospedeiras do ToYVSV está de acordo com os dados observados por Brown e Nelson (1988) para o CdTV, por Picó, Diez e Nuez (1996) para o TYLCV, por Stonor et al. (2003), para o TLCV e Santos et al. (2004), para dois isolados de begomovírus coletados no Distrito Federal.

Souza-Dias et al. (1996) ao trabalharem com amostras de plantas de tomate que exibiam sintomas típicos de amarelecimento de nervuras em tomateiro, que mais tarde Faria et al. (1997) atribuíram ao ToYVSV, identificaram *D. stramonium*, *Physalis* sp., *N. tabacum* cv. Turkish, *P. vulgaris*, *S. rhombifolia* e batata (*S. tuberosum*) como hospedeiras deste vírus. Estes resultados diferem daqueles obtidos no presente trabalho, visto que com exceção de *D. stramonium*, todas as outras plantas testadas não se mostraram suscetíveis ao isolado de ToYVSV em estudo. Uma hipótese para explicar este fato seria a de se tratarem de isolados distintos que podem ter reações diferentes. Um exemplo disso é o que ocorreu no trabalho de Santos et al (2004), que estudou a gama de hospedeiros de dois isolados geneticamente parecidos coletados em regiões distintas. Um isolado, chamado de GO-ANPL, causava clareamento de nervura e pontos cloróticos em *D. stramonium*, enquanto o outro, intitulado de DF-BR2, causava mosaico e rugosidade nesta mesma espécie. Estes isolados também induziram diferentes sintomas em plantas de *N. tabacum* cv. TNN, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. benthamiana* e *N. physaloides*.

Relato de ocorrência de ToYVSV isolado de batata, coletado em 1983, no Estado do Rio Grande do Sul, infectando *N. benthamiana* e *N. physaloides* experimentalmente foram realizados por Ribeiro et al. (2007a). Estes resultados enfatizam mais uma vez as diferenças que podem haver entre isolados de uma mesma espécie de vírus, pois nenhuma dessas plantas foi infectada pelo isolado de ToYVSV do presente estudo, que também não infectou plantas de batata.

Além de se identificar algumas espécies susceptíveis ao ToYVSV, este trabalho possibilitou a observação de plantas onde a *B. tabaci* biótipo B tem maior preferência. Com exceção de *A. esculentus*, *N. benthamiana* e *D. metel*, todas as outras espécies testadas foram aceitas pelo inseto. Em algumas plantas, como *S. oleraceus* e *P. floridana*, foi possível notar a aparente ação de toxina produzida pelo inseto, que induziu sintomas de mosaico e deformação foliar, facilmente confundível com sintomas causados por vírus (Figura 13). Estes sintomas regrediram com o desenvolvimento da planta e com a eliminação das ninfas presentes nela. Este tipo de reação da planta as toxinas injetadas pela *B. tabaci* também foi notada por Costa e Bennett (1950) ao determinarem a susceptibilidade de várias espécies de plantas a um vírus denominado Euphorbia mosaic I.

As plantas que se mostraram susceptíveis ao ToYVSV também foram testadas como fonte de inóculo do vírus. Para isso foi estudada a transmissão do ToYVSV presente nas espécies susceptíveis para tomateiros por meio da *B. tabaci*. De acordo com os resultados obtidos, todas as

plantas serviram como fonte de inóculo (Tabela 8). A presença do ToYVSV também foi confirmada em grupos de aleirodódeos coletados nas espécies de plantas usadas como fonte de inóculo. Estes resultados mostram a importância dessas espécies vegetais como reservatório do vírus no campo, podendo contribuir para a disseminação deste dentro de culturas importantes como a do tomateiro e pimentão, ou até mesmo de batata, visto que já foi relatado um isolado do ToYVSV de tomateiro capaz de infectar batata (SOUZA-DIAS et al., 1996).

Tabela 8 - Transmissão do ToYVSV para tomateiros após a aquisição do vírus pela *B. tabaci* biótipo B em diferentes espécies susceptíveis ao vírus

Planta fonte	Primeiro experimento		Segundo experimento		Média de plantas infectadas (%)
	Nº de plantas infectadas/inoculadas	% plantas infectadas	Nº de plantas infectadas/inoculadas	% plantas infectadas	
<i>C. quinoa</i>	1/10	10	2/10	20	15
<i>C. amaranthicolor</i>	0/10	0	4/10	40	20
<i>C. annuum</i>	1/10	10	6/10	60	30
<i>G. globosa</i>	2/10	20	5/10	50	35
<i>D. stramonium</i>	1/10	10	3/10	30	20
<i>N. tabacum</i> cv. TNN	1/10	10	3/10	30	20
<i>N. clevelandii</i>	1/10	10	4/10	40	25



Figura 13 - *S. oleraceus* com sintomas de leve mosaico induzido por toxina de *B. tabaci*

2.3.5.2 Transmissão mecânica e com *Cuscuta campestris*

A transmissão do ToYVSV por inoculação mecânica e por *C. campestris* foi realizada somente com as plantas suscetíveis nos testes de transmissão de *B. tabaci* biótipo B. Quando se realizou a transmissão do ToYVSV mecanicamente, o número de plantas infectadas diminuiu drasticamente, sendo que somente uma planta de *D. stramonium*, entre doze inoculadas, foi infectada, em 3 experimentos realizados (Tabela 9, Figura 14). Isso é compreensível, pois a maioria dos begomovírus não são transmitidos mecanicamente. O mesmo ocorreu no trabalho de Idris e Brown (1998) que não obtiveram sucesso ao inocularem *D. metel*, *D. stramonium*, *N. tabacum* cv. Samsun, pimentão e tomateiro com extrato de tomateiro infectado com o STLTV. Costa e Bennett (1950) ao inocularem centenas de plantas de diferentes espécies com um begomovírus encontrado em *E. prunifoliai* conseguiram infectar somente *D. stramonium*, e mesmo assim em pequena porcentagem. Segundo esses autores o que pode contribuir para a baixa eficiência da transmissão mecânica seriam fatores como baixa concentração do vírus no extrato vegetal, a inativação do vírus na preparação do inóculo ou uma alteração na célula da planta inoculada. Sendo assim a possibilidade de contaminação acidental da única planta de *D. stramonium* que se mostrou positiva para o teste de inoculação mecânica não pode ser descartada.

Tabela 9 - Reação de algumas espécies vegetais ao ToYVSV após inoculação mecânica a partir de extrato de tomateiro infectado

Espécie testada	Número de plantas positivas PCR/ inoculadas		
	Exp.1	Exp.2	Exp.3
<i>C. annuum</i>	0/12	0/12	0/12
<i>C. amaranticolor</i>	0/12	0/12	0/12
<i>C. quinoa</i>	0/12	0/12	0/12
<i>D. stramonium</i>	1/12	0/12	0/12
<i>G. globosa</i>	0/12	0/12	0/12
<i>N. tabacum</i> cv. TNN	0/12	0/12	0/12
<i>N. clevelandii</i>	0/12	0/12	0/12
<i>L. esculentum</i>	0/12	0/12	0/12

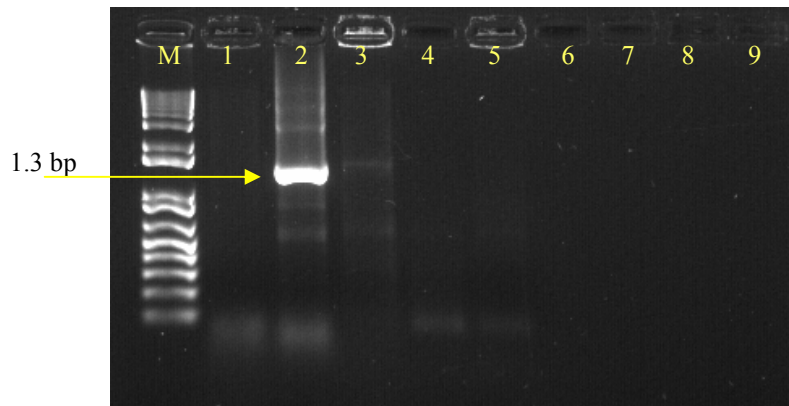


Figura 14 - Detecção do DNA-A do ToYVSV nas plantas inoculadas mecanicamente. M: marcador molecular de 1Kb; 1: tomate inoculado mecanicamente (controle); 2: *D. stramonium* infectada com o ToYVSV; 3: planta tomateiro sadio; 4 a 9: plantas de *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *G. globosa*, *C. annuum*, *N. tabacum* cv. TNN e *N. clevelandii*, respectivamente

Colariccio et al. (2007) ao estudarem algumas características moleculares e biológicas de alguns isolados de ToYVSV, testaram a passagem deste vírus por meio de inoculação mecânica para plantas de *C. amaranticolor*, *D. metel*, *D. stramonium*, *N. glutinosa* e *N. tabacum* cv 'White Burley'. Os resultados foram similares ao do presente trabalho, visto que não houve sucesso na transmissão do ToYVSV para nenhuma das plantas testadas.

Existe porém trabalhos que obtiveram sucesso na transmissão mecânica de geminivírus. Fernandes et al. (2006) verificaram que a transmissão do ToRMV via extrato vegetal só é possível quando ocorre de tomateiro para *N. benthamiana* e desta para tomateiro, mas nunca de tomateiro para tomateiro. A mesma observação foi realizada por Costa, Oliveira e Silva (1977), que ao fazerem a transmissão mecânica do agente causal do mosaico dourado do tomateiro, a partir de folhas de tomate, para diversas espécies de plantas, perceberam que o tomate foi a que se teve menor porcentagem de infecção, uma planta susceptível em 94 inoculadas. Porém quando estes autores utilizavam outra espécie como fonte de inóculo, como *Physalis sp.*, obtinha-se sucesso na inoculação do tomate (12 plantas susceptíveis dentre 40 testadas). No presente trabalho tentou-se infectar plantas de tomate mecanicamente a partir de extrato vegetal das hospedeiras identificadas. Nenhuma planta de tomate inoculada foi infectada (Tabela 10). Ribeiro et al. (2007b) também obtiveram sucesso na inoculação mecânica do TCMV em diferentes espécies vegetais. Das 13 espécies inoculadas 9 foram infectadas pelo vírus, dentre elas estão *N. rustica*, *N. clevelandii* e *D. stramonium*. Calegario et. al, (2007) também conseguiram transmitir,

a partir de inoculação mecânica, o Tomato yellow spot virus (ToYVSV). Das 20 espécies testadas 11 foram infectadas e com alta porcentagem de infecção, por exemplo, 13 das 15 plantas de *D. stramonium* foram infectadas pelo vírus.

Tabela 10 - Reação de plantas de tomate ao ToYVSV após inoculação mecânica com extrato de diferentes espécies vegetais infectadas com o vírus

Planta fonte	Número de plantas de tomate positivas para PCR/ inoculadas	
	Exp.1	Exp.2
<i>C. annuum</i>	0/16	0/18
<i>C. quinoa</i>	0/18	0/18
<i>C. amaranticolor</i>	0/18	0/18
<i>D. stramonium</i>	0/18	0/18
<i>G. globosa</i>	0/18	0/18
<i>N. tabacum</i> cv. TNN	0/16	0/18
<i>N. clevelandii</i>	0/16	0/18
<i>L. esculentum</i>	0/18	0/18

No teste de transmissão com a cuscuta somente uma planta-teste de tomateiro foi infectado (Tabela 11), em dois experimentos independentes. Análise de PCR indicou que o vírus estava presente no tecido da cuscuta, bem como no tomateiro usado como planta-teste (Figura 15). A figura 16 ilustra o estabelecimento da cuscuta em tomateiro e pimentão.

Um experimento complementar para avaliar a capacidade de multiplicação e retenção do ToYVSV pela cuscuta foi realizado. Para isso, fragmentos de cuscuta, que tiveram a presença do vírus confirmada por PCR, foram estabelecidos em plantas de berinjela (que não é hospedeira do vírus) e em plantas de tomate. Após 10 dias da transferência, a cuscuta estabelecida no tomateiro e na berinjela não apresentava mais o vírus em seu tecido indicando assim que o ToYVSV não parece multiplicar-se nesta planta. Assim sendo parece que a cuscuta usada neste estudo serviu apenas como um duto para a movimentação do vírus entre plantas. Porém esse movimento não parece ser eficiente, visto que apenas uma planta foi infectada. Há necessidade de mais análises para comprovar estes fatos.

Tabela 11 - Reação de algumas espécies vegetais ao ToYVSV no teste de transmissão por cuscuta

Espécie testada	Número de plantas positivas no PCR/ inoculadas		
	Exp.1	Exp.2	Sintoma
<i>C. annuum</i>	0/3	0/3	SS
<i>C. quinoa</i>	0/3	0/3	SS
<i>C. amaranticolor</i>	0/3	0/3	SS
<i>D. stramonium</i>	0/3	0/3	SS
<i>G. globosa</i>	0/3	0/3	SS
<i>N. tabacum</i> cv. TNN	0/3	0/3	SS
<i>N. clevelandii</i>	0/3	0/3	SS
<i>L. esculentum</i>	1/3	0/3	AN

AN: Amarelecimento de nervuras, SS: sem sintomas.

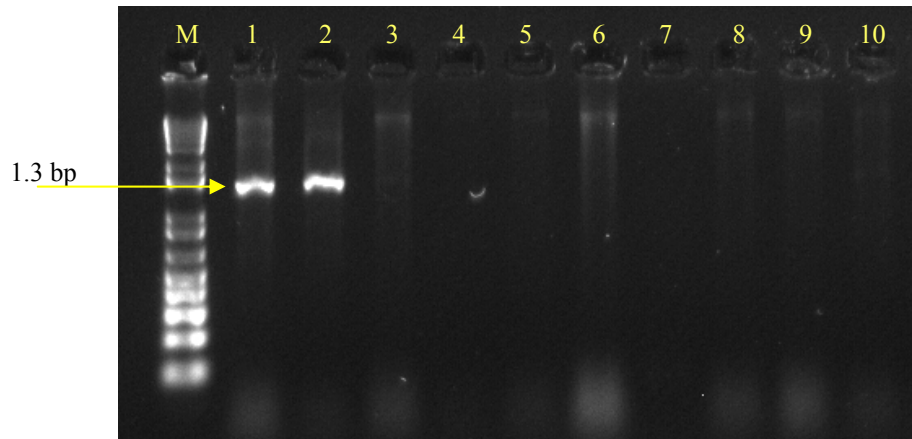


Figura 15 - Detecção do DNA-A do ToYVSV nas plantas inoculadas com cuscuta. M: marcador molecular de 1Kb; 1: cuscuta estabelecida na fonte de inóculo 2: tomateiro infectado com o ToYVSV por cuscuta; 3 a 10: plantas de *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *G. globosa*, *D. stramonium*, *C. annuum*, *N. tabacum* cv. TNN, *N. clevelandii*, cuscuta sadia, respectivamente



Figura 16 - Planta de *Capsicum annuum* parasitada pela cuscuta (esquerda). Cuscuta estabelecida em planta de tomate (direita)

3 CONCLUSÕES

- Os períodos de aquisição e de inoculação do ToYVSV pela *B. tabaci* biótipo B foram de no mínimo 30 e 10 minutos, respectivamente. Conforme há aumento em ambos os períodos há maior eficiência de transmissão do vírus pelo vetor.
- O período de latência do vírus no vetor foi de aproximadamente 16 horas.
- Não há passagem do ToYVSV para ninfas e adultos oriundos de insetos virulíferos.
- A *B. tabaci* biótipo B foi capaz de transmitir o ToYVSV até 20 dias após a aquisição deste.
- Dentre as 34 espécies de plantas testadas, somente *Capsicum annuum*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *N. tabacum* cv. TNN e *N. clevelandii* foram identificadas como suscetíveis ao ToYVSV a partir de inoculação utilizando *B. tabaci* biótipo B.
- Todas as plantas identificadas como susceptíveis ao ToYVSV servem como fonte de inóculo do vírus para aquisição por *B. tabaci* biótipo B e posterior transmissão para tomateiro.
- A transmissão de ToYVSV mecanicamente e por *Cucuta campestris* não foi eficiente.

REFERÊNCIAS

- AL-AQEEL, H.A. **Characterization of two begomoviruses isolated from *Sida santaremensis* Monteiro and *Sida acuta* Burm. f.** 2004. 67 p. Thesis (Master in Science) – University of Florida.
- AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 372-377, 2002.
- ANDRADE, E.C.; ALFENAS ZERBINI, P.; MANHANI, G.G.; CALEGARIO, R.F.; LIMA, A.T.M.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Tomato yellow spot virus (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil with a recombinant origin, is capable of forming viable pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida* sp. In: INTERNATIONAL GEMINIVIRUS SYMPOSIUM, 5.; INTERNATIONAL ssDNA COMPARATIVE VIROLOGY WORKSHOP, 3., 2007, Ouro Preto. **Resumos ...**Ouro Preto: UFV, 2007. p. 90.
- ANTIGNUS, Y.; NESTEL, D.; COHEN, S.; LAPIDOT, M. Ultraviolet-deficient greenhouse environment affects whitefly attraction and flight-behavior. **Journal of Economic Entomology**, Berlin, v. 30, n. 2, p. 394-399, 2001.
- ASSUNÇÃO, I.P.; LISTIK, A.F.; BARROS, M.C.S.; AMORIM, E.P.R.; SILVA, S.J.C.; IZAEL, O. S.; RAMALHO-NETO, C.E.; LIMA, G.S.A. Diversidade genética de begomovirus que infectam plantas invasoras na região nordeste. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 239-244, 2006.
- AZZAM, O.; FRAZEN, J.; DELAROSA, D.; BEAVER, J.S.; AHLQUIST, P.; MAXWELL, D. P.; Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of Bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. **Virology**, New York, v. 204, p. 289-296, 1994.
- BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.M.; ROSELL, R.C.; MARKHAM, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. **Annals of Applied Biology**, Inglaterra, v.125, p.311-325, 1994.
- BEZZERA, I.C.; RIBEIRO, S.G.; ÁVILA, A.C.; GIORDANO, L.B. Survey of geminivirus in tomato producing areas in Federal District. In: ENCONTRO NACIONAL E VIROLOGIA, 8., 1996, São Lourenço. **Resumos ...** São Lourenço: Sociedade Brasileira de Virologia, 1996. p.289
- BEZZERA, I.C.; LIMA, M.F.; RIBEIRO, S.G.; GIORDANO, L.B.; ÁVILA, A.C. Occurrence of geminivirus in tomato producing áreas in Submédio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.331, 1997. Resumo.
- BOSCO, D.; MASON, G.; ACCOTTO, G.P. TYLCSV DNA, but not infectivity, can transovarially inherited by the progeny of the whitefly vector *Bemisia tabaci* (Gennadius). **Virology**, New York, v. 323, p. 276-283, 2004.

BRIDDON, R. W.; PINNER M.S.; STALEY, J.; MARKHAL. P.G.; Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, New York, v. 177, p. 85-94, 1990.

BROWN, J.K. The biology and molecular epidemiology of the Geminiviridae subgroup III. In: STACEY, G.E.; KEEN, N.T. (Ed.). **Plant-microbe interactions**. Saint Paul: APS Press, 1997. p. 125-195.

BROWN, J.K.; BIRD, J. White fly transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean basin. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, n. 3, p. 220-225, 1992.

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

CALEGARIO, R.F.; FERREIRA, S.S.; ANDRADE, E.C.; ZERBINI, F.M. Characterization of Tomato yellow spot virus, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 9, p. 13335-1343, 2007.

CALEGARIO, R.F.; ANDRADE, E.C.; FERREIRA, S.S.; MANHANI, G.G.; ZERBINI, F.M. Caracterização de um isolado do begomovirus *Sida micrantha virus* (SimMV) obtido de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 180, 2005. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38., 2005, Brasília.

COHEN, S.; ANTIGNUS, Y. *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. **Advances in disease Vector Research**, New York, v. 10, p. 259-288, 1994.

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

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

COLARICCIO, A.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; CHAGAS, C.M.; SAWAZAKI, H.E.; CHAVES, A. L.R.; EIRAS, M. Novo surto de geminivirus em *Lycopersicon esculentum* na região de Campinas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n. 1, p. 105, 2001.

COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A.L.R.; BERGMAN, J.C.; ZERBINI, F. M.; HARAKAVA, R.; CHAGAS, C.M. Tomato yellow vein streak virus, a new begomovirus on tomato from Brazil: complete DNA A sequence and some molecular and biological features. **Journal of Plant Pathology**, Oxford, v. 89, n. 3, p. 385-390, 2007.

COSTA, A.S. Whitefly-transmitted plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 14, p. 429-449, 1976.

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

COSTA, A.S.; OLIVEIRA, A.R.; SILVA, D.M. Transmissão mecânica do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 3, n. 1, p. 194-200, 1977.

COSTA, L.C. Vetores de vírus de plantas.1. Insetos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 103-137, 1998.

COTRIM, M.A.A. **Análise da diversidade genética de begomovírus em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) no centro-oeste paulista**. 2005. 42 p. Tese (Mestre em Fitopatologia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Julia de Mesquita Filho”, Botucatu.

DELLA VECCHIA, M.G.S. **Dinâmica temporal e espacial da begomovirose causada por Tomato yellow vein streak virus em tomateiro na região de Campinas-SP**. 2006. 91 p. Tese (Doutor em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.1, n. 1, p. 19-21. 1983.]

EIRAS, M., COLARICCIO, A., CHAVES, A.L.R., TAVARES, C.A.M., HAKAWA, R. Levantamento preliminar de geminivirose em tomateiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 1, p. 97, 2002.

FARIA, C.F.; MAXWELL, D.P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. **Phytopathology**, Saint.Paul, v. 89, n. 3, p.262-268, 1999.

FARIA, J.C.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; SLACK, S.A.; MAXWELL, D.P. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 423, 1997.

FARIA, J.C.; BEZERRA, I.C.; ZERBINI, F.M.; RIBEIRO, S.G.; LIMA, M.F. Situação atual das geminivirose no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 25-137, 2000.

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

FERNANDES, J.J.; CARVALHO, M.G.; ANDRADE, E.C.; BROMMOSHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, p. 513-522, 2006.

FERREIRA, P.T.O.; LEMOS, T.O.; FERNANDES, F.R.; INOUE-NAGATA, A.K. Tomato golden vein vírus – new begomovirus from Brazil. In: INTERNATIONAL GEMINIVIRUS SYMPOSIUM, 5.; INTERNATIONAL ssDNA COMPARATIVE VIROLOGY WORKSHOP, 3., 2007, Ouro Preto. **Resumos ...**Ouro Preto: UFV, 2007. p. 67.

FRANÇA, F.H.; VILLAS BÔAS, G.L.V.; BRANCO, M.C. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 25, p. 369-372, 1996.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2007**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2007. 520 p.

FRANCO, C.M.; FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUE, L.B.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L. S.; INOUE-NAGATA, A. K. Molecular characterization of the bibartite begomovirus Tomato mottle leaf curl vírus isolate DFM, from Brazil. In: INTERNATIONAL GEMINIVIRUS SYMPOSIUM, 5.; INTERNATIONAL ssDNA COMPARATIVE VIROLOGY WORKSHOP, 3., 2007, Ouro Preto. **Resumos ...**Ouro Preto: UFV, 2007. p. 71.

GALVÃO, R.M.; FERNADES, A.V.; ALMEIDA, J.D.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, E.C.; FONTES, E.P.B. Molecular characterization of two new tomato-infecting geminiviruses and the *Sida*-infecting geminiviruses complex from Brazil. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON BEMISIA AND GEMINIVIRAL DISEASES, 2., 1998, San Juan. **Abstracts ...** San Juan: International Bemisia Working Group, 1998. p. 93.

GÁLVEZ, G.E.; MORALES, F.J. Whitefly-transmitted viruses. In: SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Bean production problems in the tropics**. 2.ed. Cali: CIAT, 1989. p. 379-406.

GHANIM, M.; CZOSNEK, H. Tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV-Is) Is Transmitted among Whiteflies (*Bemisia tabaci*) in a Sex-Related Manner. **Journal of Virology**, New York, v. 74, n.10, p. 4738–4745, 2000

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

HARRISON, B.D. Advances in geminivirus research. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 23, p. 55-82, 1985.

HIDAYAT, S.H; RAHMAYANI, E. Transmission of *Tomato leaf curl begomovirus* by two different species of whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae). **Plant Pathology**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 57-61, 2007.

HÖFER, P.; BEDFORD, I.D.; MARKHAN, P.G.; JESKE, H.; FRISCHMUTH, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. **Virology**, New York, v. 236, p. 298-295, 1997.

HOLT, J.; COLVIN, J.; MUNIYAPPA, V. Identifying control strategies for tomato leaf curl virus disease using an epidemiological model. **Journal of Applied Ecology**, Boston, v. 36, p. 625-633, 1999.

HUNTER, W.B.; HIEBERG, E.; WEBB, S.E.; TSAI, J.H.; POLSTON, J.E. Location of geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 1147-1151, 1998.

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

KRAUSE-SAKATE, R.; NOZAKI, D.N.; ZERBINI, F.M.; YUKI, V.A.; PAVAN, M.A. Molecular and biological characterization of a Tomato severe rugose virus isolate collected from pepper (*Capsicum annuum*) plants in São Paulo State. In: INTERNATIONAL GEMINIVIRUS SYMPOSIUM, 5.; INTERNATIONAL DNA COMPARATIVE VIROLOGY WORKSHOP, 3., 2007, Ouro Preto. **Resumos ...**Ouro Preto: UFV, 2007. p. 64.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, cap. 67, p. 607-626.

LAZAROWITZ, S.G. Geminiviruses: genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plants Sciences**, Boca Raton, v. 11, p. 327-349, 1992.

LIMA, G.S.A.; ASSUNÇÃO, I.P.; RESENDE, L.V.; FERREIRA, M.A.J.; VIANA, T.H.P.; GALLINDO, F.A.T.; FREITAS, N.S.A. Detecção de begomovírus associados a plantas invasoras no estado de Pernambuco e caracterização molecular parcial de um isolado de *Sida rhombifolia*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 4, 2002.

LIMA, M.F.; BEZERRA, I.C.; RIBEIRO, S.G.; ÁVILA, A.C. Distribuição de geminivírus nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale do São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 81-85, 2001.

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

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

MATYIS, J.C.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.A.R.; COSTA, A.S. Purificação e morfologia do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 1, p. 267-274, 1975.

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

MELO, P.C.T. **Mosca-branca ameaça produção de hortaliças**. Campinas: Asgrow, 1992. 2 p. (Circular Técnico).

METHA, P.; WYMAN, J.A.; NAKHLA, M.K.; MAXWELL, D.P. Polymerase chain reaction detection of viruliferous *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) with two tomato-infecting geminiviruses. **Journal of Economic Entomology**, Berlin, v. 87, n. 4, p. 1285-1290, 1994.

MORIN, S.; GHANIM, M.; SOBOL, I.; CZOSNEK, H. The GroEL protein of whitefly *B. tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and non-transmissible begomovirus in the two hybrid system. **Virology**, New York, v. 276, p. 404-416, 2000.

NATESHAN, H. M.; MUNIYAPPA, V.; SWANSON, M. M.; HARRISON, B. D. Host range, vector and serological relationships of Cotton leaf curl virus from southern India. **Annals of Applied Biology**, London, v. 128, p. 233-244, 1996.

NOZAKI, D.N. **Estudo biológico, moleculares e citológicos de begomovirus infectando pimentão (*Capsicum annuum*) no Estado de São Paulo**. 2006. 87 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Julia de Mesquita Filho”, Botucatu, 2006.

PICÓ, B.; DIEZ, M.J.; NUEZ, F. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II Tomato yellow leaf curl virus review. **Scientia Horticultureae**, Amsterdam, v. 67, n. 1, p. 151-196, 1996.

POLSTON, J.E.; ANDERSON, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 12, p. 1358-1369. 1997.

POLSTON, J.E.; AL-MUSA, A.; PERRING, T.M.; DODDS, J.A. Association of the nucleic acid of Squash leaf curl geminivirus the whitefly *Bemisia tabaci*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, p. 850-856, 1990.

POLSTON, J.E.; COHEN, L.; SHERWOOD, T.A.; BEN-JOSEPH, R.; LAPIDOT, M. *Capsicum* species: Symptomless hosts and reservoirs of *Tomato yellow leaf curl virus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 447-452, 2006.

RABELO, A.R.; QUEIROZ, P.R.; SIMÕES, K.C.; HIRAGI, C.O.; LIMA, L.H.; OLIVEIRA, M.R.V.; MEHTA, A. **Diferenciação de biótipos de *Bemisia tabaci* utilizando PCR-RFLP e seqüenciamento da região ITS1 rDNA**. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/br095.pdf>>. Acesso em: 14 out. 2007.

- RAJESHWARI, R.; REDDY, R.V.C.; MARUTHI, M. N.; COLVIN, J.; SEAL, S.E.; MUNIYAPPA, V. Host range, vector relationships and sequence comparison of a begomovirus infecting hibiscus in India. **Annals of Applied Biology**, London, v. 147, p. 15–25, 2005.
- RAMAPPA, H.K.; MUNIYAPPA, V.; COLVIN, J. The contribution of tomato and alternative host plants to tomato leaf curl virus inoculum pressure in different areas of south India. **Annals of Applied Biology**, London, v. 133, p. 187-198, 1998.
- REZENDE, E.A.; FILGUEIRA, F.A.R.; ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; FERNANDES, J.J.; GILBERTSON, R.L. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 424, 1996.
- RIBEIRO, S.G.; INOUE-NAKATA, A.K.; DANIELS, J.; ÁVILA, A.C. **Potato deforming mosaic disease is caused by an isolate of *Tomato yellow vein streak virus***. Disponível em: <<http://www.bspp.org.uk/ndr/jan2006/2005-70.asp>>. Acesso em: 14 mar. 2007a.
- RIBEIRO, S.G.; BEZERRA, I.C.; LIMA, M.F.; ÁVILA, A.C.; GIORDANO, L.B. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. In: ENCONTRO NACIONAL E VIROLOGIA, 8., 1996, São Lourenço. **Resumos ...** São Lourenço: Sociedade Brasileira de Virologia, 1996. p. 290.
- RIBEIRO, S.G.; MARTIN, D.P.; LACORTE, C.; SIMÕES, I.C.; ORLANDINI, D.R.S.; INOUE-NAKATA, A.K. Molecular and characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 6, p. 702-711, 2007b.
- RIBEIRO, S.G.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; FERNANDES, J.J.; FARIA, J.C.; LIMA, M.F.; GILBERTSON, R.L.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZERBINI, E.M. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 830, 1998.
- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVICIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H.; ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomovirus in Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 148, n. 2, p. 281-295, 2003.
- ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.T.; RUSSEL, D.R.; MAXWELL, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminivirus. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, n. 4, p. 340-347, 1993.
- RUBINSTEIN, G.; CZOSNEK, H. Long-term association of tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. **Journal of General Virology**, New York, v. 78, p. 2683-2689, 1997.
- RYBICKI, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. **Archives of Virology**, New York, v. 134, p. 49-77, 1994.

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

SANTOS, C.D.G.; ÁVILA, A.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; RESENDE, R.O. Espécies vegetais hospedeiras de begomovirus isolados de tomateiro em Goiás e no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 450-455, 2004.

SOUZA-DIAS, J.A.C.; YUKI, V.A.; RIBEIRO, S.G.; RAVAGNANE, V.A. Risca amarela da nervura do tomateiro é causada por geminivirus que infecta batata. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 57, 1996. Apresentado no CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 19., 1996, Campinas.

STANLEY, J. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggest strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. **Virology**, New York, v. 206, p. 707-712, 1995.

STONOR, J.; HART, P.; GUNTHER, M.; DE BARRO, P.; REZAIAN, M. A. Tomato leaf curl geminivirus in Australia: occurrence, detection, sequence diversity and host range. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, p. 379–388, 2003.

VILLAS-BÔAS, G.L.; FRANÇA, F.H.; MACEDO, N. Potencial biótico da mosca-branca *B. tabaci* a diferentes plantas hospedeiras. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n.1, p. 71-79, 2002.

VILLAS-BÔAS, G.L.; FRANÇA, F.H.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C. **Manejo integrado de mosca-branca *Bemisia argentifolii***. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 1997. 11 p. (Circular Técnico, 9).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)