



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

***Tomato chlorosis virus*, HOSPEDEIRAS ALTERNATIVAS E INTERAÇÃO COM
TOSPOVÍRUS EM TOMATEIRO**

TADEU ARAUJO DE SOUZA

Brasília – DF

2016

TADEU ARAUJO DE SOUZA

***Tomato chlorosis virus*, HOSPEDEIRAS ALTERNATIVAS E INTERAÇÃO COM
TOSPOVÍRUS EM TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como resquisito parcial para obtenção de título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

Orientador

Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL – BRASIL**

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Tadeu Araujo de.

Tomato chlorosis virus, hospedeiras alternativas e interação com tospovírus em tomateiro.
/ Tadeu Araujo de Souza

Brasília, 2016.

P. 92

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. *Tomato chlorosis virus* - Hospedeiras alternativas

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. *Tomato chlorosis virus*, hospedeiras alternativas e interação com tospovírus em tomateiro.

Aos meus pais Cláudio de Souza e

Maria Ângela Reis e a Minha

Avó Ângela Alves, dedico.

AGRADECIMENTOS

Especialmente à minha orientadora Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata pelos ensinamentos, dedicação em proporcionar o melhor suporte de trabalho para seus alunos e orientações para a realização deste trabalho.

A minha família de modo geral, em especial a minha mãe Maria Ângela Reis pelo amor e esforço de cada dia para proporcionar a melhor educação possível para que eu pudesse chegar onde estou.

A minha avó Ângela Alves de Araújo, meu exemplo de vida.

A minha namorada Thais P. Martins pelo carinho, paciência e compreensão em todos os momentos.

Aos meus ex e atuais companheiros de laboratórios Dra. Mariana Hallwass, Dra. Sarah Barreto, Dra. Mônica Macêdo, Juliana Osse de Souza e ao Dr. Leonardo C. de Albuquerque pelo apoio, orientações e conversas motivadoras.

Aos Amigos Sérgio Miguel V. Zambrano, Aldemiro Jorge, Reinaldo Pimentel, Camila de Moraes Rego e Thiago Marques Costa.

Ao Dr. Miguel Michereff Filho pela atenção, conversas e ao apoio para a realização deste trabalho.

Ao Erich Nakasu pela prestatividade, incentivos e por toda atenção para proporcionar o melhor ambiente de trabalho.

Aos técnicos de laboratório Lúcio Flávio Barbosa e Oneilson Aquino, pelo suporte para a realização de trabalhos, orientações e “puxões de orelha”. Ao Sr. Amilton pelo apoio, sem ele a realização dos trabalhos seriam praticamente impossível.

Ao Dr. Geovani Amaro e a Dra. Mirtes Freitas Lima por terem me concedido uma oportunidade no começo da minha iniciação científica.

Aos professores, funcionários e colegas do curso de Pós-Graduação em Fitopatologia.

A todos que de alguma forma me ajudaram, meu agradecimentos.

À Embrapa Hortaliças pela estrutura necessária para realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A Deus mais que tudo e todos, ele é a luz da minha vida, meu guia.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Embrapa Hortaliças e Universidade de Brasília (UnB).

***Tomato chlorosis virus*, HOSPEDEIRAS ALTERNATIVAS E INTERAÇÃO COM
TOSPOVÍRUS EM TOMATEIRO**

TADEU ARAUJO DE SOUZA

DISSERTAÇÃO APROVADA em __/__/____ por:

Dra. Fernanda Rausch Fernandes
Embrapa Quarentena Vegetal, Brasília (Examinador Externo)

Dr. Renato de Oliveira Resende
Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília (Examinador Interno)

Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata
Embrapa – CNPH (Orientador – Presidente)

Dra. Rita de Cássia Pereira-Carvalho
Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília (Suplente)

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2016**

SUMÁRIO

SUMÁRIO	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO GERAL	v
GENERAL ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Hipóteses do trabalho	4
Objetivo geral	4
Objetivos específicos	4
CAPÍTULO 1	6
1 A cultura do tomateiro	6
2 Vírus em tomateiro	7
3 Família Closteroviridae	9
4 O gênero <i>Crinivirus</i>	11
5 Tomato chlorosis virus (ToCV)	12
6 Hospedeiras alternativas como fonte de vírus para lavoura no Brasil	20
7 Bemisia tabaci	21
8 Gênero Tospovirus	23
9 Resistência mediada pelo gene <i>Sw-5</i>	26
Literatura Citada	29
CAPÍTULO 2	38
RESUMO	38
ABSTRACT	39
1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 População de mosca-branca	42
2.2 Obtenção do isolado de <i>Tomato chlorosis virus</i> (ToCV)	42
2.3 Produção de mudas	42
2.4 Método de inoculação de ToCV	42
2.5 Classificação das plantas-teste como hospedeiras de mosca-branca	43
2.6 Extração de RNA total	43
2.7 Detecção de ToCV por RT-PCR	44
2.8 Inoculação de ToCV em plantas-teste por moscas-brancas	44
2.9 Coleta de plantas daninhas em lavouras de tomateiro	46
2.10 Transmissão de ToCV a partir de plantas-teste para o tomateiro pelo inseto-vetor	46
3 RESULTADOS	48
3.1 Gama de hospedeiras de ToCV.	48
3.2 Avaliação de sintomas de ToCV em plantas-teste.	48

3.3 Teste de transmissão para o tomateiro	51
3.4 Classificação das hospedeiras de moscas-brancas.....	51
3.5 Detecção de ToCV em plantas daninhas coletadas em lavouras de tomateiro.....	52
4 DISCUSSÃO	56
5 CONCLUSÕES	63
Literatura Citada	64
CAPÍTULO 3	66
RESUMO	66
ABSTRACT	68
1 INTRODUÇÃO	70
2 MATERIAL E MÉTODOS	72
2.1 Obtenção dos isolados virais e preparo do inóculo de tospovírus	72
2.2 Identificação da espécie de tospovírus através de sequenciamento direto de produto de PCR.	72
2.3 Detecção viral de tospovírus por sorologia (Dot-Elisa)	73
2.4 Inoculações artificiais dos isolados de ToCV e tospovírus em tomateiro	74
2.5 Método de inoculação dos isolados de ToCV e tospovírus	75
2.6 Uso de <i>N. benthamiana</i> transgênica (transformada com o gene <i>Sw-5</i>) para avaliar um provável sinergismo entre ToCV e tospovírus envolvido na quebra de resistência a tospovirus. 75	
2.7 Detecção de ToCV por RT-PCR	76
3 RESULTADOS	77
3.1 Identificação das espécies de tospovírus	77
3.2 Análise de um provável sinergismo entre ToCV e tospovírus em tomateiro resistente.....	78
3.3 Inoculação de ToCV e tospovírus em <i>N. benthamiana</i> transgênica e não transgênica	80
4 DISCUSSÃO.....	82
5 CONCLUSÃO	87
Literatura Citada	88
CONSIDERAÇÕES FINAIS	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de plantas suscetíveis ao ToCV relatadas na literatura.	19
Tabela 2: Famílias botânicas e suas espécies utilizadas na avaliação da gama de hospedeira alternativas de ToCV.....	45
Tabela 3: Espécies de plantas suscetíveis à infecção por <i>Tomato chlorosis virus</i> inoculadas por <i>Bemisia tabaci</i> biótipo B e transmissão do vírus de plantas testes suscetíveis para o tomateiro cv. Santa Clara.	49
Tabela 4: Grupo de espécie de plantas-teste co-inoculadas com ToCV e begomovírus.....	50
Tabela 5: Plantas-teste do círculo de hospedeiras de ToCV avaliadas quanto ao número de insetos no período de 72 horas após do início das inoculações e classificadas em boas hospedeiras, hospedeiras intermediárias e más hospedeiras.	52
Tabela 6: Espécies de plantas daninhas coletadas em cultivos de tomateiro e testadas para a presença de ToCV.	54
Tabela 7: Combinações dos tratamentos com as inoculações com <i>Tomato chlorosis virus</i> e tospovírus em infecção simples e mista nas três cultivares de tomateiro avaliadas (Predador, Viradoro e Dominador).	74
Tabela 8: Infecção de tospovírus e sintomas desenvolvidos pelas plantas-teste, cultivares Predador, Viradoro (resistentes) e Dominador (susceptível).	80
Tabela 9: Resultados das inoculações de tospovírus e ToCV (infecção mista e simples) em <i>Nicotiana benthamiana</i> transgênicas e não transgênicas.	81

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação esquemática do RNA 1 e RNA 2 do *Tomato chlorosis virus* (ToCV). As linhas representam o RNA genômico; As caixas representam as ORFs com os nomes das proteínas escritas abaixo ou sobre as ORFs. (Adaptado de Albuquerque et al., 2013)..... 14
- Figura 2: A) Adulto de *B. tabaci* biótipo B. B) Adulto de *T. vaporariorum*. 16
- Figura 3: Tomateiro infectado por ToCV exibindo sintomas de clorose internerval nas folhas baixas e medianas..... 17
- Figura 4: Representação esquemática da organização genômica dos três segmentos S, M e L dos tospovírus. vRNA – RNA sentido viral; vcRNA – sentido complementar. N = proteína do nucleocapsídeo; Nss = silenciamento gênico; Nsm = proteína de movimento; Gn e Gc = glicoproteínas; L = polimerase viral..... 24
- Figura 5: A) Tomateiro (cultivar Sena) com sintomas de necrose, epinastia foliares causados por tospovírus B) Anéis necróticos em fruto de tomateiro. 26
- Figura 6: A) Sintomas de clorose internerval em *P. pubescens*. B) manchas cloróticas em fumo (*N. tabacum* cv. TNN) e C) mancha clorótica e clorose internerval em maria-pretinha. 50
- Figura 7: *N. physaloides* coletada em campo com infecção por ToCV, porém com sintomas mais aparentes de mosaico, deformação foliar e bolhosidade, característicos de infecção por begomovírus. 55
- Figura 8: Gel de eletroforese dos produtos de PCR amplificados com os primers para as espécies de tospovírus GRSV (2) e TCSV (1). M: marcador 1-kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). 77
- Figura 9: A) Sintomas de necrose, epinastia foliar, anéis necróticos em tomateiro suscetível (cultivar Dominador) causados pela infecção de tospovírus. B) Clorose internerval nas folhas baixas causados por ToCV na cultivar Predador. 79
- Figura 10: A) sintomas de lesão local em *N. benthamiana* transgênica expressando o gene Sw-5. B) Sintomas de necrose, clareamento de nervura e epinastia causada por tospovírus em *N. benthamiana* não transgênica. 81

RESUMO GERAL

SOUZA, Tadeu Araujo de. *Tomato chlorosis virus, hospedeiras alternativas e interação com tospovírus em tomateiro*. 2016. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é um das hortaliças mais cultivadas em todo o mundo, inclusive no Brasil, principalmente pelas suas características nutricionais e pela sua importância sócio econômica. Essa cultura pode ser alvo de uma grande diversidade de pragas, incluindo alguns grupos de vírus. Entre os principais encontram-se as espécies dos gêneros *Begomovirus*, *Tospovirus* e *Crinivirus*. Os crinivírus são vírus emergentes, com duas espécies conhecidas em tomateiro *Tomato chlorosis virus* (ToCV) e *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) e que foram identificadas em meados da década de 90, nos Estados Unidos. No Brasil, até o momento, apenas ToCV foi relatado infectando o tomateiro. Geneticamente, o ToCV é composto por duas moléculas de RNA fita simples, encapsidadas em partículas virais longas e flexuosas. A transmissão é feita por três espécies de moscas-brancas: *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum* e *T. abutiloneus*. Em tomateiro, o principal sintoma caracteriza-se por manchas cloróticas que desenvolvem uma clorose internerval intensa, visualizada principalmente nas folhas baixas. O primeiro relato de ToCV no Brasil ocorreu em 2008 e, desde então, este vírus tem sido encontrado nas principais regiões produtoras de tomate do país, porém ainda é pouco estudado. Devido a essa demanda de pesquisa, o objetivo desse trabalho foi determinar a gama de hospedeiros do ToCV no Brasil. Foram avaliadas 50 espécies dentre elas, plantas cultivadas e não cultivadas, inoculadas com ToCV pelo inseto vetor (*B. tabaci* biótipo B). Do total de plantas avaliadas, nove espécies foram suscetíveis ao isolado testado de ToCV, indicando a potencial capacidade dessas plantas de atuarem como hospedeiras alternativas de ToCV em campo. Concluiu-se então que é necessária maior preocupação com as plantas *Amaranthus hybridus*, *Solanum americanum*, *Nicandra physaloides* e *Physalis angulata*, pois além de suscetíveis a ToCV, são plantas altamente infestantes em lavouras de tomate e potenciais hospedeiras alternativas do vírus na ausência ou na presença da cultura. Na ausência de tomateiro nas áreas de produção, o vírus pode permanecer nas hospedeiras alternativas e, na presença de tomateiro, tais hospedeiras são potenciais fontes de inóculo de ToCV. O sinergismo entre ToCV e o tospovírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) foi recentemente relatado na

Espanha. Nessa interação, há aparentemente um favorecimento da infecção de TSWV em plantas resistentes (com gene *Sw-5*), quando previamente infectadas por ToCV. Por se tratar de um relato preocupante, parte desse trabalho foi então desenvolvido para avaliar esse sinergismo entre ToCV e tospovírus em tomateiro. Foram selecionadas as cultivares resistentes a tospovírus, Predador e Viradoro, e a cultivar suscetível Dominador, utilizada como controle nos ensaios. As cultivares de tomateiro resistentes foram previamente infectadas por ToCV pelo inseto vetor e, posteriormente, inoculadas com os tospovírus *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Groundnut ringspot virus* (GRSV). Após a inoculação, as plantas resistentes não foram infectadas pelos tospovírus, avaliadas visualmente e por teste sorológico (Dot-Elisa). Adicionalmente, foi utilizado outro modelo biológico com *Nicotiana benthamina* não transgênica e transgênica, transformada constitutivamente com o gene *Sw-5*. As plantas transgênicas resistentes previamente infectadas por ToCV e posteriormente inoculadas com os tospovírus apresentaram sintoma de lesão local, indicando resistência e ausência de infecção sistêmica. A infecção prévia de ToCV não alterou a expressão do gene *Sw-5*, responsável por conferir resistência a tospovírus em plantas de tomate e *N. benthamiana*. Estudos para identificar hospedeiras alternativas de ToCV e compreender o comportamento dos vírus em casos de infecção mista constituem ações indispensáveis para o sucesso de qualquer estratégia de controle.

Palavras-chave: Gama de hospedeiras, Tomato chlorosis virus, plantas daninhas, tospovírus, gene *Sw-5*

Orientadora – Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata – Embrapa CNPH.

GENERAL ABSTRACT

SOUZA, Tadeu Araujo de. *Tomato chlorosis virus, alternative hosts and interaction with tospovirus in tomato*. 2016. 92 p. Dissertation (Master in Plant Pathology) – Univerdade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most cultivated vegetables around the world, including Brazil, mainly by their nutritional characteristics and socio-economic importance. This crop is affected by a large variety of pests and pathogens, including some viruses. The major species are found within the genus *Begomovirus*, *Tospovirus* and *Crinivirus*. The criniviruses are emerging viruses, with two known species in tomato *Tomato chlorosis virus* (ToCV) and *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV). They were identified in the mid 90s, in the United States. In Brazil, only ToCV was reported in tomatoes. Genetically, ToCV consists of two single-stranded RNA molecules, encapsidated in long and flexuous viral particles. They are transmitted by three whitefly species: *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum* and *T. abutiloneus*. In tomato, the main symptoms are characterized by chlorotic spots, which evolve to strong internervial chlorosis, mainly visualized in the lower leaves. The first report of ToCV in Brazil was made in 2006 and since then the virus has been found in the main producing regions of tomato of the country. However, it has been poorly studied. Due to this demand, the aim of this study was to determine the host range of ToCV in Brazil. A total of 50 species of cultivated and non-cultivated plants was tested in inoculation with ToCV by the insect vector (*B. tabaci* biotype B). Nine species were shown to be susceptible to ToCV infection, indicating the potential ability of these plants to act as alternative hosts of ToCV in the field. Therefore, it was concluded that the growers are concerned with the following plants: *Amaranthus hybridus*, *Solanum americanum*, *Nicandra physaloides* and *Physalis angulata*. They were all susceptible to ToCV, and are frequently found in tomato crops. They are potential virus alternative hosts in the absence of tomato plants, and when tomatoes are present, they can act as inoculum source of ToCV to these plants. The possible synergism between ToCV and the tospovirus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) was recently reported. In this interaction, apparently a ToCV infection foster TSWV infection in TSWV-resistant plants (containing the *Sw-5* gene). The interaction between two or more viruses can result in unexpected pathological consequences and because of this

possible impact in the Brazilian tomato production, we evaluated this synergism between ToCV and tospovirus in tomatoes in the Brazilian conditions. The tospovirus-resistant cultivars Predador and Viradoro were selected, and the susceptible cultivar Dominador was used as control in the assays. Resistant tomato cultivars were previously infected with ToCV by the insect-vector and then inoculated with tospoviruses *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) and *Groundnut ringspot virus* (GRSV). After inoculation, the resistant plants were not infected, confirmed by visual inspection and a serologic test (Dot-Elisa). In addition, a similar test was performed using transgenic and non-transgenic *Nicotiana benthamiana* plants, which are constitutively transformed with the gene *Sw-5*. The resistant transgenic plants previously infected with ToCV and subsequently inoculated with TCSV and GRSV showed local lesion symptoms, indicating resistance and absence of systemic infection. The prior infection of the resistant plants with ToCV did not alter the expression of the *Sw-5* gene. It is believed that this absence of resistance breakdown is possibly associated with the tomato variety and the viral species that were used. The identification of alternative hosts of ToCV and understanding the interaction of the viruses in cases of mixed infection are essential information to enable the success of any virus control strategy.

Keywords: Host Range , Tomato chlorosis virus, tospovirus, gene *Sw-5*

Supervisor: Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata – Embrapa CNPH.

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil, assumindo grande importância sócio econômica e também nutricional, por ser fonte de vitaminas essenciais à saúde humana. Os três principais países produtores de tomate no mundo são a China, Índia e Estados Unidos. O Brasil está entre os 10 maiores produtores mundiais ocupando a 8ª posição no ranking com uma produção de 3.467.990 toneladas obtidas no ano de 2015. Dentre os estados produtores, destacam-se Minas Gerais e Goiás, que juntos somam 56% da produção de tomate nacional (IBGE, 2015).

O tomateiro é afetado por uma grande diversidade de pragas e patógenos. As doenças de etiologia viral representam em muitos casos fator limitante para a cultura. Entre as doenças causadas por vírus que afetam o tomateiro destacam-se espécies pertencentes aos gêneros *Begomovirus*, *Tospovirus* e *Crinivirus* (Barbosa et al., 2008; Fernandes et al., 2008; Rosselló et al., 1996).

Plantas daninhas podem servir de hospedeiras naturais de vírus, além de atuarem como hospedeiras de pragas e, em muitos casos, podem competir por espaço e/ou nutrientes com culturas economicamente importantes (Nascente et al., 2004). Muitas espécies de plantas daninhas relatadas em infecção natural com ToCV e outros vírus como os begomovírus por exemplo, possibilita a permanência desses vírus em campo e servindo como fonte de inóculo em lavouras (Barreto et al., 2013; Fonseca et al., 2013).

Na década de 90, nos Estados Unidos, foram relatados *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) e *Tomato chlorosis virus* (ToCV) causando a doença denominada de “*Yellow leaf disorder*” (Duffus et al., 1995; Wisler et al., 1998). Estas espécies foram agrupadas como pertencentes ao gênero *Crinivirus*. O ToCV é considerado um vírus emergente em muitos países e sua ocorrência tem sido relatada em pelo menos quatro continentes (Navas-Castillo et al., 2011), justificando a grande importância que ele tem assumido no cenário da agricultura

mundial (EPPO, 2013). O TICV está presente em países da América no Norte, Ásia e Europa, e não foi relatado até o momento no Brasil (Navas-Castillo et al., 2011).

A família *Closteroviridae* a qual pertence o gênero *Crinivirus* é uma das mais complexas famílias de vírus vegetais conhecidas, caracterizada morfológicamente por partículas virais longas e flexuosas. Essa família possui membros com uma (monopartido), duas (bipartido) ou três (tripartido) moléculas de RNA, fita simples senso positivo (ssRNA+). Atualmente, a família agrupa mais três gêneros, *Ampelovirus*, *Closterovirus* e o mais recente gênero *Velarivirus* (ICTV 2016; Al Rwahnih et al., 2012).

O primeiro relato do ToCV ocorre em cultivo de tomateiro no município de Sumaré, estado de São Paulo por Barbosa et al. (2008). Desde então, pode ser detectado na maioria dos estados brasileiros, assumindo assim uma ampla disseminação nas principais áreas produtoras de tomateiro do país (Barbosa et al., 2011a).

Geneticamente, o ToCV é constituído de duas moléculas de RNA fita simples de polaridade positiva, encapsidadas em longas e flexuosas partículas virais (Wisler et al., 1998). A transmissão natural é feita por três espécies de moscas-brancas: *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum* e *T. abutiloneus* (essa última não relatada no Brasil) (Wintermantel et al., 2006).

Os sintomas causados por ToCV em tomateiro são caracterizados por uma clorose interveinal intensa, localizada inicialmente nas folhas baixas (mais velhas) e posteriormente no terço superior da planta (Wisler et al., 1998).

Não há relatos oficiais na literatura de perdas causados por ToCV em tomateiro, entretanto redução na produção pode ocorrer devido à diminuição da área fotossintética e a diminuição do número e tamanho de frutos.

Outro grupo de vírus altamente importante para o tomateiro é aquele formado por espécies que pertencem ao gênero *Tospovirus* (Família *Bunyaviridae*). Quatro espécies são

responsáveis por causar a doença denominada vira-cabeça do tomateiro, são elas: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) (Bezerra et al., 1999; Boiteux et al., 1993).

Os tospovírus são constituídos por três segmentos de RNA fita simples, senso negativo ou ambisenso, encapsidados em partículas virais pleomórficas e com envelope (Fauquet et al., 2005). A transmissão é feita por várias espécies de tripes (Thysanoptera: Thripidae) de maneira circulativa e propagativa (Nagata et al., 2004).

Um dos objetivos desse trabalho foi fundamentado em um estudo do envolvimento do ToCV na quebra de resistência em tomateiro a tospovírus, desenvolvido na Espanha por García-Cano et al. (2006). Esse relato é preocupante devido à crescente incidência de crinivirus em tomateiro em todo o mundo. Contudo, ainda não foram conduzidos ensaios em condições brasileiras visando a confirmação dessa interação entre ToCV e tospovírus, causando a quebra da resistência conferida pelo gene *Sw-5*.

Devido a crescente incidência de ToCV em tomateiro, especialmente no Brasil, são poucos os estudos relacionados a sua biologia, como a sua gama de hospedeiras e interação com outros vírus. Por isso, devido a essas demandas de pesquisas, este trabalho foi elaborado com o objetivo de avaliar experimentalmente a suscetibilidade de diversas espécies de plantas daninhas e plantas cultivadas, comumente encontradas dentro e próximas aos cultivos de tomateiro, à infecção por *Tomato chlorosis virus* (ToCV) e também avaliar um possível sinergismo entre ToCV e tospovírus que resulte na quebra de resistência à infecção por tospovírus.

Hipóteses do trabalho

As principais plantas daninhas e plantas cultivadas presentes dentro ou nas proximidades de lavouras de tomateiro são suscetíveis e multiplicam em níveis detectáveis isolados de *Tomato chlorosis virus* (ToCV).

A resistência a tospovírus em tomateiro conferida pelo gene *Sw-5* é quebrada quando a planta é previamente infectada por ToCV.

Objetivo geral

Identificar potenciais plantas cultivadas e não cultivadas à infecção por *Tomato chlorosis virus* (ToCV) experimentalmente e em condições naturais e avaliar um provável sinergismo entre ToCV e tospovírus em tomateiro resistente constituído com o gene *Sw-5*.↵

Objetivos específicos

Capítulo 2: Identificação de potenciais plantas hospedeiras de *Tomato chlorosis virus*.

Inocular um isolado de ToCV em espécies de plantas daninhas e plantas cultivadas pelo inseto-vetor (mosca-branca, *Bemisia tabaci* biótipo B).

Transmitir o isolado de ToCV a partir de plantas avaliadas consideradas suscetíveis, para plantas de tomate.

Detectar infecção natural de ToCV em amostras de plantas daninhas coletadas em áreas produtoras de tomate.

Avaliar o tempo de surgimento e os sintomas causados por ToCV em plantas-teste.

Qualificar as plantas avaliadas em eficientes ou não eficientes hospedeiras de moscas-brancas.

Capítulo 3: Avaliação da superação da resistência a tospovírus em tomateiro quando pré-infectado por *Tomato chlorosis virus*.

Inocular um isolado de ToCV pelo inseto-vetor (*B. tabaci* biótipo B) e tospovírus por inoculação mecânica em infecção simples e mista em tomates e *Nicotiana benthamiana* resistentes e suscetíveis a tospovírus.

Avaliar os sintomas em tomates e *N. benthamiana* inoculadas com ToCV e tospovírus.

1 A cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pertencente à família botânica Solanaceae é originário das Américas, nas regiões que compreendem o norte do Chile, Colômbia, Equador, Bolívia e Peru (Warnock, 1991). Entretanto, a domesticação se deu no México e posteriormente foi disseminado para a Europa e outras regiões do mundo (Alvarenga, 2013). Nos dias de hoje, a China e Estados Unidos se encontram entre os maiores produtores de tomate do mundo, sendo que o Brasil ocupa a oitava colocação no ranking de produção mundial (IBGE, 2015). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no Brasil, no ano de 2015, a produção superou 3.467.990 toneladas ocupando uma área de 2.779.469 hectares. Os principais produtores são os estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo. Goiás lidera com uma produção de 720.748 de toneladas.

O tomateiro é uma das principais hortaliças plantadas no Brasil, assumindo grande importância alimentar para o país. O fruto é composto por fibras, vitamina C, betacaroteno, licopeno e outros nutrientes importantes para a saúde humana. Além da importância para o consumo humano, a cultura também gera 2,4 milhões de empregos por ano, tornando-se a base de sustento de muitos agricultores e trabalhadores rurais, o que demonstra seu alto impacto social (Associação Brasileiras do Comércio de Sementes e Mudas, 2012).

A cultura é considerada de difícil produção, devido à existência de diversos problemas enfrentados pelos produtores, além dos altos custos para produzir tomate, a necessidade de escolha de áreas específicas de plantio e uma diversidade grande de doenças de origem biótica e abiótica dificultam a sua produção (Lopes & Ávila, 2005).

Entre os patógenos que afetam o tomateiro, bactérias, fungos, nematoides e vírus representam a causa de alto índice de perdas para a cultura. Entre as principais doenças fúngicas que afetam a cultura pode-se citar a requeima, causada por *Phytophthora infestans*, patógeno importante em algumas regiões de clima frio e úmido do Brasil (Lopes & Ávila, 2005). Contudo, a maior fonte de preocupação dos produtores na atualidade são as doenças causadas por bactérias e vírus. Entre as doenças causadas por bactéria, a mancha bacteriana causada por *Xanthomonas* spp, murcha do tomateiro (*Ralstonia solanacearum*) e pinta bacteriana podem ser consideradas as principais doenças bacterianas da cultura. Na maioria das regiões produtoras de tomate, a presença dos patógenos citados, podem muitas vezes tornar fator limitante para a produção (Quezado-Durval & Lopes, 2012).

2 Vírus em tomateiro

As doenças de etiologia viral estão entre as de maior importância, pois além das perdas consideráveis, alta incidência e severidade de sintomas, são de difícil manejo e controle. Dentre os principais gêneros de vírus com maior importância econômica que afetam o tomateiro estão: o *Tobamovirus* (*Tobacco mosaic virus* – TMV e *Tomato mosaic virus* - ToMV); o *Potyvirus*, com as espécies *Potato virus Y* (PVY) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), que causam a risca do tomateiro e o mosaico amarelo do pimentão, respectivamente. Os tospovírus (*Tomato spotted wilt virus* - TSWV, *Tomato chlorotic spot virus* - TCSV e *Groundnut ringspot virus* – GRSV), cujas espécies causam a doença do complexo do vira-cabeça-do-tomateiro; e o gênero *Begomovirus*, com inúmeras espécies descritas e relatadas infectando o tomateiro no país (Bezerra et al., 1999; Kimati et al., 2005; Barbosa et al., 2008; Fernandes et al., 2008; Hanssen et al, 2010; Albuquerque et al., 2012).

O ToMV é um exemplo de vírus pertencente aos tobamovírus, este possui uma gama de hospedeiras muito ampla, facilmente disseminado mecanicamente, persiste nas sementes e nos restos de plantas devido a alta estabilidade da partícula. Seus sintomas em tomateiro

variam de acordo com a cultivar e as condições ambientais, porém os mais comuns são mosaico verde-escuro, distorção foliar das folhas jovens, nanismo e redução no crescimento dos frutos (Kumar et al., 2011; Almeida, 2013).

Os potyvirus são transmitidos de maneira não-persistente por afídeos, destacando a espécie *Myzus persicae*. Estima-se que, no Brasil, a virose causada por PVY causou perdas de 20 a 70% da produção, variando de acordo com a idade da planta e a época de infecção, porém o PVY teve sua importância diminuída pois acredita-se que seu nicho esteja sendo ocupado por isolados de PepYMV. Os sintomas de PepYMV incluem mosqueado leve ou até mosaico forte em toda a superfície foliar (Dianese et al., 2008; Oliveira, 2014). Em 2002, Inoue-Nagata e colaboradores, relataram um novo potyvírus em pimentão, no sul do Brasil, *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). Posteriormente foi relatado causando perdas na cultura de tomateiro no estado do Espírito Santo (Maciel-Zambolim et al., 2004).

Atualmente, são descritas 14 espécies de begomovírus que infectam tomateiro no país: *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV), *Tomato leaf distortion virus* (ToLDV), *Tomato mild mosaic virus* (ToMiMV), *Tomato golden vein virus* (TGVV), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Tomato interveinal chlorosis virus* (ToICV), *Chino del tomate Amazonas virus* (CdTAV), *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) e *Sida mottle virus* (SiMoV) (Calegario et al., 2007; Fernandes-Acioli et al., 2011; Albuquerque et al., 2012; González-Aguilera et al., 2012; Rocha et al., 2013).

As espécies predominantes no país são *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV) (Fernandes et al., 2008). Eles são constituídos por genoma de DNA fita simples podendo ser mono ou bipartido (ICTV, 2016). São vírus limitados ao

floema da planta, sendo assim sua transmissão realizada exclusivamente por vetor, especificamente da espécie *Bemisia tabaci*, com relação vírus-vetor do tipo circulativa não-propagativa (Ghanim et al., 2001; Santos et al., 2003). Os sintomas induzidos no tomateiro incluem nanismo, clareamento de nervura, manchas cloróticas, mosaico, rugosidade e deformação foliar (Lopes & Reis, 2011). Vírus dos gêneros *Begomovirus* e *Crinivirus* são as principais espécies detectadas nas lavouras de tomateiro e ocorrem em maior incidência (Fernandes et al., 2008; Macêdo et al., 2014). Os demais grupos de vírus ocorrem em menor incidência, porém não são menos importantes e também contribuem para os danos econômicos, provocando sintomas agressivos, baixo ou nenhum rendimento de produção das plantas infectadas (Dianese et al., 2008).

O ToCV e os tospovírus serão temas deste trabalho e por isso irão ser melhor descritos nos tópicos a seguir.

3 Família Closteroviridae

A família *Closteroviridae* é uma das famílias de vírus vegetais mais complexas conhecidas, caracterizada morfológicamente por partículas virais longas, flexuosas e por possuir membros com uma (monopartido), duas (bipartido) ou três (tripartido) moléculas de RNA, fita simples senso positivo (ssRNA+), encapsidadas separadamente (Fauquet et al., 2005). Em espécies com o genoma monopartido (gêneros *Ampelovirus*, *Closterovirus* e *Velarivirus*), o tamanho do genoma pode variar de 15,5 a 19,3 kb. Nos vírus com genoma bipartido e tripartido (*Crinivirus*) o genoma completo varia de 15,3 a 17,6 kb.

Atualmente, a família *Closteroviridae* é composta por quatro gêneros: *Ampelovirus*, *Closterovirus*, *Crinivirus* e *Velarivirus*, esse último recentemente adicionado (Al Rwahnih, et al., 2012). A classificação em nível de gênero nessa família é baseada na organização genômica (número de componentes genômicos e posição relativa das ORFs), na gama de hospedeiras e no tipo de inseto-vetor (Fauquet et al., 2005). A seguir são descritas as

principais características genômicas e biológicas de cada gênero aceito até o momento pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, 2014).

O gênero *Ampelovirus* possui oito membros, são eles: *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3), *Grapevine leafroll-associated virus 4* (GLRaV-4), *Little cherry virus 2* (LChV-2), *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* (PMWaV-1), *Pineapple mealybug wilt-associated virus 2* (PMWaV-2), *Pineapple mealybug wilt-associated virus 3* (PMWaV-2), *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus* (PBNSPaV).

O genoma dos ampelovírus é composto por apenas uma molécula de RNA fita simples, senso positivo, com aproximadamente 17,9 kb. O gênero contém espécies que infectam apenas dicotiledôneas. A transmissão natural é feita por espécies de cochonilhas (*Parthenolecanium*, *Pulvinaria*, *Neopulvinaria*) de maneira semi-persistente (Fauquet et al., 2005). A espécie-tipo do gênero *Grapevine leafroll-associated virus 3* é o principal agente etiológico de uma das mais importantes doenças virais em videira em todo o mundo, causando a doença denominada de "Grapevine leafroll disease" (GLD) (Maree et al., 2013).

O genoma dos vírus pertencentes ao gênero *Closterovirus* é constituído de RNA fita simples, senso positivo, monopartido, variando de 15,5 a 19,3 kb. O tamanho da partícula é relativamente grande, com o comprimento de 1250 a 2200 nm. A transmissão natural é feita somente por afídeos de maneira semi-persistente. Algumas espécies do gênero podem ser transmitidas mecanicamente, porém com certa dificuldade (Fauquet et al., 2005).

Atualmente, 11 espécies do gênero *Closterovirus* são aceitas pelo ICTV, são elas: *Beet yellow stunt virus* (BYSV), *Burdock yellows virus* (BuYV), *Carnation necrotic fleck virus* (CNFV), *Carrot yellow leaf virus* (CYLV), *Citrus tristeza virus* (CTV), *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-1), *Mint virus 1* (MV-1), *Raspberry leaf mottle virus* (RLMV),

Strawberry chlorotic fleck-associated virus (SCFV), *Wheat yellow leaf virus* (WYLV) e a espécie-tipo: *Beet yellows virus* (BYV).

A espécie mais conhecida desse gênero é o *Citrus tristeza virus* (CTV), causador da tristeza dos citros, doença conhecida historicamente como uma das mais importantes por ser altamente destrutiva e limitante para a citricultura (Kimati et al., 2005). O patógeno foi controlado através da substituição do porta enxerto laranja-azedo (suscetível ao vírus) pelo porta enxerto limão-cravo (tolerante ao vírus), e através da utilização de estirpes brandas do vírus para pré-imunização (Amorim et al., 2011).

O gênero *Velarivirus* é o mais recente dentro da família *Closteroviridae*, sendo composto por espécies com genoma de RNA fita simples, senso positivo e monopartido. O tamanho da partícula viral varia de 1500 a 1700 nm. Apenas três espécies são aceitas pelo ICTV: a espécie-tipo do gênero *Grapevine leafroll-associated virus 7* (GLRaV-7) e as espécies *Cordyline virus 1* (CoV-1) e *Little cherry virus 1* (LChV-1) (ICTV, 2016).

4 O gênero *Crinivirus*

As espécies pertencentes a esse gênero possuem genoma com RNA fita simples e senso positivo, porém, diferentemente dos demais gêneros da família *Closteroviridae*, os crinivírus são bipartidos ou tripartidos. Recentemente, Livieratos et al. (2004) descreveram a espécie *Potato yellow vein virus* (PYVD) como sendo uma espécie com genoma tripartido incluída no gênero *Crinivirus*.

Vários membros desse grupo causam doenças em uma variedade de plantas economicamente importantes. Todos os crinivírus descritos têm como característica a infecção em células do floema das hospedeiras (Kiss et al., 2013). A transmissão natural ocorre exclusivamente por moscas-brancas dos gêneros *Bemisia* e *Trialeurodes* de maneira semi-persistente (Tzanetakis, et al., 2013). Experimentalmente, a enxertia de plantas também resulta na transmissão dos vírus.

Treze espécies de crinivírus são aceitas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV): *Abutilon yellows virus* (AbYV), *Bean yellow disorder virus* (BnYDV), *Beet pseudo yellows virus* (BPYV), *Blackberry yellow vein-associated virus* (BYVaV), *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), *Diodia vein chlorosis virus* (DVCV), *Lettuce chlorosis virus* (LCV), *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV), *Potato yellow vein virus* (PYVV), *Strawberry pallidosis-associated virus* (SPaV), *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV) e *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV).

A espécie-tipo desse gênero é o *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV), bastante estudada desde a década de 1970, quando causou perdas de aproximadamente 20 milhões de dólares, afetando culturas como alface, melão e beterraba açucareira nos Estados Unidos. Atualmente a doença não possui grande importância econômica devido à predominância do biótipo B de *Bemisia tabaci*, mais competitivo e agressivo do que o biótipo A, que transmite o LIYV com maior eficiência (Flock & Duffus, 1982 *apud* Kiss et al, 2013).

O *Tomato chlorosis virus* (ToCV) e o *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) são as duas espécies de crinivírus que infectam o tomateiro relatadas. TICV ocorre principalmente na América do Norte, Europa e Ásia.. No Brasil, o TICV não é relatado (Wisler et al., 1996, 1998; Barbosa et al., 2011; Zhao et al., 2014).

5 Tomato chlorosis virus (ToCV)

O *Tomato chlorosis virus* é uma ameaça para a produção de tomate em todo o mundo. Nos últimos anos, surtos de infecções por esse vírus em cultivos de tomateiro têm sido cada vez mais comuns (Barbosa et al., 2011b; Zhao et al., 2014; Navas-Castillo et al., 2000; Dovas et al., 2002). O genoma de ToCV é composto por duas moléculas de RNA fita simples com polaridade positiva (Wisler et al., 1998). Tais moléculas de RNA são encapsidadas separadamente em longas e flexuosas partículas virais com 800 a 850 nm (Liu et al., 2000).

O tamanho dos segmentos de RNA de ToCV, isolado brasileiro, consiste de 8595 bp para o RNA 1 e 8242 bp para o RNA2 (Albuquerque et al., 2013). O RNA 1 codifica quatro ORFs, duas delas resultam na tradução de proteínas envolvidas na replicação do RNA viral. A ORF1a tem uma função múltipla, com domínios de protease, metil-transferase e helicase. A ORF1b codifica a polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp) de 58 kDa. A RdRp é altamente conservada entre os membros do gênero *Crinivirus* (Wintermantel et al., 2005). A ORF 2 é traduzida em uma proteína de 22 kDa que atua como supressora de silenciamento gênico (Cañizares et al. 2008). A ORF 3, localizada no terminal 3' do RNA1, codifica uma proteína de 6 kDa com função desconhecida (Wintermantel et al., 2005).

O RNA 2 codifica nove ORFs, responsáveis por proteínas com funções de encapsidação, movimentação do vírus na planta e transmissão por moscas-brancas, dentre outras funções que ainda não foram identificadas. A ORF1 codifica uma proteína de 4 kDa possivelmente com domínio transmembrana (Wintermantel et al., 2005). Uma proteína altamente conservada denominada de HSP70 (heat shock protein 70) é codificada pela ORF 2. Esta proteína está envolvida na montagem e movimentação célula-a-célula das partículas virais (Alzhanova et al., 2001; Peremyslov et al., 1999). A ORF 3 codifica uma proteína de 8 kDa com função desconhecida. A ORF 4 codifica uma proteína de 59 kDa, envolvida também na movimentação viral. A capa proteica (CP) e a capa proteica minoritária (CPm) são codificadas pelas ORFs 6 e 7, respectivamente. A CP é responsável pela encapsidação da maior parte da partícula viral, enquanto que a CPm está associada com a encapsidação do terminal 5' (Alzhanova et al., 2001). Ambas as proteínas também atuam na supressão de silenciamento gênico (Cañizares et al., 2008). A ORF 8 codifica uma proteína de 27 kDa exclusiva dos crinivírus e com função ainda desconhecida. A ORF 9 codifica uma proteína de 7 kDa exclusiva do ToCV com domínio transmembrana (Figura 1) (Wintermantel et al., 2005).

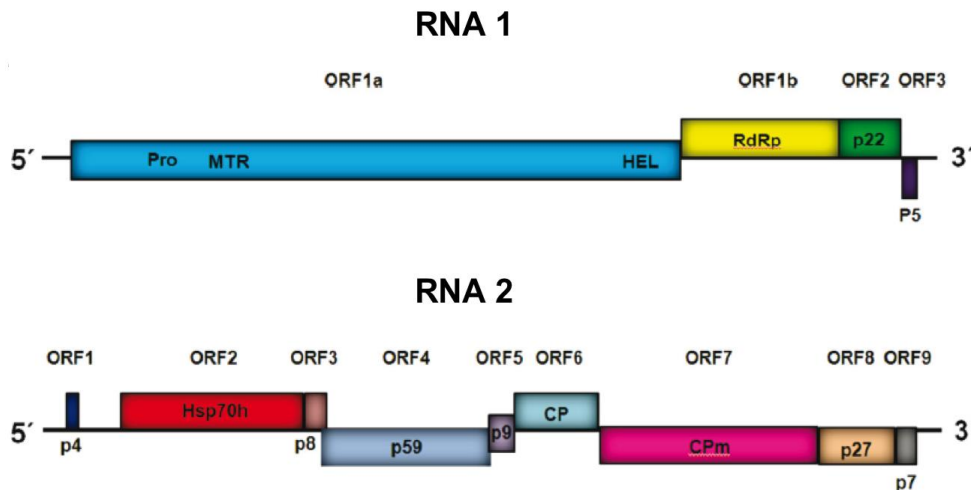


Figura 1: Representação esquemática do RNA 1 e RNA 2 do Tomato chlorosis virus (ToCV). As linhas representam o RNA genômico; As caixas representam as ORFs com os nomes das proteínas escritas abaixo ou sobre as ORFs. (Adaptado de Albuquerque et al., 2013).

A primeira descrição do ToCV foi no estado da Flórida, nos Estados Unidos, em 1998 (Wisler et al., 1998). Tomateiros que apresentavam sintomas de clorose internerval nas folhas baixas, causados por *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV), foram coletados para estudo de transmissão com moscas-brancas. A partir deste estudo os autores demonstram que a doença denominada “*yellow leaf disorder*” era também causada por um novo vírus, o ToCV. Isso foi possível devido à diferença de vetor entre as duas espécies virais. TICV é transmitido apenas por *T. vaporariorum*, enquanto ToCV, o novo vírus descrito, é também transmitido por *B. tabaci* e *T. abutiloneus* (Wintermantel & Wisler, et al., 2006).

A partir do primeiro relato de ToCV na Flórida, relatos foram feitos em outras regiões dos Estados Unidos, na Europa e na Ásia. Problemas causados nas principais áreas de produção de tomate têm sido cada vez mais frequentes (Navas-Castillo et al., 2000; Zhao et al., 2014; Wintermantel & Wisler, 2006). No Brasil, a presença do ToCV foi detectada pela primeira vez em 2006 por Barbosa et al., (2008) na região de Sumaré, Estado de São Paulo.

Amostras foliares de tomateiro provenientes de cinco estados brasileiros (Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais e Rio de Janeiro) foram avaliadas quanto à infecção por ToCV na Universidade de São Paulo – USP. O resultado confirmou a presença de ToCV em todas as amostras avaliadas, o que sugere uma ampla disseminação desse vírus no Brasil (Barbosa et al., 2011b). Além dos estados brasileiros citados anteriormente, a presença de ToCV também foi relatada no Distrito Federal por Nogueira et al. (2011). O ToCV tem sido frequentemente detectado no Distrito Federal e também em regiões de Goiás em infecções simples e mista com begomovirus, mais especificamente a espécie *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (Macêdo et al., 2014).

Atualmente apenas cinco sequências completas do genoma de ToCV estão disponíveis para os isolados dos Estados Unidos (Wintermantel et al., 2005), da Espanha (Lozano et al., 2006, 2007), da Grécia (Kataya et al., 2008), do Brasil (Albuquerque et al., 2013) e para um isolado da China (Zhao et al., 2014).

Barbosa et al. (2013), através de análises filogenéticas da sequência de HSP70 de 13 isolados brasileiros de ToCV evidenciaram uma baixa diversidade genética entre esses isolados, com 99,9-100% de identidade nucleotídica entre eles. Essa baixa divergência pode ser devida à suspeita de introdução do isolado brasileiro de ToCV no país a partir de uma única via de entrada recente e à rápida dispersão do vírus no país.

A transmissão natural de ToCV ocorre através de três espécies de moscas-brancas (Hemiptera: Aleyrodidae): *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum* e *T. abutiloneus* (espécie ainda não relatada no Brasil). A espécie *Bemisia tabaci* está amplamente difundida no Brasil, principalmente o biótipo B da espécie (Lima et al., 2002). *T. vaporariorum* encontrava-se restrita principalmente a cultivos protegidos, entretanto Lourenção et al. (2008) relataram no estado de São Paulo infestações de *T. vaporariorum* em hortaliças e plantas ornamentais em cultivo aberto, demonstrando sua adaptabilidade a diferentes ambientes.

Surto de *T. vaporariorum* também foram observados no Distrito Federal, durante visitas realizadas em cultivos de tomateiro e plantas ornamentais na região de Brazlândia, em 2015 (dados não publicados).

Wintermantel et al. (2006) estudaram a transmissão de ToCV e determinaram os parâmetros de transmissão e persistência em seus vetores. Com base nesses estudos, eles demonstraram que a eficiência de transmissão variou significativamente entre os vetores avaliados. *T. abutiloneus* e *B. tabaci* biótipo B são vetores de ToCV altamente eficientes, entretanto, *B. tabaci* biótipo A e *T. vaporariorum* transmitem o vírus com baixa eficiência. A persistência do ToCV no vetor seguiu a mesma tendência, ToCV persistiu em *T. abutiloneus* por cinco dias e em *B. tabaci* biótipo B por dois dias, já no biótipo A e em *T. vaporariorum*, persistiu apenas um dia. Com base nessas avaliações, a relação de ToCV com o seu vetor pode ser caracterizada como semi-persistente. Além dos vetores citados, o biótipo Q de *B. tabaci* recentemente detectado no Sul do Brasil também pode ser transmissor de ToCV (Fortes & Navas-Castillo, 2012). As espécies *B. tabaci* e *T. vaporariorum* podem ser diferenciadas através de aspectos simples como, formato e tamanho das asas. Em *B. tabaci* há um espaço entre as asas, diferentemente de *T. vaporariorum* com asas sobrepostas (sem espaço entre elas) (Figura 2).

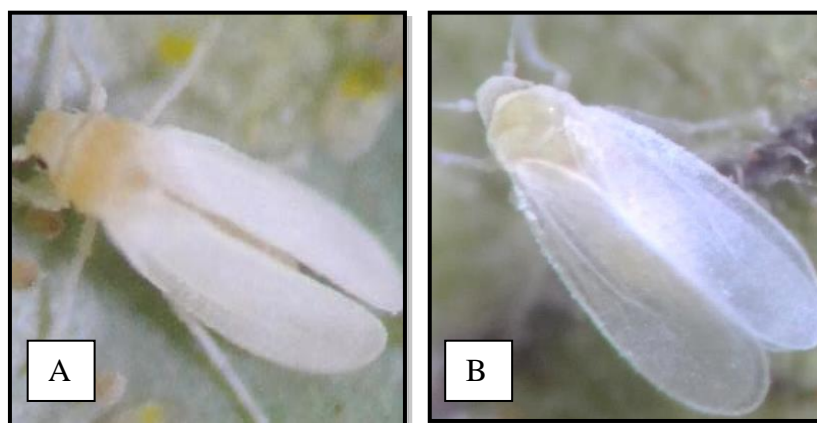


Figura 2: A) Adulto de *B. tabaci* biótipo B. B) Adulto de *T. vaporariorum*.

O principal sintoma causado por ToCV em tomateiro é a clorose intensa entre as nervuras foliares, principalmente nas folhas baixas e medianas (Figura 3). Raramente se observam sintomas nas folhas apicais da planta. O período de latência é relativamente longo, os sintomas foliares podem ser visualizados em torno de três a quatro semanas após o início da infecção (Wisler et al., 1998; Barbosa et al., 2006).

O período longo para o surgimento de sintomas e a produção de mudas de má qualidade (infectadas com crinivírus) pode fazer com que o produtor leve para a lavoura mudas já infectadas, sendo esse um fator inicial para causar epidemias no campo (Giordano et al., 2005). Não existem dados de perda de produção causadas pelo ToCV, contudo o comprometimento da produção pode ocorrer devido à redução da área fotossintética e, conseqüentemente, à diminuição no número e tamanho dos frutos.



Figura 3: Tomateiro infectado por ToCV exibindo sintomas de clorose internerval nas folhas baixas e medianas.

O manejo de crinivirose em tomateiro é realizado basicamente através do controle químico do vetor. Entretanto, a utilização de inseticidas para o controle de moscas-brancas

não tem se mostrado eficaz. A ineficiência está ligada a vários aspectos, escolha do inseticida inadequado (especificidade do inseticida quanto ao estágio do inseto), má aplicação, subdosagem, mistura de produtos, baixa volume de calda, falta de um aplicador que possibilite o alcance eficiente da gota na folha abaxial, o não controle do inseto em lavouras próximas (soja e algodão, por exemplo), a inexistência ou não uso de tecnologia de aplicação adequada e também a alta variabilidade genética desses insetos, ocasionando rápida resistência a maioria dos princípios ativos utilizados no mercado (Michereff Filho & Inoue-Nagata, 2015).

A remoção de plantas que podem servir de fonte de inóculo na lavoura é uma medida importante para diminuir a incidência no campo, além do uso de cultivares tolerantes ou resistentes (quando disponíveis) é outra forma de manejo que pode ser adotada pelo produtor (Barreto et al., 2013; García-Cano et al., 2010). O uso de plantas resistentes a vírus é o método de controle mais eficiente do vírus em campo, entretanto, ainda não estão disponíveis cultivares de tomateiro com resistência a crinivírus.

Fontes de resistência têm sido objeto de estudo para crinivirus em tomateiro por diversos grupos de pesquisa. Pereira-Carvalho et al. (2011) avaliaram a resistência de híbridos comerciais e alguns materiais do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças para a resistência a ToCV. Um acesso de *Solanum lycopersicum* (LAM 148) foi identificado como fonte promissora de tolerância, com sintomas leves e baixa acumulação viral. Na Espanha, García-Cano et al. (2010) avaliaram 145 materiais do banco de germoplasma do Instituto de Hortifruticultura Subtropical e Mediterrâneo quanto à resistência à infecção por ToCV. Dentre os materiais avaliados, duas fontes de resistência foram identificadas (acessos 802-11-1 e 821-13-1).

A gama de hospedeiro de ToCV é considerada ampla, incluindo diversas espécies de plantas daninhas e cultivadas como o tomateiro (*Solanum lycopersicum*), pimenta (*Capsicum*

annuum), batata (*Solanum tuberosum*) (Wintermantel & Wisler, 2006; Barbosa et al., 2010; Fortes & Navas-Castillo, 2012). O tomateiro representa uma hospedeira importante devido à relevância econômica dessa cultura, a severidade dos sintomas e a alta incidência dessa virose nas lavouras, tanto em cultivos para indústria quanto em cultivos de tomate para mesa.

Até o momento são relatadas 69 espécies de plantas suscetíveis ao ToCV pertencentes a 24 famílias botânicas (Tabela 1).

Tabela 1: Espécies de plantas suscetíveis ao ToCV relatadas na literatura.

Espécie	Família botânica
<i>Cirsium arvens</i> , <i>Conyza canadenses</i> ^{10*} , <i>Lactuca sativa</i> ^{17*} , <i>Erechtites hieracifolia</i> ^{10*} , <i>Erigeron annuus</i> ^{10*} , <i>Sonchus asper</i> ^{10*} , <i>Youngia japonica</i> ^{10*} , <i>Callistephus chinensis</i> ² , <i>Calendula officinalis</i> ² , <i>Crassocephalum crepidiodes</i> ^{19*} , <i>Bidens pilosa</i> ^{19*}	Asteraceae
<i>Tetragonia expansa</i> ²	Aizoaceae
<i>Amaranthus retroflexus</i> ^{17*} , <i>A. scariosus</i> ^{19*} , <i>Iresine difusa</i> , <i>Gomphrena globosa</i> ² , <i>Spinacia oleracea</i> ²	Amaranthaceae
<i>Catharanthus roseus</i> ²	Apocynaceae
<i>Anthriscus cereifolium</i> ¹⁴	Apiaceae
<i>Beta macrocarpa</i> ² , <i>Chenopodium album</i> ¹⁰ , <i>C. capitatum</i> ² , <i>C. murale</i> ² , <i>C. ambrosoides</i> ⁹ , <i>C. ficifolium</i> ^{10*}	Chenopodiaceae
<i>Convolvulus arvensis</i> ¹⁷ , <i>Ipomoea hederacea</i> ^{10*} , <i>Quamoclit coccinea</i> ^{10*}	Convolvulaceae
<i>Malva sylvestris</i> ^{17*}	Malvaceae
<i>Oxalis pes capae</i> ^{17*}	Oxalidaceae
<i>Capsicum annuum</i> ³ , <i>Cyphomandra betacea</i> ² , <i>Datura stramonium</i> ¹⁶ , <i>Nicandra physaloides</i> ¹⁶ , <i>Nicotiana benthamiana</i> ² , <i>N. clevelandii</i> ² , <i>N. edwardsoni</i> ² , <i>N. glutinosa</i> ² , <i>N. megalosiphon</i> ² , <i>N. tabacum</i> ^{2,12} , <i>N. rustica</i> ¹³ , <i>Petunia hybrida</i> ² , <i>Physalis alkekengi</i> ² , <i>P. angulata</i> ⁵ , <i>P. ixocarpa</i> ² , <i>P. wrightii</i> ² , <i>P. peruviana</i> ¹⁸ , <i>Solanum americanum</i> ² , <i>S. nigrescens</i> [*] , <i>S. nigrum</i> ² , <i>S. acaule</i> ² , <i>S. tuberosum</i> ⁴ , <i>S. melongena</i> ^{8,6} , <i>S. sessiliflorum</i> ⁸ , <i>S. aethiopicum</i> ⁶ , <i>S. pimpinellifolium</i> ⁸ , <i>Solanum lycopersicum</i> ² , <i>S. sisymbriifolium</i>	Solanaceae
<i>Ruta chalepensis</i> ⁷	Rutaceae
<i>Phytolacca icosandra</i> ⁷ , <i>P. americana</i> ^{10*}	Phytolaccaceae
<i>Plantago major</i> ⁷	Plantaginaceae
<i>Limonium latifolium</i> ²	Plumbaginaceae

<i>Anagallis foemina</i>	Primulaceae
<i>Portulaca oleracea</i> ^{17*}	Portulacaceae
<i>Rumex</i> sp. ^{17*}	Polygonaceae
<i>Brassica</i> sp. ^{7*} , <i>Cardamine flexuosa</i> ^{10*} , <i>Raphanus sativus</i> ^{11*} , <i>Eruca sativa</i> ^{11*}	Brassicaceae
<i>Cucurbita moschata</i> ^{7*}	Cucurbitaceae
<i>Vicia angustifolia</i> var. <i>segetilis</i> ^{10*} , <i>V. tetrasperma</i> ^{10*} , <i>Phaseolus</i> cf. <i>striatus</i> ^{19*}	Fabaceae
<i>Cerastium glomeratum</i> ^{10*} , <i>Stellaria media</i> ^{10*}	Caryophyllaceae
<i>Trigonotis peduncularis</i> ^{10*}	Boraginaceae
<i>Mazus pumilus</i> ^{10*}	Scrophulariaceae

* Relatos de infecção natural;

¹Alvarez-Ruiz et al., 2007; ²Wintermantel et al., 2006; ³Lozano et al., 2003; ⁴Fortes & Navas-Castillo, 2012; ⁵Fonseca et al., 2013; ⁶Fonseca et al., 2015; ⁷Solórzano-Morales et al., 2011; ⁸Esquivel & Rezende, 2015; ⁹Barbosa et al., 2013a; ¹⁰Kil et al., 2015; ¹¹Boiteux et al., 2015; ¹²Fiallo-Olivé et al., 2014; ¹³Karwitha et al., 2013; ¹⁴Morris et al., 2006; ¹⁵Arruabarrena et al., 2015; ¹⁶Barbosa et al., 2013b; ¹⁷Orfanidou et al., 2014; ¹⁸Helena et al., 2007. ¹⁹Vargas-Asencio et al., 2013.

6 Hospedeiras alternativas como fonte de vírus para lavoura no Brasil

Muitos estudos têm sido feitos com base na caracterização de vírus que além de infectar as plantas cultivadas, infectam plantas daninhas (Barreto et al., 2013). Não existem dados publicados de estudos de transmissão de ToCV de plantas daninhas para tomateiro ou para outras culturas que o vírus infecta. Entretanto, cada vez mais trabalhos relacionados a detecção natural de ToCV em amostras de plantas daninhas coletadas em plantios de tomateiro têm sido publicados (Alvarez-Ruiz, 2007; Fonseca et al., 2013; Boiteux et al., 2015).

Estudos de plantas invasoras como hospedeiras alternativas de vírus têm se tornado importantes devido ao potencial dessas como fonte de inóculo para cultivos comerciais. Diversos grupos de vírus têm sido estudados em plantas daninhas, dentre eles os

begomovírus, comumente encontrados nessas plantas nas lavouras de tomateiro. *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), espécie de begomovírus predominante nos tomateiros em muitas regiões do Brasil, é a espécie mais encontrada em plantas daninhas. Barreto et al. (2013) demonstraram a suscetibilidade de plantas daninhas infectadas por ToSRV como *Crotalaria* spp., *Euphorbia heterophylla*, *Nicandra physaloides* e *Sida* spp., relatando a importância dessas espécies como fonte de inóculo de begomovirus para o tomateiro.

Barbosa et al. (2011) avaliaram um grupo de 33 espécies de plantas cultivadas e não cultivadas como hospedeiras de um isolado de ToSRV (Pi-1). Do total de plantas avaliadas, 13 mostraram-se suscetíveis. Esses resultados demonstram a grande diversidade de plantas que podem atuar como fonte de ToSRV em campo.

As plantas daninhas podem atuar diretamente na dispersão de vírus em diversas culturas, especialmente em tomateiro. Em Goiás, desde 2003 (Instrução Normativa N° 24/2003) é estabelecido o vazio sanitário do tomateiro, de novembro a janeiro, como forma de minimizar a incidência de begomovírus. Entretanto, durante esse período sem plantio de tomateiro, os begomovírus e outros vírus (incluindo crinivírus) podem estar presentes em hospedeiras alternativas durante a entressafra, fazendo com que essas plantas sirvam de “ponte verde” para que, com a presença do vetor, esses vírus possam ser transmitidos, iniciando novas epidemias de viroses em campo.

7 Bemisia tabaci

A mosca-branca (*Bemisia tabaci*) pertence à ordem Hemiptera, subordem Sternorrhyncha e família Aleyrodidae e é considerada uma das principais pragas da agricultura mundial. A espécie *B. tabaci* foi primeiramente descrita por Gennadius em 1889 na Grécia e denominada como *Aleyrodes tabaci*. Esses aleirodódeos são insetos pequenos, sugadores, possuem corpo de coloração amarela e com dois pares de asas frágeis, cobertas por

uma substância pulverulenta branca, com pouca capacidade de vôo, mas extremamente agressivos (Byrne & Bellows, 1991).

A classificação da espécie é complexa pela existência de alta similaridade genotípica e morfológica, entretanto com características biológicas e comportamentais diferentes. Estes insetos foram agrupados utilizando ferramentas moleculares em 24 biótipos e 41 populações diferentes em todo o mundo (Perring, 2001). Recentemente, através de testes moleculares, de Barro et al. (2011) identificaram que a divergência de 3,5% da sequência do gene mitocondrial da citocromo oxidase 1 possibilita a separação das moscas-brancas em um complexo de 11 grupos bem definidos filogeneticamente e 24 espécies morfológicamente indistinguíveis. Nessa nova classificação, o biótipo B corresponde a espécie Middle East-Asia Minor 1 e o biótipo A corresponde à espécie New World. Para fins de familiaridade e facilidade, neste trabalho será utilizada a classificação de biótipos e não a classificação em espécies.

Em termos de distribuição geográfica, *B. tabaci* está presente em todas as regiões do planeta, com exceção dos pólos. No Brasil, o primeiro relato da sua presença ocorreu entre as décadas de 60 e 70, mas apenas o biótipo A era relatado (Costa, 1976). Atualmente, o biótipo B está disseminado no Brasil e tornou-se predominante (Marabuyashi et al., 2013). A partir da década de 90, através do trânsito de plantas ornamentais infestadas, o biótipo B foi provavelmente introduzido no Brasil, mostrando-se mais adaptado do que o biótipo A, por apresentar maior gama de hospedeiros (incluindo o tomateiro) e fêmeas mais férteis, ovipositando em média 300 ovos por fêmea, enquanto que cada fêmea do biótipo A colocam em média 150 ovos (Lourenção & Nagai, 1994). Recentemente, o biótipo Q foi relatado no estado do Rio Grande do Sul (Barbosa et al., 2014), o que torna ainda mais preocupante o cenário da agricultura do país, por se tratar de um biótipo semelhante em agressividade ao biótipo B (Chu et al., 2006).

Os danos causados por esses insetos podem ser divididos em danos diretos e indiretos. Os danos indiretos estão relacionados com a sucção da seiva e injeção de toxinas, que causam desordens fisiológicas nas plantas. Nas cucurbitáceas, em situações de alta população de moscas-brancas comumente são observadas mudanças de coloração nas folhas, que ficam prateadas devido à secreção de toxinas (Brown et al., 1995; Lourenção et al., 2011). Em tomateiro, a injeção de toxinas nas plantas pode causar o amadurecimento irregular dos frutos, inviabilizando-os para o comércio (Maynard & Cantiliffe, 1989).

Os danos indiretos são os mais importantes em termos econômicos. Através da alimentação, as moscas-brancas excretam uma substância açucarada (*honeydew*) que possibilita que fungos do gênero *Capnodium* cresçam sob a superfície de frutos e folhas, prejudicando a fotossíntese. Entretanto, o principal dano indireto causado por esses insetos é a transmissão de vírus, há relatos de *B. tabaci* transmitindo vírus pertencentes a cinco gêneros, destacando-se os gêneros *Begomovirus* e *Crinivirus*, com espécies que infectam o tomateiro (Navas-Castillo et al., 2011).

8 Gênero Tospovirus

O gênero *Tospovirus* (Família *Bunyaviridae*) é caracterizado geneticamente por possuir três segmentos de RNA fita simples, senso negativo ou ambisenso. Os segmentos de RNA são denominados S (*Small*), M (*Medium*) ou L (*Large*), de acordo com o seu tamanho (Figura 4). A partícula viral desse grupo de vírus varia de 80 a 120 nm, é envolta por uma membrana lipídica e não possui um formato definido (ICTV, 2015). O segmento L é senso negativo e composto por apenas uma fase de leitura aberta (ORF) responsável por codificar a proteína L envolvida na transcrição e replicação viral (de Haan et al., 1991). O segmento M é ambisenso e composto por duas ORFs, uma no sentido viral que codifica a proteína NSm responsável pelo movimento e caracterizada como determinante de avirulência para resistência em tomateiro, e a ORF no sentido complementar codifica precursores para as glicoproteínas Gn e

Gc, associadas à membrana lipídica (Li et al., 2009; Peiró et al., 2014; Hallwass et al., 2014). O segmento S também é ambisenso, codificando no sentido complementar a proteína do nucleocapsídeo (N), responsável pela proteção do material genético (de Haan et al., 1991). No sentido viral é codificada a proteína NSs com atividade de supressora de silenciamento (Takeda et al., 2002).

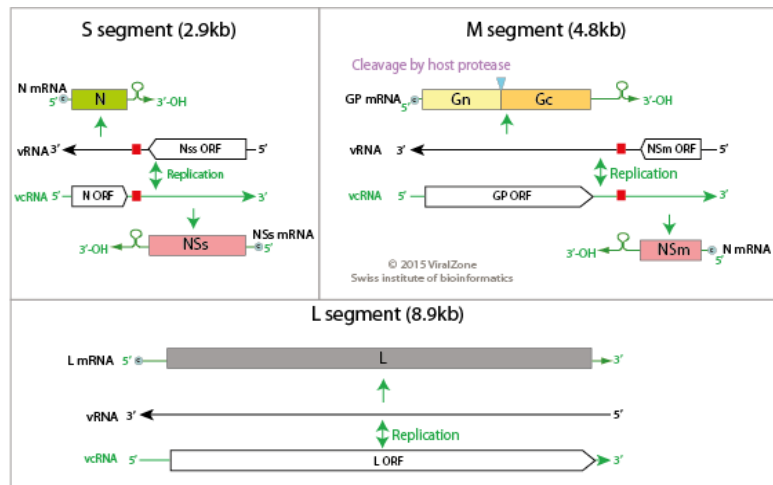


Figura 4: Representação esquemática da organização genômica dos três segmentos S, M e L dos tospovírus. vRNA – RNA sentido viral; vcRNA – sentido complementar. N = proteína do nucleocapsídeo; Nss = silenciamento gênico; Nsm = proteína de movimento; Gn e Gc = glicoproteínas; L = polimerase viral.

A transmissão natural é feita por várias espécies de tripses (Thysanoptera: Thripidae) de maneira circulativa e propagativa (Wijkamp et al, 1995; Nagata et al., 2004). Os tripses adquirem o vírus durante o primeiro e segundo estádios larvais e o transmitem principalmente quando adultos (fase alada), durante toda sua vida (Wijkamp & Peters, 1995). No Brasil são relatados pelo menos cinco espécies de tripses transmissoras de tospovírus, *Frankliniella occidentalis*, *F. schultzei*, *F. zucchini*, *Thrips tabaci* e *T. palmi* (Nagata et al., 1999, 2004).

No Brasil, os tospovírus causam a doença denominada popularmente como “vira-cabeça” do tomateiro. Entre outras culturas afetadas por esses vírus estão as culturas da alface (*Lactuca sativa*), cucurbitáceas, batata (*Solanum tuberosum*), fumo (*Nicotiana tabacum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e pimentas (*Capsicum* spp.) (Oliveira et al., 2012; Webster et al.,

2014; Sugiyama et al., 2015). Atualmente, 11 espécies de tospovírus são aceitas pelo ICTV, sendo que 4 dessas espécies podem ser encontradas no Brasil, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) (de Ávila et al., 1993; Nagata et al., 1998). A espécie-tipo do gênero é o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), sendo a espécie mais estudada e está classificada entre os dez vírus mais importantes para a agricultura (Scholthof et al., 2011).

Entre as espécies de tospovírus encontradas no Brasil, GRSV parece ser predominante no país, provavelmente devido a maior eficiência de transmissão pela espécie de tripses *F. schultzei* (Nagata et al., 2004).

Tomateiros infectados com tospovirus geralmente não se desenvolvem, surgem sintomas como arroxamento, pontos ou anéis necróticos nas folhas e nas hastes da planta. Sintomas severos também ocorrem no ápice da planta, fazendo com que a mesma fique curvada. Esse encurvamento do ápice da planta deu origem ao nome da doença, vira-cabeça (Figura 4 A). Os frutos podem apresentar anéis concêntricos, que desenvolvem para necrose, resultando em frutos inviáveis (Figura 4, B). Em alguns casos, esses anéis necróticos são vistos apenas nos frutos e o resto da planta não apresenta sintomas.

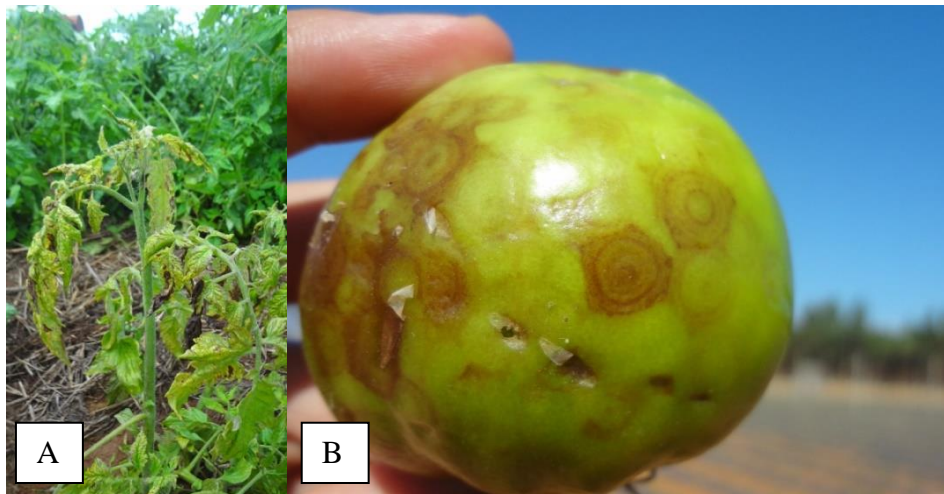


Figura 5: A) Tomateiro (cultivar Sena) com sintomas de necrose, epinastia foliares causados por tospovírus B) Anéis necróticos em fruto de tomateiro.

Para o controle de vírus vegetais o princípio básico é a prevenção devido à inexistência de medidas curativas. Quando o vírus apresenta como agente de dispersão um vetor, como é o caso dos tospovírus, há necessidade de evitar a entrada do vetor e do vírus na área com medidas que incluem: realizar o manejo de plantas daninhas, plantar em épocas desfavoráveis ao vetor (épocas de seca), realizar o *roguing* de plantas infectadas na lavoura, colocá-las dentro de uma sacola de plástico fechada e levá-las para fora da área de plantio. Essas medidas básicas controlam ou minimizam a incidência da doença em campo.

Por outro lado, o controle químico do vetor é pouco eficiente devido à ampla gama de hospedeiros e a resistência à inseticidas (Moura et al., 2014). A utilização de materiais resistentes é considerada a forma mais eficaz de controlar ou complementar outras medidas de controle dessa doença (Dianese et al., 2011).

9 Resistência mediada pelo gene *Sw-5*

Devido às dificuldades de controle e às perdas econômicas ocasionadas pelos tospovirus, a resistência genética de plantas tem sido o foco de pesquisas voltadas para o seu

manejo. A utilização de genes de resistência resulta em uma queda considerável em termos de perdas econômicas para esses vírus (Stevens et al., 1992; Dianese et al., 2011).

Em tomateiro, as primeiras fontes de resistência a tospovírus encontradas foram nas espécies *Lycopersicon pimpinellifolium* (Samuel et al., 1930) e *Solanum lycopersium* (Holmes, 1948), sendo que entre esses genes, dois foram determinados como dominantes (*Sw-1* e *Sw-1^b*) e três recessivos (*sw-2*, *sw-3* e *sw-4*) (Finlay, 1952). O gene *Sw-5*, mais tarde identificado na espécie *Solanum peruvianum*, demonstrou ser mais amplo e estável do que os genes anteriormente citados, conferindo resistência a todas as espécies de tospovírus (Boiteux & Giordano, 1993; Roselló et al., 1998).

O gene *Sw-5* pertence à mesma classe de genes de resistência a patógenos como *Meloidogyne* spp. (NBS-LRR), a qual a resistência é conferida pelo gene *Mi* e pelo gene *I2* que confere resistência a *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*. (Spassova et al., 2001). A resistência de plantas que expressam o gene *Sw-5* é caracterizada por sintomas de lesões locais (reação de hipersensibilidade), restringindo o vírus a infecção local (Boiteux & Giordano, 1993; Lau et al., 2006).

Segundo Spassova et al. (2001), a localização do gene *Sw-5* foi mapeada no cromossomo 9, caracterizada por um complexo de cinco cópias do gene, *Sw-5a*, *Sw-5b*, *Sw-5c* e *Sw-5d*. A cópia *Sw-5b* sozinha é capaz de conferir resistência. Entretanto as demais cópias quando expressadas isoladamente não conferem resistência.

A primeira entrada de material comercial resistente a tospovirus foi em 1988, com a cultivar Stevens, derivada de cruzamentos da espécie *S. peruvianum* com *S. lycopersicum*. (Stevens et al., 1992; Boiteux & Giordano, 1993). Desde então, diversas pesquisas visam a identificação de materiais comerciais ou de banco de germoplasma com resistência aos tospovírus (Dianese et al., 2011)

Atualmente, está disponível no mercado uma gama considerável de cultivares de tomateiro carregando o gene *Sw-5*. A cultivar Viradoro desenvolvida pela Embrapa Hortaliças em parceria com o IPA (Instituto Pernambucano de Pesquisa Agropecuária), resistente as espécies TSWV, TCSV e GRSV é um exemplo de cultivar disponível no mercado com crescimento indeterminado e resistente a tospovírus (Giordano et al., 2000).

Isolados mutantes de TSWV capazes de superar a resistência mediada pelo gene *Sw-5* são conhecidos, o que coloca em risco esse gene como uma fonte durável de resistência a tospovírus (Aramburu et al., 2003, 2010).

Outro estudo relevante envolvente a quebra de resistência a tospovirus em tomateiro é o estudo da interação sinérgica entre ToCV e TSWV que resulta na quebra de resistência à infecção por TSWV em tomateiro conferida pelo gene *Sw-5* (García-Cano et al., 2006). Os autores demonstraram que em cultivar de tomateiro suscetível a TSWV, a infecção mista com ToCV resultou no aumento da severidade dos sintomas e conseqüentemente na morte mais rápida das plantas, quando comparadas às plantas dos tratamentos infectados apenas com TSWV. Os autores também observaram que, tomateiros resistentes a tospovírus previamente infectados com ToCV e inoculados com TSWV resultaram em plantas infectadas, caracterizando quebra de resistência.

Literatura Citada

- ABREU, H., FONSECA, M.E.N., NOGUEIRA I., PEREIRA-CARVALHO, R.C., BOUTEUX, L.S. 2012. *Tomato chlorosis virus* on the weed *Physalis angulata* within tomato fields in São Paulo State, Brazil. In: Anais CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA. Manaus, AM. Agosto de 2012. Sociedade Brasileiro de Fitopatologia. Manaus, AM.
- AL RWAHNIH, M., DOLJO, V.V., DOUBERT, S., KOONIN, E.V., ROWHANI. 2012. Genomic and biological analysis of Grapevine leafroll-associated virus 7 reveals a possible new genus within the Family *Closteroviridae*. *Virus Research*. 163: 302-309.
- ALBUQUERQUE, L.C., VARSANI, A., FERNANDES, F.R., PINHEIRO, B., MARTIN, D.P., FERREIRA P.T.O., LEMOS, T.O., INOUE-NAGATA, A.K. 2012. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*. 157: 747-52.
- ALBUQUERQUE, L.C., VILLANUEVA, F., RESENDE, R.O., NAVAS-CASTILLO, J., BARBOSA, J.C., INOUE-NAGATA, A.K. 2013. Molecular characterization reveals Brazilian *Tomato chlorosis virus* to be closely related to a Greek isolate. *Tropical Plant Pathology*. 38(4): 332-336.
- ALMEIDA, J.E.M. 2013. Detecção e transmissibilidade de vírus em sementes de abóbora, pimentão e tomate. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil.
- ALVARENGA, A.R. 2013. Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia. 2.ed. rev. – Lavras: Editora. 455p.
- ALVAREZ-RUIZ, P. JIMENEZ, C.G., LEYVA-LÓPEZ, N.E., MÉNDEZ-LOZANO. 2007. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Sinaloa Mexico. *Plant Pathology*. 56:1043.
- ALZHANOVA, D.V., NAPULI, A.J., CREAMER, R., DOLJA, V.V.2001. Cell-to-cell movement and assembly of a plant closterovirus: roles for the capsid proteins and Hsp70 homolog. *European Molecular Biology Organization*. 20:6997-7007.
- AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., FILHO, A.B. 2011. Manual de Fitopatologia: principios e conceitos. 4ª ed. Piracicaba: Agronômica Ceres.
- ARAMBURU, J., GALIPIENSO, L., SOLER, S., LÓPEZ, C. 2010. Characterization of *Tomato spotted wilt virus* isolates that overcome the Sw-5 resistance gene in tomato and fitness assays. *Phytopathology*. 49:342-351.
- ARAMBURU, J., MARTI, M. 2003. The occurrence in north-east Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the Sw-5 gene. *Plant Pathology*. 52: 407.
- ARRUABARRENA, A., RUBIO, L., GONZÁLEZ-ARCOS, M., MAESO, D., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., FONSECA, M.E.N., BOITEUX, L.S. 2015. First report of *Solanum sisymbriifolium* and *S. americanum* as natural weed hosts of *Tomato chlorosis virus* (Genus *Crinivirus*) in South America. *Plant Disease*. 99(6): 895.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS. 2012. 2º Levantamento de dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil.

- <http://www.abcsem.com.br/releases/2420/tomaticultura-valioso-segundo-do-agronegocio-nacional>. Consultado em 05/01/2016.
- BARBOSA, J.C., BARRETO, S.S., INOUE-NAGATA, A.K., REZENDE, A.M. 2011a. Characterization and experimental host range of a Brazilian tomato isolate of *Tomato severe rugose virus*. *Journal of Phytopathology*. 159:644-646.
- BARBOSA, J.C., COSTA, H., GIORIA, R., & REZENDE, J.A.M. 2011b. Occurrence of *Tomato chlorosis virus* in tomato crops in five Brazilian states. *Tropical Plant Pathology*. 36(4): 256-258.
- BARBOSA, J.C., REZENDE, J.A.M., COSTA, H. 2013a. Algumas espécies vegetais suscetíveis ao *Tomato chlorosis virus*. In: Anais XXXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA. Ouro Preto, MG, 20 a 25 de Outubro de 2013. Sociedade Brasileira de Fitopatologia. Ouro Preto.
- BARBOSA, J.C., REZENDE, J.A.M.M., FILHO, A.B. 2013b. Low genetic diversity suggests a single introduction and recent spread of *Tomato chlorosis virus* in Brazil. *Journal of Phytopathology*. 161:884-886.
- BARBOSA, J.C., TEIXEIRA, A.P.M., MOREIRA, A.G. CAMARGO, L.E.A., FILHO, A.B., KITAJIMA, E.W. REZENDE, J.A.M. 2008. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Brazil. *Plant Disease*. 92(2):1709.
- BARBOSA, J.C., TEIXEIRA, L.D.D., REZENDE, J.A.M. 2010. First report on the susceptibility of sweet pepper crops to *Tomato chlorosis virus* in Brazil. *Plant Disease*. 94(3): 374.
- BARBOSA, L.D., YUKI, V. A., MARUBAYASHI, J. M., DE MARCHI, B. R., PERINI, F. L., PAVAN, M. A., BARROS, D.R., GHANIM, M., MORIONES, E., NAVAS-CASTILLO, J., SAKATE, R. K. 2014. First report of *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. *Pest Management Science*. 71(4): 501-504.
- BARRETO, S.S., HALLWASS, M. AQUINO, O.M., INOUE-NAGATA, A.K. 2013. A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato-infecting begomovirus in central Brazil. *Phytopathology*. 103:436-444 .
- BEZERRA, I.C., RESENDE, R.O., POZZER, L., NAGATA, T., KORMELINK, R., DE ÁVILA, A.C. 1999. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from *Chrysanthemum* and one from *Zucchini*. *Phytopathology*. 89:823-830.
- BOITEUX, L.S. & GIORDANO L.B. 1993. Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Euphytica*. 71: 151-154.
- BOITEUX, L.S., FONSECA, M.E.N., REIS, A., COSTA, A.F., FONTES, M.G., GONZÁLES-ACOS, M. 2015. Wild radish (*Raphanus* species) and Garden Rocket (*Eruca sativa*) as new Brassicaceae host of Tomato chlorosis virus in South America. *Plant Disease*. [Online]. Disponível em: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-09-15-1069-PDN>. Consultado em 16/01/2016.
- BROWN, J.K., COATS, S.A., BEDFORD, I.D, MARKHAN, P.G., BIRD, J. FROHLICH, D.R. 1995. Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera:Aleyrodidae). *Biochemical Genetics*. 33(7-8): 205-214.

- BYRNE, D.N., BELLOWS, T.S. 1991. Whitefly biology. *Annual Review of Entomology*. 36:431-457.
- CALEGARIO, R.F., FERREIRA, S.S., DE ANDRADE, E.C., ZERBINI, F.M. 2007. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Pesquisa agropecuária brasileira*. 42(9): 1335-1343.
- CAÑIZARES, M.C., NAVAS-CASTILLO, J., MORIONES, E. 2008. Multiple suppressors of RNA silencing encoded by both genomic RNAs of the crinivirus, *Tomato chlorosis virus*. *Virology*. 379: 168-174.
- CHU, D., ZHANG, Y-J., BROWN, J.K., CONG. B., XU, B-Y., WU, Q-J., ZHU, G-R. 2006. The introduction of the exotic Q biotype of *Bemisia tabaci* from the mediterranean region into China on ornamental crops. *Florida Entomologist*. 89(2): 168-174.
- COSTA, A.S. 1976. Whitefly-transmitted plant diseases. *Annual review of Phytopathology*. 14: 429-449.
- DE ÁVILA, A.C, DE HAAN, P, KORMELINK, R., RESENDE, R.O, GOLDBACH, R.W., PETERS, D. 1993. Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleocapsid protein gene sequences. *Journal of General Virology*. 74: 153-159.
- DE BARRO, P.J., LIU, S-S., BOYKIN, L.M., DINSDALE, A.B. 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual reviews entomology*. 56:1-19.
- DIANESE, E.C., FONSECA, M.E.N., INOUE-NAGATA, A.K., RESENDE, R.O., BOITEUX, L.S. 2011. Search in *Solanum* (section *Lycopersicon*) germplasm for sources of broad-spectrum resistance to four *Tospovirus* species. *Euphytica*. 180:307-319.
- DIANESE, E.C., FONSECA, M.E.N., INOUE-NAGATA, A.K., RESENDE, R.O., BOITEUX, L.S. 2011. Search in *Solanum* (section *Lycopersicon*) germplasm for sources of broad-spectrum resistance to four tospovirus species. *Euphytica*. 180:307-319.
- DIANESE, E.C., RESENDE, R.O., INOUE-NAGATA, A.K. 2008. Alta incidência de *Pepper yellow mosaic virus* em tomateiro em região produtora no Distrito Federal. *Tropical Plant Pathology*. 33(1): 67-68.
- DOVAS, C.I., KATIS, N.I., AVGELIS, A.D. 2002. Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in greece. *Plant Disease*. 86:1345-1349.
- ESQUIVEL, F.A. REZENDE, J.A.M.2015. Identificação de outros hospedeiros alternativos do *Tomato chlorosis virus* (ToCV) no Brasil. CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, In: Anais: 48º CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA. São Pedro, SP, Agosto de 2015. Sociedade Brasileira de Fitopatologia. São Pedro, SP.
- EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION (EPPO). 2013. *Tomato chlorosis virus* and tomato infectious chlorosis virus. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 43(3): 462-470.
- FAUQUET, C.M., MAYO, A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L.A. 2005. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the Internattional Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Science.

- FERNANDES, F.R., ALBUQUERQUE, L.C., GIORDANO, L.B., BOITEUX, L.S., DE ÁVILA, A.C., INOUE-NAGATA, A.K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes*. 36: 251-258.
- FERNANDES-ACIOLI, N.A.N., FONSECA, M.E.N., PEREIRA-CARVALHO, R.C., FONTENELE, R.S., LACORTE, C., RIBEIRO, S.G., REIS, A., BOITEUX, L.S. 2011. Registro no Estado do Amazonas de um novo begomovírus do tomateiro relacionado com espécies virais da América Central e Caribe. *In: XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA*. Bento Gonçalves, RS. Tropical Plant Pathology. 36, Suplemento: 1403.
- FIALLO-OLIVÉ, E., SPINO, A.I., BOTELLA-GUILLÉN, M., GÓMEZ-GONZÁLES, E., NAVAS-CASTILLO, J. 2014. Tobacco: a new natural host of *Tomato chlorosis virus* in Spain. *Plant Disease*. 98(8): 1162.
- FINLAY, K.W. 1952. Inheritance of spotted wilt resistance in tomato II. Five genes controlling spotted wilt resistance in four tomato types. *Australian Journal of Biological Sciences*. 6: 153.
- FONSECA, M.E.N., BOITEUX, M.F., LIMA, M.F., MENDONÇA, J.L., COSTA, A.F., FONTES, M.G., COSTA, H. 2015. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting eggplant and Scarlet eggplant in Brazil. *Plant Disease* [Online]. Disponível em <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-09-15-1087-PDN> Consultado em 18/01/2016.
- FONSECA, M.E.N., BOITEUX, L.S., ABREU, H., PEREIRA-CARVALHO, R.C. 2013. *Physalis angulata*: A new natural host of *Tomato chlorosis virus* in Brazil. *Plant Disease*. 97(5):692.
- FORTES, I.M., NAVAS-CASTILLO, J. 2012. Potato, an experimental and natural host of the crinivirus *Tomato chlorosis virus*. *European Journal of Plant Pathology*. 134:81-86.
- GARCÍA-CANO, E., RESENDE, R.O., FERNANDEZ, MUÑOS, R., MORIONES, E. 2006. Synergistic interaction between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* results in breakdown of Resistance in tomato. *Phytopathology*. 96: 1263-1269.
- GARCÍA-CANO, E., NAVAS-CARILLO, J., MORIONES, E., FERNÁNDEZ-MUÑOZ. 2010. Resistance to *Tomato chlorosis virus* in wild tomato species that impair virus accumulation and disease symptom expression. *Phytopathology*. 100:582-592.
- GHANIM M., MORIN, S., CZOSNEK, K. 2001. Rate of *Tomato yellow leaf curl virus* translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology*. 91(2): 188-196.
- GIORDANO, L.B. FONSECA, M.E.N. SILVA, J.B.C. INOUE-NAGATA, A.K. BOITEUX, L.S. 2005. Efeito da infecção precoce por Begomovirus com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. *Horticultura Brasileira*. 23(3):.815-818.
- GIORDANO, L.B., ÁVILA, A.C., CHARCHAR, J.M., BOITEUX, L.S. 2000. Viradoro: a tospovirus-resistant processing tomato cultivar adapted to tropical environments. *HortScience*. 35(7):1368-1370.
- HALLWASS, M., OLIVEIRA, A.S., DIANESE, E.C., LOHUIS, D., BOITEUX, L.S., INOUE-NAGATA, A.K., RESENDE, R.O., KORMELINK, R. 2014. The *Tomato spotted wilt virus* cell-to-cell movement protein (NSm) triggers a hypersensitive response in Sw-5-containing resistant tomato lines and in *Nicotiana benthamiana*

- transformed with the functional *Sw-5b* resistance gene copy. *Molecular Plant Pathology*. 15(9): 871-880.
- HANSEN, I.M., LAPIDOT, M. 2012. Major tomato viruses in the contents mediterranean basin. *Advances in Virus Research*. 84:31-66.
- HANSEN, I.M., LAPIDOT, M., THOMMA B.P.H.J. 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 23:539-48.
- HIROTA, T., NATSUAKI, T., MURAI, T., NISHIGAWA, H., NIIBORI, K., GOTO, K., HARTONO, S., SUASTIKA, G., OKUDA, S.2010. Yellowing disease of tomato caused by *Tomato chlorosis virus* newly recognized in Japan. *Journal of General Plant Pathology*. 76:168-171.
- HOLMES, F.O. 1948. Resistance to spotted wilt of tomato. *Phytopathology*. 38:467-473.
- IBGE, 2015. Levantamento sistemática do produção agrícola. Rio de Janeiro. 29(1): 1-83.
- ICTV. 2016. *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) [Online]. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Consultado em 18/01/2016.
- INOUE-NAGATA, A. K., FONSECA M.E.N., RESENDE R.O., BOITEUX L.S.; MONTE, D.C., DUSI, A.N., DE ÁVILA, A.C., VAN DER VLUGT, R.A.A. 2002. *Pepper yellow mosaic virus*, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. *Archives of Virology*. 147: 849-855.
- KARWITHA, M., FENG, Z., YAO, M., CHEN, X., ZHANG, W., LIU, X., TAO, X. 2013. The complete nucleotide sequence of the RNA1 of a chinese isolate of *Tomato chlorosis virus*. *Journal of Phytopathology*. 162:411-415.
- KATAYA, A.R.A., STAVRIDOU, E., FARHAM, K. LIVIERATOS, I.C. Nucleotide sequence analysis and detection of a Greek isolate of Tomato chlorosis virus. *Plant Pathology*. 57(5): 819-824.
- KIL, E-J., LEE, E-J., CHO, S., AUH, C-K., KIM, D., LEE, K-Y., CHOI, H-S., KIM, C-S, LEE, S.2015. Identification of natural weed hosts of *Tomato chlorosis virus* in Korea by RT-PCR with root tissues. *Europe Journal Plant Pathology*. 142:419-426.
- KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., FILHO, A.B., CAMARGO, L.E.A. 2005. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 3^a ed. Piracicaba: Agronômica Ceres.
- KISS, Z.A., MEDINA, V., FALK. 2013. *Crivirus* replication and host interactions. *Frontiers in microbiology*. 99(4): 1-11.
- LAU, D., OLIVEIRA, J.C.F., YAMAZAKI LAU, E., BROMMONSCHENKEL, S.H.2006. Hipersensibilidade e necrose sistêmica em *Nicotiana benthamiana* transformada com o gene de resistência *Sw-5* de tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*. 31:247-253.
- LIMA, L.H.C., CAMPOS, L., MORETZSOHN, M.C., NÁVIA, D., OLIVEIRA, M.R.V. 2002. Genetic diversity of *Bemisia tabaci* populations in Brazil revealed RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*. 25(2): 217-223.
- LIU, H-Y., WISLER, G.C. DUFFUS, J.E. 2000. Particle lengths of whitefly-transmitted criniviruses. *Plant Disease*. 84: 803-805.
- LIVIERATOS, I.C., ELIASCO, E., MULLER, G., OLSTHOORN, R.C.L., SALAZAR, L.F., PLEIJ, C.W.A., COUTTS, R.H.A. 2004. Analysis of the RNA of *Potato yellow veins virus*: evidence for a tripartite genome and conserved 3'-terminal structures among members of genus *Crivirus*. *Journal of General Virology*. 85:2065-2075.

- LOPES, C.A., REIS, A. 2011. Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2011. 17 p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 100).
- LOURENÇÃO, A.L., ALVES, A.C., FUGI, C.G.Q., MATOS, E.V.S. 2008. Outbreaks of *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Hemiptera:Aleyrodidae) under field conditions in the state of São Paulo, Brazil. *Neotropical Entomology*. 37(1): 089-091.
- LOURENÇÃO, A.L., ALVES, A.C., MELO, A.M.T., VALLE, G.E. 2011. Development of leaf silvering in squash cultivars infested by silverleaf whitefly. *Horticultura Brasileira*. 29: 112-116.
- LOURENÇÃO, A.L., NAGAI, H. 1994. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. *Bragantia*. 53:53-59.
- LOZANO, G., Moriones, E., NAVAS-CASTILLO, J. 2006. Complete nucleotide sequence of the RNA 2 of the crinivirus *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology*. 151: 581-587.
- LOZANO, G., Moriones, E., NAVAS-CASTILLO, J. 2007. Complete sequence of the RNA 1 of a European isolate of *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology*. 152: 839-841.
- LOZANO, G., MORIONES, E., NAVAS-CASTILLO, L. 2003. First report of sweet pepper (*Capsicum annuum*) as a natural host plant for *Tomato chlorosis virus*. *Plant Disease*. 88:224.
- MACEDO, M.A., BARRETO, S.S., HALWASS, M., INOUE-NAGATA A.K. 2014. High incidence of *Tomato chlorosis virus* alone and in mixed infection with begomoviruses in two tomato fields in the Federal district and Goiás state, Brazil. *Tropical Plant Pathology*. 39(6): 449-452.
- MACIEL-ZAMBOLIM, COSTA, H., CAPUCHO, A.S., DE AVILA, A.C., INOUE-NAGATA, A.K., KITAJIMA, E.W. 2004. Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região serrana do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*. 29: 325-327.
- MAREE, H.J., ALMEIDA, R.P.P., BESTER, R., CHOOI, K.M., COHEN, D., DOLJA, V., FUCHS, M.F., GOLINO, D.A., JOOSTE, A.E.C., MARTELLI, G.P., NAIDU, R.A., ROWHANI, A., SALDARELLI, P., BURGER, J.T. 2013. *Grapevine leafroll-associated virus 3*. *Frontiers in microbiology*. 82(4): 1-19.
- MAYNARD, D.N., CANTLIFFE, D.J. 1989. Squash silverleaf and tomato irregular ripening: new vegetable disorders in Florida. *Vegetable Crops Fact Sheet*. VC-37, 4 p.
- MICHEREFF FILHO, M.M., INOUE-NAGATA, A.K. 2015. Guia para o reconhecimento e manejo da mosca-branca, da Geminivirose e da Crinivirose na cultura do tomateiro. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2015. 16 p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 142).
- MORRIS, J., STEEL, E., SMITH, P., BOONHAM, N., SPENCE, N., BARKER, I. Host range studies for *Tomato chlorosis virus*, and Cucumber vein yellowing virus transmitted by *Bemisia tabaci* (Gennadius). *European Journal of Plant Pathology*. 114:265-273.
- MOURA .A.P., MICHEREFF FILHO, M., GUIMARÃES, J.A. LIZ, R.S. 2014. Manejo integrado de pragas do tomateiro para processamento industrial. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2014. 24 p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 129). Brasília. 24p.

- NAGATA, T., ALMEIDA, A.C.L., RESENDE, R.O., ÁVILA, A.C. 2004. The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. *Plant Pathology*. 53: 136-140.
- NAGATA, T., MOUND, L.A., FRANÇA, F.H., DE ÁVILA, A.C. 1999. Identification and rearing of four thrips species vectors of tospovirus in the Federal District, Brazil. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 28(3): 535-539.
- NASCIMENTO, A.R., FERNANDES, P.M., BORGES, L.C., MOITA, A.W., QUEZADO-DUVAL, A.M. 2013. Controle químico da mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial em campo. *Horticultura Brasileira*. 31: 15-24.
- NAVAS-CASTILLO, J., FIALLO-OLIVÉ, E., SÁNCHEZ-CAMPOS, S. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Reviews. Phytopathology*. 49: 219-248.
- NAVAS-CASTILLO, J.R., BUENO, M. MORIONES, E. 2000. Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain associated with infections of *Tomato chlorosis virus*. *Plant disease*. 84:835-837.
- NOGUEIRA, L., VIEIRA, B.G., PEREIRA-CARVALHO, R.C., DIANESE, E.C., RESENDE, R.O., BOITEUX, L.S., FONSECA, M.E.N. 2011. Detecção de *Tomato chlorosis virus* (*Crinivirus*, Closteroviridae) em tomateiro no Distrito Federal. In: Anais XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA – Bento Gonçalves, RS. Agosto de 2011 Sociedade Brasileira de Fitopatologia.
- OLIVEIRA, A.S., MELO, F.L., INOUE-NAGATA, A.K., NAGATA, T., KITAJIMA, E.W., RESENDE, R.O. 2012. Characterization of *Bean necrotic mosaic virus*: A member of a novel evolutionary lineage within the genus *Tospovirus*. *PloS ONE* 7(6): e38634.
- OLIVEIRA, R. M. 2014. Análises da resistência genética à tospovirus e potyvirus em acessos de *Solanum* (seção lycopersicon). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.
- PEIRÓ, A., CAÑIZARES, M.C., RUBIO, L., LÓPEZ, C., MORIONES, E., ARAMBURU, J., SÁNCHEZ-NAVARRO, J. 2014. The movement protein (NSm) of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the tomato *Sw-5* gene-based resistance. *Molecular Plant Pathology*. 15(8): 802-813.
- PEREIRA-CARVALHO, R.C., BOITEUX, L.S., NOGUEIRA, I. FERNANDES-ACIOLI, N.A.N., FONSECA, M.E.M. 2011. Evaluation of tomato germplasm reaction to *Tomato chlorosis virus*. In: Anais XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA – Bento Gonçalves, RS. Agosto de 2011. Sociedade Brasileira de Fitopatologia.
- PEREMYSLOV, V.V., HAGIWARA, Y., DOLJA, V.V. 1999. HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96: 14771-14776.
- PERRING, T.M. 2001. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection*. 20(9): 725-737.
- QUEZADO-DUVAL, A.M & LOPES, C.A. 2012. Doenças bacterianas. In: Clemente, F.M.V.T & BOITEUX (Eds). *Produção de tomate para processamento industrial*. Brasília. 344p.
- QUEZADO-DUVAL, A.M., NASCIMENTO, A.R., PONTES, N.C., MOITA, A.W., ASSUNÇÃO, A., GOLYNSKI, A., INOUE-NAGATA, A.K., OLIVEIRA, R.T., CASTRO, Y.O., MELO, B.J. 2014. Desempenho de híbridos de tomate para

- processamento industrial em pressão de begomovirose e de mancha-bacteriana. *Horticultura Brasileira*. 32: 446-452.
- ROCHA, C.S., CASTILLO-URQUIZA, G.P., LIMA, A.T.M., SILVA, F.N., XAVIER, C.A.D., HORA-JÚNIOR, B.T., BESERRA-JUNIOR, J.E., MALTA, A.W.O., MARTIN, D.P., VARSANI, A., ALFENAS-ZERBINI, P., MIZUBUTI, E.S.G., ZERBINI, F.M. 2013. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. *Journal of Virology*. 87(10): 5789-5799.
- ROSELLÓ, S., DIEZ, M.J. & NUEZ, F. 1998. Genetics of *Tomato spotted wilt virus* resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*. *European Journal of Plant Pathology*. 104: 499-509.
- SAMUEL, G., BALD, J.G., PITTMAN, H.A. 1930. Investigation on spotted wilt of tomatoes. *Australian Council of Science Industry Research Bulletin*. 44: 64.
- SANTOS, C.D.G., DE ÁVILA, A.C., RESENDE, R.O. 2003. Estudo da Interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca. *Fitopatologia Brasileira* 28:664-673.
- SCHOLTHOF, K.G., ADKINS, A., CZOSNEK, H. PALUKAITIS, P., JACQUOT, E., HOHN, T., HOHN, B., SAUNDERS, K., CANDRESSE, T., AHLQUIST, P., HEMENWAY, C., FOSTER G.D. 2011. Top 10 plant viroses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 12(9): 938-954.
- SOLÓRZANO-MORALES, A., BARBOZA, N. HERNÁNDEZ, E., MORA-UMANÃ, F., RAMÍREZ, P. 2011. New discovered natural host of *Tomato chlorosis virus* in Costa Rica. *Plant Disease*. 95(4): 497.
- SOUZA, J.O. 2014. Análise da diversidade de begomovírus em tomateiros (*Solanum lycopersicum*) da região Nordeste do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- STEVENS, M.R. SCOTT, S.J. & GERGIRICH, R.C. 1992. Inheritance of a gene for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum*. *Euphytica*. 59: 9-17.
- SUGIYAMA, M., KAWAZU, Y., FUKINO, N., YOSHIOKA, Y., SHIMOMURA, K., SAKATA, Y., OKUDA, M. 2015. Mapping of quantitative trait loci for *Melon yellow spot virus* resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica*. 205(2): 615-625.
- TAKEDA, A., SUGIYAMA, K., NAGANO, H., MORI, M., KAIDO, M., MISE, K., TSUDA, S., OKUNO, T. 2002. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS letters*. 532:72-79.
- TRENADO, H.P., FORTES, I.M., LOURO, D., NAVAS-CASTILHO, J. 2007. *Physalis ixocarpa* and *P. peruviana*, new natural host of *Tomato chlorosis virus*. *European Journal Plant Pathology*. 118: 193-196.
- TZANETAKIS, I., MARTIN, R., WINTERMANTEL, W.M. 2013. Epidemiology of criniviruses: na emerging problem in world a agriculture. *Frontiers in Microbiology*. 119(4): 1-15.
- WARNOCK, S.J. 1991. Natural habitats of *Lycopersicon* species. *HortaScience*. 26: 466-471.
- WEBSTER, C.G., FRANTZ, G., REITZ, S.R., FUNDERBURK, J.E., MELLINGER, H.C., MCAVOY, E., TURECHEK W.W., MARSHALL, S.H., TANTIWANICH,, Y.,

- MCGRATH, M.T., DAUGHTREY, M.L., ADKINS, S. 2015. Emergence of *Groundnut ringspot virus* and *Tomato chlorotic spot virus* in vegetables in Florida and the Southeastern United States. *Phytopathology*. 105(3): 388-398.
- WIJKAMP, I. PETERS, D. 1993. Determination of the median latent period of two tospoviruses in *Frankliniella occidentalis*, using a novel leaf disk assay. *Phytopathology*. 83: 986-991.
- WIJKAMP, I., ALMARZA, N., PETERS, D. 1995. Median latent period and transmission of tospoviruses vectored by thrips. *Thrips Biology and Management*. 276: 153-156.
- WINTERMANTEL, W.M. & WISLER, G.C. 2006. Vector specificity, host range and genetic diversity of Tomato chlorosis virus. *Plant Disease*. 90:814-819.
- WINTERMANTEL, W.M., WISLER, G.C., ANCHIETA, A.G. LIU, H-Y., KARASEV, A.V., TZANETAKIS, I.E. 2005. The complete nucleotide sequence and genome organization of *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology*. 150:2287-2298.
- WISLER, G.C., LI, R.H., LIU, H-Y. LOWRY, D.S. 1998. *Tomato chlorosis virus*: a new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology*. 88: 402-409.
- WISLER, G.C., LIU, K-H., KLAASSEN, J.E., DUFFUS, J.E., FALK, B.W. 1996. *Tomato infectious chlorosis virus* has a bipartite genome and induces phloem-limited inclusions characteristic of the closteroviruses. *Phytopathology*. 86: 622-626.
- ZHAO, L-M. LI, G., GAO, Y., LIU, Y-J. SUN, G-Z., ZHU, X-P. 2014. Molecular detection and complete genome sequences of *Tomato chlorosis virus* isolates from infectious outbreaks in China. *Journal of Phytopathology*. 162:627-634.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO DE HOSPEDEIRAS ALTERNATIVAS DE *Tomato chlorosis virus* NO BRASIL.

RESUMO

Na década de 90, dois crinivírus foram relatados nos Estados Unidos infectando o tomateiro, *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) e *Tomato chlorosis virus* (ToCV). Apenas a espécie ToCV é relatada no Brasil. Esse vírus é constituído por um genoma bipartido e possui RNA de fita simples. Em geral, plantas infectadas com ToCV apresentam clorose entre as nervuras, as folhas ficam coriáceas e a produção é reduzida como consequência da diminuição do número e tamanho dos frutos. Devido à recente detecção de crinivírus em tomateiro, há poucos estudos voltados para o comportamento biológico desse vírus no país. O objetivo deste trabalho foi determinar o círculo de hospedeiras alternativas de ToCV no Brasil, além de detectar a infecção natural em plantas daninhas coletadas próximas e dentro de lavouras de tomateiro. As inoculações foram realizadas por moscas-brancas (*B. tabaci* biótipo B) em grupos de plantas-teste, totalizando 50 espécies avaliadas, entre elas plantas cultivadas e não cultivadas. Do total de plantas-teste, nove espécies foram suscetíveis ao isolado de ToCV, *Gomphrena globosa*, *Chrysanthemum coronarium*, *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum* cv. TNN, *Nicandra physaloides*, *Physalis angulata*, *P. pubescens* e *Solanum americanum*, além do tomateiro, *S. lycopersicum*. Das amostras de plantas daninhas coletadas em campo, o vírus foi detectado naturalmente em *A. hybridus*, *N. physaloides* e *S. americanum*, demonstrando o potencial dessas plantas de atuarem como fonte de inóculo em lavouras. Destas, somente *A. hybridus* não foi infectada artificialmente. Conclui-se que *A. hybridus*, *S. americanum*, *N. physaloides* e *P. angulata* são espécies que merecem maior atenção, pois além de suscetíveis são plantas altamente infestantes em lavouras de tomateiro e potenciais hospedeiras alternativas do vírus. Além disso, atenção especial é necessária para *Chrysanthemum coronarium*, uma ornamental comumente comercializada no país, que foi relatada pela primeira vez neste trabalho como hospedeira de ToCV. O conhecimento das espécies de plantas que podem servir de reservatório natural do vírus é indispensável para o estabelecimento de medidas eficientes de controle.

Palavras-chave: Gama de hospedeiro, ToCV, Plantas daninhas.

IDENTIFICATION OF ALTERNATIVE HOSTS OF *Tomato chlorosis virus*.

ABSTRACT

In the 90's, two crinivirus were reported in the United States infecting tomatoes, *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) and *Tomato chlorosis virus* (ToCV). Only ToCV is reported in Brazil, which can be found in the main growing regions of tomatoes. This virus consists of a bipartite genome of single-stranded RNA. In general, they induce foliar interveinal chlorosis, leathery leaves and the yield is reduced as a result of a decrease in the number and size of the fruits. Due to the recent crinivirus detection in tomatoes, only few studies are available focused on the biological behavior of the virus in the country. The objective of this work was to determine the alternative host range of ToCV in Brazil and to detect natural infection on weeds collected near and within tomato crops. The inoculations were performed by whiteflies (*B. tabaci* biotype B) in groups of test-plants totaling 50 species, including cultivated and non-cultivated plants. Nine were susceptible to ToCV infection, *Gomphrena globosa*, *Chrysanthemum coronarium*, *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum* cv. TNN, *Nicandra physaloides*, *Physalis angulata*, *P. pubescens* and *Solanum americanum*, in addition to tomatoes. Regarding the samples of weeds collected in the field, the virus was detected under natural infection in *A. hybridus*, *N. physaloides* and *S. americanum*, which are potential source of ToCV inoculum in the field. Of these, just *A. hybridus* was not artificially infected. In conclusion, *A. hybridus*, *S. americanum*, *N. physaloides* and *P. angulata* are species that deserve more attention, because in addition to their susceptibility to ToCV infection, they occur in high frequency associated to tomato crops, and they are potential alternative hosts for the virus. Furthermore, a special attention is needed in the case of *Chrysanthemum coronarium*, an ornamental plant, commonly marketed in the country, which was first reported in this work as host of ToCV.

Keywords: Host range, ToCV, weeds.

1 INTRODUÇÃO

O *Tomato chlorosis virus* (família *Closteroviridae*, gênero *Crinivirus*) pode ser considerado um dos mais importantes vírus emergentes para o tomateiro em todo o mundo (EPPO, 2013). Nos últimos anos, surtos de infecções causadas por esse vírus tem sido cada vez mais comuns, o que demonstra sua crescente importância para a cultura do tomateiro (Navas-Castillo et al., 2000; Dovas et al., 2002; Barbosa et al., 2011b, Zhao et al., 2014).

Geneticamente, o ToCV é composto por dois segmentos de RNA fita simples senso positivo. O RNA 1 codifica quatro ORFs, duas dessas ORFs resultam na tradução de proteínas envolvidas na replicação viral. O RNA 2 é composto por nove ORFs, responsáveis pela produção de proteínas com funções de encapsidação, movimentação do vírus na planta, transmissão por moscas-brancas e outras funções que ainda não foram identificadas (Wintermantel et al., 2005).

A transmissão natural do ToCV é realizada por, pelo menos, três espécies de moscas-brancas, *B. tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum* e *T. abutiloneus* (Wintermantel et al., 2006). As duas primeiras espécies podem ser encontradas nas principais regiões produtoras de tomate do Brasil, sendo que o biótipo B de *B. tabaci* encontra-se predominante. Até o momento não há relatos da presença de *T. abutiloneus* no país (Lourenção et al., 2008).

A primeira descrição do ToCV ocorreu no estado da Flórida, Estados Unidos, em 1989 por Wisler et al. (1998). Atualmente, esse vírus encontra-se disseminado nas Americas, Europa, Ásia e África (Navas-Castillo et al., 2011). No Brasil, foi relatado no ano de 2006, no município de Sumaré, São Paulo (Barbosa et al., 2008), e posteriormente detectado em diversos estados brasileiros. Possivelmente esse vírus encontra-se disseminado em todo o país (Barbosa et al., 2011b).

A gama de hospedeiros de ToCV pode ser considerada ampla. São relatadas na literatura pelo menos 66 espécies de plantas, pertencentes a 19 famílias botânicas. No Brasil, o vírus tem

sido detectado em condições naturais infectando, além do tomateiro, plantas como bucho de rã (*Physalis angulata*), pimenta doce (*Capsicum annuum*), batata (*Solanum tuberosum*), berinjela (*S. melogena*) e jiló (*S. aethiopicum*) (Barbosa et al., 2010; Fonseca et al., 2015) .

Visto que a detecção de ToCV em tomateiros do Brasil é relativamente recente, são escassos os estudos voltados sobre sua biologia, diversidade genética, estudos de transmissão, perdas na produção, interação com outros vírus e epidemiologia. Considerando essa falta de dados sobre o ToCV no Brasil, o objetivo desse estudo foi avaliar experimentalmente a suscetibilidade das principais espécies de plantas daninhas e plantas cultivadas presentes próximas a cultivos de tomateiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 População de mosca-branca

As moscas-brancas *Bemisia tabaci* biótipo B (avirulíferas) utilizadas no trabalho foram provenientes da criação da Embrapa Hortaliças, mantidas por várias gerações em casa de vegetação em plantas de couve (*Brassica oleracea*) e pepino (*Cucumis sativus*).

2.2 Obtenção do isolado de *Tomato chlorosis virus* (ToCV)

O isolado de ToCV, denominado neste trabalho de ToCV-BR (GenBank acesso: JQ952600) selecionado para este estudo, foi obtido em 2010 em plantas de tomate em Sumaré, São Paulo, cedido pelos doutores. Júlio Cesar Barbosa e Jorge Alberto Marques Rezende (USP – Esalq) e mantido desde então em tomateiro na Embrapa Hortaliças.

2.3 Produção de mudas

As sementes de plantas daninhas foram adquiridas junto à empresa Agro Cosmos. Mudas no estágio de duas a três folhas verdadeiras transplantadas individualmente em vasos de 500ml foram utilizadas para a realização das inoculações.

2.4 Método de inoculação de ToCV

As inoculações foram realizadas por insetos adultos de moscas-brancas, *Bemisia tabaci* biótipo B. Moscas-brancas avirulíferas foram confinadas para aquisição viral em folíolos destacados de tomateiro infectado com ToCV, fixados em uma solução de ágar-água 1%, em tubos de polietileno de 50 ml. Cerca de 150 moscas-brancas por tubo permaneceram por um período de acesso de aquisição (PAA) de 48 horas. Após o PAA, aproximadamente 50 moscas-brancas virulíferas foram transferidas para cada planta-teste, dentro de copos plásticos de 500 ml com o fundo cortado e substituído por tecido organza. As inoculações das plantas testes foram feitas de forma individual (uma planta por copo), o que caracteriza um ensaio sem livre chance de escolha de alimentação para as moscas-brancas.

O período de acesso de inoculação (PAI) nas plantas-teste foi de 72 horas. Terminado o PAI, as moscas-brancas foram eliminadas manualmente e as plantas mantidas em câmara de crescimento ou em telado à prova de insetos para avaliação de sintomas. A detecção viral por RT-PCR foi realizada 40 dias depois de inoculado. Pelo menos três plantas de tomate cv. Santa Clara Miss Brasil ou *Physalis floridana* foram utilizadas como controles suscetíveis nas inoculações realizadas.

2.5 Classificação das plantas-teste como hospedeiras de mosca-branca

Para fins de classificação das plantas-teste como, eficientes ou hospedeiras não eficientes de mosca-branca (*B. tabaci* biótipo B), durante as inoculações foi avaliado o número desses insetos vivos que permaneceram em contato com as plantas avaliadas no período de 72 horas. Plantas que apresentaram até cinco insetos vivos foram consideradas hospedeiras não eficientes. Plantas com 5 a 30 insetos vivos foram consideradas hospedeiras eficientes.

2.6 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído com Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Aproximadamente 100 mg de tecido foliar foi colocado dentro de microtubos de 1,5 mL. O tecido foliar foi macerado em nitrogênio líquido com o auxílio de um pistilo plástico e em seguida 1 mL de Trizol foi adicionado. O macerado foi mantido em temperatura ambiente por três minutos, foi acrescentado 200 µl de clorofórmio e, em seguida agitado levemente por 30 segundos. O extrato homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos em microcentrífuga refrigerada a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 250 µl de isopropanol e 250 µl NaCL. A solução foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e logo em seguida centrifugada novamente para precipitação do RNA. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 75% e centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos. Descartado o etanol, o precipitado foi seco à temperatura ambiente e

ressuspendido em 40 µL de água Milli-Q autoclavada e armazenado a -80°C até o momento das análises.

2.7 Detecção de ToCV por RT-PCR

Para a obtenção do cDNA, 1 µL do RNA total extraído foi adicionado em 9 µL de mistura contendo 4,5 µl de água, 0,1 µL do oligonucleotídeo (anti-senso, 10 mM conc) TOC6 (AAACTGCCTGCATGAAAAGTCTC) (Dovas et al., 2002) e 0,1 µl de desoxinucleotídeos trifosfato 2,5 mM (dNTP's). A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos para desnaturação da dupla fita de RNA e colocada no gelo por 1 minuto. Depois de incubado, foi adicionado 0,1 µL de DTT a 0,1 M, 2 µL de tampão First Strand M-MLV 5x, 0,1 µL da enzima transcriptase reversa M-MMLV (200 U/µL, Invitrogen) e 0,1 µl de RNaseOUT (40 U/µL, Invitrogen). A reação foi incubada a 37°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos para inativação da transcriptase reversa.

Para reação de PCR, o cDNA sintetizado foi utilizado como molde em uma reação de 10 µL composta por 6,5 µL de água, 1 µL de tampão 10x da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 0,8 µL de MgCl₂ a 50 mM, 0,1 µL os oligonucleotídeos TOC 5 (GGTTTGGATTTTGGTACTACATTCAGT), TOC 6 (Dovas et al., 2002) a 10 mM e 0,1 µL de *Taq* DNA polimerase, totalizando uma reação final de 10 µL. O produto amplificado de aproximadamente 463 pares de bases foi visualizado em gel de agarose na concentração de 1%.

2.8 Inoculação de ToCV em plantas-teste por moscas-brancas

Experimentalmente foram avaliadas 50 espécies, dentre elas plantas cultivadas e não cultivadas, pertencentes às famílias botânicas Asteraceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Commelinaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Malvaceae, Poaceae, Portulacaceae, Solanaceae, Violaceae, Brassicaceae e Cucurbitaceae (Tabela 2).

Tabela 2: Famílias botânicas e suas espécies plantas utilizadas na avaliação da gama de hospedeiras alternativas de ToCV.

Plantas cultivadas		Plantas não cultivadas	
Família/ Nome científico	Nome comum	Família/ Nome científico	Nome comum
Asteraceae		Asteraceae	
<i>Lactuca sativa</i>	Alface	<i>Ageratum conyzoides</i>	Mentrasto
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	Crisântemo	<i>Bidens pilosa</i>	Picão preto
<i>Helianthus annuus</i>	Girassol	<i>Emilia sonchifolia</i>	Serralha vermelha
Brassicaceae		<i>Galinsoga parviflora</i>	Fazendeiro
Brassica oleracea cv.	Couve	<i>Melampodium</i>	
Manteiga	manteiga	<i>perfoliatum</i>	Estrelinha
Curcubitaceae		<i>Sonchus oleraceus</i>	Serralha
<i>Cucurbita pepo</i> cv. Caserta	Caserta	<i>Tagetes minuta</i>	Cravinho
<i>Citrullus lanatus</i> cv. Top Gun	Melancia	Amaranthaceae	
Fabaceae		<i>Amaranthus hybridus</i>	Caruru-roxo
<i>Glycine max</i>	Soja	<i>A. viridis</i>	Caruru-mancha
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Pérola	Feijão	<i>A. spinosa</i>	Caruru de espinho
Malvaceae		<i>Alternanthera tenella</i>	Apaga fogo
<i>Abelmoschus esculentus</i> cv. Santa Cruz	Quiabo	<i>Gomphrena globosa</i>	Gonfrena
Solanaceae		Chenopodiaceae	
<i>Capsicum annuum</i> cv. Ikeda	Pimentão	<i>Chenopodium quinoa</i>	Quinoa
<i>C. chinense</i> PI159236	Pimenta	Commelinaceae	
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. TNN	Fumo	<i>Commelina benghalensis</i>	Trapoeiraba
<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	Fumo	Convolvulaceae	
<i>Solanum melongena</i> cv. Florida Maket	Berinjela	<i>Ipomoea grandifolia</i>	Corda-de-viola
<i>S. aethiopicum</i>	Jiló	<i>I. nil</i>	Carriola
		Euphorbiaceae	
		<i>Euphorbia heterophylla</i>	Amendoim-bravo
		<i>E. hirta</i>	Santa Luzia
		Fabaceae	
		<i>Senna obtusifolia</i>	Mata pasto
		Lamiaceae	
		<i>Hyptis suaveolens</i>	Hortelã
		<i>Leonurus sibiricus</i>	Rubim
		Malvaceae	
		<i>Sida rhombifolia</i>	Guanxuma
		<i>S. cordifolia</i>	Malva
		<i>Urena lobata</i>	Guanxuma
		Poaceae	
		<i>Digitaria horizontalis</i>	Capim-colchão
		<i>Eleusine indica</i>	Pé de galinha
		Portulacaceae	
		<i>Portulaca oleracea</i>	Beldroega
		Solanaceae	
		<i>Datura stramonium</i>	Figueira-do-

	inferno
<i>D. metel</i>	Metel
<i>Nicandra physaloides</i>	Joá-de-capote
<i>Solanum americanum</i>	Maria-pretinha
<i>Physalis angulata</i>	Bucho de rã
<i>P. pubescens</i>	Fisalis
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Benthamiana
Violaceae	
<i>Viola wittrockiana</i>	Amor-perfeito

Para a realização das inoculações com as plantas-teste, estas foram organizadas em grupos de plantas de acordo com o tempo de germinação e o desenvolvimento de cada espécie. Para uniformizar os ensaios foram selecionadas plantas com estágio de duas a três folhas verdadeiras. Um total de 6 repetições por planta-teste foram inoculadas.

2.9 Coleta de plantas daninhas em lavouras de tomateiro

A infecção natural de ToCV foi procurada em plantas daninhas comumente encontradas em lavouras de tomateiro. A amostragem foi feita aleatoriamente dentro e em torno das lavouras de tomate, nas principais regiões produtoras de Taquara e Brazlândia - DF, em Jaíba - MG e Faxinal, município do estado do Paraná. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e analisadas no Laboratório de Virologia para identificação em nível de gênero e/ou espécie. O RNA total das amostras foi extraído e submetido a RT-PCR para detecção de ToCV. Foi coletado um total de 120 amostras de 15 espécies de plantas diferentes pertencentes às famílias Astereaceae, Amaranthaceae, Phyllanthaceae, Portulacaceae e Solanaceae.

2.10 Transmissão de ToCV a partir de plantas-teste para o tomateiro pelo inseto-vetor

Plantas-teste do ensaio de círculo de hospedeiras comprovadamente infectadas através de RT-PCR foram selecionadas para transmissão do ToCV para o tomateiro. Moscas-brancas avirulíferas foram colocadas em contato com essas plantas-teste infectadas por 48 horas. Terminado esse período, cerca de 20 moscas-brancas foram transferidas para mudas de tomateiro cv. Santa Clara Miss Brasil, individualmente, dentro de copos plásticos com fundo

cortado e substituído por tecido organza. Decorrido o período de 48 horas para inoculação, as moscas-brancas foram eliminadas mecanicamente e os tomateiros mantidos em telado à prova de insetos. Cerca de 20 dias após a inoculação, a detecção do vírus foi realizada utilizando RT-PCR.

3 RESULTADOS

3.1 Gama de hospedeiras de ToCV.

Foram avaliadas 35 espécies de plantas daninhas e 15 espécies de plantas cultivadas com o objetivo de determinar as principais espécies de plantas que podem atuar como reservatório natural de ToCV no Brasil. As inoculações foram conduzidas utilizando o vetor *B. tabaci* biótipo B (moscas-branca). Por se tratar de um inseto com forte preferência para determinados hospedeiros as inoculações foram conduzidas utilizando copos plásticos em plantas individuais, caracterizando assim ensaios sem livre chance de escolha para o vetor.

Das 50 espécies de plantas avaliadas, nove espécies foram consideradas suscetíveis ao isolado de ToCV utilizado neste trabalho. As espécies suscetíveis pertencentes as famílias: *Amaranthaceae* (*Gomphrena globosa*), *Asteraceae* (*Chrysanthemum coronarium*) e *Solanaceae* (*Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum*, *Nicandra physaloides*, *Physalis angulata*, *P. pubescens* e *Solanum americanum* (Tabela 3).

Nenhuma das espécies de plantas avaliadas pertencentes às famílias *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, *Commelinaceae*, *Convolvulaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Malvaceae*, *Poaceae*, *Portulacaceae* e *Violaceae* foram consideradas suscetíveis.

3.2 Avaliação de sintomas de ToCV em plantas-teste.

Os sintomas das plantas-testes inoculadas com ToCV foram avaliados até 60 dias depois das inoculações. Houve variações nos tipos de sintomas de acordo com a planta-teste infectada. Os sintomas variaram de manchas cloróticas, amarelecimento e clorose entre as nervuras foliares. Em algumas espécies, os sintomas começaram a surgir mais cedo do que em outras. Na espécie *P. pubescens* os sintomas surgiram a partir de sete dias depois de inoculado, caracterizados por uma clorose intensa entre as nervuras (Figura 6 A). As outras plantas-testes suscetíveis ao ToCV começaram a demonstrar sintomas mais tardios com 15 a 20 dias depois de inoculado com ToCV. Fumo (*N. tabacum* cv TNN) e maria-pretinha (*S.*

americanum) apresentaram sintomas fortes, por manchas cloróticas, principalmente nas folhas mais velhas (Figura 6 B e C). A infecção por ToCV não resultou em sintomas nas espécies *G. globosa* e *C. coronarium* nas condições que foram realizadas os ensaios (Tabela 3).

Tabela 3: Espécies de plantas suscetíveis à infecção por *Tomato chlorosis virus* inoculadas por *Bemisia tabaci* biótipo B e transmissão do vírus de plantas testes suscetíveis para o tomateiro cv. Santa Clara.

Família	Espécie	Nº. de plantas infectadas/ Inoculadas (%)	Tipos de sintomas*	Transmissão para o tomateiro (%)
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i>	2/6 (33,3%)	SS	0/3 (0%)
Asteraceae	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	6/6 (100%)	SS	3/3 (100%)
Solanaceae	<i>Datura stramonium</i>	5/6 (83,3%)	MC	3/3 (100%)
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	3/6 (50%)	AM	1/3 (33,3%)
	<i>N. tabacum</i> cv. TNN	6/6 (100%)	MC	3/3 (100%)
	<i>Nicandra physaloides</i>	4/6 (66,6%)	CI	2/3 (66,6%)
	<i>Physalis angulata</i>	6/6 (100%)	AM	3/3 (100%)
	<i>P. pubescens</i>	6/6 (100%)	CI	2/3 (66,6%)
	<i>Solanum americanum</i>	6/6 (100%)	MC/CI	3/3 (100%)
	<i>S. lycopersicum</i> (Controle)	6/6 (100%)	CI	-----

*Clorose internerval: **CI**; Amarelecimento: **AM**; Manchas cloróticas: **MC**; Sem sintomas **SS**.

Durante as avaliações de sintomas do primeiro ensaio, sintomas de mosqueado e clareamento de nervura foram observados em plantas de tomateiro utilizadas como controle no experimento. Esses sintomas não são característicos de infecção por ToCV, mas característicos de infecção por begomovírus, por isso foi investigado. Utilizando primers universais para begomovírus PAL1c496 e PAL1v1978 (Rojas et al., 1993), foi amplificado por PCR um fragmento de 1,1 kb o que confirmou a presença de begomovirus. Por isso a presença de begomovírus também foi avaliada em todas as plantas do grupo de 21 plantas-teste inoculadas durante o primeiro ensaio (Tabela 4).

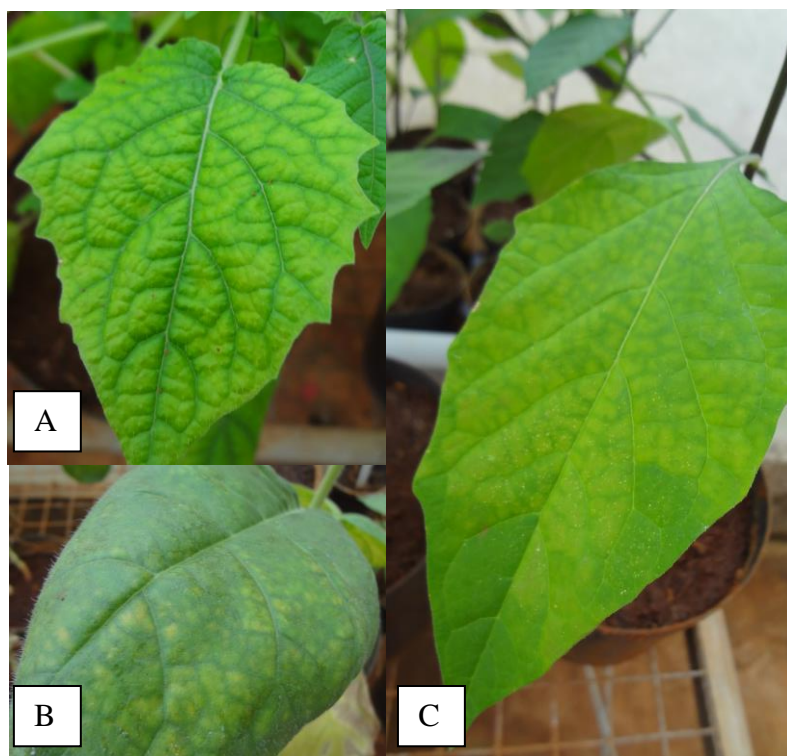


Figura 6: A) Sintomas de clorose internerval em *P. pubescens*. B) manchas cloróticas em fumo (*N. tabacum* cv. TNN) e C) mancha clorótica e clorose internerval em maria-pretinha.

Entre as espécies de plantas co-inoculas com ToCV e begomovírus, as espécies, *N. tabacum* cv. Samsun, *Melampodium perfoliatum* e *D. stramonium* foram infectadas por begomovírus. *D. stramonium* foi a única espécie de planta-teste infectada em mistura por ToCV e begomovírus.

Tabela 4: Grupo de espécie de plantas-teste co-inoculadas com ToCV e begomovírus.

Espécies de plantas
<i>Portulaca oleracea</i> , <i>Amaranthus viridis</i> , <i>Nicotiana. tabacum</i> cv. Samsun, <i>Tagetes minuta</i> , <i>Datura stramonium</i> , <i>Euphorbia heterophylla</i> , <i>Ageratum conyzoides</i> , <i>E. hirta</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Capsicum annum</i> cv. Ikeda, <i>Ipomoea nil</i> , <i>I. grandifolia</i> , <i>Chenopodium quinoa</i> , <i>Physalis floridana</i> , <i>Bidens pilosa</i> , <i>Gomphrena globosa</i> , <i>Alternanthera tenella</i> , <i>Cucurbita pepo</i> cv. Caserta, <i>Digitaria horizontalis</i> e <i>Eleusine indica</i> .

3.3 Teste de transmissão para o tomateiro

A seguir, foram realizados testes de transmissão a partir de plantas-testes (infectadas apenas com ToCV) para o tomateiro pelo inseto-vetor. O isolado de ToCV foi transmitido a partir de todas as plantas avaliadas, com exceção de *G. globosa*. A taxa de transmissão de ToCV para as demais plantas testes variou de 33,3 a 100% a depender da espécie (Tabela 4). Esse resultado demonstrou que as plantas estavam consistentemente infectadas por ToCV.

3.4 Classificação das hospedeiras de moscas-brancas

Durante o processo de inoculação de ToCV, foi avaliado o número de insetos que permaneceram vivos em contato com as plantas por um período de 72 horas. Baseado na quantidade de insetos vivos durante o fim desse período, as plantas foram classificadas em hospedeiras eficientes e não eficientes.

Entre todas as espécies de plantas avaliadas apenas as espécies *N. benthamiana*, *P. pubescens*, *Tagetes minuta*, *Gomphrena globosa*, *Portulaca olearacea*, *Lactuca sativa* e *Datura metel* não foram consideradas hospedeiras eficientes de mosca-branca, devido à alta taxa de mortalidade desses insetos no final do período de 72 horas. As demais plantas foram consideradas plantas eficientes (Tabela 5).

Tabela 5: Plantas-teste do círculo de hospedeiro de ToCV avaliadas quanto ao número de moscas-brancas vivas no período de 72 horas após o início das inoculações e classificadas em hospedeiras eficientes ou não eficientes.

Hospedeiras eficientes	<i>Euphorbia hirta</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Pérola, <i>Brassica oleracea</i> cv. Manteiga, <i>Cucurbita pepo</i> cv. Caserta, <i>Emilia sonchifolia</i> , <i>Sonchus oleraceus</i> , <i>Ageratum conyzoides</i> , <i>Chrysanthemum coronarium</i> , <i>Amaranthus spinosa</i> , <i>Nicandra physaloides</i> , <i>Solanum americanum</i> . <i>Capsicum annuum</i> cv. Ikeda, <i>C. chinense</i> PI679, <i>Nicotiana tabacum</i> cv. TNN, <i>Solanum melogena</i> , <i>S. aethiopicum</i> , <i>Citrullus lanatus</i> cv. Top Gun, <i>Glycine max</i> , <i>Abelmoschus esculentus</i> cv. Santa Cruz, <i>Amaranthus hybridus</i> , <i>Commelina benghalensis</i> , <i>Datura stramonium</i> , <i>Physalis angulata</i> , <i>Digitaria horizontalis</i> , <i>Eleusine indica</i> , <i>Senna obtusifolia</i> , <i>Euphorbia heterophylla</i> , , <i>Ipomoea nil</i> , <i>I. grandifolia</i>
Hospedeiras não eficientes	<i>Tagetes minuta</i> , <i>Gomphrena globosa</i> , <i>D. metel</i> , <i>Physalis pubescens</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>Portulaca oleracea</i> , <i>Lactuca sativa</i> .

3.5 Detecção de ToCV em plantas daninhas coletadas em lavouras de tomateiro

Sintomas de infecção de ToCV foram observados em cultivos protegidos em tomateiros nas regiões do Distrito Federal (Taquara e Brazlândia), Jaíba-MG e Faxinal - PA durante visitas realizadas no meses de Junho a Agosto de 2015. Nessas regiões, havia alta incidência em tomateiro com sintomas características de ToCV. Nas regiões de Brazlândia e Faxinal, as altas populações de *T. vaporariorum* foram observadas. Plantas dentro e em torno desses cultivos foram coletadas e avaliadas quanto à presença de infecção natural de ToCV.

No total foram avaliadas 118 amostras de plantas daninhas pertencentes a 15 espécies dentro de três famílias botânicas (Tabela 6). Apenas 4.72% do total de plantas avaliadas foram encontradas infectadas por ToCV. Duas amostras de *Amaranthus hybridus* coletadas no Paraná, uma amostra de *Solanum americanum* provinda de Jaíba-MG e uma amostra de *Nicandra physaloides* coletada em Taquara-DF foram positivas para detecção de ToCV. A

região da CP do isolado de ToCV em *S. americanum* foi clonada e a sequência obtida confirmou a infecção por ToCV.

Os sintomas naturais de ToCV visualizados em caruru-roxo são caracterizados pela clorose geral das folhas em toda a planta. A única amostra positiva para ToCV de *N. physaloides* quando coletada em campo apresentava sintomas severos de begomovirus, não sendo possível a visualização dos sintomas de crinivírus (Figura 7). Nas amostras de maria-pretinha os sintomas de ToCV podem ser vistos por uma clorose intensa entre as nervuras nas folhas baixas e médias da planta.

Tabela 6: Espécies de plantas daninhas coletadas em cultivos de tomateiro e testadas para presença de ToCV.

Família	Nome comum	Espécie	Nº de amostras coletadas	Nº de plantas infectadas/ testadas	Áreas de coleta
Asteraceae	Picão preto	<i>Bidens pilosa</i>	5	0/5	Taquara
	Picão branco	<i>Galinsoga parviflora</i>	8	0/8	Taquara
	Mentrasto	<i>Ageratum conyzoides</i>	10	0/10	Taquara, Brazlândia
	Serralha	<i>Sonchus oleraceus</i>	8	0/8	
Amaranthaceae	Caruru-roxo	<i>Amaranthus hybridus</i>	10	2/10	Paraná
	Caruru-mancha	<i>Amaranthus viridis</i>	16	0/14	Brazlândia
	Caruru de espinho	<i>Amaranthus spinosa</i>	10	0/10	Brazlândia
	Apaga fogo	<i>Alternanthera tenella</i>	5	0/5	Brazlândia
Euphorbiaceae	Amendoim-bravo	<i>Euphorbia heterophylla</i>	3	0/3	Taquara
	Erva de Santa Luzia	<i>Euphorbia hirta</i>	2	0/2	Taquara
Phyllanthaceae	Quebra pedra	<i>Phyllanthus</i> sp.	5	0/5	Brazlândia
Portulacaceae	Beldroega	<i>Portulaca oleracea</i>	8	0/8	Taquara
Solanaceae	Maria pretinha	<i>Solanum americanum</i>	10	1/10	Jaíba
	Joá-de-capote	<i>Nicandra physaloides</i>	5	1/5	Taquara
	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	10	7/10	Brazlândia, Taquara
		Espécie não determinada	5	0/5	Brazlândia
	Total		120	10/118	



Figura 7: *N. physaloides* coletada em campo com infecção por ToCV, porém com sintomas mais aparentes de mosaico, deformação foliar e bolhosidade, característicos de infecção por begomovírus.

4 DISCUSSÃO

A compreensão de quais espécies de plantas podem atuar como hospedeiras alternativas e potencial fonte de inóculo é indispensável para aplicação de medidas de controle visando a eliminação de plantas fontes de vírus em campo. Nesse estudo, foram selecionadas as principais plantas daninhas e cultivadas para avaliação quanto à suscetibilidade à infecção pelo crinivírus *Tomato chlorosis virus* (ToCV). São poucos os trabalhos relacionados à caracterização biológica do ToCV, incluindo a sua gama de hospedeiras, que ainda não é conhecida no Brasil, o que justifica a demanda de pesquisas voltadas para essa área.

Diversas espécies de plantas daninhas podem atuar diretamente na dispersão de vírus em campo, servindo de reservatório natural e, conseqüentemente, fonte de inóculo para culturas economicamente importantes (Barbosa et al., 2011b; Barreto et al., 2013). Estudos de plantas daninhas como reservatório natural de vírus são cada vez mais difundidos devido à capacidade de plantas invasoras hospedarem não apenas vírus que infectam apenas plantas daninhas, mas também vírus que infectam culturas economicamente importantes, como o tomateiro, por exemplo (Barreto et al., 2013). Muitas espécies de plantas são relatadas como hospedeiras naturais de ToCV especialmente aquelas pertencentes à família Solanaceae (Wintermantel et al., 2006). Barbosa et al. (2010) relataram a suscetibilidade de pimenta doce (*C. annuum*) através de avaliações em plantas exibindo clorose internerval encontradas no município de São Miguel Arcanjo, Estado de São Paulo. Posteriormente, a mesma espécie também foi relatada por Vargas et al. (2011) em cultivo de pimenta doce na Costa Rica e por Fortes et al. (2012) na Espanha. Entretanto, nos Estados Unidos, essa mesma espécie mostrou-se resistente em condições experimentais (Wintermantel et al., 2006). *C. annuum* cv Ikeda foi avaliada experimentalmente nesse trabalho, contudo não foi infectada em nenhuma das inoculações realizadas.

Recentemente amostras de berinjela (*Solanum melongena*) e jiló (*S. aethiopicum*) coletadas em campo também foram encontradas infectadas naturalmente por ToCV (Fonseca et al., 2015). Esquivel & Rezende (2013) avaliaram em condição experimental as espécies de solanáceas *S. melongena* e *S. sessiliflorum*, sendo que ambas foram suscetíveis ao isolado de ToCV. Apesar dos relatos de infecção por ToCV em *Solanum melongena* e *S. aethiopicum*, as mesmas não foram suscetíveis ao isolado de ToCV deste trabalho.

Nas amostras consideradas suscetíveis ao ToCV, dentre amostras coletadas em campo e as espécies avaliadas experimentalmente, as espécies *A. hybridus* (caruru-roxo), *C. coronarium* e *P. pubescens* são pela primeira vez relatadas como hospedeiras de ToCV. Apesar dessa ocorrência de infecção natural de ToCV, a espécie *A. hybridus* não foi artificialmente infectada. Esse fato pode ter ocorrido devido a fatores como, a idade que as plantas foram inoculadas, diferentes isolados de ToCV, diferença varietal, dentre outros fatores. *A. hybridus* está presente em praticamente todas as regiões do Brasil, possui grande capacidade reprodutiva e, além de infestar com facilidade áreas de cultivos, compete com culturas agrônômicas (Silva et al., 2010).

A espécie *Chrysanthemum coronarium* é uma planta ornamental com elevada importância econômica. A cultura é afetada por uma alta diversidade de patógenos, entre eles bactérias, fungos e vírus como, por exemplo, a espécie *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), pertencente ao gênero *Tospovirus* (Bezerra et al. 1999). O cultivo dessa planta em condições de estufa propicia a presença de *T. vaporariorum*, conhecida como a “mosca de casa de vegetação” (Lourenção et al., 2008). A presença de ToCV em cultivo de crisântemo juntamente com populações do vetor podem ser um problema para o agricultor em futuro bem próximo. Plantas ornamentais são frequentemente relatadas como hospedeiras de ToCV, a espécie *Zinnia elegans* é outro exemplo de planta ornamental suscetível à infecção por ToCV (Tsai et al., 2004).

Várias espécies do gênero *Physalis* são conhecidas como hospedeiros de ToCV, *P. alkekengi*, *P. angulata*, *P. ixocarpa*, *P. wrightii*, *P. peruviana*. Nesse trabalho a espécie *P. angulata* foi avaliada experimentalmente e considerada suscetível. Essa espécie é constantemente encontrada em cultivos de tomateiro e foi anteriormente relatada como hospedeira natural de ToCV no Brasil (Fonseca et al., 2013). Esses resultados demonstram o alto potencial desta espécie de atuar na disseminação desse vírus em campo e deve ser alvo de eliminação para minimizar ou excluir a fonte de inóculo.

As demais espécies suscetíveis, *Gomphrena globosa*, *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicandra physaloides*, *Nicotiana tabacum* cv. TNN, *Physalis angulata* e *Solanum americanum* já foram citadas anteriormente como hospedeiras do ToCV (Fortes et al., 2012; Wintermantel et al., 2006; Barbosa et al., 2013a; Fonseca et al., 2013). As espécies *P. angulata* e *S. americanum* exigem maior atenção devido à sua alta incidência em campo. (Nascente et al., 2004).

Infestações de plantas daninhas podem contribuir para a redução da produtividade através da competição por espaço, água, nutriente, luz, da liberação substâncias químicas e da sua atuação como reservatório natural de vírus (Hernandez et al., 2007; Nascente et al., 2007). A espécie *N. physaloides* é uma importante planta daninha que pode exercer um papel na manutenção de diversos vírus que infectam culturas agrícolas, como begomovírus e crinivírus (Barbosa et al., 2009, 2013). ToCV foi detectado em amostras de *N. physaloides* e *S. americanum* coletadas em campo e inoculadas experimentalmente.

A detecção do isolado de ToCV em plantas-testes foi realizado por RT-PCR. Essa técnica molecular possui alta sensibilidade, porém isoladamente não é capaz de determinar a suscetibilidade das plantas-testes devido à possibilidade do anelamento com regiões do genoma da planta, havendo a necessidade de complementação com outras técnicas moleculares adicionais, sorológicas ou biológicas. De modo a complementar os resultados

obtidos na RT-PCR, plantas suscetíveis ao ToCV foram selecionadas para a transmissão para o tomateiro, utilizando o inseto vetor. A transmissão a partir das espécies *G. globosa* e *N. benthamiana* não foi eficiente. Ambas as espécies foram consideradas más hospedeiras de moscas-brancas neste trabalho e esse fato pode explicar a ausência de transmissão. Adicionalmente, é possível que ToCV replica-se em baixa quantidade, não produzindo partículas virais suficientes para ocorrência de transmissão (Barreto, 2013). A transmissão a partir das demais espécies suscetíveis ocorreu de forma eficiente, demonstrando que o vírus replica-se de forma eficiente nessas plantas.

Com relação a incidência do ToCV nas plantas daninhas coletadas em campo, a taxa de incidência foi considerada baixa, pois somente 4,72% das amostras apresentaram resultado positivo. Resultado semelhante foi obtido em estudo conduzido por Orfanidou et al. (2013) onde em um total de 1237 amostras de plantas daninhas pertencentes a 26 famílias botânicas, coletadas dentro e nas proximidades de lavouras de tomateiro na Grécia e analisadas para a detecção de ToCV apenas 2,2% estavam infectadas. Neste mesmo trabalho, ToCV foi detectado nas seguintes espécies: *Lactuca sativa*, *Amaranthus retroflexus*, *Cirsium arvense*, *Conyza* sp., *Chenopodium album*, *Convolvulus arvensis*, *Malva sylvestris*, *Plantago major*, *Portulaca oleracea*, *Rumex* sp., *Anagalis foemina* e *Datura stramonium*. Os resultados obtidos pelos autores, demonstram que a gama de hospedeiras de ToCV pode ser maior do que acreditava-se, devido ao número de novas espécies relatadas.

Foram observadas variações na suscetibilidade de plantas a determinados isolados relatados na literatura e com base em resultados obtidos nesse trabalho. As espécies *Lactuca sativa* e *Portulaca oleracea* são listadas na literatura como hospedeiras de ToCV, porém nesse trabalho não foram consideradas hospedeiras. Essa variação pode ocorrer devido a fatores como mutações no genoma viral dos isolados, idade da planta no momento da inoculação, eficiência de transmissão pelo vetor, eficiência de replicação do vírus na

hospedeira, variedade da planta e ferramenta utilizada na detecção do vírus, entre outros fatores.

Durante as inoculações por moscas-brancas no início dos ensaios de círculo de hospedeiras, sintomas característicos de infecção por begomovírus foram observados em tomateiros utilizados como controles nos ensaios e isso foi investigado. Através de PCR utilizando primers universais para begomovirus foi confirmada a presença de begomovírus inoculado junto com ToCV. Um grupo de 21 espécies de plantas-testes foram inoculadas com moscas-brancas virulíferas para ambos os vírus. A espécie *D. stramonium* foi a única espécie detectada com infecção mista com o isolado de ToCV e begomovírus. As espécies detectadas em infecção simples apenas com begomovirus foram *N. tabaccum* cv. Samsun e *Melampodium perfoliatum*, que foi relatada como hospedeira de begomovirus na Costa Rica (Jovel et al. 1999). Esse é o primeiro relato de begomovírus infectando *M. perfoliatum* no Brasil. A co-inoculação do isolado de ToCV junto com begomovírus não influenciou nos resultados da identificação das plantas-teste suscetíveis ao ToCV, pois, apenas a espécies *D. stramonium* foi infectada com ambos os vírus, e portanto as plantas em infecção mista foram eliminadas do ensaio e posteriormente inoculadas novamente com o isolado de ToCV sozinho. A espécie de mosca-branca utilizada para as inoculações (*B. tabaci*) é vetora de uma de muitos outros vírus e por isso o risco de contaminação por outros vírus não específicos, quando se trabalha com esse vetor é elevado, devido à dificuldade de manutenção de inóculos apenas com o vírus de interesse, à dificuldade de manter criações de moscas-brancas avirulíferas, estrutura inadequada e principalmente ao difícil controle dessas moscas-brancas durante os experimentos.

Para fins de classificação das plantas avaliadas em eficientes ou não eficientes hospedeiras de moscas-brancas, durante as inoculações, foram realizadas contagens de moscas-brancas nas plantas-teste de forma individual. Sabe-se que a mosca-branca é um inseto

altamente polífago, especialmente o biótipo B, considerado um dos mais agressivos (Byrne & Bellows, 1999). Por isso, a maioria das plantas-teste avaliada foram classificadas como hospedeiras eficientes. Entre as espécies consideradas hospedeiras intermediárias, estão *Digitaria horizontalis* e *Eleusinia indica*, ambas monocotiledôneas. Apesar de esses insetos serem mais adaptados a dicoledôneas, principalmente as de importância econômica, e não serem considerados praga no milho (uma monocotiledônea), surtos de moscas-brancas têm sido relatados em plantações de milho, o que demonstra rápida adaptabilidade a novas hospedeiras e a capacidade de sobrevivência em campo na ausência de plantas conhecidas como hospedeiras (dados não publicados). Esses insetos apresentam forte preferência a determinados hospedeiros, mas no campo pode ocorrer a ausência dessas plantas e o inseto recorre a outra hospedeira disponível. Entretanto, com a metodologia de inoculação utilizando as moscas-brancas sem chance de escolha, foi comprovada a capacidade de mosca-brancas infestarem as duas espécies de monocotiledôneas. Foi realizado um ensaio adicional, não incluído neste trabalho, em que moscas-brancas foram liberadas com livre chance de escolha em gaiola contendo 10 espécies de plantas daninhas, dentre elas as espécies *D. horizontalis* e *E. indica*, nas quais nenhum inseto se alimentou ou mesmo pousou durante as avaliações. Houve, possivelmente, a preferência das moscas-brancas por plantas como tomateiro, por exemplo. As demais espécies de plantas avaliadas, *Tagetes minuta*, *Gomphrena globosa*, *D. metel*, *Physalis pubescens*, *Nicotiana benthamiana*, *Portulaca oleracea*, *Lactuca sativa*, foram classificadas como más hospedeiras, devido ao baixo número insetos vivos após 72 horas de contato com as plantas. O baixo número de insetos presentes nessas plantas provavelmente foi devido a fatores morfológicos como a presença de tricomas e liberação de substâncias químicas prejudiciais aos insetos, e por critérios nutricionais e de sabor.

O principal objetivo desse trabalho foi identificar espécies de plantas suscetíveis a um isolado brasileiro de ToCV. Os resultados mostraram que as espécies de plantas daninhas S.

americanum, *Physalis angulata*, *P. pubescens*, *N. physaloides*, *D. stramonium* e *N. benthamiana*, uma espécie de planta cultivada *Nicotiana tabacum* cv. TNN, e as plantas ornamentais, *Gomphrena globosa* e *Chrysanthemum coronarium*, são suscetíveis à infecção por ToCV. Além disso, foi o primeiro relato de infecção natural na espécie *A. hybridus* e da suscetibilidade das espécies *Physalis pubescens* e *Chrysanthemum coronarium* ao ToCV no Brasil.

5 CONCLUSÕES

As espécies de plantas *G. globosa*, *N. benthamiana*, *D.stramonium*, *N. tabacum* cv. TNN, *S. americanum*, *N. physaloides* e *P. angulata* são relatadas como hospedeiras de ToCV e também foram suscetíveis neste estudo. A infecção de *C. coronarium* e *P. pubescens* por ToCV até o momento não havia sido relatada. Testes de transmissão do ToCV a partir das plantas-testes suscetíveis demonstrou a capacidade de transferência desse vírus para o tomateiro pelo vetor, com exceção de *G. globosa*.

O ToCV foi encontrada nas plantas daninhas, *S. americanum*, *A. hybridus* e *N. physaloides* naturalmente infectadas, demonstrando que essas plantas podem atuar como fonte de ToCV em lavouras. O conhecimento das espécies de plantas que podem servir de reservatório natural do ToCV é indispensável para o sucesso de medidas para o seu manejo.

Literatura Citada

- BARBOSA, J.C., BARRETO, S.S., INOUE-NAGATA, A.K., REIS, M.S. FIRMINO, A.C., BERGAMIN, A., REZENDE, J.A.M. 2009. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. *Journal of General Plant Pathology*. 75: 440-443.
- BARBOSA, J.C., REZENDE, J.A.M., COSTA, H. 2013a. Algumas espécies vegetais suscetíveis ao *Tomato chlorosis virus*. In: Anais XXXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA. Ouro Preto, MG, 20 a 25 de Outubro de 2013. Sociedade Brasileira de Fitopatologia. Ouro Preto.
- BARBOSA, J.C., TEIXEIRA, L.D.D., REZENDE, J.A.M. 2010. First report on the susceptibility of sweet pepper crops to *Tomato chlorosis virus* in Brazil. *Plant Disease*. 94(3): 374.3.
- BEZERRA, I.C., RESENDE, R.O., POZZER, L., NAGATA, T., KORMELINK, R. DE ÁVILA, A.C. 1999. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from *Chrysanthemum* and one from *Zucchini*. *Phytopathology*. 89(9): 823-830.
- DOVAS, C.I., KATIS, N.I., AVGELIS, A.D. 2002. Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. *Plant Disease*. 86:1345-1349.
- EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. 2013. *Tomato chlorosis virus* and *tomato infectious chlorosis virus*. *Bulletin OEPP/EPPO*. 43(3): 462-470.
- FIALLO-OLIVÉ, E., HAMED, A.A., MORIONES, E., NAVAS-CASTILLO. 2011. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato in Sudan. *Plant disease*. 95(12): 1592.
- FONSECA, M.E.N, BOUITEUX, L.S., ABREU, H., NOGUEIRA, I., PEREIRA-CARVALHO, R.C. 2013. *Physalis angulata*: A new natural host of *Tomato chlorosis virus* in Brazil. *Plant Disease*. 97
- FONSECA, M.E.N., BOUITEUX, M.F., LIMA, M.F., MENDONÇA, J.L., COSTA, A.F., FONTES, M.G., COSTA, H. 2015. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting eggplant and Scarlet eggplant in Brazil. *Plant Disease* [Online]. Disponível em <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-09-15-1087-PDN> Consultado em 18/01/2016.
- FONSECA, M.E.N., BOUITEUX, L.S., ABREU, H., PEREIRA-CARVALHO, R.C. 2013. *Physalis angulata*: A new natural host of *Tomato chlorosis virus* in Brazil. *Plant Disease*. 97(5):692.
- FORTES, I.M., NAVAS-CASTILLO, J. 2012. Potato, an experimental and natural host of the crinivirus *Tomato chlorosis virus*. *European Journal of Plant Pathology*. 134:81-86
- GONZÁLEZ-AGUILERA, J., TAVARES, S.S., SOBRINHO, R.R., XAVIER, C.A.D., DUEÑAS-HURTADO, F., LARA-RODRIGUES, R.M., DA SILVA, D.J.H., ZERBINI, M. 2012. Genetic structure of a Brazilian population of the begomovirus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). *Tropical Plant Pathology*. 37(5): 346-353.

- HERNANDEZ, D.D., ALVEZ, P.L.A., PAVANI, M.C., PARREIRA, C. 2007. Períodos de interferência de maria-preitinha sobre tomateiro industrial. *Horticultura Brasileira* 25:199-204.
- LOURENÇÃO, A.L., ALVES, A.C., FUGI, C.G.Q., MATOS, E.V.S. 2008. Outbreaks of *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Hemiptera:Aleyrodidae) under field conditions in the state of São Paulo, Brazil. *Neotropical Entomology* 37(1): 089-091.
- NASCENTE, A.S., PREREIRA, W., MEDEIROS, M.A. 2004. Interferência das plantas daninhas na cultura do tomate para processamento. *Horticultura brasileira*. 22(3): 602-606.
- NAVAS-CASTILLO, J. FIALLO-OLIVÉ, SÁNCHEZ-CAMPOS, S. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Reviews Phytopathology*. 49:219-248.
- NAVAS-CASTILLO, J.R., BUENO, M. MORIONES, E.2000. Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain Associated with infections of Tomato chlorosis virus. *Plant disease*. 84:835-837.
- PAPAYIANNIS, L.C., HARKOU, I.S., MORKOU, Y.M., DEMETRIOU, C.N., KATIS, N.I. 2011. Rapid discrimination of *Tomato chlorosis virus*, *Tomato infectious chlorosis virus* and co-amplification of plant internal control using real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 176:53-59.
- ROJAS, M.R., GILBERTSON, R.L., RUSSELL, D.R., MAXELL, P. 1993. Use of degenerate primers in the Polymerase Chain Reaction to detect Whitefly-transmitted Geminiviruses. *Plant Disease*. 77:340-347.
- SILVA, B.P., DE CARVALHO, L.B., ALVES, P.L.C., SOUZA, M.C. MAGÁRIO, F.B. 2010. Interferência de caruru-de-mancha, Maria-preitinha, picão preto e tiririca em tomateiro industrial. *Bragantia*.69(2): 313-318.
- VARGAS, J.A., HERNÁNDEZ, E., MORA, N.B.F, RAMÍREZ, P. 2011. First Reporto f Tomato chlorosis virus infecting sweet pepper in Costa Rica. *Plant Disease*. 95(11): 1482.
- WINTERMANTEL, W.M. & WISLER, G.C. 2006. Vector specificity, host range and genetic diversity of Tomato chlorosis virus. *Plant Disease*. 90:814-819.
- WINTERMANTEL, W.M. & WISLER, G.C. 2006. Vector specificity, host range and genetic diversity of Tomato chlorosis virus. *Plant Disease*. 90:814-819.
- ZHAO, L-M. LI, G., GAO, Y., LIU, Y-J. SUN, G-Z., ZHU, X-P. 2014. Molecular detection and complete genome sequences of *Tomato chlorosis virus* isolates from infectious outbreaks in China. *Journal of Phytopathology*. 162:627-634.
- TSAI, W.S., SHIH, S.L., GREEN, S.K., HANSON, P., LIU, H.Y. 2004. First Reporto f the occurrence of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in Taiwan. *Plant Disease*. 88(3): 311.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA SUPERAÇÃO DE RESISTÊNCIA A TOSPOVÍRUS EM TOMATEIRO QUANDO PRÉ-INFECTADO POR *Tomato chlorosis virus*.

RESUMO

As doenças de etiologia viral estão entre os principais problemas da cultura do tomateiro. Entre os vírus que merecem destaque encontra-se o *Tomato chlorosis virus* (ToCV), um dos mais preocupantes, devido a sua incidência crescente em todo o mundo. Os danos causados por ToCV ainda não são conhecidos, entretanto, devido a severidade dos sintomas e a consequente redução da área fotossintética, efeitos negativos como a diminuição do número e tamanho dos frutos podem ocorrer. Outro grupo de vírus importantes para o tomateiro são os tospovírus, responsáveis por causar a doença denominada de vira-cabeça. Quatro espécies de tospovírus são relatadas em tomateiro no Brasil, são elas: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus*. Os tospovírus são constituídos de RNA senso negativo, diferenciado de ToCV por este ser composto de RNA senso positivo. Outra característica diferencial entre esses dois vírus está no modo de transmissão. O ToCV é um vírus limitado ao floema da planta e a transmissão natural é feita exclusivamente pelas moscas-brancas; já os tospovírus conseguem invadir tecidos parenquimáticos e a transmissão natural dos tospovírus ocorre por espécies de tripes. Ambos são capazes de infectar o tomateiro podendo ser detectados em campo isoladamente ou em mistura. Infecções mistas entre um ou mais vírus podem gerar consequências patológicas imprevisíveis. No tomateiro, é conhecido o sinergismo entre ToCV e o tospovírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em um estudo desenvolvido na Espanha. Nessa interação, há aparentemente um favorecimento da infecção de TSWV em planta resistente (com gene *Sw-5*), quando previamente infectado por ToCV. Não existem estudos voltados para interação entre esses dois vírus no Brasil, portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar um provável sinergismo entre um isolado de ToCV e tospovírus envolvido na quebra de resistência conferida pelo gene *Sw-5* em tomateiro. As cultivares Predador e Viradoro resistentes a tospovírus foram selecionadas para este estudo. As plantas foram previamente inoculadas por ToCV e após um intervalo de 10 dias, com os tospovírus TCSV e GRSV. Além das cultivares de tomate, *Nicotiana benthamiana* transgênica, transformadas com o gene *Sw-5* foram utilizadas em outro ensaio independente. A detecção do isolado de ToCV e tospovírus foi feita por RT-PCR e Dot-ELISA respectivamente. Baseados nos resultados

obtidos, evidências mostraram que, em tomateiro a pré-infecção por ToCV não resultou na alteração da expressão do gene *Sw-5* e conseqüentemente, plantas resistentes não foram infectadas por tospovírus. Em *N. benthamiana*, as plantas transgênicas resistentes a tospovírus quando previamente inoculadas com ToCV e posteriormente inoculadas com os tospovírus apresentaram sintomas de hipersensibilidade nas folhas inoculadas (característica de resistência). Apesar do preocupante relato de quebra de resistência a tospovírus resultante do sinergismo com ToCV ocorrido na Espanha, sob as condições em que os ensaios foram realizados, neste trabalho não houve sinergismo entre ToCV e os tospovírus TCSV e GRSV que resultasse na superação da resistência em ambas as cultivares de tomateiro (Predador e Viradoro) e assim como em *N. benthamiana*.

Palavras-chave: gene *Sw-5*, Sinergismo, TSWV.

EVALUATION OF THE RESISTANCE BREAKDOWN TO TOSPOVIRUSES IN TOMATOES WHEN INOCULATED WITH *Tomato chlorosis virus*.

ABSTRACT

The viral diseases are among the major problems of the tomato crop, being *Tomato chlorosis virus* (ToCV) one of great concern, due to the increasing incidence throughout the world. Losses caused by ToCV are poorly known, though due to the severity of the symptoms and consequent reduction in the photosynthetic area, negative effects, such as the reduction in the number and fruit size, can occur. The other group of important viruses for tomatoes is the tospovirus, that is responsible for causing the disease known as spotted wilt. Four tospovirus species are reported in tomatoes in Brazil: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) and *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV). The tospovirus consists of a negative sense RNA genome, distinct from ToCV which is of positive sense RNA. The other differential characteristic between those two viruses are the transmission mode. ToCV is limited to the phloem tissue, and the natural transmission occurs by the insect vector whitefly; while tospoviruses are able to invade parenchymatic tissue and the natural transmission of tospovirus occurs by thrips. Both are able to infect tomato plants and they can be detected in the field in isolated or in mixed infections, producing unpredictable pathological consequences. In tomato, a synergism between ToCV and the tospovirus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) was reported in a study carried out in Spain. In this interaction, a previous infection of a TSWV-resistant (carrying the *Sw-5* gene) plant with ToCV favors the infection of TSWV. There are no studies carried out on the interaction between these two viruses in Brazil, so the aim of this study was to evaluate a possible synergism between isolates of ToCV and tospovirus, analysing the breaking down of resistance given by *Sw-5* gene in tomato. The tospovirus-resistant cultivars Predator and Viradoro were selected for this study. The plants were inoculated by ToCV and after a 10-day interval they were inoculated with the tospoviruses TCSV and GRSV. In addition to the tomato cultivars, transgenic *Nicotiana benthamiana* transformed with the *Sw-5* gene were used in another independent test. Based on the results, evidence was observed that in tomatoes a pre-infection with ToCV did not result in an altered expression of the *Sw-5* gene and thus resistant plants were not infected by the tospoviruses. In *N. benthamiana*, resistant transgenic plants previously infected with ToCV and then inoculated with tospoviruses showed symptoms of hypersensitivity in the inoculated leaves (resistance characteristic). Although the

breakdown of a resistance gene resulting from the interaction of ToCV and TSWV reported in Spain is serious, under the conditions in which the assays were performed in this study, a synergism between ToCV and the tospoviruses TCSV and GRSV was neither observed in tomato cultivars (Predator and Viradoro) or in *N. benthamiana*.

Keywords: gene *Sw-5*, Synergism, TSWV

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro é uma das hortaliças mais plantadas no Brasil e em muitas regiões do mundo, assumindo assim grande importância na alimentação humana. Uma diversidade grande de pragas e doenças prejudica a cultura, dentre elas as doenças causadas por vírus assumem real importância em termos de perdas econômicas. Entre os principais grupos de vírus que infectam o tomateiro, além dos begomovírus, estão aqueles dos gêneros *Crinivirus* e *Tospovirus* (Barbosa et al., 2008; Fernandes et al., 2008).

Pertencente ao gênero *Crinivirus* (família *Closteroviridae*), as duas espécies *Tomato chlorosis virus* (ToCV) e *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) infectam o tomateiro, sendo que TICV não foi relatado no Brasil. O primeiro relato do ToCV ocorreu nos Estados Unidos por Wisler et al. (1998). Desde então relatos de surtos em tomateiro foram realizados em muitas regiões do mundo (Zhao et al., 2014). O ToCV foi detectado no Brasil no ano de 2006, infectando tomateiro em São Paulo (Barbosa et al., 2008). A presença de ToCV foi a seguir relatada em diversos estados brasileiros, assumindo ampla disseminação no país (Barbosa et al., 2011).

O ToCV é um vírus de RNA fita simples, senso positivo, bipartido e encapsidado por longas e flexuosas partículas virais. A transmissão é feita pelas espécies de mosas-branca, *B. tabaci*, *T. vaporariorum* e *T. abutineus* de maneira semi-persistente (Wintermantel et al., 2005,2006)

O gênero *Tospovirus* pertence a família *Bunyaviridae*, juntamente com outros quatro gêneros (ICTV, 2016). No Brasil são relatadas pelo menos quatro espécies infectando o tomateiro, sendo que a espécie *Groundnut ringspot virus* (GRSV) é a mais comum. Os tospovírus são um grupo de vírus importante, devido à severidade dos danos causados pela infecção. A transmissão é feita por várias espécies de tripses (*Thysanoptera: Tripidae*) de maneira circulativa e propagativa (Wijkamp et al., 1995; Nagata et al., 2004).

A incidência de ToCV tem sido motivo de preocupação em muitas regiões produtoras de tomate devido à severidade dos sintomas e a aparente interação sinérgica com tospovírus em tomateiro (García-Cano et al., 2006) Esse relato é altamente preocupante, devido a crescente incidência de ToCV e a ocorrência de infecções mistas cada vez mais comuns em condições naturais (Macêdo et al., 2014). Não existem estudos no Brasil da interação de ToCV e tospovírus. Portanto, o objetivo deste capítulo foi avaliar um provável sinergismo com efeitos de quebra de resistência de tospovírus em tomateiro quando previamente inoculado por ToCV.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados virais e preparo do inóculo de tospovírus

O isolado de tospovírus foi coletado em cultivo de tomate industrial (cultivar BRS Sena) na região de Luziânia – GO. A amostra com o isolado de tospovírus foi avaliada por Dot-Elisa quanto à presença de outros vírus que infectam o tomateiro e que também são transmitidos por inoculação mecânica, *Potato virus Y* (PVY), *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV), confirmando a ausência de infecção por esses vírus.

Para a preparação da fonte de inóculo, o isolado coletado em campo foi inoculado mecanicamente em plantas de fumo (*N. tabacum*) e *Datura stramonium* com tampão de inoculação contendo fosfato de sódio 0,01M e sulfito de sódio a 1%, pH 7,0. Cerca de 10 dias depois da inoculação, folhas infectadas por tospovírus foram maceradas em tampão fosfato e o extrato utilizado como inóculo para os ensaios.

O isolado de ToCV (GenBank acessos: JQ952600) selecionado para este estudo foi obtido em 2010 em plantas de tomate em Sumaré, São Paulo, cedido pelo Dr. Júlio Cesar Barbosa/Dr. Jorge Alberto Marques Rezende (USP – Esalq) e mantido desde então em tomateiro na Embrapa Hortaliças.

2.2 Identificação da espécie de tospovírus através de sequenciamento direto de produto de PCR.

A identificação da espécie de tospovírus utilizada neste trabalho foi através do sequenciamento direto de produto de PCR amplificado com o par de oligonucleotídeos específico para o segmento S das espécies TSWV, TCSV e GRSV, desenhados pelo Dr. Leonardo Albuquerque, TSWV-SegSF (TTTCYTCRACAAGCCTGACC) e TSWV-SegR (TGCTAGTGGTGCTGTTACTGT), TCSV-SegF (AGCTGTCCACAGAAGCAATCA) e TCSV-SegR (AGTTCGCTGTTCTTYGATTCC), GRSV-SegF (GACCAAAACCAGG

TCGCATTC) e GRSV-SegR (AAGCACTGTGCAAACCTTCC). Dois fragmentos utilizando os primers para TCSV e GRSV do tamanho de 557 e 516 pares de bases respectivamente foram amplificados e ambos enviados para sequenciamento. Os fragmentos gerados foram corridos em gel de agarose a 1% e logo em seguida recuperados e purificado com kit de extração de gel PureLink DNA extraction kit (Invitrogen) e enviado para MacroGen Inc (Seoul Coréia do Sul) para o sequenciamento com os oligonucleotídeos utilizados na amplificação. As sequências nucleotídicas dos fragmentos virais foram comparadas com outras disponíveis no banco de dados público (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o algoritmo Blastn.

2.3 Detecção viral de tospovírus por sorologia (Dot-Elisa)

A detecção dos isolados de tospovirus tanto em tomateiro, quanto em *N. bethamiana* foi realizada pelo método sorológico Dot-Elisa. As amostras foliares maceradas em tampão 1/2PBS, e aplicadas 3µL do extrato sobre a membrana de nitrocelulose Millipore (0,45µ). Após a secagem da membrana, a mesma foi imediatamente processada, sendo imersa por 2 horas, sob agitação lenta em 20 mL de solução bloqueadora (PBS, pH 7,4 acrescido de 2% de leite em pó desnatado).

Terminado o tempo de bloqueamento da membrana, foi adicionado anti-soro policlonal para detectar a espécie GRSV, diluído 1:1000 na mesma solução de bloqueamento, incubando-se durante a noite. A membrana foi lavada três vezes em ½ PBS sob agitação rápida e em seguida adicionado anti-IgG comercial (anti-rabbit IgG, Sigma), diluído 1:30000 em 1/2PBS e incubado por cerca de 2 horas. Novamente foi realizada a lavagem das membranas com 1/2PBS. A detecção do complexo antígeno-anticorpo foi realizada por colorimetria com a utilização de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e NBT (nitroblue tetrazolium). Após o término da revelação às membranas foram lavadas em água destilada.

2.4 Inoculações artificiais dos isolados de ToCV e tospovírus em tomateiro

Três cultivares de tomateiro foram utilizadas, são elas Predador, Viradoro e Dominador. Duas cultivares são híbridos (Predador e Dominador) e uma cultivar de polinização aberta (Viradoro). As cultivares Predador e Viradoro possuem o gene *Sw-5* que confere resistência a tospovírus, por isso, selecionada para os ensaios. A cultivar Dominador não é resistente à infecção por tospovírus, sendo utilizada como controle suscetível. Todas as cultivares avaliadas neste ensaio são suscetíveis ao ToCV. Os ensaios foram conduzidos em condições experimentais na Embrapa Hortaliças durante os meses de junho e julho de 2015.

O experimento foi conduzido com 2 ensaios independentes. No primeiro ensaio, foram utilizadas 5 repetições para cada tratamento e o intervalo entre as inoculações foi de 5 dias. O segundo ensaio foi conduzido com um total de 10 repetições para cada tratamento e o intervalo entre a primeira inoculação (tempo 1) e a segunda inoculação (tempo 2) foi de 10 dias. Moscas-brancas avirulíferas e tampão de inoculação (sem inóculo de tospovírus) foram utilizados como controle nos ensaios. Os ensaios foram compostos por quatro tratamentos para cada cultivar de tomateiro avaliada (Tabela 7).

Tabela 7: Combinações dos tratamentos com as inoculações com *Tomato chlorosis virus* e tospovírus (GRSV+TCSV) em infecção simples e mista nas três cultivares de tomateiro avaliadas (Predador, Viradoro e Dominador).

Tratamentos	Tempo 1	Intervalo (dias)*	Tempo 2
1	ToCV	5	Tospovírus
2	ToCV	5	Controle ^b
3	Controle ^a	5	Tospovírus
4	Controle ^a	5	Controle ^b

^aMoscas-brancas avirulíferas, ^bTampão de inoculação (sem inóculo de tospovírus)

*O 2º ensaio foi conduzido com um intervalo de 10 dias entre as inoculações (tempo 1 e 2).

2.5 Método de inoculação dos isolados de ToCV e tospovírus

As inoculações com ToCV foram realizadas de forma individual, em copos plásticos, com cerca de 20 moscas-brancas (*B. tabaci* biótipo B) virulíferas por planta por um período de inoculação de 48 horas. Para a aquisição do ToCV, moscas-brancas foram confinadas dentro de tubos de 50mL contendo um folíolo de tomateiro infectado por ToCV com o pecíolo imerso em uma solução ágar-água 0,7% por um período de acesso de aquisição viral de 48 horas. Ao final as moscas-brancas foram eliminadas inicialmente de forma mecânica, e em seguida aplicado o inseticida Actara. As plantas foram mantidas em telado à prova de insetos e o local constantemente monitorado utilizando armadilhas adesivas amarelas quanto à presença de moscas-brancas.

Para a realização das inoculações dos tospovírus, o inóculo utilizado foi diluído 1:10 em tampão fosfato. No momento da inoculação, as plantas de tomate apresentavam três a cinco folhas verdadeiras. As folhas foram polvilhadas com carborundum e com o auxílio de gaze, o inóculo de tospovirus macerado em tampão fosfato foi friccionado em todas as folhas de cada planta. A inoculação mecânica foi realizada duas vezes, com um intervalo de 24 horas entre elas.

2.6 Uso de *N. benthamiana* transgênica (transformada com o gene *Sw-5*) para avaliar um provável sinergismo entre ToCV e tospovírus envolvido na quebra de resistência a tospovirus.

Além do tomateiro, a análise de um aparente sinergismo entre ToCV e tospovírus também foi analisada em *N. benthamiana* transgênica, expressando o gene *Sw-5*. (Lau et al. 2006). *N. benthamiana* sem o gene *Sw-5* (não transgênica) foram utilizadas como controle positivo nos ensaios. As sementes de *N. benthamiana* transgênicas utilizadas nos ensaios foram gentilmente cedidas pelo Dr. Richard Kormelink, Universidade de Wageningen, Holanda.

As combinações dos tratamentos utilizados nesse ensaio para *N. benthamiana* transgênica e não transgênica foram os mesmos descritos no tópico anterior para o tomateiro com um intervalo entre as inoculações de 10 dias (Tabela.7). O ensaio utilizando *N. benthamiana* também foram compostos por quatro tratamentos com 10 repetições.

As inoculações artificiais também seguiram o mesmo método dos ensaios realizados com tomateiro descrito no tópico anterior. Após as inoculações, as plantas foram mantidas em casa de vegetação na Embrapa Hortaliças com Certificado de Qualidade em Biossegurança.

2.7 Detecção de ToCV por RT-PCR

O RNA total extraído das plantas testes foi submetido à síntese de cDNA utilizando o primers TOC6 (Dovas et al., 2002) em uma reação com um volume total de 10 µL composta por 4,5 µL de água Milli-Q (DEPC) autoclavada, 0,5 uL do oligonucleotídeo reverso (TOC6, 10mM) e 0,5 µL de dNTP (10 mM) e 1 uL do RNA total. A reação foi aquecida a 65°C por 5 minutos e logo após colocada no gelo. Em seguida foi adicionado 0,5 µL de DTT, 2,5 µL de tampão 5x, 0,5 µL de RNaseOUT (40 U/µL, Invitrogen). e 0,5 µL da transcriptase reversa M-MMLV (200 U/µL, Invitrogen). O cDNA foi sintetizado a 37°C por 50 minutos e a inativação da transcriptase reversa foi feita por 70°C durante 10 minutos.

Para as reações de PCR foi utilizado os pares de primers TOC5 (Dovas et al., 2002) e TOC6. O cDNA obtido foi utilizado na reação de PCR com um volume final de 10 µL contendo 6,5 µL de água Milli-Q autoclavada, 1 µL de tampão da *Taq* DNA polimerase 10x, 0,8 µL de MgCL₂ 50 mM, 0,4 µL de dNTP 2,5 mM, 0,1 µl dos oligonucleotídeos TOC5 e TOC6 (10 mM) cada e 0,1 µL de *Taq* DNA polimerase (500 U/µL). As reações de PCR foram realizadas em termociclador, aquecidas a 94°C por 5 minutos, passando a seguir por 30 ciclos, sendo cada um composto de desnaturação das fitas a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto. Concluído os 30 ciclos a temperatura permaneceu a 72° por 10 minutos para extensão final.

3 RESULTADOS

3.1 Identificação das espécies de tospovírus

Tomateiro (cultivar Sena) exibindo sintomas característicos de tospovírus foi coletado em Luziânia-GO e levado para o laboratório de Virologia Vegetal da Embrapa Hortaliças para identificação da espécie viral. Foram utilizados oligonucleotídeos específicos para amplificação completa do segmento S das espécies TCSV, GRSV e TSWV. Dois fragmentos foram amplificados correspondentes às espécies TCSV e GRSV (Figura 8). Os fragmentos amplificados foram recuperados e enviados para sequenciamento. Com base nas análises das sequencias utilizando a ferramenta Blastn (NCBI) pode-se confirmar que a planta com o inóculo de tospovírus utilizado encontrava-se em infecção mista. Os fragmentos amplificados apresentaram 99% de identidade a partir do fragmento amplificado para TCSV (acesso: HQ644140) e 98% de identidade para o fragmento amplificado de GRSV (acesso: JX244197), quando comparada com sequencias disponíveis em banco de dados.

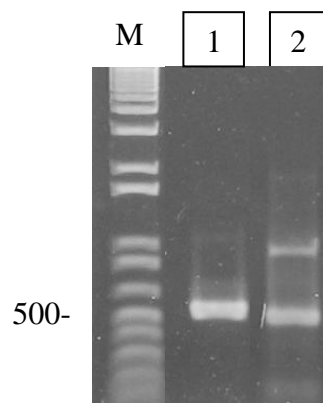


Figura 8: Gel de eletroforese dos produtos de PCR amplificados com os primers específicos para as espécies de tospovírus GRSV (2) e TCSV (1). M: marcador 1-kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

3.2 Análise de um provável sinergismo entre ToCV e tospovírus em tomateiro resistente.

Para condução dos ensaios foram selecionadas duas cultivares de tomateiro resistente a tospovírus: Predador, Viradoro; e a cultivar Dominador, um híbrido suscetível a tospovírus, utilizada como controle dos experimentos. Todas as cultivares utilizadas neste ensaio são suscetíveis ao ToCV.

A cultivar Dominador, quando co-inoculada com tospovírus (TCSV+GRSV) (tratamento 3), apresentou uma taxa de infecção 66,6% do total de plantas inoculadas (10 de 15 plantas avaliadas). A mesma cultivar submetida à inoculação mista com ToCV e os tospovirus (tratamento 1) apresentou 53,3% (8 de 15) das plantas infectadas (Tabela 8). Os sintomas de infecção de tospovírus começaram a surgir a partir de 8 dias depois da inoculação em ambos os tratamentos, sendo visualizados por anéis necróticos, necrose do ápice da planta, epinastia foliar e redução do desenvolvimento da planta (Figura 9 A). Através das avaliações de sintomas, pode-se observar que não houve diferenças na severidade dos sintomas, comparando as plantas da cultivar Dominador (suscetível) quando inoculadas com tospovírus sozinho (tratamento 1) e quando inoculada com ToCV e 10 dias depois feita a inoculação com tospovírus o tratamento 3 na cultivar Dominador.

As cultivares resistentes a tospovírus (Predador e Viradoro) e a cultivar suscetível (Dominador) inoculadas com ToCV+ tospovírus (tratamento 1) exibiram 100% de infecção com ToCV. Plantas inoculadas em infecção simples com ToCV apresentaram sintomas a partir de 30 dias depois de inoculado (Figura 9 B). O desenvolvimento das plantas infectadas apenas por ToCV não foi reduzido quando comparada com as plantas controle não inoculadas o vírus.

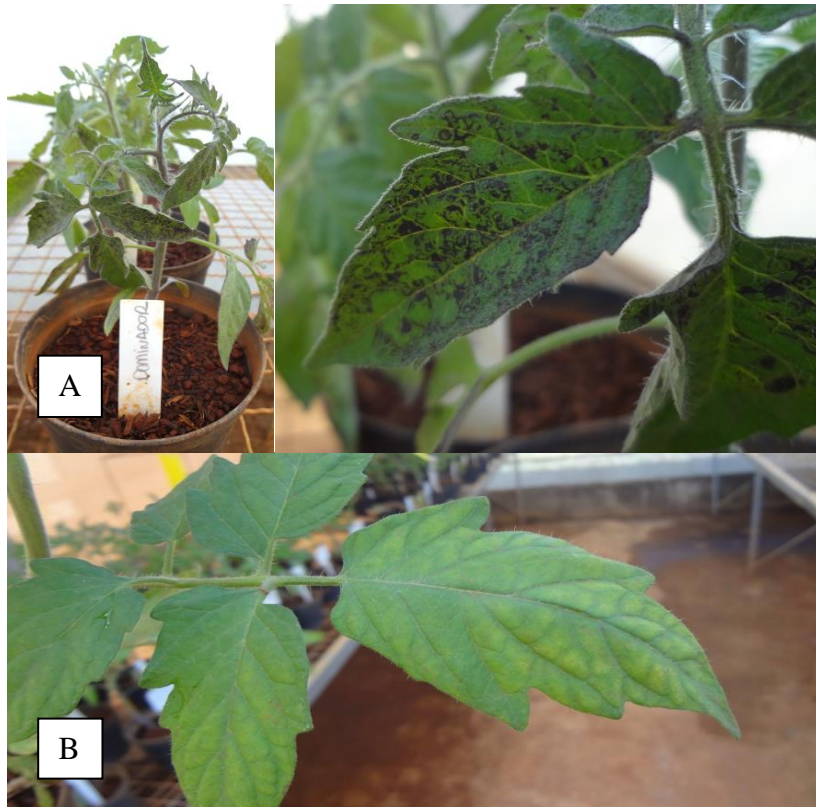


Figura 9: A) Sintomas de necrose, epinastia foliar, anéis necróticos em tomateiro suscetível (cultivar Dominador) causados pela infecção de tospovírus. B) Clorose internerval nas folhas baixeras causados por ToCV na cultivar Predador.

As cultivares resistentes constituídas pelo gene *Sw-5* quando inoculadas com tospovírus isoladamente, nenhuma planta

Devido à característica de resistência a tospovírus conferida pelo gene *Sw-5* as cultivares Predador e Viradoro não apresentaram nenhuma planta infectada quando inoculada com tospovírus isoladamente. Entretanto quando inoculado o isolado de ToCV e 10 dias depois realizada a inoculação de tospovírus, apenas uma planta de Predador dentre 15 avaliadas foi infectada, sendo que as demais repetições não apresentaram sintomas de tospovírus e foram negativas pelo teste Dot-Elisa.

Tabela 8: Infecção de tospovírus e sintomas desenvolvidos pelas plantas-teste, cultivares resistentes (Predador, Viradoro) e Dominador (suscetível).

Cultivar	N° de plantas infectadas/ N° de plantas avaliadas					
	tospovírus		ToCV + tospovírus		Controles	
	Dot-Elisa	Sintomas	Dot-Elisa	Sintomas	Dot-Elisa	Sintomas
Predador	0/15	0/15	1/15	1/15	0/15	0/15
Viradoro	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Dominador	10/15	10/15	8/15	8/15	0/15	0/15

3.3 Inoculação de ToCV e tospovírus em *N. benthamiana* transgênica e não transgênica

Com base nos resultados obtidos em tomateiro relacionados à ausência de quebra de resistência a tospovírus, quando previamente infectados por ToCV, outro modelo biológico foi utilizado com *Nicotiana benthamiana* transgênica, resistente a tospovírus (com o gene *Sw-5*). Plantas de *N. benthamiana* não transgênicas, por isso suscetíveis a tospovírus foram utilizadas no ensaio para fins de comparação e controle. Os isolados do tospovírus e ToCV foram inoculados mecanicamente e por moscas-brancas, respectivamente.

Plantas de *N. benthamiana* transgênicas expressando o gene de resistência *Sw-5* a tospovírus previamente infectadas por ToCV e após 10 dias inoculadas com tospovírus (Tratamento 1) não foram sistemicamente infectadas por tospovírus, apresentando sintomas de lesão local nas folhas inoculadas (característica de resistência) após cerca de 48 horas depois da inoculação e seguida de abscisão foliar (Figura 10A).

Plantas de *N. benthamiana* não transgênicas exibiram 100% de infecção quando inoculadas apenas com os tospovírus e 95% de infecção (19 de 20 plantas avaliadas) quando inoculadas com ToCV e depois em intervalos de 10 dias inoculadas com os tospovírus (Tabela 9). O aparecimento dos sintomas de tospovírus começou a partir de 8 dias depois da inoculação, caracterizados por necrose do ápice das plantas, epinastia e redução do seu desenvolvimento (Figura 10 B).

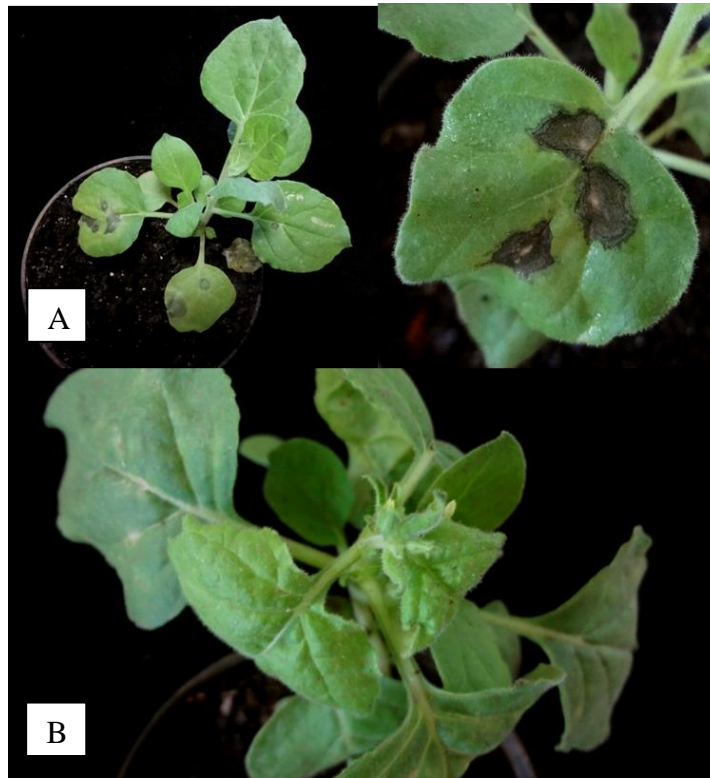


Figura 10: A) sintomas de lesão local em *N. benthamiana* transgênica expressando o gene Sw-5. B) Sintomas de necrose, clareamento de nervura e epinastia causada por tospovírus em *N. benthamiana* não transgênica.

Tabela 9: Resultados das inoculações de tospovírus e ToCV (infecção mista e simples) em *Nicotiana benthamiana* transgênicas e não transgênicas.

<i>N. benthamiana</i>	N° de plantas infectadas/ N° de plantas avaliadas					
	tospovírus		ToCV + tospovírus		Controles	
	Dot-Elisa	Sintomas	Dot-Elisa	Sintomas	Dot-Elisa	Sintomas
Transgênica	0/10	10/10 ^a	0/18	18/18 ^a	0/20	0/20
Não transgênica	10/10	10/10 ^b	19/20	19/20 ^b	0/20	0/20

^a Sintomas caracterizados por lesões locais; ^b Sintomas de infecção sistêmica.

4 DISCUSSÃO

O uso de plantas resistentes é uma das medidas mais eficazes para o controle de viroses, tornando-se o objetivo de diversas instituições de pesquisa (Boiteux & Giordano, 1993; Dianese et al., 2011). Os tospovírus causam perdas significativas em hortaliças, especialmente em cultivos de tomate. O gene *Sw-5* identificado na espécie *S. peruvianum* demonstrou ser de amplo espectro, conferindo resistência a todos as espécies de tospovírus que infectam o tomateiro (Stevens et al., 1992). Perdas econômicas têm sido minimizadas significativamente através da utilização desse gene para conferir resistência a esse grupo de vírus (Boiteux & Giordano, 1993). A estabilidade do gene *Sw-5* pode ser comprometida principalmente por fatores como o surgimento de isolados mutantes e sinergismo viral (Aramburu et al., 2010; García-Cano et al., 2006).

Neste trabalho foi analisado um provável sinergismo entre um isolado de ToCV e os tospovírus (GRSV+TCSV) que poderia resultar na quebra de resistência a tospovírus em tomateiro. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que sob as condições em que os ensaios foram realizados, não houve interação sinérgica entre o isolado de ToCV e tospovírus que resultasse na quebra de resistência das duas cultivares de tomate (Predador e Viradoro) que apresentam o gene *Sw-5*. Estes resultados não corroboram com aqueles obtidos por García-Cano et al. (2006). Os autores reportaram na Espanha a interação sinérgica entre ToCV e a espécie de tospovírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). O sinergismo foi observado através do aumento da severidade dos sintomas de tospovírus na cultivar suscetível utilizada (Moneymaker) co-inoculada com os dois vírus. Contudo, o resultado de maior importância relatado pelos autores foi o efeito desse sinergismo relacionado a quebra de resistência conferida pelo gene *Sw-5* em cultivares de tomateiro.

A ausência de sinergismo entre os isolados de ToCV e tospovírus brasileiros pode estar ligado a condições ambientais e/ou experimentais diferentes, comparadas com o estudo

desenvolvido na Espanha, por exemplo, isolados/espécies virais diferentes, e cultivares de tomate utilizadas. Para fins de controle e comparação, a cultivar Dominador (suscetível a tospovírus) quando inoculada isoladamente com os tospovírus, apresentou taxa de infecção um pouco maior comparada a combinação dos vírus ToCV e tospovírus. Aparentemente apesar da pouca variação da taxa de infecção, a presença de ToCV previamente inoculado na cultivar suscetível resultou em um possível antagonismo a infecção pelos tospovírus, resultado contrário ao relatado na literatura. Mesmo na cultivar Dominador que não apresenta nenhum gene de resistência a tospovírus (portanto suscetível), apenas cerca de 50% das plantas foram infectadas pelos tospovírus em cada um dos ensaios independentes. Possivelmente os escapes a infecção de tospovírus na cultivar Dominador ocorreram devido a presença de *Defective interfering* (DI) RNA. Os DIs originam-se em consequência a passagens seriadas do vírus por inoculação mecânica, estão envolvidos na interferência com a replicação do vírus e atenuação de sintomas em plantas infectadas (Inoue-Nagata et al., 1997). Para o inóculo utilizado nos ensaios, a planta de tomateiro infectada com tospovírus coletada em campo foi multiplicado apenas uma vez em plantas de *Nicotiana tabacum* e *Datura stramonium* de modo a reduzir a ocorrência de DIs presentes no inóculo. Outro fator que pode ter influenciado para esse resultado é a idade das plantas durante as inoculações de tospovírus.

A escolha dos tratamentos com as respectivas combinações das inoculações com os isolados virais foi baseado no trabalho desenvolvido por García-Cano et al. (2006). Foram utilizados 4 tratamentos dos 8 utilizados pelos autores (Tabela 7). Não foram realizadas inoculações simultâneas devido a ausência da quebra de resistência relatada pelos autores. O intervalo entre as inoculações no primeiro ensaio foi de 5 dias, devido a possibilidade das plantas estarem mais velhas, portanto menos suscetíveis no momento da inoculação dos tospovírus. Entretanto, com base no artigo citado anteriormente, os autores descrevem a necessidade de um período mínimo de 10 dias para haver quebra de resistência. Portanto o

segundo ensaio foi melhor planejado para que as inoculações fossem realizadas com esse período de tempo para inocular tospovírus depois de inoculado ToCV.

Para a condução dos ensaios, as cultivares de tomateiro selecionadas para este estudo apresentam as seguintes características: a cultivar Predador, um híbrido de crescimento indeterminado tolerante a begomovírus e apresentando o gene *Sw-5* e resistente aos tospovírus, TSWV, TCSV, GRSV e CNSV. Esta cultivar tem se destacado nas propriedades de tomateiro do estado de Goiás devido as condições ambientais favoráveis e alta produtividade nessa região. A cultivar Viradoro com hábito de crescimento indeterminado, resistente aos tospovírus foi derivada a partir de cruzamentos realizados entre as cultivares IPA-5 (resistente a altas temperaturas, aos fungos verticillium, fusarium, stemphylium e ao nematoide meloidogyne) e TWS-10 contendo o gene *Sw-5* responsável por conferir resistência a tospovírus e também o gene de resistência *Sm* (resistência a stemphylium) e o gene *Ve* que confere resistência a verticillium (Giordano et al., 2000). A cultivar Dominador, um híbrido de crescimento indeterminado, suscetível a tospovírus, foi utilizada como controle suscetível nos experimentos.

Embora os resultados obtidos neste trabalho demonstrarem evidências da ausência de sinergismo entre ToCV e os tospovírus (GRSV+TCSV), infecções esporádicas de tospovírus em tomateiro carregando o gene *Sw-5* são comuns. Originalmente a resistência mediada pelo gene *Sw-5* foi considerada com penetrância incompleta (Stevens et al., 1992). Essa informação pode explicar a ocorrência dessas infecções esporádicas devido à redução da expressão do gene *Sw-5* em algumas condições. Por outro lado, isolados mutantes de TSWV, capazes de superar a resistência conferida pelo gene *Sw-5*, foram relatados em países como a Itália (Ciuffo et al., 2005) e Espanha (Aramburu et al., 2010). A capacidade de isolados de tospovírus infectarem tomateiro resistente está ligada a alterações no genoma viral. Esse fato

é de grande preocupação para programas de melhoramento, havendo cada vez mais a necessidade de busca de novas fontes de resistência (Dianese et al., 2011).

Devido à ausência de sinergismo dos isolados virais de ToCV e os tospovírus, outro modelo biológico com plantas de *N. benthamianas* transgênicas, transformadas com o gene *Sw-5* foram utilizadas para confirmação dos resultados anteriores obtidos em tomate. Essas plantas expressam o gene *Sw-5* e a infecção com tospovírus é restringida apenas nas folhas inoculadas, resultando em hipersensibilidade e sintomas de lesão local (Lau et al., 2006). Resultado semelhante obtido nos ensaios com tomateiro foi obtido com *N. benthamiana*. Sob as condições que o ensaio foi conduzido, a pré-infecção por ToCV não resultou em alterações na resistência à infecção por TCSV e GRSV. Plantas transgênicas inoculadas com os tospovírus após 10 dias de inoculado ToCV, apresentaram sintomas de lesão local, característica de resistência. Benthamianas não transgênicas inoculadas com os tospovírus isoladamente ou em infecção mista com ToCV e tospovírus não apresentaram plantas-escape, sendo 100% das plantas infectadas. Esse fato pode ter ocorrido devido a suscetibilidade desta planta ser mais elavada do que a de tomateiro.

O isolado de tospovírus foi avaliado para a preença dos principais vírus que infectam o tomateiro e que podem também ser transmitidos via inoculação mecânica (CMV, PepYMV e PVY). Nenhuma dessas espécies de vírus foram detectadas. Esse teste foi realizado devido à importância da utilização de um inóculo com o vírus específico, não podendo haver a possibilidade de influência por outros vírus. Entretanto, devido às dificuldades encontradas para obter um isolado específico de TSWV em campo, o isolado de tospovírus selecionado para ser utilizado neste estudo, foi identificado com infecção mista com as espécies GRSV e TCSV. Não foi possível saber se esse fato pode ter influenciado nos resultados obtidos no trabalho. Entretanto, para complementar esses resultados, novos ensaios podem ser conduzidos com um isolado de TSWV.

Detecção de infecções mistas em campo em muitos casos pode ser considerada a regra e não a exceção, gerando na maioria das vezes consequências imprevisíveis para determinados patossistemas. O relato da quebra de resistência a tospovírus em tomateiro ocasionada pelo sinergismo entre ToCV e TSWV é altamente preocupante por ser mais um dos fatores que podem afetar a estabilidade do gene *Sw-5*. Entretanto, esse fato não ocorreu nas condições em que foram conduzidos os ensaios. Apesar dos resultados obtidos neste trabalho, estudos adicionais podem ser realizados para melhor compreender essa interação entre ToCV e TSWV relatada na Espanha, porém em condições brasileiras.

5 CONCLUSÃO

Nas condições em que foram realizados os ensaios, a prévia inoculação do isolado de ToCV não alterou a condição de resistência das cultivares de tomateiro Viradoro e Predador para a infecção por tospovírus (TCSV+GRSV). Resultados semelhantes também foram obtidos em plantas de *N. benthamina* transgênicas transformadas com o gene Sw-5.

Literatura Citada

- ARAMBURU, J., GALIPIENSO, L., SOLER, S., LÓPEZ, C. 2010. Characterization of *Tomato spotted wilt virus* isolates that overcome the *Sw-5* resistance gene in tomato and fitness assays. *Phytopathology*. 49:342-351.
- BARBOSA, J.C., COSTA, H., GIORIA, R., & REZENDE, J.A.M. 2011b. Occurrence of *Tomato chlorosis virus* in tomato crops in five Brazilian states. *Tropical Plant Pathology*. 36(4): 256-258.
- BARBOSA, J.C., TEIXEIRA, A.P.M., MOREIRA, A.G. CAMARGO, L.E.A., FILHO, A.B., KITAJIMA, E.W. REZENDE, J.A.M. 2008. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Brazil. *Plant Disease*. 92(2):1709.
- BOITEUX, L.S & GIORDANO L.B. 1993. Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Euphytica*. 71: 151-154.
- CIUFFO, M., FINETTI-SIALER, M.M., GALLITELLI, D., TURINA, M. 2005. First report in Italy of a resistance-breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* infecting tomato cultivars carrying the *Sw5* resistance gene. *Plant Pathology*. 54: 564.
- DIANESE, E.C., FONSECA, M.E.N., INOUE-NAGATA, A.K., RESENDE, R.O., BOITEUX, L.S. 2011. Search in *Solanum* (section *Lycopersicon*) germplasm for sources of broad-spectrum resistance to four tospovirus species. *Euphytica*. 180:307-319.
- FERNANDES, F.R., ALBUQUERQUE, L.C., GIORDANO, L.B., BOITEUX, L.S., DE ÁVILA, A.C., INOUE-NAGATA, A.K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes*. 36: 251-258.
- GARCÍA-CANO, E., RESENDE, R.O., FERNANDEZ, MUÑOS, R., MORIONES, E. 2006. Synergistic interaction between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* results in breakdown of Resistance in tomato. *Phytopathology*. 96: 1263-1269.
- GIORDANO, L.B., ÁVILA, A.C., CHARCHAR, J.M., BOITEUX, L.S. 2000. Viradoro: a tospovirus-resistant processing tomato cultivar adapted to tropical environments. *HortScience*. 35(7):1368-1370.
- ICTV. 2016. *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) [Online]. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Consultado em 18/01/2016.
- ICTV. 2016. *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) [Online]. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Consultado em 18/01/2016.
- INOUE-NAGATA, A.K., KORMELINK R., NAGATA, T., KITAJIMA, E.W., GOLBACH, R. PETERS D. 1997. Effects of temperature and host on the generation of *Tomato spotted wilt virus* defective interfering RNAs. *Phytopathology*. 87: 1168-1173.
- LAU, D., OLIVEIRA, J.C.F., YAMAZAKI LAU, E., BROMMONSCHENKEL, S.H. 2006. Hipersensibilidade e necrose sistêmica em *Nicotiana benthamiana* transformada com o gene de resistência *Sw-5* de tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*. 31:247-253.
- MACEDO, M.A., BARRETO, S.S., HALWASS, M., INOUE-NAGATA A.K. 2014. High incidence of *Tomato chlorosis virus* alone and in mixed infection with begomoviruses in two tomato fields in the Federal district and Goiás state, Brazil. *Tropical Plant Pathology*. 39(6): 449-452.

- STEVENS, M.R. SCOTT, S.J. & GERGIRICH, R.C. 1992. Inheritance of a gene for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum*. *Euphytica*. 59: 9-17.
- WIJKAMP, I., ALMARZA, N., PETERS, D. 1995. Median latent period and transmission of tospoviruses vectored by thrips. *Thrips Biology and Management*. 276: 153-156.
- WINTERMANTEL, W.M. & WISLER, G.C. 2006. Vector specificity, host range and genetic diversity of Tomato chlorosis virus. *Plant Disease*. 90:814-819.
- WINTERMANTEL, W.M., WISLER, G.C., ANCHIETA, A.G. LIU, H-Y., KARASEV, A.V., TZANETAKIS, I.E. 2005. The complete nucleotide sequence and genome organization of *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology*. 150:2287-2298.
- WISLER, G.C., LI, R.H., LIU, H-Y. LOWRY, D.S. 1998. *Tomato chlorosis virus*: a new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology*. 88: 402-409.
- ZHAO, L-M. LI, G., GAO, Y., LIU, Y-J. SUN, G-Z., ZHU, X-P. 2014. Molecular detection and complete genome sequences of *Tomato chlorosis virus* isolates from infectious outbreaks in China. *Journal of Phytopathology*. 162:627-634.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ToCV é considerado um dos mais importantes vírus para a cultura do tomateiro em todo o mundo. Esse vírus é relativamente pouco estudado, havendo principalmente carência de dados voltados para o seu comportamento biológico e interação com outros vírus. Especialmente no Brasil, são poucos os estudos visando compreender quais espécies de plantas podem servir de hospedeiras desse vírus e nenhum estudo envolvendo interação com outros vírus desenvolvido no país.

No Brasil, a partir do relato de sua ocorrência, o ToCV é detectado nas principais regiões de cultivo de tomate do país. Devido ao modo de transmissão, por moscas-brancas *B. tabaci* e *T. vaporariorum*, esse vírus está se tornando muito importante e significativo com altas incidências em lavouras de tomate.

A gama de hospedeira de ToCV é considerada ampla, sendo que com base nos resultados desse trabalho três espécies de plantas podem ser incluídas como suscetíveis ao ToCV, são elas: *Amaranthus hybridus* (caruru-roxo), *Physalis pubescens* e a espécie de planta ornamental *Chrysanthemum coronarium*. A espécie *A. hybridus* popularmente conhecida como caruru-roxo, merece atenção especial visando sua eliminação de cultivos de tomate, por se tratar de uma planta comumente encontrada em lavouras de tomate, considera boa hospedeira de moscas-branca, altamente competitiva com culturas agrônômicas e por possivelmente estar atuando na manutenção do ToCV em campo. A suscetibilidade da espécie de planta ornamental *C. coronarium* é um relato importante. O modo que essa planta é cultivada, em estufas, proporciona condições favoráveis à multiplicação do vetor *T. vaporariorum*. Portanto, com a presença do vetor e do vírus, essa combinação pode se tornar um grave problema para a cultura.

Plantas daninhas afetam a cultura do tomate de forma direta e indireta. Diretamente essas plantas podem competir por espaço, nutrientes e luz e indiretamente são importantes meios de manutenção e dispersão de vírus em campo. A eliminação das principais daninhas suscetíveis como, maria-pretinha (*Solanum. americanum*), caruru-roxo (*Amaranthus hybridus*) joá de capote (*Nicandra physaloides*), caruru-roxo (*Amaranthus hybridus*) e Fisalis (*Physalis angulata*) pode auxiliar no manejo de crinivírus em tomateiro.

Interações entre vírus de plantas muitas vezes geram consequências patológicas inesperadas. O relato do sinergismo entre ToCV e a espécie de tospovírus TSWV, que resulta na superação da resistência a tospovírus em tomateiro, é preocupante devido ao crescente uso de materiais com resistência a tospovírus e a alta incidência do ToCV em diversas regiões onde o tomate é cultivado. Ensaios para avaliar um provável sinergismo entre ToCV e tospovírus foram conduzidos neste trabalho. Com base nos resultados obtidos, não houve quebra de resistência das cultivares constituídas pelo gene *Sw-5* (Predador e Viradoro) quando previamente inoculadas com ToCV e posteriormente inoculadas com tospovírus, demonstrando que não houve interação sinérgica entre os isolados virais avaliados que resulta-se na alteração da expressão desse gene nas plantas resistentes. Entretanto, apesar dos resultados não corroborarem com a já relatada superação de resistência a tospovírus em tomateiro, novos ensaios devem ser conduzidos utilizando um isolado específico da espécie TSWV.