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

**Cinética da invasão sistêmica e períodos de latência e de
incubação do *Tomato severe rugose virus* e *Tomato chlorosis
virus*, em infecções simples e mista em tomateiro**

Gabriel Madoglio Favara

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

**Piracicaba
2017**

Gabriel Madoglio Favara
Engenheiro Agrônomo

**Cinética da invasão sistêmica e períodos de latência e de incubação do
Tomato severe rugose virus e *Tomato chlorosis virus*, em infecções simples e
mista em tomateiro**

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

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

Piracicaba
2017

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

Favara, Gabriel Madoglio

Cinética da invasão sistêmica e períodos de latência e de incubação do *Tomato severe rugose virus* e *Tomato chlorosis virus*, em infecções simples e mista em tomateiro / Gabriel Madoglio Favara. - - Piracicaba, 2017.

60p.

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

1. Begomovírus 2. Crinivírus 3. *Solanum lycopersicum* 4. *Bemisia tabaci* MEAM1 I. Título

DEDICATÓRIA

OFEREÇO

À minha mãe Isabel e minha namorada Cintia,
por estarem sempre ao meu lado.

DEDICO

Ao meu pai Savério Favara Neto (*in memoriam*)

“É uma brasa, mora?”

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP e ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

Ao Prof.^o Dr.^o Jorge Alberto Marques Rezende, pela orientação desta dissertação, pela confiança ao me aceitar em sua equipe de trabalho, pelos ensinamentos e pela grande contribuição para minha formação como pesquisador.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Fitopatologia da ESALQ/USP pelos conhecimentos transmitidos.

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia – ESALQ/USP pelo apoio nos momentos necessários.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos no início deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos para o curso de Mestrado.

À Dr.^a Alice Kazuko Inoue-Nagata, pesquisadora da Embrapa Hortaliças, por ter fornecido gentilmente um dos isolados virais utilizados no trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal, Arnaldo E. Fariña, Daiana Bampi, David A. M. Spadotti, Heron D. Kraide, Luiz Rafael Pinto, Talita N. Z. Silva, Tatiana Mituti, Vanessa C. S. Ramos e Viviana M. C. Garcia. Agradeço pelo apoio nos momentos difíceis, pela prazerosa convivência e por todos os ensinamentos que me passaram.

Aos meus amigos Felipe F. de Oliveira, Vanessa Takeshita, Jacson Ferreira, Taciana M. A. Kuhn e Karen M. A. Komada. Agradeço por tudo que me ensinaram, pela ajuda sempre que necessária e pelos bons momentos compartilhados.

Finalmente, agradeço a toda a minha família, pelo incentivo, confiança e por todo apoio que me permitiram chegar até aqui. Em especial, agradeço ao meu pai Savério Favara Neto (*in memoriam*), a minha mãe Isabel Donizete Madoglio Favara e minha namorada Cintia Maria Crespam, pelo amor, carinho e compreensão.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. A CULTURA DO TOMATEIRO.....	11
2.2. <i>TOMATO SEVERE RUGOSE VIRUS</i>	12
2.3. <i>TOMATO CHLOROSIS VIRUS</i>	15
2.4. EPIDEMIOLOGIA E MANEJO DO ToSRV E DO ToCV EM TOMATEIRO.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. MATERIAL VEGETAL	21
3.2. ISOLADOS VIRAIS	21
3.3. COLÔNIA DE <i>BEMISIA TABACI</i> MEAM1.....	22
3.4. TRANSMISSÃO DOS VÍRUS POR <i>BEMISIA TABACI</i> MEAM1	22
3.5. DETECÇÃO DO ToSRV POR RCA-PCR	23
3.6. DETECÇÃO DO ToCV POR RT-PCR	24
3.7. DETECÇÃO DO ToSRV POR qPCR E DO ToCV POR RT-qPCR	25
3.8. SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS.....	25
3.9. CINÉTICA DA INVASÃO SISTÊMICA DO ToSRV E DO ToCV EM INFECÇÕES SIMPLES E MISTA EM TOMATEIRO	26
3.10. IDENTIFICAÇÃO DOS PERÍODOS DE LATÊNCIA E DE INCUBAÇÃO DO ToSRV E DO ToCV EM INFECÇÕES SIMPLES E MISTA EM TOMATEIRO	27
3.11. IDENTIFICAÇÃO DOS PERÍODOS DE INCUBAÇÃO DO ToSRV E DO ToCV EM INFECÇÕES SIMPLES E MISTA EM TOMATEIRO, EM FUNÇÃO DA IDADE DA PLANTA NA ÉPOCA DA INOCULAÇÃO	29
4. RESULTADOS.....	31
4.1. CINÉTICA DA INVASÃO SISTÊMICA DO ToSRV E DO ToCV EM INFECÇÕES SIMPLES E MISTA EM TOMATEIRO	31
4.2. PERÍODOS DE LATÊNCIA E DE INCUBAÇÃO DO ToSRV E DO ToCV EM INFECÇÕES SIMPLES E MISTA EM TOMATEIRO.....	32
4.3. PERÍODOS DE INCUBAÇÃO DO ToSRV E DO ToCV, EM INFECÇÕES SIMPLES E MISTA EM TOMATEIRO, EM FUNÇÃO DA IDADE DA PLANTA NA ÉPOCA DA INOCULAÇÃO.....	35

5. DISCUSSÃO	39
5.1. CINÉTICA DA INVASÃO SISTÊMICA DO ToSRV E DO ToCV EM INFECÇÕES SIMPLES E MISTA EM TOMATEIRO	39
5.2. PERÍODOS DE LATÊNCIA E DE INCUBAÇÃO DO ToSRV E DO ToCV, EM INFECÇÕES SIMPLES E MISTA EM TOMATEIRO	42
REFERÊNCIAS	50
APÊNDICE	59

RESUMO

Cinética da invasão sistêmica e períodos de latência e de incubação do *Tomato severe rugose virus* e *Tomato chlorosis virus*, em infecções simples e mista em tomateiro

O *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e o *Tomato chlorosis virus* (ToCV) estão entre as principais espécies de vírus que afetam a cultura do tomateiro atualmente no Brasil. Ambos possuem o mesmo vetor, a mosca-branca *Bemisia tabaci* MEAM1 (biótipo B), um inseto polífago e amplamente disseminado por todo país. Por este fato, infecções mistas destes vírus em lavouras de tomateiro são frequentes. No entanto, parâmetros epidemiológicos importantes para melhor compreensão das viroses associadas a esses vírus, quando em infecção simples ou mista em tomateiro, permanecem desconhecidos. Neste trabalho foram avaliados a cinética da invasão sistêmica e os períodos de latência e de incubação do ToSRV e do ToCV, em infecções simples e mista, em tomateiros. A cinética da invasão sistêmica foi analisada em tomateiros nos quais a folha inoculada foi destacada em diferentes intervalos de tempo após a inoculação. Os períodos de latência foram avaliados em tomateiros inoculados e que foram posteriormente utilizados como fontes de inóculo para a aquisição do(s) vírus por *B. tabaci* MEAM1, em ensaios de transmissão realizados em diferentes intervalos de tempo. Os períodos de incubação foram avaliados através da observação diária dos sintomas após a inoculação dos vírus nos tomateiros. O ToSRV e o ToCV iniciaram o movimento sistêmico em apenas um dia após a inoculação em tomateiro. Os períodos de latência do ToSRV, em infecções simples e mista, foram em média, 7 e 6 dias, respectivamente. Para o ToCV, os períodos médios de latência foram 13 dias em infecção simples e 11 dias em infecção mista. Os períodos de incubação do ToSRV, em infecções simples e mista, ocorreram, em média, 11 dias após os períodos de latência. O período de incubação do ToSRV foi influenciado pela idade da planta no momento da inoculação e também pela co-infecção com o ToCV. Os períodos de incubação do ToCV, em infecções simples e mista, ocorreram, em média, 17 e 20 dias após os períodos de latência, respectivamente. O início dos sintomas do ToCV não foi afetado pela idade da planta no momento da inoculação e nem pela co-infecção com o ToSRV. Estes resultados indicam que após a infecção o tomateiro rapidamente se torna uma fonte de inóculo do(s) vírus e passa a contribuir para a disseminação de ambos no campo. A defasagem de tempo entre os períodos de latência e de incubação do ToSRV e do ToCV nos tomateiros infectados revela que as plantas possibilitam a aquisição e subsequente transmissão dos vírus de um hospedeiro doente para um hospedeiro sadio antes de qualquer manifestação dos sintomas, fato que deve ser levado em consideração para o manejo destas fitoviroses no campo.

Palavras-chave: Begomovírus; Crinivírus; *Solanum lycopersicum*; *Bemisia tabaci* MEAM

ABSTRACT

Kinetics of systemic invasion and latent and incubation periods of *Tomato severe rugose virus* and *Tomato chlorosis virus*, in single and mixed infections in tomato

Tomato severe rugose virus (ToSRV) and *Tomato chlorosis virus* (ToCV) are among the main species of virus affecting tomato crops currently in Brazil. Both are transmitted by the same vector, the whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1 (biotype B), a polyphagous insect widely disseminated throughout the country. Because of this fact, mixed infections of these viruses in tomato crops are frequent. However, important epidemiological parameters to better understand the diseases associated with these viruses, when in single or mixed infection in tomato, remain unknown. This study evaluated the kinetics of systemic invasion and latent and incubation periods of ToSRV and ToCV in single and mixed infections in tomato. The kinetics of systemic invasion was analyzed in tomato plants in which the inoculated leaf was detached at different time intervals after inoculation. The latent periods were evaluated in inoculated tomato plants which were later used as inoculum sources for the acquisition of ToSRV and/or ToCV by *B. tabaci* MEAM1, in transmission assays performed at different time intervals. Incubation periods were evaluated by daily observation of symptoms after inoculation of tomato plants. ToSRV and ToCV started the systemic movement just one day after inoculation in tomato plants. Average latent periods of ToSRV, in single and mixed infections, were 7 and 6 days, respectively. For ToCV, the average latent periods were 13 days in single infection and 11 days in mixed infection. ToSRV incubation periods, in single and mixed infections, occurred on average 11 days after the respective latent periods. The incubation period of ToSRV was influenced by the age of the plant at the time of inoculation and by the co-infection with ToCV. ToCV incubation periods, in single and mixed infections, occurred on average 17 and 20 days after the latent periods, respectively. The beginning of ToCV symptoms was not affected by the age of the plant at the time of inoculation or by co-infection with ToSRV. These results indicate that after infection, tomato plants rapidly become source of inoculum of the viruses and contribute to the dissemination of both in tomato crops. The mismatch between the latent and incubation periods of ToSRV and ToCV in infected tomato plants reveals that plants enable the acquisition and subsequent transmission of both viruses from a diseased to a healthy plant, prior to any manifestation of symptoms. Such knowledge should be taken into consideration for the management of these viruses in tomato crops.

Keywords: Begomovirus; Crinivirus; *Solanum lycopersicum*; *Bemisia tabaci* MEAM1

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*, família Solanaceae) é uma das hortaliças mais importantes no Brasil e no mundo, pela geração de um grande número de empregos, tanto no campo como na indústria, e por constituir uma fonte de nutrientes e minerais de grande valor para a alimentação humana (Bergougnoux, 2014; Makishima e Melo, 2004). O tomateiro é uma cultura cosmopolita, sendo os maiores produtores mundiais a China, a Índia e os Estados Unidos (FAOSTAT, 2017). O Brasil possui um lugar de destaque na produção desta hortaliça, sendo atualmente o nono maior produtor mundial, com uma produção anual de cerca de 4 milhões de toneladas de tomate (FAOSTAT, 2017). O cultivo de tomateiro no Brasil predomina nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, sendo os estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais responsáveis por 65% da produção nacional desta hortaliça (IBGE, 2017).

Diversos fatores podem comprometer a produção do tomateiro, como desequilíbrios nutricionais, déficit hídrico, compactação do solo, competição com plantas daninhas e também o ataque de pragas e doenças (Reis Filgueira et al., 2008). Dentre as doenças que infectam o tomateiro, duas viroses, o mosaico dourado e o amarelão, possuem grande importância e ocorrem em altas incidências em cultivos dessa solanácea atualmente no Brasil (Inoue-Nagata et al., 2016; Barbosa et al., 2011b).

O mosaico dourado do tomateiro é uma doença ocasionada por um complexo de espécies virais pertencentes ao gênero *Begomovirus* (Inoue-Nagata et al., 2016b). Dentre os begomovírus que infectam o tomateiro no Brasil, o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) é a espécie que predomina e que ocorre em maior incidência nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, enquanto o *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) e o *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) são predominantes na região Nordeste e no estado do Espírito Santo, respectivamente (Fernandes et al., 2008; Macedo et al., 2015; Inoue-Nagata, 2016b).

O amarelão do tomateiro é ocasionado por um vírus pertencente ao gênero *Crinivirus*, o *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (Wisler et al., 1998; Barbosa et al., 2008). O ToCV ocorre em diversos países do mundo e atualmente está presente nas principais regiões produtoras de tomate do Brasil (Navas-Castillo et al., 2011; Barbosa et al., 2011b).

O ToSRV e o ToCV são transmitidos eficientemente pelo mesmo vetor, a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1 ou biótipo B), e possuem relações vírus-vetor dos tipos persistente circulativa e semipersistente, respectivamente (Inoue-Nagata et al., 2016a). Por possuírem o mesmo vetor, frequentemente o tomateiro é infectado por ambos os vírus no campo (Macedo et al., 2014).

Infecções mistas de vírus em plantas é um fenômeno comum na natureza, podendo os resultados destas interações serem classificados como: sinergismo (quando pelo menos uma espécie é beneficiada na interação), antagonismo (quando uma espécie é prejudicada na interação) e neutralismo (quando a interação não influencia nenhuma das espécies). Do ponto de vista dos vírus envolvidos na interação, as principais alterações que podem ocorrer em infecções mistas dizem respeito à replicação viral, tropismo celular, movimento no hospedeiro e taxa de transmissão (Mascia e Gallitelli, 2016).

Com relação à transmissão por *B. tabaci* MEAM1, aparentemente não há interação entre o ToSRV e ToCV nos processos de aquisição e inoculação pelo inseto vetor, uma vez que as taxas de transmissão quando ambos foram adquiridos simultaneamente ou de forma isolada foram as mesmas (Freitas, 2012). No entanto, outros parâmetros necessitam ser avaliados em infecções mistas desses vírus em tomateiro, para permitir uma melhor compreensão da interação entre eles nas plantas duplamente infectadas, como, por exemplo, os efeitos provocados na concentração viral, no movimento sistêmico no hospedeiro, na intensidade dos sintomas, nos danos ocasionados na produção e em parâmetros epidemiológicos como os períodos de latência (tempo entre a inoculação e a infecciosidade do hospedeiro) e de incubação (tempo entre a inoculação e a manifestação dos sintomas).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a cinética da invasão sistêmica e os períodos de latência e de incubação do ToSRV e do ToCV, em infecções simples e mista em tomateiro. As informações obtidas permitirão uma melhor compreensão de parâmetros epidemiológicos importantes e da interação entre ambos no tomateiro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pertence à família Solanaceae e atualmente é considerado uma das principais hortaliças em termos de importância econômica e alimentar, sendo cultivado em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (Reis Filgueira, 2008). O centro de origem do tomateiro é a região andina da América do Sul, mas a cultura foi domesticada no México. O tomateiro foi introduzido na Europa em 1544 e posteriormente disseminado para outras partes do mundo como a Ásia, a África e o Oriente Médio (Naika et al., 2006).

Atualmente, os maiores produtores mundiais de tomate são: China, Índia, Estados Unidos, Turquia, Egito, Irã, Itália, Espanha, Brasil e México. Estes países agregam 76% da produção mundial desta hortaliça (FAOSTAT, 2017). A produção brasileira de tomate corresponde a 2,4% da produção mundial, o que faz do Brasil o nono maior produtor no mundo (FAOSTAT, 2017). Em 2017, 64.168 hectares (ha) foram plantados com tomateiros no Brasil. As regiões Sudeste e Centro-Oeste são as que possuem as maiores áreas destinadas ao cultivo desta hortaliça no país, com 27.183 ha e 14.061 ha, respectivamente (IBGE, 2017). A produção brasileira em 2017 foi de 4.333.480 ton de tomate, com uma produtividade média de 67,53 ton/ha (IBGE, 2017). Destaque para as regiões Centro-Oeste e Sudeste, que juntas produzem 73% de todo o tomate do país, sendo os estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais os maiores produtores, com produções de 1.143.735 ton, 984.940 ton e 667.533 ton, respectivamente (IBGE, 2017).

O custo de produção do tomate é um dos maiores em toda a atividade agrícola. De acordo com a Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM, 2009) existe grande variação nos custos de produção desta cultura, entre R\$ 30 mil e R\$ 55 mil por hectare, sendo que este preço é influenciado principalmente pelo nível tecnológico utilizado pelo produtor e pela produtividade que se espera alcançar.

No Brasil, o tomateiro é uma grande fonte de empregos e de renda ao longo de toda a sua cadeia produtiva, gerando por ano, entre 5 e 6 empregos diretos e indiretos, respectivamente, para cada hectare plantado com esta hortaliça (Boiteux et al., 2008). Este fato está relacionado com a intensa necessidade de mão-de-obra

do tomateiro em todas as suas fases de produção (Boiteux et al., 2008). O tomateiro também possui grande importância no agronegócio brasileiro, movimentando anualmente cerca de R\$ 2 bilhões, o que corresponde a 16% do PIB gerado pela produção de hortaliças no Brasil (ABCSEM, 2009).

O tomate possui grande destaque na alimentação humana. Os frutos podem ser consumidos frescos, cozidos, em sopas e em diversas combinações com outros ingredientes. Os frutos também podem ser processados e consumidos como purês, molhos para massas, ketchup, sucos e até doces (Naika et al., 2006). O fruto do tomateiro possui em sua composição 93% a 95% de água e 5% a 7% de compostos inorgânicos, ácidos orgânicos, açúcares, sólidos insolúveis em álcool e outros compostos. Assim sendo, o tomate é uma fonte de nutrientes importante para a saúde humana, com destaque para os antioxidantes, representados principalmente pelo licopeno, vitaminas, como o ácido ascórbico e o beta caroteno, e minerais, como o cálcio, magnésio, fósforo e potássio (Bergougnoux, 2014).

2.2. *Tomato severe rugose virus*

Begomovirus é atualmente o gênero de vírus de plantas com o maior número de espécies, sendo que algumas delas são responsáveis por danos na produção de diversas culturas agrícolas ao redor do mundo, como, feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), tomateiro, batateira (*Solanum tuberosum*), batata-doce (*Ipomoea batatas*) e a mandioca (*Manihot esculenta*) (Inoue-Nagata et al., 2016b, Navas-Castillo et al., 2011). Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), o gênero *Begomovirus* é composto até o momento por 322 espécies (ICTV online, 2017).

Os *Begomovirus* possuem DNA circular de fita simples, encapsulados em partículas geminadas e, de acordo com o número de componentes genômicos, são classificados em monopartidos (possuem uma molécula de DNA: DNA A) e bipartidos (possuem duas moléculas de DNA: DNA A e DNA B) (Brown et al., 2015). Os begomovírus monopartidos predominam no Velho Mundo (África, Ásia, Australasia e Europa), enquanto que os bipartidos são considerados nativos e predominam no Novo Mundo (Américas). O DNA A possui 5 genes, os quais codificam proteínas responsáveis pela replicação do genoma viral, montagem das partículas e supressão de respostas de defesa do hospedeiro, enquanto o DNA-B

codifica proteínas relacionadas ao movimento célula-a-célula do vírus nas plantas (Brown et al., 2012).

Diversas espécies de begomovírus já foram relatadas no Brasil, infectando uma grande variedade de culturas agrícolas, como, a soja (*Glycine max*), o feijoeiro, a batateira, o quiabeiro (*Abelmoschus esculentus*), o algodoeiro (*Gossypium hirsutum*), o pimentão (*Capsicum annuum*) e o tomateiro (Inoue-Nagata et al., 2016a). Neste cenário, o tomateiro se destaca pela sua suscetibilidade a um elevado número de espécies de begomovírus. No Brasil, já foram descritas 16 espécies infectando naturalmente tomateiros no campo (Fernandes et al., 2008; Rocha et al., 2013; Inoue-Nagata et al., 2016a). Dentre estas espécies, o ToSRV, o ToCmMV e o ToMoLCV são as de maior incidência na cultura do tomateiro atualmente no Brasil. O ToSRV predomina nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e no Distrito Federal; o ToCmMV predomina no Espírito Santo; enquanto o ToMoLCV ocorre em maior incidência no norte de Minas Gerais, Ceará e Piauí (Inoue-Nagata et al., 2016b).

O primeiro relato do ToSRV infectando tomateiro no Brasil ocorreu no ano de 1999 no estado de Minas Gerais (Fernandes et al., 2008). Posteriormente ele foi encontrado em tomateiros nos estados de São Paulo, Goiás, Distrito Federal, Rio de Janeiro e Pernambuco (Castillo-Urquiza et al., 2008; Contrim et al., 2007; Fernandes et al., 2008; Lima et al., 2006). Além do tomateiro, o ToSRV já foi detectado infectando naturalmente plantas de pimenta “dedo-de-moça” (*C. baccatum* var. *pendulum*), pimentão, batata, *Nicandra physaloides*, feijoeiro, *Euphorbia heterophylla*, *Malva* spp., *Sida* spp., *Crotalaria* sp. e soja (Nozaki et al., 2006; Bezerra-Agasie et al., 2006; Souza-Dias et al., 2008; Barbosa et al., 2009; Barreto et al., 2013; Macedo, 2016; Macedo et al., 2017a). Além das espécies infectadas naturalmente pelo ToSRV, fazem parte da gama de hospedeiros experimentais do vírus: *Amaranthus spinosus*, *Emilia sonchifolia*, *Chenopodium album*, *C. ambrosioides*, *Datura stramonium*, *Nicotiana clevelandii*, *N. tabacum* cvs. TNN e Samsun, *N. rustica*, *Solanum americanum* e *Capsicum baccatum* cv. Mari (Barbosa et al., 2011a; Macedo et al., 2015).

O ToSRV é transmitido pela mosca-branca *Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1 ou biótipo B), com relação vírus-vetor do tipo persistente circulativa. A eficiência de transmissão do ToSRV por MEAM1 é alta, podendo alcançar taxas de 70% quando utilizado apenas um inseto para a aquisição e

inoculação do vírus em tomateiro (Marubayashi, 2009). Os períodos mínimos de acesso à aquisição (PAA) e inoculação (PAI) do ToSRV em tomateiro por MEAM1 foram de 5 min em experimentos realizados por Freitas (2012). Tempo ainda menor para aquisição do ToSRV por MEAM1 foi observado por Toloy et al. (2017). Neste estudo os insetos adquiriram o vírus durante um minuto de alimentação em folha de tomateiro infectada e foram capazes de inoculá-lo em outras plantas de tomate após um PAI de 24 h. Este último resultado, em conjunto com a possibilidade de transmissão do ToSRV para pimentão e *N. physaloides*, através de inoculação mecânica com extrato vegetal obtido de plantas de *N. benthaminana* infectadas com este begomovírus (Nozaki, 2007), sugerem a capacidade do ToSRV colonizar, além dos vasos do floema, células mais superficiais do hospedeiro, como por exemplo, as células da epiderme e do parênquima foliar (Toloy et al., 2017). O período de latência e o tempo de retenção do ToSRV em MEAM1 são 12-15 h e 25 dias, respectivamente (Toloy et al., 2017). Esses parâmetros são próximos aos de outros begomovírus que ocorrem no Brasil, como, por exemplo, o *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) que possui período de latência de 16 horas e permanece retido no vetor por 20 dias e o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), cuja latência é de 16 h em *B. tabaci* MEAM1 (Santos et al., 2003; Firmino et al., 2009).

Os sintomas provocados pela infecção por espécies de begomovírus em tomateiro incluem o clareamento de nervuras, clorose foliar, clorose entre as nervuras, mosaico, deformação foliar, enrugamento foliar e redução do porte da planta (Inoue-Nagata et al., 2016b). O tomateiro pode ter a sua produtividade comprometida drasticamente quando infectado por begomovírus. A infecção precoce de uma espécie de begomovírus bipartido em mudas de tomateiro provocou uma queda na produtividade de cerca de 60%. O número de frutos produzidos por planta doente também foi reduzido. Os tomateiros sadios produziram em média 66 frutos, enquanto aqueles infectados produziram apenas 38 frutos (Giordano et al., 2005). Para tomateiros duplamente infectados com o ToSRV e com o ToCV, houve uma redução na produtividade de 52 a 69%, quando as plantas foram inoculadas aos 15 dias após o transplante e, de 44 a 59%, quando a inoculação ocorreu aos 30 dias após o transplante (Guimarães et al., 2017). Para o pimentão, plantas infectadas com o ToSRV, comparadas com plantas sadias, apresentaram uma redução na altura final de 13,8 a 18,4% e uma redução na produção de frutos comerciais de 28 a 44,6%, de acordo com as cultivares avaliadas (Rocha et al., 2012). Os danos

acarretados ao tomateiro quando infectado somente com o ToSRV ainda não foram estimados.

2.3. *Tomato chlorosis virus*

O gênero *Crinivirus* pertence à família *Closteroviridae*, a qual engloba outros três gêneros, *Ampelovirus*, *Closterovirus* e *Velarivirus*. O gênero *Crinivirus* possui 14 espécies (ICTV online, 2017), sendo que duas delas infectam o tomateiro, o *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) e o *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (Navas-Castillo et al., 2011). Até o momento, a única espécie de crinivírus relatada infectando tomateiro no Brasil é o ToCV (Barbosa et al., 2011b). O ToCV possui genoma bipartido, constituído por duas moléculas de RNA de fita simples, senso positivo, encapsuladas separadamente em partículas alongadas e flexuosas com comprimentos de 800-850 nm (Liu et al., 2000).

O ToCV já foi detectado em cultivos de tomateiro de diversos países do mundo, como, Estados Unidos, Portugal, Espanha, Porto Rico, Itália, Grécia, Taiwan, Israel, México e Brasil (Navas-Castillo et al., 2011). No Brasil, o primeiro relato desse crinivírus foi em 2006, em campos de produção de tomate na região de Sumaré (SP) (Barbosa et al., 2008). Nos anos seguintes foi confirmada a sua presença em amostras de plantas sintomáticas de tomate dos estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro (Barbosa et al., 2011b), e Rio Grande do Sul (De Marchi, 2014), sugerindo uma ampla disseminação desse vírus no Brasil.

A gama de hospedeiros do ToCV é ampla, incluindo cerca de 70 espécies vegetais, entre plantas cultivadas ou daninhas, distribuídas em 24 famílias botânicas (Kil et al., 2015; Esquivel, 2016; Souza, 2016). Além do tomateiro, dentre os hospedeiros do ToCV estão presentes outras solanáceas de importância social e econômica como a batateira, o pimentão, a berinjela (*Solanum melongena*) e o jiló (*S. gilo*) (Barbosa et al., 2010; Freitas et al., 2012; Fonseca et al., 2016). Algumas plantas daninhas que já foram encontradas no Brasil infectadas naturalmente com esse crinivírus incluem a maria-pretinha (*S. americanum*), joá-de-capote (*N. physaloides*), camapú (*Physalis angulata*), caruru (*Amaranthus viridis*), trapoeraba (*Commelina benghalensis*) e *Sida* spp. (Fonseca et al., 2013; Macedo, 2016). Os hospedeiros alternativos do ToCV podem apresentar importância na epidemiologia

do vírus por atuarem como fontes externas de inóculo (Tzanatekis et al., 2013; Esquivel, 2016).

O ToCV é transmitido de maneira semipersistente pelas espécies de moscas-brancas do complexo *B. tabaci* MEAM1, Mediterranean (MED ou biótipo Q), New World I (NW1 ou biótipo A) e New World II (NW2). O vírus também é transmitido pelas espécies *Trialeurodes abutilonea* e *T. vaporariorum* (Navas-Castillo et al., 2000; Wintermantel e Wisler, 2006; De Marchi, 2014). Dentre estas espécies, apenas *T. abutilonea* não foi constatada no Brasil. A eficiência de transmissão do ToCV varia em função da espécie do vetor, sendo obtidas altas taxas de transmissão do vírus pelas espécies MEAM1, MED e *T. abutilonea* em comparação com as espécies *T. vaporariorum* e NW1 (Wintermantel e Wisler, 2006; Orfanidou et al., 2016). Os períodos mínimos de acesso à aquisição e inoculação do ToCV em tomateiro por MEAM1 foram de 5 min em experimentos realizados por Freitas (2012). Devido a relação vírus-vetor do tipo semipersistente, o ToCV pode ser transmitido pelas moscas-brancas logo após a aquisição, uma vez que não há período de latência no vetor (Inoue-Nagata et al., 2016b). O ToCV persiste na espécie MED por 6 dias, em *T. abutilonea* por 5 dias, 3 dias em MEAM1 e apenas 1 dia em *T. vaporariorum* e NW1 (Wintermantel e Wisler, 2006; Orfanidou et al., 2016).

Os sintomas do ToCV em tomateiros se iniciam com manchas cloróticas internervais nas folhas da parte inferior da planta, em seguida, as manchas evoluem e a folha toda pode ficar amarela, exceto as nervuras que continuam verdes. Geralmente aparecem bronzeamentos ou manchas avermelhadas e as folhas ficam grossas e quebradiças, com os bordos curvados para cima. Os sintomas se iniciam na base e progridem em direção ao topo da planta, mas raramente aparecem nas folhas mais novas. O amarelecimento da planta compromete o processo fotossintético, resultando em queda de vigor, redução no tamanho dos frutos, os quais também demoram mais para amadurecer (EPPO, 2013; Wintermantel e Wisler, 2006). O início dos sintomas induzidos pelo ToCV em tomateiro ocorrem entre 3 a 4 semanas após a infecção (Wintermantel e Wisler, 2006). Desta maneira, se o tomateiro for infectado com o ToCV nos viveiros, durante a fase de produção das mudas, na ocasião do transplante destas para o campo poderá ocorrer a introdução do vírus para novas áreas, antes mesmo da manifestação dos sintomas (Wintermantel et al., 2008; Tzanatekis et al., 2013).

O ToCV pode provocar danos significativos na produção do tomateiro, principalmente quando infectado precocemente. De acordo com o genótipo de tomateiro avaliado, plantas infectadas apresentaram uma redução no desenvolvimento, com base na massa fresca da parte aérea, variando de 2,9 a 71,9%, enquanto que a redução da produtividade variou de 0,2 a 52%, quando comparadas com tomateiros sadios (Mansilla-Córdova, et al., 2017). Em estudos conduzidos por Guimarães et al. (2017) os danos provocados pela infecção mista do ToCV e do ToSRV em tomateiro foram influenciados pela idade das plantas no momento da inoculação. Plantas inoculadas precocemente, aos 15 dias após o transplante, tiveram a produtividade reduzida em até 69%, enquanto que nas plantas inoculadas tardiamente, aos 75 dias após o transplante, a redução na produtividade não passou de 4%. Em pimentão, a infecção pelo ToCV provocou uma redução no crescimento das plantas que variou de 21 a 34% e uma queda de produtividade de 45 a 75%, de acordo com as cultivares avaliadas (Fortes et al., 2012).

2.4. Epidemiologia e manejo do ToSRV e do ToCV em tomateiro

Segundo Vanderplank (1963) epidemiologia pode ser classificada como “a ciência da doença em populações” e de acordo com Kranz (1974) como “o estudo de populações de patógenos em populações de hospedeiros e da doença resultante desta interação, sob a influência do ambiente e a interferência humana”. Na maioria das doenças de plantas causadas por vírus, as populações importantes para a epidemiologia correspondem às populações do hospedeiro, do patógeno e do vetor (Bergamin Filho e Amorim, 2011). Desta maneira, são consideradas importantes para o desenvolvimento de epidemias do ToSRV e do ToCV, além da variabilidade viral existente, as populações das espécies vetoras do(s) vírus e também a população de hospedeiros do(s) vírus, a qual pode ser dividida entre os hospedeiros principais e os hospedeiros alternativos, sendo o primeiro constituído por espécies cultivadas de elevada importância econômica e social e o último constituído por diversas espécies de plantas daninhas que podem servir como fonte externa de inóculo do ToSRV e do ToCV para a cultura do tomateiro e outras solanáceas, onde esses vírus podem causar doenças de importância econômica (Tzanatekis et. al, 2013; Wintermantel e Wisler, 2006; Inoue-Nagata et. al, 2016; Esquivel, 2016).

As doenças de plantas foram tradicionalmente classificadas, de acordo com o número de ciclos do patógeno por ciclo de cultivo do hospedeiro, em doenças monocíclicas ou de juro simples (apenas 1 ciclo de infecção do patógeno por ciclo de cultivo do hospedeiro) e doenças policíclicas ou de juro compostos (mais de 1 ciclo de infecção do patógeno por ciclo de cultivo do hospedeiro) (Vanderplank, 1963). Em doenças monocíclicas, devido à ausência de ciclo secundário do patógeno, a epidemia é governada pela infecção primária. Em doenças policíclicas, a infecção primária seria responsável por trazer o inóculo de fora para dentro da área de cultivo, sendo o desenvolvimento subsequente da epidemia ocasionado por sucessivos ciclos de infecções secundárias (Bergamin Filho et al., 2016). No entanto, existe um terceiro padrão epidemiológico de doenças de plantas, intermediário aos dois já comentados, sendo as doenças incluídas neste padrão denominadas de “policíclicas com infecção primária contínua” (Bergamin Filho et al., 2016). Neste grupo de doenças de plantas, os dois tipos de infecções, primária e secundária, contribuem para o desenvolvimento da epidemia, o que aumenta a dificuldade para o manejo destas doenças (Bergamin Filho et al., 2016).

As características epidemiológicas do ToSRV e do ToCV em tomateiro são semelhantes (Macedo, 2016). Isto está relacionado em grande parte pela presença de hospedeiros comuns a ambos os vírus (Barbosa et al., 2009; Macedo et al., 2015; Esquivel, 2016), aliada a capacidade de transmissão simultânea do ToSRV e do ToCV por *B. tabaci* MEAM1 (Freitas, 2012). Devido a isso, são frequentes as ocorrências de infecções mistas do ToSRV e do ToCV em cultivos de tomateiro. Em um levantamento realizado em campos de tomateiro nos estados de Goiás e Brasília, de um total de 150 amostras analisadas, 48% estavam infectadas por ambos os vírus, 32% estavam infectadas apenas com o ToCV e 20% estavam infectadas apenas com o ToSRV (Macedo et al., 2014).

Em avaliação do progresso temporal do ToSRV durante três cultivos consecutivos de tomateiro no município de Sumaré (SP), Barbosa et al. (2016) relataram que as curvas de progresso da doença obtidas se ajustaram melhor ao modelo epidemiológico do tipo monomolecular, o que revela a importância e predominância da disseminação primária na epidemiologia do ToSRV. Em estudo realizado por Calaça (2011) sobre a dinâmica espacial e temporal do ToCV em tomateiro, a doença apresentou um comportamento linear de crescimento, em consequência de um influxo contínuo de moscas-brancas virulíferas vindas de fora

da propriedade. A autora também relatou um forte efeito de bordos, indicando a existência de fontes externas de inóculo. Macedo (2016) avaliando o progresso temporal e espacial do ToSRV e do ToCV em áreas de produção comercial de tomate em Goiás e no Distrito Federal, observou que o avanço das doenças, no tempo e no espaço, foi bastante similar, e também apontou que, para ambas as viroses a disseminação primária foi contínua e a principal responsável pela ocorrência das epidemias. Neste trabalho, as curvas de progresso do ToSRV e do ToCV foram praticamente paralelas, sendo a curva de progresso do ToCV defasada no tempo em relação a curva de progresso do ToSRV, provavelmente devido ao maior período de incubação do ToCV (Macedo, 2016).

A aplicação de inseticidas visando o controle das moscas-brancas é uma prática realizada com frequência pelos produtores na tentativa de minimizar os danos provocados pelo ToSRV e ToCV em tomateiro. No entanto, esta alternativa não apresenta a eficiência desejada (Inoue-Nagata et al., 2016a). Um dos motivos para este fato é que os inseticidas comumente utilizados para o controle das moscas-brancas, apesar de serem eficientes para o manejo do inseto como praga, não são capazes de impedir as transmissões desses vírus, que ocorrem principalmente devido a influxos contínuos de vetores virulíferos vindos de fora das propriedades (Barbosa et al., 2016; Macedo et al., 2017b). Em simulações feitas em gaiolas a prova de insetos, avaliando o efeito de inseticidas no controle das transmissões primária e secundária do ToSRV por *B. tabaci* MEAM1, verificou-se que os ingredientes ativos testados, ciantraniliprole foliar, ciantraniliprole solo, espiromesifeno, tiametoxam e cloridrato de cartape não foram eficientes em reduzir as infecções primárias deste begomovírus. No entanto, as aplicações de ciantraniliprole foliar, ciantraniliprole solo e cloridrato de cartape reduziram as transmissões secundárias do ToSRV (Gouvêa et al., 2017). Isto ocorreu, provavelmente pela existência do período de latência de 12-15 h entre a aquisição desse begomovírus e a sua subsequente transmissão pelo vetor. Este intervalo de tempo possibilitou a ação dos inseticidas sobre os insetos vetores (morte ou bloqueio da alimentação) antes que ocorresse a inoculação do vírus (Gouvêa et al., 2017; Toloy et al., 2017). Em estudo semelhante, foi demonstrado experimentalmente que para o ToCV, que é transmitido de maneira semipersistente por *B. tabaci* MEAM1 e não possui período de latência no vetor, as aplicações dos inseticidas flupiradifurone, ciantraniliprole solo e cloridrato de cartape não

apresentaram eficiência em reduzir, tanto as infecções primárias como as secundárias desse crinivírus para tomateiro (Silva et al., 2017).

Diante destes fatos, para o maior êxito no manejo do ToSRV e do ToCV em tomateiro, as medidas de controle para essas viroses necessitam ser realizadas em escala regional e devem envolver o manejo integrado, com a adoção de diferentes práticas, entre elas, o transplante de mudas saudáveis, o uso de cultivares resistentes/tolerantes (existentes atualmente apenas para o ToSRV), o estabelecimento de um período de vazio sanitário, evitar o escalonamento de plantios, a eliminação de fontes externas de inóculo e o controle racional do inseto vetor por meio da aplicação de inseticidas (Bergamin Filho et al., 2016; Macedo et al., 2017b; Inoue-Nagata et al., 2016a, Gouvêa et al., 2017).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Virologia Vegetal e em casas de vegetação do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, ESALQ/USP, Piracicaba-SP. Foram utilizadas sementes sadias de tomateiro tipo Santa Cruz cv. Kada. As mudas foram obtidas a partir de sementeiras feitas em vasos de 1,5 litros, contendo substrato comercial (Tropstrato HT Hortaliças[®]), composto por casca de pinus, turfa, vermiculita expandida e enriquecido com macro e micronutrientes. Posteriormente as mudas foram transplantadas no estágio de 3 a 4 folhas verdadeiras para outros vasos de 1,5 ou 3 litros, de acordo com o experimento, contendo o mesmo substrato. As plantas foram periodicamente adubadas com a formulação N-P-K (10-10-10).

3.2. Isolados virais

O isolado de ToCV utilizado foi coletado em tomateiros infectados no município de Sumaré-SP. O isolado de ToSRV utilizado na primeira repetição dos experimentos foi gentilmente cedido pela Dr.^a Alice Kazuko Inoue-Nagata, pesquisadora da Embrapa Hortaliças. Nas demais repetições dos experimentos foi utilizado um isolado de ToSRV obtido em tomateiros infectados no município de Sumaré-SP. A identidade dos isolados virais foi confirmada através de sequenciamento parcial de nucleotídeos de seus genomas. Plantas de tomate com infecções simples do ToCV e do ToSRV foram mantidas, separadamente, em câmaras de crescimento de plantas (Conviron[®]), com temperatura de 25 °C e com regime de fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro. Tomateiros duplamente infectados com os isolados do ToSRV e do ToCV foram mantidos em casa de vegetação, com temperatura e fotoperíodo ambiente. A renovação do inóculo foi feita periodicamente através da transmissão dos vírus para plantas jovens de tomate, por meio do vetor *B. tabaci* MEAM1.

3.3. Colônia de *Bemisia tabaci* MEAM1

Para os ensaios de transmissão foi utilizada uma colônia de *B. tabaci* MEAM1 livre de vírus, pré-estabelecida em insetário no Departamento de Fitopatologia e Nematologia, ESALQ/USP, Piracicaba-SP. A colônia foi estabelecida em plantas de couve (*Brassica oleraceae*), mantida em gaiolas com proteção anti-afídica. Periodicamente, a identidade da espécie e a pureza da colônia foram verificadas molecularmente. O DNA total de insetos adultos foi extraído seguindo uma adaptação do protocolo Chelex 100 (Walsh et al., 1991) e posteriormente amplificado por PCR, utilizando o par de primers Bem23F (5'-CGGAGCTTGCGCCTTAGTC-3') e Bem23R (5'-CGGCTTTATCATAGCTCTCGT-3'), que diferencia as espécies crípticas de *B. tabaci* MEAM1 (biótipo B) e MED (biótipo Q) (De Barro et al., 2003). Em alguns casos a confirmação de *B. tabaci* MEAM1 foi feita através da amplificação parcial do gene mitocondrial citocromo oxidase 1 utilizando o par de primers C1-J-2195 (5'-TTGATTTTTTGGTC ATCCAGAAGT-3') e L2-N-3014 (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3') descritos por Simon et al. (1994). Os amplicons obtidos foram sequenciados e comparados com outras sequências de nucleotídeos de moscas-brancas depositadas no GenBank, utilizando o programa Blastn disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

3.4. Transmissão dos vírus por *Bemisia tabaci* MEAM1

Com auxílio de um aspirador bucal, adultos de *B. tabaci* MEAM1 livres de vírus foram coletados em folhas de couve e transferidos para potes de vidro contendo folhas de tomateiro infectadas com os isolados do ToSRV e do ToCV, separadamente. Os insetos foram mantidos nesta condição por um período de acesso à aquisição (PAA) do(s) vírus de 24 h. Para a transmissão dos vírus em conjunto, foi utilizada como fonte de inóculo folhas destacadas de tomateiros duplamente infectados com o ToSRV e o ToCV, uma vez que a aquisição simultânea destes vírus não altera a eficiência de transmissão pelo vetor (Freitas, 2012). Após o PAA de 24 h, os possíveis insetos virulíferos foram transferidos para “clip cages”, colocadas no folíolo terminal da terceira folha dos tomateiros a serem inoculados (Figura 1). Para a inoculação foi adotado um período de acesso à inoculação (PAI) de 24 h ou de 5 dias, de acordo com o experimento. Após o PAI,

para prevenir possíveis contaminações de plantas do experimento, as folhas inoculadas junto com as 'clip-cages' foram destacadas das plantas, eliminando desta maneira todos os insetos adultos, e possíveis ovos depositados e ninfas. Após este procedimento foi feita a aplicação dos inseticidas Tiger 100 EC (Piriproxifem) e Cartap BR 500 (Cloridrato de cartape) para prevenir a posterior colonização do vetor.

Figura 1: a) Inoculação no folíolo terminal da terceira folha. b) Detalhe das moscas-brancas durante o período de acesso à inoculação (PAI) no interior da "clip-cage".

3.5. Detecção do ToSRV por RCA-PCR

A presença do ToSRV foi analisada a partir do DNA total extraído das amostras foliares através de uma adaptação do método de Dellaporta et al. (1983). O DNA total extraído de tomateiros sabidamente infectados com o ToSRV e de plantas sadias foram utilizados nas reações de RCA-PCR como controles positivo e negativo, respectivamente. Após a extração do DNA total, realizou-se uma amplificação inicial pela técnica de RCA ("rolling-circle amplification") com a enzima phi29 DNA polimerase, utilizando-se o TempliPhi DNA Amplification Kit (GE Healthcare, USA), da seguinte maneira: 1 μ L de DNA extraído foi adicionado em 5 μ L do tampão da amostra, a mistura foi incubada a 95 °C por 3 min e mantida no gelo por 10 min. Posteriormente foram adicionados 5 μ L do tampão de reação e 0,2 μ L da enzima phi29. A reação foi incubada a 30 °C por 18 h e em seguida desativada, aquecendo-se as amostras a 65 °C por 10 min. O produto da RCA foi armazenado em freezer a -20 °C até sua posterior utilização na PCR.

A reação de PCR foi realizada utilizando o kit de PCR Master Mix (Promega). Para um volume de 25 µL foram adicionados: 12,5 µL de tampão Master Mix; 8,5 µL de água livre de DNAses, 1,5 µL do produto de RCA e 1,25 µL dos oligonucleotídeos iniciadores específicos de detecção de begomovírus PAR1c496 (5'- AAT ACT GCA GGG CTT YCT RTA CAT RGG -3') e PAL1v1978 (5'- GCA TCT GCA GGC CCA CAT YGT CTT 56 YCC NGT -3), na concentração de 20 mM, desenvolvidos por Rojas et al. (1993). As condições do termociclador foram: 92 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 40 s, 54 °C por 60 s, 72 °C por 60 s e uma extensão final de 72 °C por 10 min. Os amplicons obtidos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen) e visualizados em um transiluminador de luz UV. O marcador de peso 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) foi utilizado para determinar o tamanho dos amplicons obtidos.

3.6. Detecção do ToCV por RT-PCR

A detecção do ToCV foi feita a partir do RNA total extraído das amostras foliares utilizando uma adaptação do método descrito por Dellaporta et al. (1983). O RNA total extraído de plantas sadias e infectadas com o ToCV foram usados nas reações de RT-PCR como controles negativo e positivo, respectivamente. Para a síntese da primeira fita de cDNA (RT= *Reverse Transcription*) foram utilizados: 3 µL de RNA; 0,25 µL de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs a 10 mM); 1 µL do oligonucleotídeo iniciador específico (anti-senso) HS-12 (5'-CC(G/T)CCACCAAA (A/G)TCGTA-3') a 20 mM (Dovas et al., 2002), e 9,75 µL de água livre de RNAses. A mistura foi colocada em termociclador e mantida por 5 min a 65 °C e em seguida resfriada por 5 min a 4 °C. Posteriormente foram adicionados 5 µL do AMV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer e 0,2 µL da enzima transcriptase reversa AMV (*Avian myeloblastosis virus*, marca Promega, a 15 unidades/ µL). A mistura foi incubada a 37 °C por 50 min e a 65 °C por 15 min, sendo mantida a 4 °C até a sua utilização na reação de PCR. A PCR foi realizada utilizando o kit de PCR Master Mix (Promega). Para um volume de 25 µL foram adicionados: 12,5 µL de tampão Master Mix; 0,8 µL dos oligonucleotídeos iniciadores específicos ToC-5 (5'-GGTTTGGAT TTTGGTACTACATTCAGT-3') e ToC-6 (5' – AAAGTGCCTGCATGAAAAGTCTC-3') a 20 mM (Dovas et al., 2002), 3 µL de cDNA e 7,9 µL de água livre de RNAses. As

condições do termociclador foram: 95 °C por 1 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 20 s, 60 °C por 15 s, 72 °C por 10 s e uma extensão final de 72 °C por 10 min. Os amplicons obtidos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen) e visualizados em um transiluminador de luz UV. O marcador de peso 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) foi utilizado para determinar o tamanho dos amplicons obtidos.

3.7. Detecção do ToSRV por qPCR e do ToCV por RT-qPCR

A detecção do ToSRV e do ToCV foi feita a partir do DNA e RNA total extraído das amostras foliares, respectivamente, utilizando o PureLink Viral RNA/DNA mini Kit (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Para as reações foram utilizados os oligonucleotídeos específicos ToSRV-F (5'-GCAACCGCCTCTAGCACTTC-3') e ToSRV-R (5'-GACCTGGTCTCCCCAACAAGG-3') para o ToSRV e ToCV-F (5'-GACCGAAGTGACACCAACCC-3') e ToCV-R (5'-TGGGACCGAGTACATTCCAAC-3') para o ToCV, ambos na concentração de 500 nM (Mansilla-Córdova et al., 2017). As reações de qPCR e de RT-qPCR foram realizadas em placas com 96 poços "MicroAmp" (Life Technologies), com volume final de 12,5 µL, utilizando GoTaq® qPCR Master mix (PROMEGA) para o ToSRV e SYBR Green GoTaq® 1-Step RT-qPCR (PROMEGA) para o ToCV, seguindo as instruções do fabricante. As reações foram realizadas e analisadas no termociclador 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). As condições de amplificação para o ToSRV foram: um ciclo de 95 °C por 2 min, seguidos de 30 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 30 s. As condições de amplificação para o ToCV foram: 37 °C por 15 min, 95 °C por 10 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 10 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s. Cada uma das amostras foi analisada em duplicata.

3.8. Sequenciamento de nucleotídeos

Para confirmar a identidade das espécies dos vírus que foram detectados através de RCA-PCR e RT-PCR nos experimentos realizados, alguns amplicons foram aleatoriamente selecionados e enviados para sequenciamento de

nucleotídeos. Inicialmente, os produtos da RCA-PCR e da RT-PCR foram purificados utilizando o kit de purificação Wizard® SV Gel e PCR Clean-up System (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Os amplicons purificados foram quantificados em espectrofotômetro modelo Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) e enviados à Macrogen (Koreia Seoul) para sequenciamento.

As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com outras sequências disponíveis no Genbank, utilizando o programa BLASTn disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

3.9. Cinética da invasão sistêmica do ToSRV e do ToCV em infecções simples e mista em tomateiro

Plantas de tomate cv. Kada foram inoculadas com o ToSRV e com o ToCV, separadamente e em conjunto, 30 dias após a emergência. O PAA foi realizado como descrito no item 3.4. A inoculação do(s) vírus foi realizada confinando 20 adultos virulíferos de *B. tabaci* MEAM1 em “clip cages”, colocadas no folíolo terminal da terceira folha das plantas-teste de tomate e mantidos por um PAI de 24 h (Figura 2). Após o PAI de 24 h, os insetos foram mortos dentro das “clip cages”, através da aplicação de gás carbônico, por um período de 30 s. As folhas onde ocorreram as inoculações dos vírus com o vetor foram destacadas das plantas, juntamente com as “clip-cages”, nos seguintes intervalos de tempo: 1, 2, 3 e 4 dias após o confinamento dos insetos virulíferos (Figura 2). Como controle positivo da invasão sistêmica, em alguns tomateiros a folha inoculada não foi destacada da planta. Após a retirada das folhas inoculadas foi feita a aplicação dos inseticidas Tiger 100 EC (Piriproxifem) e Cartap BR 500 (Cloridrato de cartape) para prevenir a posterior colonização do vetor. A confirmação da infecção, bem como da invasão sistêmica do(s) vírus nos tomateiros foi realizada 30 dias após a inoculação, através de RCA-PCR para o ToSRV e de RT-PCR para o ToCV. Para verificar possíveis contaminações das plantas dos experimentos, alguns tomateiros inoculados apenas com o ToSRV foram selecionados aleatoriamente e testados molecularmente para a detecção do ToCV, enquanto outros inoculados apenas com o ToCV foram selecionados e testados molecularmente para a detecção do ToSRV.

Figura 2: a) Tomateiro inoculado aos 30 dias após a emergência (DAE). Seta mostra a inoculação realizada no folíolo terminal da terceira folha. b) Detalhe da folha inoculada destacada da planta juntamente com a “clip-cage”.

3.10. Identificação dos períodos de latência e de incubação do ToSRV e do ToCV em infecções simples e mista em tomateiro

Plantas de tomate foram inoculadas com os vírus, separadamente e em mistura, 30 dias após a emergência. O PAA e o PAI foram realizados como descrito no item 3.4, adotando-se um PAI de 5 dias. Os tomateiros inoculados foram utilizados posteriormente como fontes de inóculo para a aquisição do(s) vírus por *B. tabaci* MEAM1, em ensaios de transmissão realizados em diferentes intervalos de tempo. As plantas fontes de inóculo foram usadas para a aquisição do(s) vírus pelo vetor aos 4, 8, 12 e 16 dias após a inoculação. Para a aquisição, 50 adultos de moscas-brancas livres de vírus foram confinados em “clip-cages”, colocadas sempre, para padronização do experimento, na folha mais nova totalmente desenvolvida das plantas fontes de inóculo, em cada intervalo de tempo de aquisição avaliado. Os insetos foram mantidos confinados nas plantas fontes de inóculo por um PAA de 24 h. Após o PAA, os insetos foram transferidos para outras clip-cages, colocadas no folíolo terminal da terceira folha de plantas saudáveis de tomate (plantas-teste). Para a inoculação, foram utilizados cerca de 30 insetos por planta, os quais foram mantidos confinados nas plantas-testes por um PAI de 5 dias. Em cada intervalo de aquisição avaliado, os insetos que adquiriram o(s) vírus em um tomateiro fonte de inóculo foram utilizados para a inoculação de uma planta-teste. Após a inoculação

as plantas-testes foram mantidas em gaiolas individualizadas dentro da casa de vegetação e foi feita a aplicação dos inseticidas Tiger 100 EC (Piriproxifem) e Cartap BR 500 (Cloridrato de cartape) para evitar possíveis contaminações entre as plantas do experimento (Figura 3). Dois experimentos foram conduzidos de acordo com os procedimentos descritos. Os períodos de incubação do ToSRV e do ToCV em tomateiro foram avaliados com base na manifestação dos sintomas, avaliada diariamente, apenas nas plantas utilizadas como fontes de inóculo. Os períodos de latência foram avaliados com base na transmissão do ToSRV e do ToCV por *B. tabaci* para as plantas-testes de tomate, após a aquisição dos vírus nos tomateiros fontes de inóculo, em diferentes intervalos de tempo após a inoculação. A confirmação da transmissão do(s) vírus foi realizada 30 dias após a inoculação, por RCA-PCR para o ToSRV e por RT-PCR para o ToCV. Para verificar possíveis contaminações das plantas dos experimentos, alguns tomateiros inoculados apenas com o ToSRV foram selecionados aleatoriamente e testados molecularmente para a detecção do ToCV, enquanto outros inoculados apenas com o ToCV foram selecionados e testados molecularmente para a detecção do ToSRV.

Posteriormente, um terceiro experimento foi realizado, diferindo dos anteriores apenas com relação aos intervalos de tempo para a aquisição do(s) vírus nas plantas fontes de inóculo por *B. tabaci* avaliados. Neste experimento, as aquisições dos vírus pelo vetor foram diárias, desde o 1º até o 8º dia após a inoculação, para os tomateiros inoculados com o ToSRV; do 4º até o 12º dia após a inoculação, para os tomateiros inoculados com o ToCV e do 1º até o 12º dia após a inoculação, para os tomateiros duplamente inoculados com o ToSRV e com o ToCV. As avaliações seguiram os mesmos critérios já descritos.

Figura 3: a) Gaiola utilizada para individualizar o tomateiro inoculado. b) Vista geral das plantas individualizadas em gaiolas após a inoculação.

3.11. Identificação dos períodos de incubação do ToSRV e do ToCV em infecções simples e mista em tomateiro, em função da idade da planta na época da inoculação

Plantas de tomate cv. Kada foram inoculadas com o ToSRV e o ToCV, separadamente e em conjunto, aos 15 e 30 dias após a emergência. Em cada época de inoculação avaliada, seis plantas de tomate foram inoculadas com os vírus isoladamente ou em mistura, constituindo os diferentes tratamentos. A aquisição do(s) vírus por *B. tabaci* MEAM1 foi feita como descrito no item 3.4. Para a inoculação foram utilizados 20 insetos por planta e adotado um PAI de 5 dias. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação, separando-se cada tratamento dentro de gaiolas protegidas com *voil* (Figura 4). Para facilitar a identificação dos sintomas, algumas plantas de tomate foram mantidas sadias e utilizadas para a comparação com os tomateiros infectados nos diferentes tratamentos. Periodicamente, foi realizada a aplicação dos inseticidas Tiger 100 EC (Piriproxifem) e Cartap BR 500 (Cloridrato de cartape) para evitar a presença do inseto vetor e possíveis contaminações de plantas nas gaiolas. Para a avaliação dos períodos de incubação, as plantas foram verificadas diariamente quanto à manifestação dos sintomas. A confirmação da infecção viral nos tomateiros inoculados foi realizada através da visualização dos sintomas e molecularmente por qPCR para a detecção do ToSRV e por RT-qPCR para a detecção do ToCV. Para verificar possíveis contaminações das plantas do experimento, alguns tomateiros inoculados apenas com o ToSRV foram selecionados aleatoriamente e testados

molecularmente para a detecção do ToCV, enquanto outros inoculados apenas com o ToCV foram selecionados e testados molecularmente para a detecção do ToSRV.

Figura 4: a) Gaiola utilizada para a individualização e confinamento das plantas de cada tratamento. b) Disposição das plantas de um tratamento no interior da gaiola. C) Vista geral de algumas gaiolas do experimento

4. RESULTADOS

4.1. Cinética da invasão sistêmica do ToSRV e do ToCV em infecções simples e mista em tomateiro

Os resultados da cinética da invasão sistêmica do ToSRV e do ToCV, em infecções simples e mista em tomateiro, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Invasão sistêmica do ToSRV e do ToCV, em infecções simples e mista em tomateiros, após a retirada da folha inoculada em diferentes intervalos de tempo (dias).

Fonte de inóculo	Vírus detectado	Nº de plantas infectadas/Nº de plantas inoculadas (% de infecção)					Folha não destacada (controle)
		1 dia	2 dias	3 dias	4 dias		
1º experimento							
ToSRV	ToSRV	7/9 (78)	4/7 (57)	6/8 (75)	6/8 (75)	2/3 (67)	
ToCV	ToCV	1/12 (8)	3/10 (30)	8/14 (57)	9/10 (90)	2/2 (100)	
Mista	ToSRV	2/10 (20)	0/8 (0)	3/8 (38)	1/8 (13)	0/2 (0)	
Mista	ToCV	1/10 (10)	1/8 (13)	2/8 (25)	0/8 (0)	0/2 (0)	
Mista	Ambos	3/10 (30)	6/8 (75)	3/8 (38)	7/8 (88)	2/2 (100)	
2º experimento							
ToSRV	ToSRV	6/8 (75)	5/8 (63)	5/8 (63)	5/6 (83)	2/2 (100)	
ToCV	ToCV	3/16 (19)	4/8 (50)	5/8 (63)	8/10 (80)	2/3 (67)	
Mista	ToSRV	4/8 (50)	2/8 (25)	1/8 (13)	1/6 (17)	0/3 (0)	
Mista	ToCV	0/8 (0)	2/8 (25)	2/8 (25)	1/6 (17)	0/3 (0)	
Mista	Ambos	4/8 (50)	0/8 (0)	4/8 (50)	4/6 (67)	3/3 (100)	

Os resultados obtidos demonstraram que o ToSRV e o ToCV, em infecções simples e mistas, moveram-se da folha inoculada e iniciaram o movimento sistêmico em apenas um dia após a inoculação (DAI) em tomateiro. Decorrido um dia da inoculação, a média de tomateiros infectados com o ToSRV foi de 77%. Essa porcentagem de plantas infectadas com o ToSRV manteve-se alta e com pouca variação após a retirada da folha inoculada aos 2, 3 e 4 DAI (Tabela 1).

A porcentagem de plantas infectadas com o ToCV aumentou a medida que a folha inoculada foi mantida por mais tempo nos tomateiros, variando, na média de dois experimentos, de 14% de infecção quando a folha inoculada foi retirada da

planta um DAI, para 85% de infecção nos tomateiros em que a folha inoculada foi retirada das plantas 4 DAI (Tabela 1).

Para os tomateiros duplamente infectados com o ToSRV e com o ToCV, o número de plantas infectadas com ambos os vírus também aumentou a medida em que as folhas inoculadas foram mantidas por mais tempo nos tomateiros (Tabela 1). A porcentagem média de infecção com ambos os vírus subiu de 40% para as plantas em que a folha inoculada foi retirada um DAI, para 78% de infecção quando a folha inoculada foi retirada 4 DAI (Tabela 1).

Nas plantas utilizadas como controles, nas quais as folhas inoculadas com os vírus não foram retiradas após a inoculação, a porcentagem de infecção com o ToSRV e com o ToCV, isoladamente ou em mistura, foi alta, variando de 67% a 100% (Tabela 1).

Não foram verificadas contaminações das plantas utilizadas nos experimentos. Os tomateiros selecionados que foram inoculados apenas com o ToSRV testaram negativos quanto a presença do ToCV por RT-PCR, e os tomateiros inoculados apenas com o ToCV foram negativos para a presença do ToSRV por RCA-PCR.

4.2. Períodos de latência e de incubação do ToSRV e do ToCV em infecções simples e mista em tomateiro

No apêndice A são apresentados os dados individualizados dos testes de transmissão de três experimentos realizados para a avaliação dos períodos de latência do ToSRV e do ToCV, em infecções simples e mista, em tomateiros. Na Tabela 2 são apresentados os dados conjuntos dos períodos de latência e de incubação desses vírus em infecções simples e mista, bem como o intervalo de tempo entre a latência e a incubação.

Tabela 2: Períodos de latência e de incubação do ToSRV e do ToCV em infecções simples e mista em tomateiros.

Experimento	Plantas fonte de inóculo	Período de latência (dias)	Período de incubação (dias)	Intervalo entre latência e incubação (dias)
ToSRV				
1	1	8	As*	nd**
	2	8	As	nd
	3	8	As	nd
	4	8	As	nd
	5	8	As	nd
2	6	4	As	nd
	7	8	As	nd
	8	4	As	nd
	9	4	As	nd
	10	4	As	nd
3	11	7	18	11
	12	8	18	10
	13	7	16	9
	14	7	18	11
	Média	7	18	11
ToCV				
1	1	16	34	18
	2	16	29	13
	3	12	34	22
	4	16	41	25
	5	12	35	23
2	6	12	29	17
	7	16	32	16
	8	12	32	20
	9	-	-	-
	10	16	31	15
3	11	11	25	14
	12	12	21	9
	13	7	25	18
	14	11	23	12
	Média	13	30	17
ToSRV + ToCV				
1	1	8/-***	As/28	-/-
	2	8/12	As/31	-/19
	3	8/16	As/27	-/11
	4	8/12	As/26	-/14
	5	8/16	As/34	-/18
2	6	8/16	As/37	-/21
	7	4/-	As/41	-/-
	8	4/-	As/41	-/-
	9	4/12	As/39	-/27
	10	4/8	As/37	-/29
3	11	5/6	16/23	11/17
	12	2/12	16/25	14/13
	13	2/8	16/25	14/17
	14	8/8	18/25	-/17
	Média	6/11	17/31	11/20

*As: plantas assintomáticas

** nd: não determinado

*** Lado esquerdo da barra representa os resultados obtidos para o ToSRV/lado direito da barra representa os resultados obtidos para o ToCV

-: planta não infectada

Os períodos latentes mínimo e médio do ToSRV em infecção simples em tomateiro foram de 4 e 7 dias, respectivamente (Tabela 2). O período de incubação do ToSRV nos tomateiros inoculados na primeira e segunda repetição do experimento não pôde ser determinado, uma vez que as plantas infectadas, por razões desconhecidas, não manifestaram sintomas típicos dos induzidos por esse vírus, como mosaico e enrugamento foliar (Tabela 2). É importante ressaltar que em todos os tomateiros assintomáticos a infecção pelo ToSRV foi confirmada por RCA-PCR. Na terceira repetição do experimento, os tomateiros infectados com o ToSRV manifestaram sintomas da infecção, tais como clareamento de nervuras, enrugamento foliar e algumas plantas também apresentaram mosaico nas folhas mais novas. O início dos sintomas variou de 16 a 18 dias após a inoculação (DAI). Em média, 11 dias antes da manifestação dos sintomas, os tomateiros infectados com o ToSRV passaram a servir como fonte de inóculo do vírus para a aquisição do vetor (Tabela 2).

Nos tomateiros duplamente inoculados com o ToSRV e com o ToCV, os períodos mínimo e médio de latência do ToSRV foram de 2 e 6 dias, respectivamente (Tabela 2). Nas plantas duplamente infectadas os tomateiros também apresentaram sintomas característicos ocasionados pela infecção por esse begomovírus apenas na terceira repetição do experimento (Tabela 2). O período de incubação do ToSRV em infecção mista em tomateiro variou de 16 a 18 dias, semelhante ao da infecção simples. Também nesse caso, 11 dias (média) antes da manifestação dos sintomas os tomateiros duplamente infectados passaram a servir como fonte de inóculo do ToSRV para a aquisição do vetor (Tabela 2).

O período latente mínimo do ToCV em infecção simples em tomateiro foi 7 dias e o período médio de latência foi 13 dias (Tabela 2). O período de incubação do ToCV em infecção simples em tomateiro variou de 23 a 41 dias, com uma média para o aparecimento dos sintomas de 30 dias. Em média, 17 dias antes da manifestação dos sintomas os tomateiros infectados com o ToCV passaram a servir como fonte de inóculo do vírus para a aquisição do vetor, (Tabela 2).

O período latente mínimo do ToCV em tomateiros também infectados com o ToSRV foi de 6 dias, com um período de latência médio de 11 dias (Tabela 2). Para as plantas com infecção mista, o início da expressão dos sintomas do ToCV variou de 23 a 41 dias, sendo a média, de 31 dias. Os tomateiros duplamente infectados

passaram a servir como fonte de inóculo do ToCV para a aquisição do vetor, em média, 20 dias antes da manifestação dos sintomas (Tabela 2).

As análises moleculares confirmaram que os tomateiros selecionados aleatoriamente e que foram inoculados apenas com o ToSRV ou com o ToCV estavam infectados apenas com os respectivos vírus, indicando que não ocorreram contaminações entre as plantas dos experimentos.

4.3. Períodos de incubação do ToSRV e do ToCV, em infecções simples e mista em tomateiro, em função da idade da planta na época da inoculação

Os resultados do início da manifestação dos sintomas (período de incubação) do ToSRV e do ToCV, em infecções simples e mista em tomateiro, em função da idade da planta na época de inoculação estão apresentados na Tabela 3. Neste experimento, todos os tomateiros inoculados com o ToSRV e com o ToCV, isoladamente ou em mistura, tiveram a infecção pelo(s) vírus confirmadas por qPCR e RT-qPCR, respectivamente. Também foi verificado molecularmente que os tomateiros inoculados com o ToSRV e com o ToCV estavam infectados apenas com os respectivos vírus, indicando que não houve contaminação entre as plantas do experimento.

Os sintomas da infecção simples do ToSRV nos tomateiros infectados aos 15 DAE iniciaram-se, em média, 23 dias após a inoculação (DAI), e incluíram um mosaico amarelo, que se desenvolveu inicialmente nas folhas mais novas, o qual posteriormente atingiu também as folhas mais velhas (Tabela 3; Figura 5). O período de incubação do ToSRV nos tomateiros inoculados aos 30 DAE foi, em média, 41 dias e os sintomas incluíram um mosaico amarelo fraco, que ocorreu apenas nas folhas mais novas (Tabela 3; Figura 6). Quatro plantas permaneceram assintomáticas, embora infectadas com o ToSRV, conforme detecção molecular (Tabela 3).

Tabela 3: Períodos de incubação do ToSRV e do ToCV, em infecções simples e mista, em tomateiros inoculados aos 15 e 30 dias após a emergência (DAE).

Planta	Período de incubação (dias)	
	15 DAE	30 DAE
ToSRV		
1	As*	As
2	As	46
3	22	36
4	23	41
5	As	41
6	23	As
Média	23	41
ToCV		
1	40	41
2	42	41
3	40	36
4	37	As
5	42	36
6	42	41
Média	41	39
ToSRV + ToCV		
1	21/42**	12/41
2	As/40	As/As
3	22/37	46/41
4	24/37	12/36
5	15/37	12/36
6	15/42	10/36
Média	19/39	18/38

* As: plantas assintomáticas

**lado esquerdo da barra representa o período de incubação do ToSRV/lado direito da barra representa o período de incubação do ToCV

O início da manifestação dos sintomas em tomateiros inoculados com o ToCV aos 15 DAE ocorreu, em média, aos 41 DAI (Tabela 3; Figura 5). A inoculação do ToCV em tomateiros mais velhos (30 DAE) não influenciou no tempo para a manifestação dos sintomas, os quais se iniciaram, em média, aos 39 DAI (Tabela 3). Os tomateiros infectados com o ToCV aos 15 DAE apresentaram inicialmente uma clorose internerval nas folhas mais velhas. Com o progresso da doença, a clorose intensificou e também se espalhou para as folhas mais novas. Com frequência, as plantas infectadas com o ToCV apresentaram manchas arroxeadas nas folhas, as quais também adquiriram um aspecto quebradiço e ficaram com os bordos foliares voltados para cima (Figura 5). Os tomateiros inoculados com o ToCV aos 30 DAE apresentaram uma clorose internerval fraca, com a presença de poucas manchas

arroxeadas (Figura 6). Uma planta permaneceu assintomática, embora infectada com o ToCV, conforme detecção molecular (Tabela 3).

Nos tomateiros duplamente inoculados com o ToSRV e com o ToCV aos 15 DAE, os sintomas do primeiro se iniciaram, em média, aos 19 DAI. Naqueles duplamente inoculados aos 30 DAE, a infecção mista com o ToCV reduziu o período de incubação do ToSRV, o qual foi, em média, 18 dias nos tomateiros duplamente inoculados e 41 dias nos tomateiros inoculados apenas com o begomovírus (Tabela 3). Os sintomas induzidos pelo ToSRV quando em infecção mista com o ToCV, independente da época de inoculação, foram um pouco mais intensos do que aqueles apresentados pelos tomateiros infectados apenas com o ToSRV, e incluíram o clareamento das nervuras e o desenvolvimento de um mosaico amarelo, principalmente nas folhas mais novas (Figuras 5 e 6).

Nos tomateiros duplamente inoculados com o ToSRV e o ToCV aos 15 DAE, os sintomas do ToCV apareceram, em média, aos 39 DAI. Nos tomateiros duplamente inoculados aos 30 DAE, o período de incubação médio do ToCV foi 38 dias, praticamente não diferindo do início dos sintomas dos tomateiros inoculados com apenas esse crinivírus na mesma época (Tabela 3). Em infecção mista, os sintomas induzidos pelo ToCV nos tomateiros inoculados aos 15 DAE foram semelhantes àqueles exibidos pelos tomateiros inoculados com apenas este crinivírus aos 15 DAE, e incluíram o aparecimento de uma clorose internerval forte, principalmente nas folhas mais velhas, a presença de manchas arroxeadas e o curvamento dos bordos foliares para cima. No entanto, quando os tomateiros foram inoculados aos 30 DAE, as plantas co-infectadas apresentaram sintomas mais intensos induzidos por esse crinivírus, em comparação com as plantas com infecção simples, nesta mesma época de inoculação (Figuras 5 e 6). Duas plantas duplamente inoculadas não exibiram sintomas do ToSRV, embora infectadas com esse begomovírus e uma planta não exibiu sintomas do ToCV, embora infectada com esse crinivírus, conforme detecções moleculares (Tabela 3).

Nos tomateiros inoculados com o ToSRV e com o ToCV separadamente, os testes moleculares comprovaram que as plantas estavam infectadas apenas com os respectivos vírus, não sendo observadas contaminações entre as plantas do experimento.

Figura 5: Sintomas apresentados por folhas de tomateiros infectados aos 15 dias após a emergência: a e e) sintomas do ToSRV em infecção simples; b e f) sintomas do ToCV em infecção simples; c) sintomas do ToSRV em infecção mista; d e g) sintomas do ToCV em infecção mista.

Figura 6: Sintomas apresentados por folhas de tomateiros infectados aos 30 dias após a emergência: a e e) sintomas do ToSRV em infecção simples; b e f) sintomas do ToCV em infecção simples; c e g) sintomas do ToSRV em infecção mista; d e h) sintomas do ToCV em infecção mista.

5. DISCUSSÃO

5.1. Cinética da invasão sistêmica do ToSRV e do ToCV em infecções simples e mista em tomateiro

Com apenas um dia após a inoculação o ToSRV e o ToCV moveram-se da folha inoculada e iniciaram o processo de invasão sistêmica no tomateiro. A porcentagem de infecção com ambos os vírus aumentou à medida que a folha inoculada permaneceu por mais tempo na planta (Tabela 1).

Um dos primeiros experimentos de movimento de vírus em plantas foi realizado por Samuel (1934), o qual fez uma avaliação minuciosa do movimento sistêmico do *Tobacco mosaic virus* (TMV) em plantas de tomate. Os resultados obtidos permitiram ao autor fazer as seguintes considerações: ao mover-se da folha inoculada o vírus foi inicialmente para as raízes do tomateiro; geralmente um dia após chegar às raízes o vírus foi transportado para as folhas do ponteiro; após a chegada nessas folhas, as demais folhas das plantas foram invadidas sucessivamente de cima para baixo e simultaneamente de baixo para cima até que a planta fosse completamente invadida pelo vírus; o tempo necessário para o vírus invadir completamente o tomateiro (infecção sistêmica) variou de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta na época da inoculação, o qual durou de 3 semanas a 2 meses. O autor também relatou que o TMV não moveu-se da folha inoculada antes do quarto dia após a inoculação em plantas de tomate (Samuel, 1934).

Vários fatores podem influenciar o tempo que os vírus demoram para invadir sistemicamente o hospedeiro: a espécie, a variedade e a idade do hospedeiro; a espécie viral; a supressão da defesa do hospedeiro induzida pelo vírus, como o silenciamento de RNA; a temperatura; o método e o local de inoculação (Hull, 2013). Outra informação que deve ser considerada é que a taxa de movimento dos vírus nas células do mesófilo e da epiderme são bem menores do que a taxa de movimento dos vírus através dos vasos do floema (Hull, 2013; Pereira-Carvalho, 2015). Desta maneira, para vírus que são inoculados em tecidos superficiais do hospedeiro, como as células do mesófilo e epiderme, o início do movimento sistêmico pode ser mais demorado, pois antes de chegarem aos vasos do floema

eles necessitam realizar o movimento célula a célula no hospedeiro, que ocorre através dos plasmodesmas e que é lento.

Kawakami et al. (2004) analisaram o movimento intra e intercelular do TMV através da marcação da proteína de movimento do vírus com GFP (*green fluorescent protein*). Constataram que o vírus moveu-se da primeira para a segunda célula infectada num período de 18-20 h após a inoculação, enquanto da segunda para a terceira célula ele necessitou de menos tempo, cerca de 2-4 h. Utilizando uma técnica de microinjeção em células do tricoma, seguida da remoção deste em diferentes intervalos de tempo, Derrick et al. (1993) relataram que o *Tobacco rattle virus* (TRV) necessitou de pelo menos 4 h para se mover da célula inicialmente infectada para a célula adjacente em *Nicotiana clevelandii*.

Gal-On et al. (1994) avaliaram a cinética da infecção do *Cucumber mosaic virus* (CMV) em abobrinha (*Cucurbita pepo*) através da inoculação do vírus nos cotilédones, os quais foram destacados das plantas em diferentes intervalos de tempo após a inoculação. Os resultados demonstraram que o CMV moveu-se do cotilédone inoculado e iniciou o processo de invasão sistêmica no intervalo entre 24-30 h após a inoculação. Em estudo semelhante com os begomovirus *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) e o *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), inoculados por biobalística em *N. benthamiana* e tomateiro, ambos foram capazes de moverem-se da folha inoculada 2 dias após a inoculação em *N. benthamiana* e 4 dias após a inoculação em tomateiro (Alves-Júnior et al., 2009). Estes resultados diferem dos obtidos para o ToSRV no presente trabalho, onde foi observado que este begomovírus possui a capacidade de mover-se da folha inoculada em apenas um dia após a inoculação em tomateiro. A divergência entre os resultados obtidos nestes experimentos pode ter ocorrido por diferenças na adaptação desses begomovírus ao tomateiro, ou pelos métodos de inoculação dos vírus utilizados. Como comentado por Hull (2013), o método de inoculação, por influenciar o local de deposição das partículas virais no interior do hospedeiro é um dos fatores que afetam o tempo que os vírus demoram para iniciar o processo de invasão sistêmica. Para vírus limitados ao floema, que são inoculados pelo inseto vetor diretamente nos elementos de vaso, os movimentos iniciais célula a célula podem não ocorrer e as partículas virais serem transportadas imediatamente a longa distância através do floema, quase que imediatamente após a inoculação. Este fato pode explicar o

rápido início do movimento sistêmico do begomovírus e do crinivírus em tomateiro observado no presente trabalho.

Infecções mistas de vírus em plantas também podem acarretar mudanças na cinética da invasão sistêmica dos vírus envolvidos. Alves-Júnior et al. (2009), ao avaliarem a movimentação sistêmica dos begomovírus ToRMV e ToYSV em *N. benthamiana* e tomateiro, encontraram interações positivas e negativas no movimento viral em diferentes estádios da infecção. Em plantas duplamente infectadas, quando a folha inoculada foi destacada aos 2 dias após a inoculação (DAI) em *N. benthamiana* e aos 4 DAI em tomateiro, houve uma redução na porcentagem de plantas infectadas com o ToYSV, em comparação com as plantas inoculadas apenas com este vírus. Nas plantas em que as folhas inoculadas foram destacadas aos 4 e 6 DAI em *N. benthamiana* e aos 8 e 12 DAI em tomateiro, as porcentagens de plantas infectadas com o ToYSV, em infecções simples ou mista, foram equivalentes, enquanto que a porcentagem de plantas infectadas com o ToRMV aumentou nas infecções mistas. Os autores sugeriram que a presença do ToRMV interferiu com os eventos iniciais do ciclo de infecção do ToYSV (replicação na célula inicialmente infectada ou no movimento célula a célula), mas o ToYSV facilitou a invasão sistêmica do ToRMV nos estádios posteriores, em ambos os hospedeiros. No presente trabalho, não se constatou efeitos positivos ou negativos na invasão sistêmica do ToSRV e do ToCV, em infecções mistas em tomateiro. Ambos iniciaram este processo um dia após a inoculação e a porcentagem de plantas infectadas com os vírus foi variável e crescente de acordo com os intervalos de retirada das folhas inoculadas (Tabela 1).

O ToCV é um crinivirus limitado ao floema e sua inoculação por *B. tabaci* ocorre principalmente durante a salivação do vetor neste tecido vascular (Medina et al., 2003; Maluta et al., 2017). O local de inoculação do ToSRV por *B. tabaci* ainda não foi avaliado com detalhes, no entanto, com base em estudos feitos com outros begomovírus, pode-se presumir que o principal local de inoculação do ToSRV por *B. tabaci* também seja os vasos do floema. Por exemplo, o comportamento alimentar da *B. tabaci* foi monitorado pela técnica “*electrical penetration graph*” (EPG) no processo de transmissão do begomovírus TYLCV em estudos realizados por Jiang et al. (2000). A eficiência de transmissão do vírus foi proporcional ao tempo de alimentação da *B. tabaci* nos vasos do floema, indicando ser este o principal local de inoculação do vírus.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que o ToSRV e o ToCV rapidamente movem-se da folha inoculada e iniciam o processo de invasão sistêmica em plantas de tomate. Está rápida movimentação provavelmente está relacionada com o local de inoculação dos vírus pelo vetor, como discutido anteriormente. Devido à alta porcentagem de plantas que foram infectadas sistemicamente com o ToSRV e o ToCV, quando a folha inoculada foi destacada apenas um dia após a inoculação, é possível que o movimento desses vírus para os vasos condutores do floema possa ocorrer em um intervalo de tempo inferior à 24 h. Trabalhos para elucidar essa hipótese devem ser desenvolvidos.

5.2. Períodos de latência e de incubação do ToSRV e do ToCV, em infecções simples e mista em tomateiro

O conhecimento dos períodos de latência e de incubação dos patógenos em seus hospedeiros possui grande importância para a elaboração de estratégias de manejo de doenças de plantas (Rimbaud et al., 2015). Período de latência pode ser definido como o tempo entre a inoculação e a infecciosidade do hospedeiro, ou seja, o momento em que a planta infectada se torna uma fonte de inóculo, e período de incubação, como o intervalo de tempo entre a inoculação do patógeno no hospedeiro até a manifestação dos sintomas (Vanderplank, 1963; Bergamin Filho e Amorim, 2011; Rimbaud et al., 2015).

O período de latência possui uma importância direta no desenvolvimento de epidemias porque determina o momento exato que o patógeno pode ser transmitido de um hospedeiro doente para outro sadio (Rimbaud et al., 2015). Corresponde a um parâmetro epidemiológico que influencia o progresso de doenças policíclicas no campo, pois quanto menor o período de latência, mais ciclos do patógeno por ciclo de cultivo do hospedeiro serão obtidos, aumentando desta maneira a velocidade com que a epidemia se desenvolve (Vanderplank, 1963; Bergamin e Amorim, 2011). Por esta característica, o período de latência é um parâmetro avaliado em programas de melhoramento genético na busca de fontes de resistência a doenças (Bergamin e Amorim, 2011).

Os períodos médios de latência do ToCV em infecções simples e mista em tomateiro foram de 13 e 11 dias, respectivamente. Também foi constatado que o ToCV pode ser transmitido de um tomateiro doente para outro sadio antes de

qualquer manifestação dos sintomas, pois os intervalos de tempo médios entre os períodos de latência e de incubação foram 17 dias em infecções simples e 20 dias em infecções mistas (Tabela 2).

O período de latência médio do ToSRV em tomateiro foi 7 dias em infecções simples e 6 dias em infecções mistas. Houve uma defasagem entre o início da infecciosidade do hospedeiro e o aparecimento de sintomas desse begomovírus, nos dois tipos de infecções, de 11 dias (Tabela 2).

Para determinar o período de latência do TMV em *N. tabacum*, Schramm e Engler (1958) inocularam uma série de plantas mecanicamente e, em diferentes intervalos de tempo após a inoculação as folhas mais novas foram retiradas das plantas inoculadas, maceradas, e o extrato obtido inoculado mecanicamente em *Nicotiana glutinosa*, hospedeiro que reproduz lesões locais quando infectado com o TMV. Através destes ensaios, constatou-se que o período de latência do TMV em *N. tabacum* foi 30 h. Outro fato interessante relatado por Schramm e Engler (1958) é que o período de latência do TMV também pode estar relacionado com o tempo que a partícula viral demora para desencapsular e iniciar o processo de replicação no hospedeiro. Comparando a inoculação do TMV em forma de partícula viral completa com aquela apenas do ácido ribonucleico do vírus, este último apresentou aumento na concentração no interior do hospedeiro cerca de 10-12 h antes daquela constatada na inoculação da partícula viral completa. Segundo os autores, o período latente é diretamente relacionado a concentração viral, uma vez que o vírus necessita atingir uma determinada concentração no hospedeiro infectado para poder ser transmitido ao hospedeiro sadio.

Diferente do que foi constatado no presente trabalho, da relativa longa defasagem de tempo entre os períodos de latência e de incubação do ToSRV e do ToCV em tomateiro, os períodos de incubação e de latência do *Plum pox virus* (PPV) em pessegueiro (*Prunus persica*) foram quase sincronizados. Os primeiros sintomas induzidos pelo PPV nas folhas de pessegueiro apareceram um dia antes destas tornarem-se infecciosas (Rimbaud et al., 2015). Os autores também relataram que a porcentagem de plantas de pêssago que se tornaram infecciosas aumentou em função do tempo após a inoculação. Aos 7 DAI, 35% (6/17) das plantas serviram como fonte de inóculo e permitiram a aquisição do vírus pelo vetor e a posterior transmissão para outras plantas sadias. Nos ensaios realizados aos 11 DAI e 18 DAI, 87% (21/24) e 96% (23/24) das plantas serviram como fontes de

inóculo e possibilitaram a transmissão do PPV para pessegueiros. O período de incubação do PPV em pessegueiro variou de 6 a 13 dias (Rimbaud et al., 2015).

A importância do período de incubação para doenças de plantas varia de acordo com interações específicas que existem entre os hospedeiros, os vetores e o homem (Rimbaud et al., 2015). O período de incubação é importante para doenças em que medidas de controle são baseadas em sintomas visíveis, como é o caso do roguing. Tal medida de controle interfere na disseminação do patógeno no campo através da redução do período infeccioso (Rimbaud et al., 2015).

A presença de sintomas também pode influenciar na atratividade do inseto vetor ao hospedeiro, o que pode ter efeito na disseminação do patógeno. Avaliando a preferência de alimentação do pulgão *Acyrtosiphon pisum* em plantas de feijão-fava (*Phaseolus lunatus*), sadias e infectadas separadamente com o *Pea enation mosaic virus* (PEMV), o *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) e o *Broad bean mottle virus* (BBMV), foi constatado que os afídeos preferiram se estabelecer nas plantas infectadas com as respectivas espécies virais, em comparação com as plantas sadias. Este fato ocorreu, provavelmente, devido às respostas visuais dos afídeos para o amarelecimento das plantas de feijão-fava que estavam infectadas e sintomáticas (Hodge e Powell, 2008). A presença dos sintomas induzidos pelo ToSRV e ToCV em tomateiro também influenciaram na etapa de seleção do hospedeiro por *B. tabaci* MEAM1 (Feres et al., 2016). Esses autores avaliaram a preferência deste vetor durante o pouso, em testes com livre chance de escolha, conduzidos em uma plataforma onde as pistas visuais eram as seguintes: folhas de tomateiros sadias (assintomáticas); folhas de tomateiros infectadas com o ToSRV ou ToCV (sintomáticas) e espaços de coloração marrom semelhantes à cor do solo. Constatou-se que os insetos virulíferos para os respectivos vírus ou avirulíferos tiveram preferência por pousarem nas folhas infectadas. Neste mesmo estudo foi avaliada a preferência de insetos avirulíferos para folhas de tomateiro sadias ou infectadas com o ToSRV ou ToCV, na presença ou ausência de luz. No escuro, os insetos pousaram indistintamente em folhas infectadas ou sadias. No entanto, na presença de luz os insetos demonstraram preferência por folhas infectadas com os respectivos vírus do que àquelas sadias, indicando a importância das pistas visuais para o processo de seleção do hospedeiro por *B. tabaci* MEAM1. No entanto, em outro estudo de avaliação da preferência para pouso de *B. tabaci* MEAM1 em tomateiros sadios ou infectados com o ToSRV ou ToCV, Maluta (2017) obteve

resultados distintos. Insetos virulíferos para o ToCV pousaram indistintamente em plantas de tomate infectadas com esse crinivírus ou sadias, enquanto insetos avirulíferos preferiram tomateiros não infectados. Por outro lado, os insetos avirulíferos ou virulíferos para o ToSRV preferiram pousar em tomateiros sadios, do que naqueles infectados com esse begomovírus. Pereira (2016) ao avaliar a atratividade de *B. tabaci* MEAM1 por clones de batateira cvs. Ágata e Bach 4, sadios ou infectados com o ToCV, constatou que as plantas infectadas foram mais atrativas para os insetos após quatro e seis horas do início das avaliações. Entretanto, estes moveram-se indistintamente para plantas infectadas ou sadias nas avaliações feitas após 12, 24 e 72 h da liberação dos insetos.

Além das pistas visuais, pistas olfativas também podem influenciar na escolha do hospedeiro pelo vetor. Fereres et al. (2016) relataram que as concentrações dos voláteis emitidos por tomateiros sadios ou infectados com o ToSRV ou ToCV afetaram o comportamento de *B. tabaci* MEAM1. Insetos virulíferos para o ToCV moveram-se indistintamente para tomateiros sadios ou infectados com esse crinivírus, enquanto insetos avirulíferos tiveram preferência por plantas sadias. Insetos virulíferos para o ToSRV apresentaram preferência por tomateiros sadios do que os infectados com esse begomovírus. No entanto, insetos avirulíferos moveram-se indistintamente para as plantas infectadas ou sadias. Em estudo semelhante feito em batateira cv. Ágata, sadias ou infectadas com o ToCV, verificou-se diferença no tipo e nas concentrações dos voláteis emitidos pelas plantas infectadas e sadias, e que este fato afetou a preferência dos insetos. Na ausência de luz, quando os insetos se orientaram somente pelos voláteis emitidos pelas plantas, eles preferiram se estabelecer em tomateiros infectados com o ToCV. Na presença de luz os insetos moveram-se indistintamente para plantas infectadas ou sadias (Pereira, 2016).

Com relação aos dados obtidos no presente trabalho sobre os períodos de incubação do ToCV em tomateiros, constatou-se que ele foi relativamente longo, 21-41 dias após a inoculação (Tabelas 2 e 3). Este resultado está de acordo com o de outros relatos para esse crinivírus. Wintermatel e Wisler (2006) e Mansilla-Córdova (2015) relataram que os sintomas induzidos pelo ToCV em tomateiro geralmente só aparecem 3 a 4 semanas após a inoculação. Barbosa et al. (2008) observaram o início dos sintomas do ToCV em tomateiros após 65 dias da inoculação. Em ensaios no campo, conduzidos por Calaça (2011), os primeiros sintomas do ToCV em tomateiro foram visualizados tardiamente, entre 46 e 86 dias

após o transplante das mudas no campo, sendo mais frequente a manifestação dos sintomas por volta dos 60 dias após o transplante. No entanto, como naquele estudo os tomateiros foram infectados naturalmente no campo, o início dos sintomas não permitiu a identificação precisa do período de incubação, uma vez que o momento da infecção dos tomateiros com o ToCV não foi identificado. Estas diferenças quanto ao período de incubação do ToCV em tomateiro podem ser explicadas pelo fato dos sintomas induzidos pelo vírus serem influenciados pelas condições ambientais, cultivares e idade das plantas no momento da inoculação (Fortes et al., 2012; García-Cano et al., 2010). No presente trabalho, verificou-se que o período de incubação do ToCV não foi influenciado pela idade da planta no momento da inoculação (Tabela 3). Apesar dos sintomas iniciarem praticamente na mesma época, houve diferença com relação à intensidade. No geral, os sintomas induzidos pelo ToCV foram mais intensos nas plantas inoculadas precocemente, aos 15 DAE, do que naquelas inoculadas aos 30 DAE.

O longo período de incubação do ToCV faz com que a diagnose visual da doença seja feita tardiamente, piorando o panorama, principalmente se a infecção ocorrer ainda na fase de produção das mudas, as quais serão transplantadas no campo antes mesmo de manifestarem os sintomas. Consequentemente, essas plantas logo servirão de fontes de inóculo e contribuirão para a disseminação dos vírus no campo, fato este já alertado por Wintermantel et al. (2008) e Tzanatekis et al. (2013).

Para os begomovírus, de acordo com Inoue-Nagata et al. (2016b) a idade do hospedeiro, o nível de resistência da cultivar e as condições ambientais podem influenciar o desenvolvimento de sintomas. No presente trabalho, verificou-se que a idade do tomateiro no momento da inoculação afetou o período de incubação do ToSRV. Os sintomas apareceram, em média, 18 dias antes e foram ligeiramente mais intensos nas plantas inoculadas aos 15 DAE do que naquelas inoculadas aos 30 DAE (Tabela 3; Figuras 5 e 6). O efeito da idade das plantas no momento da inoculação sobre o início do desenvolvimento de sintomas do ToSRV em tomateiro também foi estudado por Rodrigues (2017). Ao inocular mudas de tomateiro após 20, 30, 40, 50 e 60 dias da semeadura, constatou-se que plantas inoculadas precocemente exibiram sintomas mais cedo do que aquelas inoculadas tardiamente. Apesar dessa diferença para o início do desenvolvimento dos sintomas, no final das avaliações, não foram constatadas diferenças nas taxas de infecção dos tomateiros

e na severidade dos sintomas em função da idade da planta no momento da inoculação. Outros fatores avaliados por Rodrigues (2017) que influenciaram o período de incubação do ToSRV em tomateiro foram o número de insetos virulíferos usados para a inoculação e o nível de resistência da cultivar. Inoculando as mudas com 1, 5, 10, 15, 30 e 60 insetos, foi observado que, geralmente, a inoculação com o maior número de insetos provocou o aparecimento dos sintomas de maneira mais rápida e de forma mais intensa. Os sintomas induzidos pelo ToSRV na cultivar resistente (BRS Sena) foram menos severos e apareceram tardiamente em comparação com aqueles exibidos pela cultivar suscetível (Heinz-9553).

O efeito das infecções mistas nos períodos de incubação do ToSRV e do ToCV em tomateiros, por sua vez, foi variável. Observou-se no presente trabalho que nos tomateiros duplamente inoculados aos 15 DAE, o período médio de incubação do ToSRV foi reduzido para 19 dias, contra 23 dias em infecções simples com esse begomovírus (Tabela 3). Esta redução foi muito mais acentuada nas plantas inoculadas aos 30 DAE, pois o período médio de incubação reduziu de 41 dias em infecções simples para 18 dias em infecções mistas (Tabela 3). Em infecção mista os sintomas do ToSRV também foram ligeiramente mais intensos do que os induzidos em plantas infectadas apenas com esse begomovírus (Figuras 5 e 6). Com relação ao ToCV, verificou-se que o período de incubação não foi afetado pela co-infecção com o ToSRV (Tabela 3). No entanto, houve variações na intensidade dos sintomas. Tomateiros inoculados aos 15 DAE, em infecções simples ou mista, apresentaram sintomas semelhantes (Figuras 5 e 6). Nos tomateiros inoculados aos 30 DAE, os sintomas do ToCV em infecções mistas foram mais intensos do que em infecções simples (Figuras 5 e 6).

Outros estudos já relataram o fato de sintomas induzidos por vírus serem mais intensos em plantas co-infectadas. Avaliando o sinergismo entre os begomovírus *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) e *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) em pimentão (Rentería-Cannet et al., 2011), entre o ToRMV e o ToYSV em tomateiro (Alves-Júnior et al., 2009) e entre o *African cassava mosaic virus* (ACMV) e o *East African cassava mosaic virus* (EACMV) em *N. benthamiana* (Fondong et al., 2000) foi constatado que nas infecções mistas os sintomas foram mais severos do que nas respectivas plantas inoculadas com cada um deles isoladamente. O mesmo efeito também foi relatado nas interações entre o potyvirus, *Turnip mosaic virus* (TuMV) com o crinivirus, *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV)

em *N. benthamiana* (Wang et al., 2009), e em plantas de tomate duplamente infectadas com o ToCV e o tospovírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (García-Cano et al., 2006).

A maior severidade dos sintomas em infecções mistas geralmente é relacionada ao aumento na concentração de um ou de ambos os vírus envolvidos na interação. Este fato pode explicar os sintomas mais fortes do ToSRV quando em infecção mista com o ToCV observado no presente trabalho. Analisando a concentração do ToSRV e do ToCV, quando inoculados isoladamente ou em mistura, em duas cultivares de tomateiro (Santa Clara e Kada) e em duas épocas de inoculação (30 e 45 DAE), Bampi et al. (2017) verificaram que a concentração do ToSRV nas plantas duplamente infectadas, independente da cultivar ou da época de inoculação, foi sempre maior do que em plantas infectadas apenas com esse begomovírus. Para o ToCV, os autores relataram que a concentração desse crinivírus não foi influenciada pela idade da planta no momento da inoculação e nem pela infecção mista com o ToSRV. Em outro estudo avaliando a concentração do ToCV em infecção mista, desta vez com o crinivírus *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV), em *Physalis wrightii* e *N. benthamiana*, Wintermantel et al. (2008) observaram que a concentração do ToCV foi menor em infecção mista em ambos hospedeiros. Por outro lado, a concentração do TICV em infecção mista aumentou em *N. benthamiana* e diminuiu em *Physalis wrightii*.

O ToCV possui um forte supressor do silenciamento de RNA, a proteína p22, e isto corresponde a uma característica conservada entre os isolados dessa espécie (Landeo-Ríos et al., 2015). Este fato pode beneficiar os vírus que ocorrem em infecções mistas com o ToCV, os quais acabam tirando vantagens da atividade supressora da defesa do hospedeiro induzida por esse crinivírus. Isto pode explicar o aumento na concentração do ToSRV em tomateiro (Bampi et al., 2017) e do TICV em *N. benthamiana* (Wintermantel et al., 2008) quando em co-infecção com o ToCV.

A discrepância nos períodos de incubação do ToSRV e ToCV encontradas entre os experimentos do presente trabalho (Tabelas 2 e 3) podem estar associadas às variações nas condições experimentais. Entre as principais diferenças estão as casas de vegetação em que os experimentos foram conduzidos, a temperatura e a luminosidade dentro das casas de vegetação, a forma de irrigação, os tipos de gaiolas e o volume de substrato nos vasos em que as plantas foram mantidas.

Devido a estas diferenças fica difícil saber o motivo para a variação do início dos sintomas do ToSRV e do ToCV que ocorreram entre os experimentos.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que após a infecção os tomateiros rapidamente podem servir como fonte de inóculo e contribuir para a disseminação do ToSRV e do ToCV no campo. Além disso, foi constatado que a aquisição e subsequente transmissão dos vírus podem ocorrer bem antes da manifestação dos sintomas. Estes fatos reforçam a importância epidemiológica do tomateiro como fonte de inóculo de ambos os vírus no campo. Diante disso, medidas de manejo para essas viroses devem ter entre as prioridades, atrasar a época de infecção dos tomateiros. O atraso na época de infecção tem como objetivos reduzir os danos acarretados pelo ToSRV e pelo ToCV na cultura do tomateiro e também reduzir o tempo de atuação das plantas infectadas como fontes de inóculo no campo, seja como inóculo primário, contribuindo para a transmissão de ambos os vírus entre cultivos de tomateiros próximos, ou como inóculo secundário, contribuindo para a transmissão dos vírus entre as plantas de um mesmo cultivo. Pesquisas futuras podem avaliar o efeito da idade das plantas no momento da infecção sobre o período de latência do ToSRV e do ToCV em tomateiro. Caso o atraso na época de infecção reflita no aumento do período de latência desses vírus, medidas de manejo que evitem infecções precoces serão ainda mais benéficas.

REFERÊNCIAS

- Alves-Júnior, M., Alfenas-Zerbini, P., Andrade, E. C., Esposito, D. A., Silva, F. N., da Cruz, A. C. F., & Zerbini, F. M. Synergism and negative interference during co-infection of tomato and *Nicotiana benthamiana* with two bipartite begomoviruses. **Virology**, v. 387, n. 2, p. 257-266, 2009.
- Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas. **Tomate lidera crescimento e lucratividade no setor de hortaliças**. <http://www.abcsem.com.br/releases/284/tomate-lidera-crescimento-e-lucratividade-no-setor-de-hortalicas->. Acesso em: 07/08/2017.
- Bampi, D., Favara, G. M., Rezende, J. A. M. Effect of single and mixed infections of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) and *Tomato chlorosis virus* (ToCV) on plant development and virus titer. **APS Annual Meeting**, San Antonio, Texas, 2017.
- Barbosa, J. C., Barreto, S. D. S., Inoue-Nagata, A. K., & Rezende, J. A. M. Characterization and experimental host range of a Brazilian tomato isolate of *Tomato severe rugose virus*. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 9, p. 644-646, 2011a.
- Barbosa, J. C., Barreto, S. S., Inoue-Nagata, A. K., Reis, M. S., Firmino, A. C., Bergamin Filho, A., & Rezende, J. A. M. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, n. 6, p. 440, 2009.
- Barbosa, J. C., Costa, H., Gioria, R., & Rezende, J. A. M. Occurrence of *Tomato chlorosis virus* in tomato crops in five Brazilian states. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 4, p. 256-258, 2011b.
- Barbosa, J. C., Rezende, J. A., & Amorim, L. Temporal dynamics of *Tomato severe rugose virus* and *Bemisia tabaci* in tomato fields in São Paulo, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 164, n. 1, p. 1-10, 2016.
- Barbosa, J. C., Teixeira, A. P. M., Moreira, A. G., Camargo, L. E. A., Filho, A. B., Kitajima, E. W., & Rezende, J. A. M. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Brazil. **Plant Disease**, v. 92, n. 12, p. 1709-1709, 2008.
- Barbosa, J. C., Teixeira, L. D. D., & Rezende, J. A. M. First report on the susceptibility of sweet pepper crops to *Tomato chlorosis virus* in Brazil. **Plant Disease**, v. 94, n. 3, p. 374-374, 2010.
- Barreto, S. S., Hallwass, M., Aquino, O. M., & Inoue-Nagata, A. K. A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato-infecting begomovirus in central Brazil. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 436-444, 2013.
- Bergamim Filho, A., Amorim, L. **Epidemiologia de doenças de plantas**. In: Amorim, L., Rezende, J. A. M., & Bergamin Filho, A. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. **São Paulo**, p. 107-117, 2011.

- Bergamin Filho, A., Inoue-Nagata, A. K., Bassanezi, R. B., Belasque, J., Amorim, L., Macedo, M. J. C. Barbosa, L. Willocquet & Savary, S. The importance of primary inoculum and area-wide disease management to crop health and food security. **Food Security**, v. 8, n. 1, p. 221-238, 2016.
- Bergougnoux, V. The history of tomato: from domestication to biopharming. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 170-189, 2014.
- Bezerra-Agasie, I. C., Ferreira, G. B., de Avila, A. C., & Inoue-Nagata, A. K. First report of *Tomato severe rugose virus* in chili pepper in Brazil. **Plant Disease**, v. 90, n. 1, p. 114-114, 2006.
- Boiteux, L. S., Melo, P. C. T. & Vilela, N. J. **Tomate para Consumo in natura**. In: Albuquerque, A. C. S, Silva, A. G, eds. Desenvolvimento da Agricultura Tropical: Quatro Décadas de Inovações Tecnológicas, Institucionais e Políticas. Brasília, DF: Embrapa 1: 557- 567, 2008.
- Brown JK, Fauquet CM, Briddon RW, Zerbini FM, Moriones E, Navas-Castillo J. Family Geminiviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (Eds.) **Virus Taxonomy. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London UK. EI, 2012.
- Brown, J. K., Zerbini, F. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J. C., & Malathi, V. G. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. **Archives of Virology**, v. 160, n. 6, p. 1593-1619, 2015.
- Calaça, H.A. **Dinâmica temporal e espacial da virose causada por *Tomato chlorosis* em tomateiro**. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2011.
- Contrim, M. A. D. A., Krause-Sakate, R., Narita, N., Zerbini, F. M., & Pavan, M. A. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. **Summa Phytopathologica**, p. 300-303, 2007.
- Castillo-Urquiza, G. P., Beserra, J. E. A., Bruckner, F. P., Lima, A. T., Varsani, A., Alfenas-Zerbini, P., & Zerbini, F. M. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, v. 153, n. 10, p. 1985-1989, 2008.
- De Barro, P. J., Scott, K. D., Graham, G. C., Lange, C. L., & Schutze, M. K. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bemisia tabaci*. **Molecular Ecology Resources**, v. 3, n. 1, p. 40-43, 2003.
- De Marchi, B.R. **Associação de begomovírus e crinivírus com *Bemisia tabaci* espécie New World 2 e *Trialeurodes vaporariorum***. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2014.

- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. A plant DNA miniprep: version II. *Plant molecular biology reporter*, 1(4), 19-21. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.
- Derrick, P. M., Barker, H., & Oparka, J. Increase in plasmodesmatal permeability during cell-to-cell spread of *Tobacco rattle virus* in Individually inoculated cells. **American Society of Plant Physiologists**, v. 4, p. 1405-1412, 1993.
- Dovas, C. I., Katis, N. I., & Avgelis, A. Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. **Plant Disease**, v. 86, n. 12, p. 1345-1349, 2002.
- EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization PM 7/118 (1) – **Tomato chlorosis virus and Tomato infectious chlorosis virus**. Bulletin OEPP/EPPO (3), 462–4, 2013.
- Esquivel, A. F. **Identificação de hospedeiros alternativos do Tomato chlorosis virus**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2016.
- Fereres, A., Peñaflor, M. F. G., Favaro, C. F., Azevedo, K. E., Landi, C. H., Maluta, N. K., Bento, J. M. B. & Lopes, J. R. Tomato infection by whitefly-transmitted circulative and non-circulative viruses induce contrasting changes in plant volatiles and vector behaviour. **Viruses**, v. 8, n. 8, p. 225, 2016.
- Fernandes, F. R., de Albuquerque, L. C., de Britto Giordano, L., Boiteux, L. S., de Ávila, A. C., & Inoue-Nagata, A. K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, v. 36, n. 1, p. 251-258, 2008.
- Firmino, A. C., Yuki, V. A., Moreira, A. G., & Rezende, J. A. M. *Tomato yellow vein streak virus*: relationship with *Bemisia tabaci* biotype B and host range. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 6, p. 793-799, 2009.
- Fortes, I. M., Moriones, E., & Navas-Castillo, J. *Tomato chlorosis virus* in pepper: prevalence in commercial crops in southeastern Spain and symptomatology under experimental conditions. **Plant Pathology**, v. 61, n. 5, p. 994-1001, 2012.
- Fondong, V. N., Pita, J. S., Rey, M. E. C., De Kochko, A., Beachy, R. N., & Fauquet, C. M. Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 1, p. 287-297, 2000.
- Fonseca, M. E. N., Boiteux, L. S., Abreu, H., Nogueira, I., & Pereira-Carvalho, R. C. *Physalis angulata*: a new natural host of *Tomato chlorosis virus* in Brazil. **Plant Disease**, v. 97, n. 5, p. 692-692, 2013.

- Fonseca, M. E. N., Boiteux, L. S., Lima, M. F., Mendonça, J. L., Costa, A. F., Fontes, M. G., & González-Arcos, M. First Report of *Tomato chlorosis virus* Infecting Eggplant and Scarlet Eggplant in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, n. 4, p. 867-868, 2016.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Disponível em <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso em 25/07/2017.
- Freitas, D. M. S., Nardin, I., Shimoyama, N., Souza-Dias, J. A. C., & Rezende, J. A. M. (2012). First report of *Tomato chlorosis virus* in potato in Brazil. **Plant Disease**, v. 96, n. 4, p. 593-593, 2012.
- Freitas, D. M. S. **Tomato severe rugose virus (ToSRV) e Tomato chlorosis virus (ToCV): relações com a Bemisia tabaci biótipo B e eficiência de um inseticida no controle da transmissão do ToSRV**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2012.
- García-Cano, E., Navas-Castillo, J., Moriones, E., & Fernández-Muñoz, R. Resistance to *Tomato chlorosis virus* in wild tomato species that impair virus accumulation and disease symptom expression. **Phytopathology**, v. 100, n. 6, p. 582-592, 2010.
- García-Cano, E., Resende, R. O., Fernández-Muñoz, R., & Moriones. Synergistic interaction between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* results in breakdown of resistance in tomato. **Phytopathology**, v. 96, n. 11, p. 1263-1269, 2006.
- Gal-On, A., Kaplan, I., Roossinck, M. J., & Palukaitis, P. The kinetics of infection of zucchini squash by cucumber mosaic virus indicate a function for RNA 1 in virus movement. **Virology**, v. 205, n. 1, p. 280-289, 1994.
- Giordano, L. D. B., Fonseca, M. D. N., Silva, J. D., Inoue-Nagata, A. K., & Boiteux, L. S. Efeito da infecção precoce por Begomovirus com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 815-8, 2005.
- Gouvêa, M. M., Freitas, D. M., Rezende, J. A., Watanabe, L. F., & Lourenção, A. L. Bioassay of insecticides on mortality of *Bemisia tabaci* biotype B and transmission of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) on tomatoes. **Phytoparasitica**, v. 45, n. 1, p. 95-101, 2017.
- Guimarães, L. R. P., Nozaki, D. N., Moura, M. F., Spadotti, D. M. D. A., Mituti, T., Krause-Sakate, R., & Pavan, M. A. Fungicide application can improve production of tomato coinfecting with Begomovirus and Crinivirus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 6, p. 435-442, 2017.
- Hodge, S., & Powell, G. Do plant viruses facilitate their aphid vectors by inducing symptoms that alter behavior and performance?. **Environmental Entomology**, v. 37, n. 6, p. 1573-1581, 2008.

Hull, Roger. **Plant Virology**. Academic press, 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>. Acesso em 25/07/2017.

ICTV on line, International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso em 28/07/2017.

Inoue-Nagata, A. K., Carvalho, C. M., Zerbini, F. M., Rezende, J. A. M., Krause-Sakate, R., Nagata, T. Vírus transmitidos por moscas-brancas no Brasil: vetores, principais doenças e manejo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v 24, p. 7-29, 2016a.

Inoue-Nagata, A. K., Lima, M. F., & Gilbertson, R. L. A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 8-18, 2016b.

Jiang, Y. X., de Blas, C., Barrios, L., & Fereres, A. Correlation between whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) feeding behavior and transmission of *Tomato yellow leaf curl virus*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 93, n. 3, p. 573-579, 2000.

Kawakami, S., Watanabe, Y., & Beachy, R. N. *Tobacco mosaic virus* infection spreads cell to cell as intact replication complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 16, p. 6291-6296, 2004.

Kil, E. J., Lee, Y. J., Cho, S., Auh, C. K., Kim, D., Lee, K. Y., & Lee, S. Identification of natural weed hosts of *Tomato chlorosis virus* in Korea by RT-PCR with root tissues. **European journal of plant pathology**, v. 142, n. 2, p. 419-426, 2015.

Kranz, J. **Comparison of epidemics**. *Annual Review of Phytopathology*, 12(1), p. 355-374, 1974.

Landeo-Ríos, Y. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., & Cañizares, M. C. Genetic diversity and silencing suppression activity of the p22 protein of *Tomato chlorosis virus* isolates from tomato and sweet pepper. **Virus genes**, v. 51, n. 2, p. 283-289, 2015.

Lima, A. T. M., Pereira, C. D. O., Alfenas, P. F., Paula, M. B., Mello, R. N., & Zerbini, F. M. Lima, A. T. M. et al. Primeiro relato de infecção pelo geminivírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em tomateiro no estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. S224, 2006.

Liu, H. Y., Wisler, G. C., & Duffus, J. E. Particle lengths of whitefly-transmitted criniviruses. **Plant Disease**, v. 84, n. 7, p. 803-805, 2000.

- Macedo, M. A. **Progresso temporal e espacial de begomovirose e crinivirose em tomateiro**. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016.
- Macedo, M. A., Barreto, S. S., Costa, T. M., Maliano, M. R., Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., & Inoue-Nagata, A. K. First report of common beans as a non-symptomatic host of *Tomato severe rugose virus* in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 1, p. 261, 2017a.
- Macedo, M. A., Barreto, S. S., Hallwass, M., & Inoue-Nagata, A. K. 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**, v. 39, n. 6, p. 449-452, 2014.
- Macedo, M. A., Costa, T. M., Barbosa, J. C., Pereira, J. L., Michereff-Filho, M., Gilbertson, R. L., & Bergamin Filho, A. Temporal and spatial dynamics of begomovirus disease in tomatoes in central Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, n. 4, p. 529-538, 2017b.
- Macedo, M. A., Michereff Filho, M., Navas-Castillo, J., & Inoue-Nagata, A. K. Host range and whitefly transmission efficiency of *Tomato severe rugose virus* and *Tomato golden vein virus* in tomato plants. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, n. 6, p. 405-409, 2015.
- Makishima, N & Melo, W. F. O rei das hortaliças. Cultivar hortaliças e frutas, 2004. Disponível em http://www.grupocultivar.com.br/ativemanager/uploads/arquivos/artigos/hf29_rei.pdf. Acesso em: 07/08/2017.
- Maluta, N. K. P., Garzo, E., Moreno, A., Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., Lopes, J. R. S., & Fereres, A. Stylet penetration activities of the whitefly *Bemisia tabaci* associated with inoculation of the crinivirus *Tomato chlorosis virus*. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 6, p. 1515-1520, 2017.
- Maluta, N. K. P. **Respostas biológicas e comportamentais de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) a plantas de tomate infectadas com *Tomato chlorosis virus* (ToCV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e atividades estiletares associadas à inoculação de ToCV**. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2017.
- Mansilla-Córdova, P. J., Bampi, D., Rondinel-Mendoza, N. V., Melo, P. C. T., Lourenção, A. L., Rezende, J. A. M. Screening tomato genotypes for resistance and tolerance to *Tomato chlorosis virus*. **Plant Pathology**, 2017.
- Mansilla-Córdova, P. J. **Resistência de genótipos de tomateiro à infecção com o *Tomato chlorosis virus* e tolerância à doença**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2015.

- Marubayashi, Julio Massaharu. **Interação de *Tomato severe rugose virus* com *Bemisia tabaci* biótipo B, a acessos de *Capsicum* spp. e ocorrência de espécies de mosca-branca no Estado de São Paulo**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2009.
- Mascia, T., & Gallitelli, D. Synergies and antagonisms in virus interactions. **Plant Science**, v. 252, p. 176-192, 2016.
- Medina, V., Rodrigo, G., TIAN, T., Juarez, M., Dolja, V. V., Angeles Achon, M., & Falk, B. W. Comparative cytopathology of *Crinivirus* infections in different plant hosts. **Annals of Applied Biology**, v. 143, n. 1, p. 99-110, 2003.
- Naika, S., Jeude, J. L. J., Goffau, M., Hilmi, M., Dam, B. A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização. Wageningen: Agromisa, p. 99, 2006.
- Navas-Castillo, J., Camero, R., Bueno, M., & Moriones, E. Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain associated with infections of *Tomato chlorosis virus*. **Plant Disease**, v. 84, n. 8, p. 835-837, 2000.
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., & Sánchez-Campos, S. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual review of Phytopathology**, v. 49, p. 219-248, 2011.
- Nozaki, D. N. **Estudos biológicos e moleculares de begomovírus infectando pimentão (*Capsicum annuum*) no estado de São Paulo**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2007.
- Nozaki, D. N., Krause-Sakate, R., Hasegawa, J. M., Cezar, M. A., Dziuba, P. H., & Pavan, M. A. First report of *Tomato severe rugose virus* infecting pepper plants in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 321-321, 2006.
- Orfanidou, C. G., Pappi, P. G., Efthimiou, K. E., Katis, N. I., & Maliogka, V. I. Transmission of *Tomato chlorosis virus* (ToCV) by *Bemisia tabaci* Biotype Q and Evaluation of Four Weed Species as Viral Sources. **Plant Disease**, v. 100, n. 10, p. 2043-2049, 2016.
- Pereira-Carvalho, R. C. **Movimento de vírus na planta**. In: Medeiros, R. B., Resende, R., Carvalho., Dianese, E., Costa, C. L., Sgro, J. Y. Virologia Vegetal – Conceitos, fundamentos, classificação e controle. Ed. UnB, p. 255-278, 2015.
- Pereira, L. S. **Interações *Bemisia tabaci* biótipo B e *Tomato chlorosis virus* em clones de batata**. Tese (Doutorado) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2016.
- Reis Filgueira, F. A. **Novo manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, UFV, 2008.

- Rentería-Canett, I., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., & Rivera-Bustamante, R. F. Geminivirus mixed infection on pepper plants: synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 104, 2011.
- Rimbaud, L., Dallot, S., Delaunay, A., Borron, S., Soubeyrand, S., Thébaud, G., & Jacquot, E. Assessing the mismatch between incubation and latent periods for vector-borne diseases: the case of sharka. **Phytopathology**, v. 105, n. 11, p. 1408-1416, 2015.
- Rocha, C. S., Castillo-Urquiza, G. P., Lima, A. T., Silva, F. N., Xavier, C. A., Hora-Júnior, B. T., & Alfenas-Zerbini. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. **Journal of Virology**, v. 87, n. 10, p. 5784-5799, 2013.
- Rocha, K. C., Sakate, R. K., Pavan, M. A., Kobori, R. F., Gioria, R., & Yuki, V. A. (2012). Yield losses caused by *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) in pepper cultivars. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 1, p. 87-89, 2012.
- Rodrigues, C. S. **Efeito do número de indivíduos de Bemisia tabaci e idade de mudas de tomateiros na infecção pelo begomovírus Tomato severe rugose virus**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2017.
- Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., & Maxwell, D. P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v. 77, n. 4, p. 340-347, 1993.
- Samuel, G. The movement of tobacco mosaic virus within the plant. **Annals of Applied Biology**, v. 21, n. 1, p. 90-111, 1934.
- Santos, C. D. G., Avila, A. C. D., & Resende, R. D. O. Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 664-673, 2003.
- Silva, T. N. Z., Favara, G. M., Rezende, J. A. M. Efeito de três inseticidas no controle das transmissões primária e secundária do *Tomato chlorosis virus* (ToCV) para tomateiro por *Bemisia tabaci* biótipo B. **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Uberlândia-MG, 2017.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n. 6, p. 651-701, 1994.
- Schramm, G., & Engler, R. The latent period after infection with tobacco mosaic virus and virus nucleic acid. **Nature**, v. 181, n. 4613, p. 916-917, 1958.
- Souza, Tadeu Araujo de. **Tomato chlorosis virus, hospedeiras alternativas e interação com tospovírus em tomateiro**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

- Souza-Dias, J. A. C., Sawazaki, H. E., Pernambuco-Fo, P. C. A., Elias, L. M., & Maluf, H. *Tomato severe rugose virus*: another begomovirus causing leaf deformation and mosaic symptoms on potato in Brazil. **Plant Disease**, v. 92, n. 3, p. 487-487, 2008.
- Toloy, R. S., Mituti, T., Freitas, D. M. S., Maluta, N. K. P., Silva, T. N. Z., Lopes, J. R. S., Fereres, A. & Rezende, J. A. M. Features of the relationship between *Tomato severe rugose* begomovirus and *Bemisia tabaci* MEAM1 reveal that the virus is acquired during a probe lasting only one minute. **European Journal of Plant Pathology**, p. 1-7, 2017.
- Tzanetakis, I. E., Martin, R. R., & Wintermantel, W. M. Epidemiology of criniviruses: an emerging problem in world agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013.
- Vanderplank, J. E. **Plant diseases: epidemics and control**. Elsevier, 1963.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**, v. 10, n. 4, p. 506-513, 1991.
- Wang, J., Turina, M., Medina, V., & Falk, B. W. Synergistic interaction between the Potyvirus, *Turnip mosaic virus* and the Crinivirus, *Lettuce infectious yellows virus* in plants and protoplasts. **Virus Research**, v. 144, n. 1, p. 163-170, 2009.
- Wintermantel, W. M., & Wisler, G. C. Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus*. **Plant Disease**, v. 90, n. 6, p. 814-819, 2006.
- Wintermantel, W. M., Cortez, A. A., Anchieta, A. G., Gulati-Sakhuja, A., & Hladky, L. L. Co-infection by two criniviruses alters accumulation of each virus in a host-specific manner and influences efficiency of virus transmission. **Phytopathology**, v. 98, n. 12, p. 1340-1345, 2008.
- Wisler, G. C., Li, R. H., Liu, H. Y., Lowry, D. S., & Duffus, J. E. *Tomato chlorosis virus*: a new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. **Phytopathology**, v. 88, n. 5, p. 402-409, 1998.

Apêndice A

Transmissão do ToSRV e do ToCV, separados e em mistura, por *B. tabaci* MEAM1 para tomateiro, após aquisição em tomateiros em diferentes dias após a inoculação (DAI). 1º e 2º experimentos.

Experimento	Plantas fontes de inóculo	Aquisição dos vírus por <i>B. tabaci</i> /DAI			
		4	8	12	16
ToSRV					
1	1	-	+	+	-
	2	-	+	+	+
	3	-	+	+	+
	4	-	+	+	+
	5	-	+	+	+
2	6	+	+	+	+
	7	-	+	+	+
	8	+	+	+	+
	9	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
ToCV					
1	1	-	-	-	+
	2	-	-	-	+
	3	-	-	+	+
	4	-	-	-	+
	5	-	-	+	+
2	6	-	-	+	-
	7	-	-	-	+
	8	-	-	+	-
	9	-	-	-	-
	10	-	-	-	+
ToSRV+ToCV					
1	1	-/-*	+/-	+/-	-/-
	2	-/-	+/-	+/+	+/-
	3	-/-	+/-	+/-	+/+
	4	-/-	+/-	+/+	+/+
	5	-/-	+/-	+/-	+/+
2	6	-/-	+/-	+/-	+/+
	7	+/-	+/-	+/-	+/-
	8	+/-	+/-	+/-	+/-
	9	+/-	-/-	+/+	+/-
	10	+/-	+/+	+/-	+/-

* lado esquerdo da barra representa a transmissão do ToSRV/lado direito da barra representa a transmissão do ToCV.

-: ausência de infecção. +: presença de infecção confirmada molecularmente

Transmissão do ToSRV e do ToCV, separados e em mistura, por *B. tabaci* MEAM1 para tomateiro, após aquisição em tomateiros em diferentes dias após a inoculação (DAI). 3º experimento.

Experimento	Plantas fontes de inóculo	Aquisição dos vírus por <i>B. tabaci</i> /DAI											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3		ToSRV											
	11	-	-	-	-	-	-	+	+	na*	na	na	na
	12	-	-	-	-	-	-	-	+	na	na	na	na
	13	-	-	-	-	-	-	+	+	na	na	na	na
	14	-	-	-	-	-	-	+	+	na	na	na	na
3		ToCV											
	11	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	12	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	13	na	na	na	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	14	na	na	na	-	-	-	-	-	-	-	+	-
3		ToSRV+ToCV											
	11	-/-**	-/-	-/-	-/-	+/-	-/+	-/-	-/+	-/-	+/-	+/-	+/+
	12	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/+
	13	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	-/+	-/-	-/-	+/-	+/+
	14	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+	+/-	-/-	+/+

* intervalo de aquisição não avaliado

** lado esquerdo da barra representa a transmissão do ToSRV/lado direito da barra representa a transmissão do ToCV.

-/: ausência de infecção. +/: presença de infecção confirmada molecularmente