

**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fitopatologia**

Caracterização molecular e biológica de um begomovírus isolado de tomateiro, *Lycopersicon esculentum* Mill., no estado de Goiás e sua interação com o vetor *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring

Carmem Dolores Gonzaga Santos

Tese apresentada ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Fitopatologia.

Brasília/DF, julho de 2001

Aos meus pais José Alves e Maria de Lourdes,
Aos meus irmãos e irmãs,
Ao meu esposo Orlando Moreira,
Às minhas filhas Samara Lou e Sarah Luisa,
A um anjinho,
Aos que prezam pela vida,
dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador do homem, dos vegetais, dos insetos e dos vírus.

Ao Prof. Renato de Oliveira Resende da UNB, além da orientação e ensinamentos, pela disponibilidade, confiança, incentivo e apoio essenciais.

A Universidade Federal do Ceará pela liberação para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Incentivo e Capacitação de Docentes e Técnicos (PICDT) da CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Hortaliças e a Universidade de Brasília por disponibilizar suas instalações para a execução deste trabalho.

À Dra Isabel Cristina Bezerra pela concessão do uso de equipamentos do Laboratório de Biologia Molecular e de Radioisótopos, pelo apoio e acompanhamento nos trabalhos iniciais na área de Biologia Molecular.

À Dra Alice Inoue Nagata pelas valiosas sugestões e auxílio nas atividades relativas à biologia molecular, pela atenção, disponibilidade e amizade.

Ao Dr. Antônio Carlos de Ávila pela concessão do uso de equipamentos do Laboratório de Virologia Vegetal, pelas providências na obtenção de químicos e material fotográfico.

Ao Dr. André Dusi, pelas sugestões e auxílio nas análises de resultados da interação vírus-vetor e pelo apoio concedido na locação dos experimentos em insetários.

Ao Dr. Tatsuya Nagata por sugestões nas etapas relativas ao estudo da interação vírus- vetor.

Ao Prof. Cláudio Lúcio Costa pelas valiosas sugestões na condução dos experimentos com o vetor, pelas críticas e considerações finais.

Ao Prof. Ricardo Brillhante da UNB e Dr. Josias Corrêa de Faria do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão pelas críticas e sugestões concedidas.

À Dra Geni Litni Villas-Bôas por ceder a população inicial da mosca branca e pelas orientações sobre a biologia do inseto.

À Dra. Simone da Graça Ribeiro, pela colaboração nos ensaios com radioisótopos.

Ao Dr. Willians Moita , pela colaboração na análise estatística.

À Dra. Nirlene Junqueira, Dr. Nosomu Makishima e Dr. Leonardo Giordano pelas informações referentes à hortaliça estudada.

Aos colegas Marcelo Eiras do Instituto Biológico de Campinas e Ana Maria da UNB pelo interesse e colaboração para a obtenção do seqüenciamento do DNA viral.

Aos técnicos de Laboratórios de Virologia Vegetal e Biologia Molecular, Lúcio Flávio, Élcio Vieira e Hamilton por todo o apoio concedido na realização deste trabalho.

Aos bibliotecários da Embrapa/Hortaliça Fátima Bezerra e Paulo Fraga pela colaboração com empréstimos de materiais e revisão de citações bibliográficas.

A César Júnior do laboratório de informática da Embrapa Hortaliças pela colaboração com a organização de fotos no corpo da tese e na produção dos slides de seminários.

Aos professores dos Departamentos de Fitopatologia e de Biologia Celular da UNB pelos ensinamentos e disponibilidade.

Ao coordenador de pós-graduação Prof. Juvenil Enrique Cares pela atenção e colaboração para o cumprimento das atividades exigidas.

Ao Prof. João Bosco Pitombeira, Chefe do Departamento de Fitotecnia da UFC, por todo o apoio concedido para a conclusão deste trabalho.

Aos colegas que conheci e aos amigos que tive oportunidade de fazer, Laudete, Ana Maria, Cleusa Mitiko, Fernanda Lovato, Herickson, Denise Dornello, Valácia, Murillo Lobo, Flávio Santana, Daniele, Paulo de Tarso, Péricles, Rose, Marília, Ana Carla, Ivani, Reginaldo, Adilson, Fernando Aragão.

Às amigas Dalka e Edneusa pela importante amizade, conselhos e incentivos.

À Ana Paula pela preciosa contribuição e dedicação.

Aos meus familiares por todo o apoio e, em particular, à minha irmã Conceição de Maria e a Miranda Júnior, pilstras durante toda a minha permanência em Brasília, presença constante nos diversos momentos e circunstâncias vivenciadas, pela amizade e disponibilidade, sempre.

Ao meu esposo Orlando Moreira pelo amor, paciência, incentivo, força, estímulo, colaboração, cuidados e pelas perdas e ganhos partilhados.

Às minhas filhas Samara Lou e Sarah Luisa que souberam esperar a minha atenção.

A Maria.

ÍNDICE

Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Quadros.....	xi
Relação de membros da família <i>Geminiviridae</i> citados no texto.....	xii
1 – Resumo.....	01
2 – Abstract.....	03
3 - REVISÃO DE LITERATURA	
3.1. A cultura do tomate.....	05
3.2 Impacto econômico das viroses provocadas por <i>Begomovirus</i>	
No Mundo.....	06
No Brasil.....	11
3.3. Família <i>Geminiviridae</i>	
3.3.1. Taxonomia e nomenclatura.....	13
3.3.2. Composição e organização genômica.....	16
3.3.3. Função genômica.....	19
3.3.4. Replicação.....	21
3.3.5. Variabilidade genética em <i>Geminiviridae</i>	22
3.3.6. Movimento viral.....	24
3.3.7. Desenvolvimento de sintomas.....	26
3.3.8. Diagnose viral e identificação de espécies.....	27
3.4. Mosca branca, vetor de <i>Begomovirus</i>	
3.4.1. Histórico.....	28
3.4.2. Dispersão da mosca branca	
No mundo.....	31
No Brasil.....	32
3.4.3. Taxonomia e biologia da mosca branca.....	34
3.4.4. Plantas hospedeiras e sintomas causados pela praga.....	36
3.4.5. Importância econômica da mosca branca.....	38
3.5. Relação vírus-vetor-planta.....	39
3.5.1. Tipo de transmissão.....	39
3.5.2. Aspectos da aquisição e transmissão do vírus.....	41
4. Objetivos do trabalho.....	46
CAPÍTULO I – Caracterização molecular de um begomovírus isolado de tomate coletado no estado de Goiás.....	47
1. Introdução.....	48
2. Objetivos.....	50
3. Material e métodos.....	50
3.1. Origem do vírus, diagnose e manutenção do isolado GO-ANPL.....	50

3.2. Caracterização molecular do isolado GO-ANPL.....	51
3.2.1 Extração do DNA viral.....	51
3.2.2. Amplificação dos fragmentos do DNA A e do DNA B via PCR.....	53
3.2.3. Purificação e clonagem do DNA no vetor pGEM-T.....	56
3.2.4. Transformação de células competentes de <i>E. coli</i> com o vetor pGEM-T recombinante.....	57
3.2.5. Seleção dos clones recombinantes e purificação do plasmídeo.....	58
3.2.6. Digestão com enzimas de restrição.....	58
3.2.7. Seleção de clones para seqüenciamento.....	59
3.3. Análise e comparação da seqüência do isolado GO-ANPL com a de outros begomovírus.....	60
4. Resultados.....	60
4.1. Obtenção dos fragmentos do DNA A do isolado GO-ANPL.....	60
4.2. Seleção de clones recombinantes.....	61
4.3. Análise da seqüência do isolado GO-ANPL e comparação com outros begomovírus já descritos no Brasil e no Mundo.....	62
5. Discussão	76
CAPÍTULO II. Determinação do círculo de hospedeiros do begomovírus isolado de tomateiro e estudo da sua interação com a mosca branca, <i>Bemisia argentifolii</i>	82
♦ Determinação do círculo de hospedeiros do begomovírus isolado de tomateiro.....	83
1. Introdução.....	84
2. Objetivos.....	86
3. Material e Métodos.....	86
3.1. Origem do isolado de begomovírus.....	86
3.2. Determinação do círculo de hospedeiros do GO-ANPL.....	87
3.3. Círculo de hospedeiros do isolado DF-BR2.....	89
3.4. “Dot-Blot” para confirmação dos resultados.....	90
3.4.1. Preparo da membrana para hibridização.....	90
3.4.2. Lavagem da membrana.....	90
3.4.3. Pré-hibridização da membrana.....	91
3.4.4. Marcação radioativa do fragmento de PCR e hibridização.....	91
4. Resultados.....	91
5. Discussão.....	92
♦ Estudo da interação begomovírus isolado de tomate e a mosca branca, <i>Bemisia argentifolii</i>	107
1. Introdução.....	108
2. Objetivos.....	111
3. Material e Métodos.....	112
3.1. Origem do isolado de begomovírus.....	112
3.2. Manutenção das moscas brancas avirulíferas.....	112
3.3. Procedimento adotado para os ensaios de aquisição do vírus pela mosca branca.....	114
3.4. Procedimento adotado para as transmissões do vírus pelas moscas brancas.....	115

3.5. Detecção do GO-ANPL nas amostras foliares infectadas.....	118
3.6. Determinação do período de acesso de aquisição do vírus pelo vetor, PAA.....	120
3.7. Determinação do período de acesso de inoculação do vírus pelo vetor, PAI.....	120
3.8. Determinação do período de latência do vírus no vetor, PL.....	121
3.9. Detecção do vírus no vetor.....	122
3.9.1. Detecção do vírus em ovos e ninfas do 1º ao 4º ínstar da mosca branca.....	122
3.9.2. Detecção da retenção do vírus no inseto a partir da ninfa do 1º ínstar.....	123
3.9.3. Detecção do vírus em adultos com diferentes PAA.....	123
3.9.4. Detecção de transmissão do vírus à progênie da mosca branca.....	124
3.9.5. Detecção da passagem transtadial do vírus.....	124
3.10. Extração de DNA a partir da mosca branca e PCR das amostras.....	124
3.11. Transmissibilidade do vírus pelos adultos.....	126
4. Resultados.....	127
4.1. Período de acesso de aquisição do vírus, PAA.....	127
4.2. Período de acesso de inoculação do vírus, PAI.....	131
4.3. Período de latência.....	133
4.4. Detecção do begomovírus no vetor.....	135
5. Discussão.....	141
6. Conclusões.....	152
BIBLIOGRAFIA.....	155

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1	09
Exemplo de sintomas de infecção provocada por begomovírus em tomateiro no campo – mosaico com áreas cloróticas, enrolamento foliar e subdesenvolvimento da planta.	
Figura 2	18
Organização genômica de <i>Mastrevirus</i> , de <i>Curtovirus</i> e de <i>Begomovirus</i> do Novo Mundo. <i>Topocuvirus</i> tem organização similar a <i>Curtovirus</i> , exceto pelo gene V3.	
Figura 3	35
Adultos de mosca branca <i>Bemisia argentifolii</i>	
Figura 4	35
Ovos, ninfas do primeiro ao quarto ínstar de mosca branca, <i>Bemisia argentifolii</i> Bellows e Perring, 1994.	
 <u>Capítulo I</u>	
Figura 1	52
Tomate 'Santa Clara' infectado com o isolado GO-ANPL exibindo sintomas de mosaico e clorose internerval (A) e enrolamento foliar (B).	
Figura 2	55
Regiões de anelamento dos oligonucleotídeos, no DNA A e no DNA B, usados para amplificação, via PCR, de fragmentos do isolado GO-ANPL e os respectivos tamanhos de fragmentos amplificados	
Figura 3	61
Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR do isolado GO-ANPL amplificados com os pares de oligonucleotídeos.	

Figura 4	61
Análise eletroforética em gel de agarose da digestão, com a endonuclease <i>EcoRI</i> , de cinco plasmídeos contendo os fragmentos de 2,1 kb do GO-ANPL, amplificados com o par de oligonucleotídeos PAL1v1978/CP2; M= Marcador DNA Marker.	
Figura 5	64
Seqüência de nucleotídeos do DNA A do isolado GO-ANPL amplificado com o par de oligonucleotídeos PAL1v1978/CP2.	
Figura 6	65
Provável organização genômica circular e organização linear do DNA A do isolado GO-ANPL, com a localização, orientação e tamanho dos fragmentos seqüenciados.	
Figura 7	69
Alinhamento de parte da região comum do GO-ANPL, DF-BR2 e TRMV, destacando o TATA box da ORF Rep em negrito, e a seqüência repetida, provável sítio de ligação da proteína associada a replicação, Rep, sublinhada. A posição da região repetida na seqüência do isolado GO-ANPL está indicada com setas.	
Figura 8	70
Alinhamento dos 70 aminoácidos deduzidos da região N- terminal da Capa Proteica do isolado GO-ANPL, do DF-BR2 e do TRMV. Os aminoácidos diferentes estão destacados em verde (GO-ANPL), em vermelho demais vírus	
Figura 9	72
Árvore filogenética (obtida via programa Clustal W 1.8) resultante do alinhamento das seqüências de aminoácidos da região N-terminal da capa proteica de GO-ANPL e de outros begomovírus do Brasil e de outros países. As distâncias verticais são arbitrárias e as horizontais refletem o percentual de aminoácidos diferentes entre os vírus dos ramos distintos	
Figura 10	73
Árvore filogenética (obtida via programa Clustal W 1.8) resultante do alinhamento das seqüências de aminoácidos da região Rep de GO-ANPL com outros begomovírus do Brasil e de países. As distâncias verticais são arbitrárias e as horizontais refletem o percentual de aminoácidos diferentes entre os vírus dos ramos distintos.	
Figura 11	74
Árvore filogenética (obtida via programa Clustal W 1.8) resultante do alinhamento da região intergênica (RI) de GO-ANPL com outros begomovírus de tomate do Brasil. As distâncias verticais são arbitrárias e as horizontais refletem o percentual de nucleotídeos diferentes entre os vírus dos ramos distintos.	
Figura 12	75
Árvore filogenética (obtida via programa Clustal W 1.8) resultante do alinhamento das seqüências de 1.300 nucleotídeos de GO-ANPL com outros begomovírus ocorrentes no Brasil. As distâncias verticais são arbitrárias e as horizontais refletem o percentual de nucleotídeos diferentes entre os vírus dos ramos distintos.	
Capítulo II	
Figura 1	88
Inoculação de muda de tomate com a mosca branca utilizando gaiola de tubo PVC revestida em sua parte superior com voal.	
Figura 2	96
Tomateiro 'Rutgers' infectada com GO-ANPL apresentando sintomas de mosaico, amarelecimento e enrolamento foliar.	

Figura 3	96
<i>Nicotiana benthamiana</i> infectada com o GO-ANPL exibindo sintomas de mosaico.	
Figura 4	97
<i>Datura stramonium</i> infectada com o isolado GO-ANPL exibindo pontos cloróticos sistêmicos.	
Figura 5	97
<i>Nicandra physalodes</i> infectada com o isolado GO-ANPL com sintomas de mosaico na brotação.	
Figura 6	98
Detecção autoradiográfica em amostras foliares de plantas infectadas com o GO-ANPL	
Figura 7	100
<i>Datura stramonium</i> infectada pelo isolado, DF-BR2, apresentando sintomas de mosaico	
Figura 8	100
<i>Nicotiana benthamiana</i> infectada com o isolado DF-BR2 exibindo sintomas de mosaico com bolhosidade e redução do crescimento.	
Figura 9	113
Insetário onde foram mantidas as moscas brancas avirulíferas em repolho e couve (A), folhas de couve com numerosas moscas brancas (B).	
Figura 10	114
Aspirador utilizado na coleta de moscas brancas.	
Figura 11	116
Tubos falcon contendo folhas de tomate infectadas e moscas brancas, utilizados nos ensaios para determinação do período de acesso de aquisição do vírus, PAA e do período de latência, PL.	
Figura 12	116
Folhas de tomate infectadas e recipiente onde foram mantidas juntamente com moscas brancas para a aquisição do vírus para posterior uso na determinação do período de acesso de inoculação do vírus, PAI.	
Figura 13	117
Mudas de tomate usadas para inoculação com o vetor, mostrando folhas cotiledonares com ou sem o filme plástico.	
Figura 14	117
Caixa de papelão revestida com duplex preto utilizada para a coleta de grupos de moscas para inoculação.	
Figura 15	119
Muda inoculada, ponteira e gaiola confeccionada com copo plástico descartável de 300 ml.	
Figura 16	119
Bandejas plásticas com mudas de tomate 'Santa Clara' inoculadas com o GO-ANPL e separadas conforme o tratamento (A); telado onde permaneceram as plantas inoculadas (B).	
Figura 17	128
Sintomas de mosaico e deformação foliar observados em mudas de tomate, 15 dias após inoculação do GO-ANPL com a mosca branca.	
Figura 18	129
Resultado da análise da detecção por "dot-blot" do isolado do begomovírus GO-ANPL em amostras foliares de tomate 'Santa Clara' inoculadas pela mosca branca após diferentes períodos de acesso de aquisição do vírus, PAA, e um período de acesso de inoculação, PAI, fixo de 48h.	

Figura 19	130
Transmissão do begomovírus GO-ANPL por <i>Bemisia argentifolii</i> para tomate 'Santa Clara' após diferentes períodos de acesso de aquisição (PAA) do vírus pelo vetor e empregando-se um período acesso de inoculação (PAI) fixo de 48h.	
Figura 20	132
Resultado do “dot blot” do begomovírus GO-ANPL em amostras foliares de tomate 'Santa Clara' inoculadas pela mosca branca após período de acesso de aquisição do vírus, PAA, fixo de 72h e diferentes períodos de acesso de inoculação, PAI. Linhas de 1 a 9 – amostras de plantas com PAI de 15' a 24h; S= planta sadia , T = Tomate infectado.	
Figura 21	133
Transmissão do begomovírus GO-ANPL por <i>Bemisia argentifolii</i> para tomate 'Santa Clara' após diferentes períodos de acesso de inoculação, PAI, pelo vetor que adquiriu o vírus por um período fixo de 72h em tomate infectado.	
Figura 22	137
Análise eletroforética em gel de agarose de amostras de mosca branca submetidas a PCR.	
Figura 23	137
Análise eletroforética em gel de agarose de amostras de mosca branca submetidas a PCR.	
Figura 24	138
Análise eletroforética em gel de agarose de amostras de mosca branca submetidas a PCR. Southern blot do mesmo material realizado com sonda preparada com DNA A do begomovírus GO-ANPL (B).	

LISTAS DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1	66
Percentual de homologia das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de regiões do DNA A do isolado GO-ANPL comparado com a de begomovírus caracterizados em outros países.	
Tabela 2	67
Percentual de homologia das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos do DNA A do isolado GO-ANPL comparado com outros begomovírus de tomate caracterizados no Brasil.	
Tabela 3	68
Homologia do DNA A entre o GO-ANPL, DF-BR2 e TRMV.	

Capítulo II

Tabela 1	94
Sintomas em solanáceas infectadas com o begomovírus isolado de tomate, GO-ANPL, mediante transmissão mecânica e, ou com <i>Bemisia argentifolii</i> .	
Tabela 2	95
Relação das espécies vegetais não infectadas com o begomovírus isolado de tomate, GO-ANPL, mediante transmissão mecânica e, ou com <i>Bemisia argentifolii</i> .	
Tabela 3	99
Resultados das inoculações com o isolado DF-BR2 efetuadas mecanicamente ou empregando o vetor, <i>B. argentifolii</i> , em plantas da família Solanaceae.	

Tabela 4	129
Percentual de plantas de tomate 'Santa Clara' infectadas com o GO-ANPL após diferentes períodos de acesso de aquisição do vírus (PAA) pela mosca branca, <i>B. argentifolii</i> , com período de acesso de inoculação (PAI) fixo de 48h.	
Tabela 5	132
Percentual de plantas de tomate 'Santa Clara' infectadas com o GO-ANPL após diferentes períodos de acesso de inoculação do vírus, PAI, pela mosca branca, <i>B. argentifolii</i> , com período de acesso de inoculação, PAA, fixo de 72h.	
Tabela 6	134
Transmissão do isolado GO-ANPL em diferentes combinações de período de acesso de aquisição do vírus (PAA) e período acesso de inoculação do vírus (PAI) na determinação do período de latência em <i>B. argentifolii</i> .	
Tabela 7	136
Percentual de transmissão do GO-ANPL para tomate 'Santa Clara' em diferentes tempos após aquisição do vírus pelo vetor na determinação do período de latência	
Tabela 8	139
Resultados da detecção do begomovírus isolado de tomate, GO-ANPL em diferentes estádios de desenvolvimento de <i>B. argentifolii</i> em planta infectada, em planta não hospedeira e com períodos de acesso de aquisição do vírus (PAA) variados.	
Tabela 9	151
Comparação de alguns resultados de parâmetros adotados no estudo da relação vírus-vetor envolvendo a mosca branca, <i>Bemisia</i> spp, e diferentes begomovírus que infectam tomate, algodão e cucurbitáceas em outros países com os resultados obtidos para o begomovírus GO-ANPL.	

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	54
Oligonucleotídeos empregados na amplificação de fragmentos do DNA A e do DNA B do isolado GO-ANPL	
Quadro 2	59
Oligonucleotídeos internos do DNA A utilizados no seqüenciamento dos clones do GO-ANPL	

RELAÇÃO DE MEMBROS DA FAMÍLIA GEMINIVIRIDAE CITADOS NO TEXTO

ESPÉCIE	ACRÔNIMO
	(Conforme a nomenclatura sugerida por Fauquet & Mayo, 1999 aprovada no ICTV)
<i>Abutilon mosaic virus</i>	AbMV
<i>African cassava mosaic virus</i>	ACMV
<i>Bean dwarf mosaic virus</i>	BDMV
<i>Bean golden mosaic virus</i>	BGMV
<i>Bean yellow dwarf virus</i>	BeYDV
<i>Beet curly top virus</i>	BCTV
<i>Cabbage leaf curl virus</i>	CabLCV
<i>Chino del tomate virus</i>	CdTV
<i>Chloris striate mosaic virus</i>	CSMV
<i>Cotton leaf curl virus</i>	CLCuV
<i>Cotton leaf crumple virus</i>	CLCrV
<i>Euphorbia mosaic virus</i>	EuMV
<i>Havana tomato virus</i>	HTV
<i>Honeysuckle yellow vein mosaic virus</i>	HYVMV
<i>Horseradish curly top virus</i>	HrCTV
<i>Lettuce infectious yellows virus</i>	LIYV
<i>Maize streak virus</i>	MSV
<i>Mungbean yellow mosaic</i>	MYMV
<i>Potato yellow mosaic virus</i>	PYMV
<i>Serrano golden mosaic virus</i>	SGMV
<i>Sida golden mosaic virus</i>	SiGMV
<i>Sinaloa tomato leaf curl virus</i>	STLCV
<i>Squash leaf curl virus</i>	SLCV
<i>Sweet potato leaf curl virus</i>	SPLCV
<i>Taino tomato mottle virus</i>	TToMoV
<i>Texas pepper virus</i>	TPV
<i>Tobacco leaf curl virus</i>	TLCV

Cont.

<i>Tobacco yellow dwarf virus</i>	TYDV
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	TCMV
<i>Tomato chlorotic vein virus</i>	TCIVV
<i>Tomato crinkle virus</i>	ToCV
<i>Tomato dwarf leaf mosaic virus</i>	TDLCV
<i>Tomato golden mosaic virus</i>	TGMV
<i>Tomato infectious yellows virus</i>	TIYV
<i>Tomato leaf crumple virus</i>	TLCrV
<i>Tomato leaf curl virus</i>	ToLCV
<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>	TMoLCV
<i>Tomato mottle virus</i>	ToMoV
<i>Tomato pseudo-curly top virus</i>	TPCTV
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	TRMV
<i>Tomato severe mosaic virus</i>	TSMV
<i>Tomato yellow dwarf virus</i>	ToYDV
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	TYLCV
<i>Tomato yellow mosaic virus</i>	ToYMV
<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	ToYVSV
<i>Wheat dwarf virus</i>	WDV

1- RESUMO

Os begomovírus, vírus da família *Geminiviridae* transmitidos por mosca branca, têm emergido como sérios patógenos de culturas agrônomicas e hortícolas em regiões tropicais e subtropicais de muitos países em todo o mundo. A partir da década de 80, têm aumentado os relatos da disseminação da mosca branca, *Bemisia argentifolii*, e de begomovírus provocando impacto devastador nas regiões em que ocorrem. No Brasil, estes patógenos têm sido limitantes para a produção de tomate (*Lycopersicon esculentum*) em várias áreas de cultivo com incidência crescente desde 1994.

No presente trabalho, plantas de tomate exibindo sintomas de infecção provocada por vírus como mosaico, clorose internerval, enrolamento do limbo foliar e redução do crescimento, foram coletadas em lavouras de tomate indústria em Anápolis-GO. O vírus foi identificado como pertencente ao gênero *Begomovirus* mediante técnica de PCR usando oligonucleotídeos específicos que amplificaram fragmentos dos componentes A e B do genoma viral. No capítulo I são apresentados os resultados da caracterização molecular e no capítulo II, os dados da determinação do círculo de hospedeiros e da investigação da relação do begomovírus com o vetor *Bemisia argentifolii*. O isolado denominado GO-ANPL, foi clonado e parcialmente seqüenciado tendo sido obtidas as seqüências nucleotídicas dos genes da capa proteica, Rep e de toda a região intergênica, em um total de 2.130 nucleotídeos. A análise comparativa das seqüências revelou que, em geral, o GO-ANPL possui relacionamento genético distante com begomovírus da Ásia, Europa e África sendo mais próximo das espécies do Brasil, particularmente, com os begomovírus identificados em Minas Gerais (TRMV) e no Distrito Federal (DF-BR2). Com este último, apresentou alta homologia em todo o genoma podendo vir a constituir, com o mesmo, uma nova espécie.

A determinação do círculo de hospedeiros do GO-ANPL foi realizada inoculando-se 46 espécies vegetais pertencentes a nove famílias botânicas, sob duas modalidades de inoculação: mecânica e com a mosca branca. Constatou-se que o GO-ANPL infecta, preferencialmente, plantas da família Solanaceae como *Nicotiana benthamiana*, *Datura stramonium* e *Nicandra physalodes*. O número de espécies infectadas com o inseto vetor foi superior ao obtido pela inoculação mecânica e diferiu dos resultados obtidos para outros isolados de begomovírus de tomate no Brasil. Os testes foram todos confirmados com hibridização com sondas moleculares, em "dot blot".

No estudo da relação vírus-vetor, foram investigados o período de acesso de aquisição do vírus (PAA), o período de acesso de inoculação do vírus (PAI), e o período de latência do vírus na fase adulta do vetor, empregando-se cinco moscas/planta de tomate 'Santa Clara' em todos os tratamentos. Para a definição do PAA e do PAI, foram testados nove diferentes períodos de tempo: 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 20 e 24 horas. Nos testes para determinação do PAA, após cada um desses períodos seguiu-se uma inoculação de 48 horas e para definição do PAI, antes de cada período antecedeu-se um período de acesso de aquisição fixo de 72 horas. Constatou-se que o PAA mínimo da mosca branca foi de apenas 0,25 hora, com o qual foram obtidas 6% de plantas infectadas. O percentual de plantas aumentou de 6 para 65% com a extensão do PAA de 0,25 para 24 horas. Com relação ao período de acesso de inoculação do vírus, foram registrados 18% de plantas infectadas com o PAI de 0,5 hora. O percentual elevou-se para 67% quando 24 horas de PAI foram concedidos. Valores isolados de 90 e 100% na transmissão viral, também foram observados. O término do período latente do vírus no vetor ocorreu 16h após a aquisição do mesmo em planta infectada, considerando os 3% de infecção observados nas plantas inoculadas. Os dados obtidos indicam que a interação vírus-vetor é estabelecida desde a fase inicial de desenvolvimento do inseto. Como parte do estudo dessa interação, avaliou-se a presença do begomovírus GO-ANPL em todas as fases de desenvolvimento do inseto vetor (ovo, 1º ao 4º ínstar e adulto) na planta infectada, em adultos com diferentes PAA, na progênie de fêmeas virulíferas e em adultos cujos estágios ninfais desenvolveram-se em tomateiro infectado. A técnica PCR foi empregada para a detecção do GO-ANPL em mais de 2.500 espécimens testados. O vírus foi detectado em ninfas do 1º ao 4º ínstar que se alimentaram em plantas de tomate infectada, contudo, em ovos provenientes de avirulíferas, os quais foram ovipositados em planta infectada e coletados após sete dias, o vírus não foi detectado. A transmissão à progênie foi constatada pela detecção do vírus em ovos, ninfas e adultos que se desenvolveram em planta não hospedeira do vírus. A transmissão transestadial ocorreu com índice elevado e, ao lado da transmissão à progênie, indica que a retenção do vírus é uma etapa importante da interação vírus-vetor. A transmissão do vírus para mudas de tomate, a partir de adultos da progênie de fêmeas virulíferas, não foi constatada. Contudo, transmissão para tomateiro em um percentual de 33% foi verificado nos casos em que a inoculação das plantas foi realizada pelos adultos que retiveram o vírus da sua fase imatura (transestadial).

2- ABSTRACT

The whitefly-transmitted viruses from the family *Geminiviridae*, genus *Begomovirus*, have been reported as an economically important pathogen group that affect important crops in tropical and subtropical countries. Since the beginning of the 1980 decade, the occurrence of the whitefly associated to *Begomovirus* infection has drastically increased worldwide. In Brazil, these pathogens have been responsible for severe economical losses in tomato (*Lycopersicon esculentum*) orchards and the production has hampered since 1994.

In this work, infected tomato plants showing symptoms, such as mosaic, intervein clearing, leaf curling and growth reduction were collected in tomato orchards in Anápolis, State of Goiás. The virus was identified as a member of the genus *Begomovirus* by PCR reaction, using specific primers to amplify fragments of A and B components of the virus DNA genome.

The Chapter I of this thesis presents the results of the molecular characterization of the virus and the Chapter II shows the determination of its host range and the relationship with its natural vector *Bemisia argentifolii*. The virus isolate denoted GO-ANPL was cloned and partially sequenced. Part of the sequenced genome (2.180 nucleotides long) corresponded to the coat protein and Rep genes and comprised the entire intergenic region. Sequence comparison revealed that the GO-ANPL isolate is distantly related to the begomoviruses found in Asia, Europe and Africa, and it is related to other begomoviruses reported in Brazil. The virus isolate showed to be more closely related to viruses found in the State of Minas Gerais (TRMV isolate) and in the Federal District (isolate DF-Br2). The highest homology was observed with the isolate DF-Br2 and it may represent a new specie of the genus *Begomovirus*.

In order to determine the virus host range, 46 plant species from nine different botanical families were mechanically and using the virus vector inoculated. The GO-ANPL isolate preferentially infected plants of the family Solanaceae as *Nicotiana benthamiana*, *Datura stramonium* and *Nicandra physalodes*. The number of infected plants was higher when they were inoculated by the virus vector, and the results were distinct from those obtained for other begomoviruses reported in Brazil. Viruses infections were all confirmed by dot blot hybridization using specific molecular probes to the virus.

To study virus/vector interaction, the acquisition access period (AAP), inoculation access period (IAP), and the latent period were determined transferring five whiteflies per plant and using tomato cv. Santa Clara as the host. For the AAP and IAP, nine different time periods were tested: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 20 and 24 h. The minimal AAP determined was 0.25 h, after which, 6% of the tested plants became infected. The number of infected plants increased to 65% with an AAP of 24 h. After an IAP of 0.5 h, 18% of the plants were infected and their number increased to 67% after an IAP of 24 hours. The latent period was considered to be 16 h, after which, 3% of the inoculated plants became infected. The results of AAP, IAP and latent period seem to indicate an early interaction between virus and vector starting at early stages of vector development. The presence of the GO-ANPL was determined in all stages of the vector (eggs, 1st to 4th instar and adults) in infected plants, in adults under different AAPs, in the progenies of viruliferous females, and in adults originated from nymphs developed from infected plants. More than 2.500 insects were tested by PCR to detect the GO-ANPL isolate. The virus was detected in nymphs from the 1st to 4th instar that had fed in infected plants and no virus was found in eggs from aviruliferous female that had been laid in infected plants. Transmission to the progenies was observed, since the virus was detected in all stages of insect development from eggs to adults. High level transmission was also observed in newly emerged adults that had access to virus-infected plants as immatures. This fact, in addition to the transmission to the progenies, suggests that virus retention is an important part of virus/vector interaction.

No transmission was observed from adults originated from viruliferous females. However, 33% of virus transmission was obtained when adults that retained virus from their early larval stages were employed.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A CULTURA DO TOMATE

O tomateiro, *Lycopersicon esculentum* Mill., é a segunda hortaliça mais cultivada no mundo, sendo superada apenas pela batata *Solanum tuberosum* L. É produzido e consumido em numerosos países, ao natural ou industrializado. Na América Latina, o Brasil é o maior produtor de tomate abrangendo, até o ano de 1999, uma área total de 64,6 mil hectares e produção de 3,3 milhões de toneladas (FNP Consultoria e Comércio, 2001). A maior parte da colheita (60%) destina-se ao consumo *in natura*, porém a produção do tomate para processamento vem crescendo especialmente na região dos cerrados (Filgueira, 2000). As principais regiões produtoras do tomate indústria são a Centro-Oeste (Goiás-Minas Gerais), Sudeste (São Paulo) e Nordeste (Pernambuco-Bahia) (Silva & Giordano, 2000). Em 1983, a produção em São Paulo representava mais de 80% da produção brasileira, porém na safra de 1998 sua participação foi em torno de 23% da produção nacional. A região Nordeste tem reduzido bastante a área de plantio da hortaliça. Em 1993 foram cultivados 6,6 mil hectares obtendo-se uma produção de 240 mil toneladas de tomate indústria, enquanto que no ano de 2000 apenas 2,1 mil hectares foram explorados resultando em uma produção total de 99 mil toneladas do tomate (FNP Consultoria e Comércio, 2001). Expansão na área de plantio do tomate indústria tem sido constatada na região Centro-Oeste a qual em 1999 alcançou, nos 13.400 hectares cultivados, uma produção de 840 mil toneladas, representando mais de 65% da produção nacional (Silva & Giordano, 2000). Em Goiás, a cultura vem se concentrando nas regiões de Goiânia, Cristalina, Morrinhos, Nerópolis, Luziânia, Vicentinópolis e Rio Verde (Vilela, 2001*). Esse estado aumentou significativamente a área de produção do tomate, indústria e mesa, passando de 5,5 mil hectares em 1998, para 11 mil hectares em 2000 (FNP Consultoria e Comércio, 2001).

No mercado mundial são encontradas centenas de cultivares de tomate com características diversificadas. No território nacional, as cultivares de polinização aberta estão sendo rapidamente substituídas pelos híbridos, os quais ocuparam 45% da área plantada em

* Informações prestadas pela Dra. Nirlene J. Vilela, Embrapa Hortaliças.

plantada em 1998, atingindo 80% no ano seguinte (Giordano *et al.*, 2000). As cultivares atualmente plantadas no país estão reunidas em cinco grupos: grupo Santa Cruz, grupo Salada, grupo Cereja, grupo Italiano e grupo Industrial (Filgueira, 2000). No mercado do tomate de mesa, os híbridos Santa Clara e Carmem, dos grupos Santa Cruz e Salada, respectivamente, são atualmente os mais cultivados no país pelas boas características agronômicas (longa vida) que apresentam (Makishima-Nosomu, 2001*). Não há, atualmente, predomínio de tomate do grupo Industrial, visto que o plantio de variedades de polinização aberta e de híbridos varia entre as regiões do país.

A cultura do tomate é afetada por diversas espécies de insetos e patógenos, os quais causam redução da produtividade e da qualidade do produto, variando os danos com a intensidade do ataque. Existem mais de 40 viroses relatadas em tomateiro, no continente Americano e, dentre elas, cerca de 17 são causadas por vírus do gênero *Begomovirus* da família *Geminiviridae* (Polston & Anderson, 1997). No Brasil, pelo menos 18 viroses já foram relatadas no tomateiro (Resende & Cupertino, 1996), sendo mais recentes os relatos da ocorrência de vírus do gênero *Begomovirus* no país. Os begomovírus são transmitidos pela mosca branca e estão associados aos elevados prejuízos para a hortaliça em diversas regiões onde é cultivada.

3.2. IMPACTO ECONÔMICO DAS VIROSES PROVOCADAS POR *BEGOMOVIRUS*

No Mundo

Os begomovírus têm emergido como sérios patógenos de culturas agronômicas e hortícolas em regiões tropicais e subtropicais de muitos países em todo o mundo (Brown *et al.*, 1999). A partir da década de 80, tornaram-se freqüentes os relatos da disseminação da mosca branca, *Bemisia argentifolii*, e de begomovírus provocando impacto devastador nas regiões em que ocorrem (Brown *et al.*, 1995). Até o ano de 1997, existiam em torno de 118 espécies e estirpes de vírus descritos dentro da família *Geminiviridae*, os quais vêm causando doenças economicamente importantes em várias culturas e partes do mundo (Van Regenmortel *et al.*, 1997).

* Informações prestadas pelo Dr. Nosomu Makishima, Embrapa Hortaliças

As pesquisas com os vírus dessa família iniciaram-se na África e nos EUA, no começo do século XX, com as viroses causadas por *African cassava mosaic virus* (ACMV), antes *Cassava latent virus*, *Maize streak virus* (MSV) e *Beet curly top virus* (BCTV). Na América Latina, os relatos iniciais dessas viroses, datados da década de 40, ocorreram no Brasil e referiam-se à "clorose infecciosa das malváceas" e aos "mosaicos" em plantas daninhas (Silberschmidt (1943) citado por Costa (1976b)).

Os begomovírus causam sérios problemas para o feijão, tomate, pimentão, mandioca e cucurbitáceas em várias regiões produtoras da América do Sul, do Norte e Central, África e Ásia (Flint, 1995; Rojas *et al.*, 1993). As mais sérias epidemias desses vírus estão diretamente relacionadas ao aumento e migração da população de mosca branca nas culturas (Flint, 1995). Populações de *B. tabaci* são particularmente maiores onde há cultivo de soja, algodão e tomate (Harrison, 1985). No Brasil, os problemas com begomovírus estão restritos, até o momento, às culturas do tomateiro, do feijoeiro e, em menor escala, do caupi (*Vigna unguiculata*) (Oliveira & Faria, 2000).

Costa (1965) relatou, no Brasil, três viroses transmitidas por mosca branca para o feijão, as quais, apesar de pouco frequentes, eventualmente, poderiam assumir extensões de importância econômica na cultura. Uma delas, o mosaico dourado, apesar de ter ocasionado 80% de infecção em um plantio de feijão em Campinas-SP, não foi considerada ameaça para a cultura, pois, em geral, a leguminosa não parecia boa hospedeira do vírus, a julgar pela baixa incidência viral sob elevada população do vetor, e era possível o controle químico do inseto (Costa, 1965). Atualmente, o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), causador do mosaico dourado, é considerado limitante para a produção do feijão nas regiões tropicais da América Latina, tendo provocado o abandono de mais de um milhão de hectares de área tradicionalmente plantada (Rojas *et al.*, 1993; Morales, 1998). Na América do Sul e Central, Ásia e África a produtividade de leguminosas é frequentemente reduzida pelos vírus transmitidos pela mosca branca (Markhan *et al.*, 1996).

Até o final dos anos 80, begomovírus eram problemas praticamente das leguminosas, havendo poucos relatos desses vírus em tomate. A situação atual, porém, é bastante distinta. Desde o início dos anos 90, a maioria das áreas produtoras de tomate da América Central, Flórida, Caribe, México, Venezuela e Brasil têm apresentado elevadas incidências de vírus transmitidos por mosca branca, com sérias conseqüências para as indústrias de processamento de tomateiro. Pelo menos 17 begomovírus já foram registrados nesta hortaliça no Hemisfério Ocidental (Polston & Anderson, 1997).

O tomateiro sofre o impacto da mosca branca como praga e como vetor de begomovírus. Nas Américas, o aumento da população de mosca branca provocou aumento na incidência de vírus e perdas na produção no tomateiro (Brown & Bird, 1992). O clima das regiões tropicais e subtropicais favorece o cultivo do tomate durante todo o ano (Polston & Anderson, 1997). Essas condições são também favoráveis para a mosca branca e, uma vez introduzidos o vírus e o vetor, as doenças podem ser estabelecidas na área. O tomateiro, em quase todos os continentes onde é cultivado em escala comercial, é infectado com begomovírus, os quais produzem, nas plantas infectadas, subdesenvolvimento, mosaico e enrolamento do limbo foliar, comumente acompanhado de amarelecimento (Markhan *et al.*, 1996; Polston & Anderson, 1997) (Figura 1).

O *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) é um dos mais devastadores begomovírus para a cultura do tomate. Descrito inicialmente em Israel, em 1964, onde continua a ser fator limitante para a produção de tomate (Czosnek *et al.*, 1988), o vírus tem sido reportado em vários países da África, Europa e Ásia (Czosnek *et al.*, 1988; Palanichelvam *et al.*, 1998). Isolados de genoma monopartido foram identificados no Egito, Espanha, Sicília e na Sardenha e com genoma bipartido na Tailândia (Picó *et al.*, 1996). Sua incidência na hortaliça provoca perdas econômicas de até 100% em várias regiões tropicais e subtropicais e o patógeno está se dispersando em direção a novas áreas. Nos últimos anos, o TYLCV foi detectado na América Central (Polston & Anderson, 1997) e, mais recentemente, foi introduzido na Flórida, causando sério impacto para as indústrias e temor aos produtores de tomate (Polston *et al.*, 1999). Todas as variedades de tomate são suscetíveis à doença (Picó *et al.*, 1996). As plantas apresentam subdesenvolvimento e amarelecimento intenso, severa redução do limbo foliar em função do enrugamento e do enrolamento da folha em direção à nervura central, aspecto que compromete a planta e, comumente, resulta em perda total da produção (Picó *et al.*, 1996).

Outros begomovírus que infectam o tomate são: *Potato yellow mosaic virus* (PYMV), *Taino tomato mottle virus* (TToMoV), *Tomato mottle virus* (ToMoV), relatados na região do Caribe (Morales, 1998); *Chino del tomate virus* (CdTV), *Texas pepper virus* (TPV), *Sinaloa tomato leaf curl virus* (STLCV), *Serrano golden mosaic virus* (SGMV) e



Figura 1 – Tomate apresentando sintomas de infecção por geminivírus no campo - mosaico com áreas cloróticas, deformação e enrolamento do limbo foliar e subdesenvolvimento da planta.

Tomato leaf crumple virus (TLCrV) registrados no México, podem ocorrer em complexo; *Tomato yellow mosaic virus* (ToYMV) e PYMV, constatados na Venezuela (Polston & Anderson, 1997). O *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) foi encontrado infectando a hortaliça na Costa Rica e no Brasil (Picó *et al.*, 1996).

Registros de perdas em tomate devido a begomovírus, principalmente o TYLCV, totalizaram na República Dominicana, U\$ 10 milhões, em 1988, e cerca de U\$ 50 milhões de 1989 a 1995. Em Honduras, em 1992, os prejuízos causados por begomovírus foram estimados em U\$ 4,6 milhões (Polston & Anderson, 1997). Na Venezuela, em 1995, a elevada incidência do ToYMV reduziu a área de plantio de tomate para 50% da usualmente cultivada. Na Flórida, o ToMoV provocou perdas de U\$ 125 milhões nos anos de 1990-1991, em incidências do vírus de 95-100%, apesar de aplicações semanais de inseticidas para controle da mosca branca (Sinisterra *et al.*, 1999; Polston & Anderson, 1997). Acredita-se que o ToMoV, vírus originário da Flórida, local onde permaneceu endêmico por muitos anos, evoluiu a partir de begomovírus existentes em invasoras, sendo levado para o tomate pela mosca branca vetora (Flint, 1995).

Os begomovírus não são transmitidos por semente ou por contato entre plantas infectadas e sadias. Sua dispersão no campo dá-se pela ação da mosca branca a partir de fontes de vírus nas vizinhanças (Costa, 1965; Flint, 1995). Costa (1976b) relatou que a mosca branca pode adquirir o vírus a partir de plantios antigos como também de fontes naturais no campo como, por exemplo, malváceas do gênero *Sida*. As espécies *Calopogonium mucunoides*, *Macroptilium lathyroides* e *Rhyncosia* sp. são plantas daninhas que podem constituir hospedeiras alternativas de begomovírus que infectam o feijão e a soja (Costa, 1976b). Na América do Norte já foram relatados diversos begomovírus nos gêneros *Euphorbia*, *Sida*, *Jatropha*, *Macroptilium* e *Rhyncosia* (Brown & Bird, 1992). As plantas daninhas têm sido consideradas os reservatórios de diferentes espécies desses vírus que, de modo surpreendente, vêm infectando o tomateiro em diversas localidades (Polston & Anderson, 1997; Padidam *et al.*, 1999). Na Califórnia, porém, plantas daninhas não são encontradas em associação com begomovírus, como também não há registros da virose em tomate ou pimentão. Naquela região, no entanto, cucurbitáceas e algodão são afetados por begomovírus específicos dessas culturas (Flint, 1995).

Em contraste com o que se tem observado, o *Abutilon mosaic virus* (AbMV) é um vírus que desperta interesse comercial. Propagado propositadamente para *Abutilon* spp., o AbMV causa nas plantas um variegado amarelo brilhante, aspecto considerado atrativo para aquelas espécies ornamentais (Flint, 1995).

No Brasil

A primeira constatação de begomovírus em tomate, no Brasil, ocorreu nos anos 60 quando 30 a 40% de um plantio de tomate estavam afetados com a "clorose infecciosa", enfermidade atribuída, posteriormente, ao TGMV (Matyis *et al.*, 1975). Esse vírus só voltaria a ser novamente relatado em associação com o tomateiro no país, cerca de três décadas depois de sua primeira constatação (Galvão *et al.*, 1997). Na década de 70, em São Paulo, foram observadas seis viroses em tomate associadas à mosca branca, porém sem importância econômica (Costa *et al.*, 1975). Somente a partir da década de 90, begomovírus surgem novamente em tomateiro, causando, dessa vez, sérias perdas econômicas. Esses relatos coincidem com o aparecimento da nova espécie da mosca branca no país, *B. argentifolii*, que, diferente da anterior, coloniza solanáceas (Brown *et al.*, 1995; Oliveira & Faria, 2000).

Viroses provocadas por begomovírus têm sido limitantes para a produção de tomate em várias áreas no Brasil. A incidência tem aumentado sistematicamente desde 1994. A ocorrência das viroses tem sido confirmada com a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) e análises de hibridização. Fragmentos do DNA de begomovírus de várias regiões brasileiras têm sido seqüenciados, possibilitando a identificação dos mesmos (Simone Ribeiro, comunicação pessoal).

No Distrito Federal, a presença de begomovírus foi relatada a partir de 1994, causando mosaico, clareamento de nervuras e encarquilhamento das folhas. Esse relato sucedeu à constatação da mosca branca, no DF, em 1993 (França *et al.*, 1996). Levantamentos realizados na região, no ano de 1995, revelaram que o vírus estava disseminado nas lavouras, causando perdas no tomate em torno de 40% (Bezerra *et al.*, 1996).

A partir de 1996, incidência de begomovírus em tomateiros foram observadas nos estados de Minas Gerais (Zerbini *et al.*, 1996), São Paulo (Faria *et al.*, 1997), Pernambuco (Bezerra *et al.*, 1997), Bahia (Ribeiro *et al.*, 1996), Ceará (Lima *et al.*, 2000a) e Goiás (Santos *et al.*, 1998a).

Os begomovírus, em Minas Gerais, provocaram perdas superiores a 50% na produção de tomate no cinturão verde de Belo Horizonte e no Triângulo Mineiro (Rezende *et al.*, 1996; Zerbini, *et al.*, 1996). Em São Paulo, foram registradas incidências desses vírus em tomate de 19 a 70% (Souza-Dias *et al.*, 1996). As plantas infectadas no campo exibiam

amarelecimento e riscas nas nervuras e mosaico amarelo em folhas com deformações no limbo. A análise comparativa de seqüências pode comprovar que o isolado de São Paulo era distinto dos begomovírus já descritos e foi-lhe proposto o nome *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (Faria *et al.*, 1997). No Submédio São Francisco- Pe, desde 1996, viroses provocadas por begomovírus vêm provocando perdas em tomate de até 100% em algumas áreas. Em 1997/1998, a incidência desses vírus aumentou mesmo sob baixas populações do vetor (Lima *et al.*, 1999b). Atualmente, begomovírus constituem o principal problema do tomateiro naquela região contribuindo para significativa redução da área cultivada com tomateiro nos últimos anos (Lima *et al.*, 2001). De acordo como Lima *et al.* (2001), infecção por begomovírus foi detectada também em plantios de pimentão com sintomas evidentes da virose, em localidades próximas às lavouras do tomateiro (Lima *et al.*, 2001).

A caracterização molecular de vários begomovírus isolados de tomate de alguns estados do Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste revela que os vírus relatados em tomateiro no país são distintos entre si e daqueles constatados em tomateiro em outras regiões do mundo. Estas informações foram concedidas por Simone Ribeiro e colaboradores (comunicação pessoal) que recentemente e com base nas seqüências de vários begomovírus de tomate do Brasil, propuseram sete novas espécies, as quais serão submetidas à confirmação pela comunidade científica. Os novos nomes propostos pelos pesquisadores para as referidas espécies foram os seguintes: *Tomato chlorotic vein virus* (TCIVV), *Tomato crinkle virus* (ToCV), *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV), *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV), *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV), *Tomato infectious yellows virus* (TIYV) e *Tomato severe mosaic virus* (TSMV). No Brasil não há relatos de ocorrência do TYLCV.

A diversidade de espécies de begomovírus surgindo em várias regiões do país sugere que os vírus sejam provenientes de solanáceas silvestres ou de plantas daninhas e estão sendo transferidos para o tomate pela mosca branca, *B. argentifolii*, a qual tem se dispersado pelos campos de cultivo. Outro aspecto importante é que a baixa homologia entre os vírus analisados implica em maiores esforços para obtenção de variedades resistentes, cuja fonte de resistência deveria ser efetiva contra cada um dos vírus (Krause *et al.*, 1998).

3.3. FAMÍLIA *GEMINIVIRIDAE*

3.3.1. Taxonomia e nomenclatura

A criação do gênero *Geminivirus* iniciou-se com a observação de partículas quasi-icosaédricas medindo 15-20nm de diâmetro, ocorrendo freqüentemente aos pares em extratos purificados de MSV, BCTV, TGMV, *Euphorbia mosaic virus* (EuMV), BGMV e ACMV, (Bock *et al.*, 1974; Mumford, 1974; Matyis *et al.*, 1975; Harrison *et al.*, 1977). Confundidas com artefatos, as partículas somente seriam admitidas como tais com os estudos de Hatta & Francki (1979), que as definiram como partículas geminadas formadas por dois icosaedros imperfeitos. Em 1977, Harrison *et al.* constataram que o ácido nucleico dos vírus em estudo, MSV e ACMV, era DNA de fita simples e apresentava forma circular. Dois tipos de vetores eram conhecidos transmitindo os vírus, a cigarrinha e a mosca branca. As características então observadas sugeriam a emergência de um novo grupo de vírus, cujo nome proposto foi geminivírus (Harrison *et al.*, 1977). Por ocasião do terceiro relatório do "Internacional Committee on Taxonomy of Viruses" (ICTV), em 1979, foi estabelecido o grupo geminivírus para englobar todos os vírus com as características anteriormente descritas (Matthews, 1979). Em 1981, foram listados 10 geminivírus, em 1985, 21 vírus, entre membros definitivos e prováveis, foram designados por Harrison (1985) no grupo geminivírus. Em 1991, de acordo com o relatório do quinto encontro do ICTV (Francki *et al.*, 1991), os geminivírus foram subdivididos em subgrupos I, II e III, com base na organização genômica (mono ou bipartido), nas plantas hospedeiras e no inseto vetor. Foi proposto (Mayo & Martelli, 1993) e aceito no sexto ICTV, em 1995, a classificação do grupo geminivírus em família *Geminiviridae* comportando as três subdivisões. Os subgrupos I, II e III foram, posteriormente, renomeados nos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus* e *Begomovirus*, respectivamente (Padidam *et al.*, 1997).

A classificação atual de geminivírus inclui no gênero *Mastrevirus* os vírus com genoma monopartido, transmitidos por cigarrinhas (*Cicadulina* sp., *Nesoclutha* sp. – Hemiptera (Homoptera : Cicadellidae)), para plantas monocotiledôneas e tendo por espécie-tipo *Maize streak virus*, MSV. Em *Curtovirus*, foram agrupados os vírus de genoma monopartido transmitidos por cigarrinhas *Circulifer* sp. (Hemiptera (Homoptera: Cicadellidae)), para dicotiledôneas, tendo por membro tipo o *Beet curly top virus*, BCTV.

Foram classificados em *Begomovirus* os vírus de genoma bipartido (à exceção do TYLCV e *Cotton leaf curl virus* (CLCuV), monopartidos), transmitidos por mosca branca (*Bemisia* spp.) para dicotiledôneas. O *Bean golden mosaic virus*, BGMV, foi considerado sua espécie-tipo (Padidam *et al.*, 1997). Mais recentemente, foi criado o gênero *Topocuvirus*, portanto o quarto gênero, o qual possui como único membro a espécie *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), classificada anteriormente no *Curtovirus*, cujo vetor é o membracídeo *Micrutalis malleifera* (Hemiptera (Homoptera: Membracidae)) (Van Regenmortel *et al.*, 2000). O TPCTV seria resultante de recombinação entre *Mastrevirus* e *Begomovirus* (Bridon *et al.*, 1996). Não se enquadram nessa classificação o *Tobacco yellow dwarf virus* (TYDV) e o *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV), vírus transmitidos por cigarrinha e adaptados a dicotiledôneas, candidatos a *Curtovirus*, mas com seqüência de nucleotídeos e, ou organização genômica similar a *Mastrevirus* (Morris *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1999).

As análises filogenéticas conduzidas por Rybicki (1994) com os genes de todos os geminivírus, até então seqüenciados, indicam que vários e importantes eventos ocorreram na história evolucionária da família *Geminiviridae* e sugerem que todos os seus membros tenham se originado de um ancestral comum. A comparação de seqüências, feita pelo autor, revelou que o atual gênero *Mastrevirus* é significativamente diferente dos demais gêneros da família *Geminiviridae* indicando que uma antiga divergência a partir de um ancestral comum o distanciou de *Curtovirus* e *Begomovirus*. Posteriormente, segundo Rybicki (1994), dentro dos gêneros teria ocorrido um apreciável processo de especiação que deu origem aos diferentes membros atuais. A existência de dois grupos em *Begomovirus*, o do Novo Mundo (vírus das Américas) e o do Velho Mundo (vírus da Europa, Ásia e África) e a aparente maior diversidade genética entre os componentes B dos begomovírus do Novo mundo, podem ser uma evidência adicional do efeito do estreitamento evolucionário dentro de *Curtovirus*. O genoma bipartido das espécies do Novo Mundo sugere que estas tenham se originado a partir dos vírus do Velho Mundo na remota época de separação dos continentes, provavelmente pela chegada de moscas brancas virulíferas nas Américas, provenientes da Ásia ou de outros continentes.

Para a classificação dos vírus da família *Geminiviridae*, planta, genoma e vetor não parecem suprir os critérios. Comparações de seqüências entre ácido nucleico e proteína, critérios biológicos e estruturais têm sido adotados para identificar e classificar vírus de

planta de outras famílias (Shukla & Ward, 1988). Para a família *Geminiviridae*, Padidam *et al.* (1995), após compararem genomas de 36 de seus membros, propuseram classificação baseada na comparação de seqüências, nas propriedades biológicas e moleculares dos vírus, os quais teriam novos nomes genéricos e subfamílias. Com a adoção da análise molecular não existiriam situações como aquelas citadas anteriormente para o TYDV e BeYDV.

De acordo com Van Regenmortel *et al.* (1997), os critérios taxonômicos que distinguem espécies de vírus na família *Geminiviridae* incluem: diferença no número de componentes do DNA viral e na organização genômica, ausência de transcomplementação dos produtos gênicos, ausência de pseudorecombinação entre os componentes, identidade na seqüência de nucleotídeos do componente A inferior a 90%, identidade na seqüência de aminoácidos da região N-terminal da proteína capsidial inferior a 90%, diferença na espécie de vetor (mosca branca, cigarrinha, membracídeo), diferença no tipo de hospedeiros e tecidos infetados, relação sorológica com anticorpos monoclonais.

Os vírus da família *Geminiviridae* têm sido nomeados com base na hospedeira, sintomas e região geográfica onde são encontrados, como é exemplo o ACMV. Contudo, a nomenclatura fica confusa, quando são similares os sintomas causados por espécies diferentes de vírus na mesma planta hospedeira. Em virtude disso, Padidam *et al.* (1997) propuseram normas para a identificação desses vírus contendo informação da hospedeira, sintomas, a identificação da espécie, da estirpe ou do isolado. A seqüência seria: hospedeira e sintoma-espécie /estirpe // isolado, a qual, segundo eles, evitaria a ambigüidade de nomes. Com esse sistema, os autores listaram, entre espécies, estirpes e isolados, 41 vírus pertencentes à *Mastrevirus*, 7 à *Curtovirus* e 121 à *Begomovirus*.

A proposta de Padidam *et al.* (1997), porém, manteve com o mesmo nome específico vários vírus, distinguindo os isolados pela localidade, a qual era numerada quando o local se repetia, como são exemplos: Maize streak virus// Ethiopia, Maize streak virus// Nigeria 1, Maize streak virus// Nigeria 2. Esse sistema foi criticado por Rybicki (1998), que considerou duvidosos os critérios adotados para designar estirpes e isolados dos vírus. Em estudos anteriores, Rybicki (1994) admitiu que a filogenética colabora para designar os membros da família *Geminiviridae* em gênero, espécie e estirpe e demonstrou que as similaridades de pareamento de bases entre espécies diferem significativamente entre os gêneros. Com isso, constatou que os *Begomovirus* são mais similares entre si que os *Mastrevirus* ou os *Curtovirus*. Para o autor, os gêneros devem ter critérios distintos para

nomear as suas espécies e estirpes (Rybicki, 1998). Numa proposta mais atual (Fauquet *et al.*, 2000), é sugerida, como norma à nomenclatura desses vírus, a adição, antes da palavra *virus*, da localização geográfica onde o patógeno tenha sido constatado (ex. *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*). Esse método, segundo os autores, mantém a maioria da nomenclatura concedida aos membros da família *Geminiviridae* em uso, permite diferenciar um vírus do outro e oferece uma flexibilidade para nomear estirpes de uma mesma espécie.

3.3.2. Composição e organização genômica

Os membros da família *Geminiviridae* são atualmente descritos como vírus de partículas geminadas consistindo de dois icosaedros incompletos possuindo 18 x 30 nm e ssDNA circular com tamanho variando de 2,6 a 2,8 kb (*Mastrevirus*), 2,7 a 3,0 kb (*Curtovirus*) e 2,5 a 2,8 kb (*Begomovirus*). A capa proteica possui 22 capsômeros com peso molecular de 28-34 x 10³ daltons e constitui cerca de 80% da partícula viral (Harrison, 1985). Todos os membros possuem em seus genomas uma região intergênica da qual divergem os genes com transcrição no sentido viral e complementar (Palmer & Rybicki, 1998).

O gênero *Mastrevirus* possui um único genoma contendo quatro fases abertas de leitura (ORFs) e duas regiões intergênicas (RI), uma longa (LRI) e outra curta (CRI), não codificantes. As ORFs, no sentido viral são V1 (gene *mp*, movimento) e V2 (gene *cp*, capa proteica) e no sentido complementar C1/C2, correspondente aos genes transcritos como um único RNA, *repA/repB* (replicação/transativação). Todas as ORFs divergem a partir da LRI e convergem para a CRI. A LRI contém a origem da replicação (*ori*) e elementos promotores *cis*-ativador que ligam a fatores da hospedeira e controlam o sentido da expressão. A CRI contém elementos terminadores da transcrição (Timmermans *et al.*, 1994; Liu, *et al.*, 1999). A região 3' do *rep B* e 5' do *rep A* localizam-se em um intron (Figura 2). Pela simplicidade, o *Mastrevirus* parece ser o mais antigo gênero de *Geminiviridae* em termos evolucionários (Palmer & Rybicki, 1998).

O *Curtovirus* possui o genoma com sete genes, sendo três transcritos no sentido viral, *mp* (movimento, antes V1), *cp* (capa proteica, movimento, V2), V3 (regula níveis de DNA) e quatro no sentido complementar *rep* (proteína associada a replicação, C1), C2 (transativação), *ren* (acúmulo de DNA, C3) e C4 (desenvolvimento de sintomas) (Palmer &

Rybicki, 1998; Timmermans, *et al.*, 1994). Análise filogenética sugere que os *Curtovirus* resultaram de recombinações entre *Mastrevirus* e *Begomovirus*.

O gênero *Topocuvirus* apresenta organização genômica similar ao *Curtovirus*, exceto pelo gene *v3* do qual seu genoma é destituído (Palmer e Rybicki, 1998).

O genoma do *Begomovirus* possui dois componentes, A e B, de tamanho similar, encapsidados separadamente em partículas geminadas, sendo ambos necessários para que a infecção ocorra (Timmermans *et al.*, 1994). Os dois componentes possuem ORFs com transcrição bidirecional. No componente A, onde estão as funções *trans*-ativadoras requeridas para replicação, existem cinco ORFs: uma no sentido viral, a AV2 (gene *cp*, da capa proteica) e quatro no sentido complementar, a AC1 (gene *rep*, associado a replicação), a AC2 (gene *trap*, associado a transativação que controla a expressão de genes no sentido viral), a AC3 (gene *ren*, ativador da replicação) e a AC4 (gene *ac4*, que regula a transcrição) (Idris & Brown, 1998). No componente B, o qual não replica na ausência do A, as ORFs BV1 (gene *ns*, associado ao transporte a longa distância) e BC1 (gene *mp*, associado ao movimento célula-a-célula e expressão de sintomas), constituem os genes transcritos no sentido viral e complementar, respectivamente (Fontes, *et al.*, 1994; Padidam *et al.*, 1997; Palmer & Rybicki, 1998; Brown *et al.*, 1999) (Figura 2). No caso dos *Begomovirus* TYLCV e CLCuV, o genoma, constituído de um único componente, contém os seis genes (Navot *et al.*, 1991).

Há variação no número de ORFs no sentido viral do componente A em vírus que infectam tomate: duas ORFs (AV1 - "precoat" e CP (AV2)) são relatadas para os vírus do Velho Mundo (Europa, Ásia, África, Israel, Mediterrâneo), e uma única ORF (CP) para os membros do Novo Mundo (as Américas e Caribe). A ORF AV1 é requerida para a eficiência do movimento viral (Padidam *et al.*, 1996) e talvez seja a razão de alguns begomovírus do Velho Mundo dispensarem o componente B na infecção de certas plantas hospedeiras (Palmer & Ribicki, 1998). O DNA B foi isolado do TYLCV da Tailândia, mas não é requerido para a infectividade do vírus (Padidam *et al.*, 1996).

A caracterização molecular de diversos begomovírus bipartidos revelou vários aspectos particulares do seu genoma. Todos possuem organização genômica idêntica tendo os componentes A e B diferentes seqüências de nucleotídeos, exceto pela seqüência de 200 nucleotídeos (região comum - RC) localizada na região intergênica. Essa região comum é altamente conservada (>95%) entre as duas moléculas de DNA de um mesmo vírus, mas

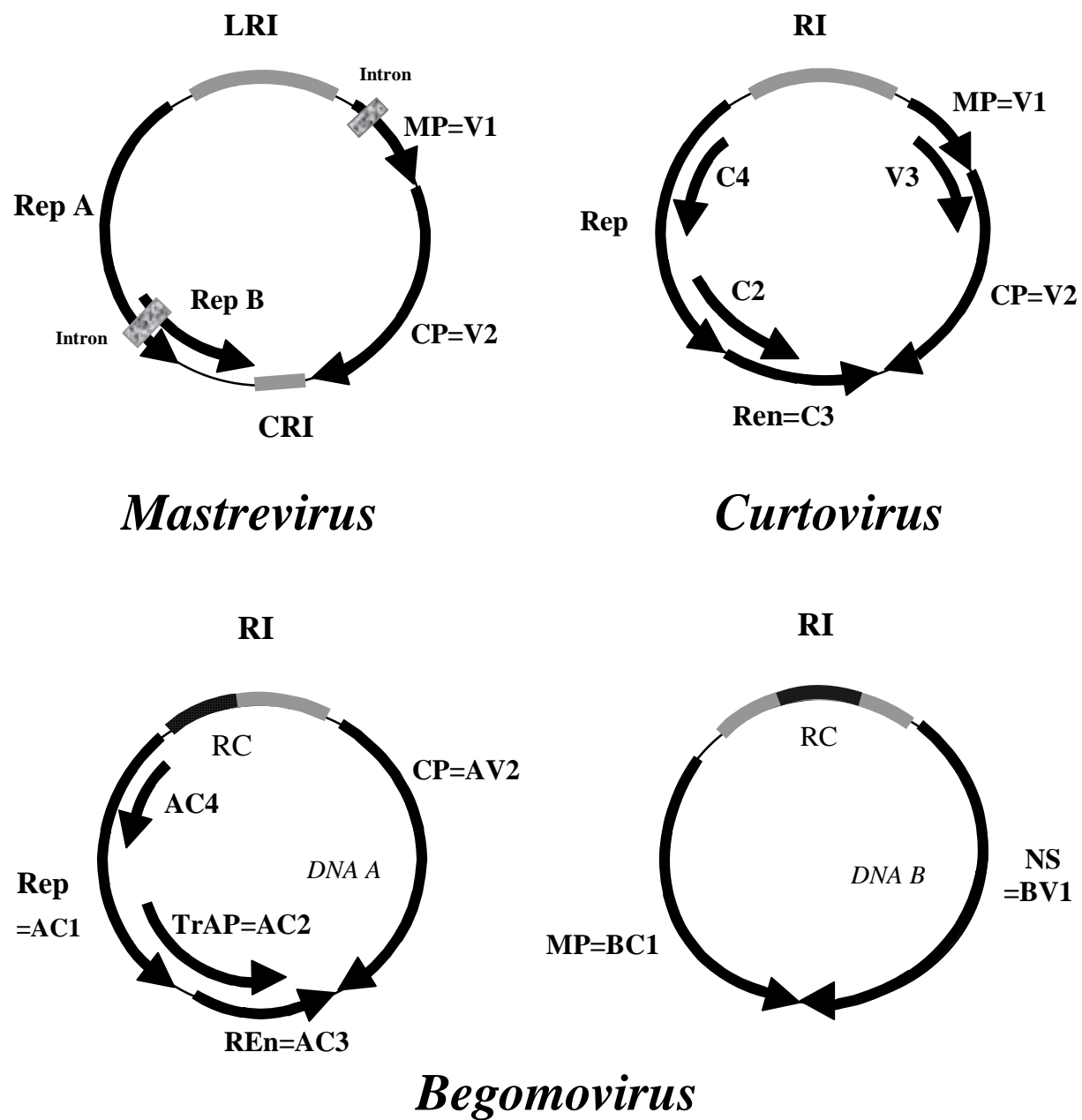


Figura 2 – Organização genômica de *Mastrevirus*, de *Curtovirus* e de *Begomovirus* do Novo Mundo. *Topocuvirus* tem organização similar a *Curtovirus*, exceto pelo gene V3. RI – região intergênica, LRI- longa região intergênica; CRI- curta região intergênica; RC – região comum. Transcrição das ORFs no sentido das setas: CP, capa proteica; Rep, associada a replicação; NS, movimento a longa distância; MP, movimento célula-a-célula; RE=, amplificação da replicação; TrAP, transativação. Demais ORFs, função do gene não elucidada. (Fonte Van Regenmortel *et. al.* 2001).

difere entre vírus distintos. A alta homologia da região comum sugere a existência de sinais essenciais para reconhecimento de processos comuns aos dois componentes como replicação, iniciação de transcrição e encapsidação (Timmermans *et al.*, 1994). A região comum contém, em todos os begomovírus bipartidos, uma seqüência conservada de 33-34 nucleotídeos numa estrutura em forma de grampo que inclui o motivo invariável de nove nucleotídeos (TAATATTAC), similar ao sítio presente do fago Ø X174, e que provavelmente, está envolvido com a replicação viral (Timmermans *et al.*, 1994). A diferença no restante da região comum sugere seu papel na determinação da hospedeira ou na montagem da partícula viral (Harrison, 1985). Possivelmente existem promotores e sinais de poliadenilação disponíveis para todas as ORFs. (Harrison, 1985). A organização genômica dos gêneros de *Geminiviridae* estão representadas na Figura 2. A disposição dos genes em Begomovirus representa as espécies do Novo Mundo.

3.3.3. Função genômica

Em todos os membros da família *Geminiviridae*, a região intergênica contém uma seqüência promotora da RNA polimerase tipo II responsável pela transcrição bidirecional dos genes, e uma origem da replicação contendo seqüências específicas que são reconhecidas pela proteína associada à replicação da fita complementar (Hou *et al.*, 1998). As funções iniciais dos vírus são mediadas pelo genes de transcrição no sentido complementar e as tardias pelos genes no sentido viral (Palmer & Rybicki, 1998). Nos vírus de genoma monopartido, todas as ORFs são requeridas para o ciclo de vida do vírus, mas somente as RI e as ORFs na fita complementar são necessárias para replicação (Timmermans *et al.*, 1994). Em bipartidos, o DNA A codifica todas as funções virais requeridas para replicação e encapsidação do genoma viral, enquanto o DNA B é requerido para desenvolvimento de sintomas e movimento viral (Timmermans *et al.*, 1994).

A ORF Rep é absolutamente requerida para replicação em mono e bipartidos (Palmer & Rybicki, 1998). A proteína, produto de gene *rep*, é uma endonuclease que não possui atividade DNA polimerase. Age somente na iniciação da replicação do DNA. A síntese de dsDNA (forma replicativa, RF) ocorre por enzimas do hospedeiro. A função da proteína da replicase é interagir com a RF ligando-se a um sítio específico na região

intergênica que detém os elementos *cis*-ativadores da origem de replicação (*ori*) para iniciar o processo de obtenção de novas fitas (Palmer & Rybicki, 1998, Behjatnia *et al.*, 1998; Fontes *et al.*, 1994; Sunter & Bisaro, 1997). Não existem relatos em *Begomovirus*, porém em *Mastrevirus* essa proteína parece ter uma função adicional como fator de transcrição, sendo requerida também para atividade promotora da capa proteica (Palmer & Ribicki, 1998; Sunter & Bisaro, 1997).

O gene *ren* (replication enhancer) não é essencial em bipartidos, mas participa amplificando a replicação viral. Na sua ausência, o acúmulo de DNA é 50 vezes menor e os sintomas da infecção viral, em menor nível de DNA B, são atenuados. Contudo, o modo de atuação dessa proteína não está elucidado (Timmermans *et al.*, 1994) A proteína de transativação codificada pelo gene *trap* é um fator de transcrição que atua em *trans* nos promotores, regulando a expressão dos genes *cp* e *ns* (Timmermans *et al.*, 1994).

A ORF CP é requerida para a síntese da proteína da capa proteica, o polipeptídeo mais abundante em tecidos infectados. Em monopartidos, essa proteína é requerida para movimento viral (sugerindo o movimento na forma de virions) e desenvolvimento de sintomas, ligando-se com fitas tipo ssDNA e dsDNA (Liu *et al.*, 1997). Em BTCV (*Curtovirus*), a CP está associada a infectividade e a dispersão viral (Bridon *et al.*, 1989). Nos begomovírus, a ORF da CP é altamente conservada (Brown *et al.*, 1999), mas a proteína não é essencial para a replicação viral, desenvolvimento de sintomas ou dispersão sistêmica, indicando o movimento dos vírus na planta como nucleoproteína (Rojas *et al.*, 1998). Na ausência da proteína da capa, contudo, ocorre atenuação ou atraso de sintomas. Em vírus de genoma mono ou bipartido, a capa proteica protege o DNA viral durante a transmissão por insetos o que contribui para a sua especificidade (Timmermans *et al.*, 1994). Briddon *et al.* (1992) demonstraram que partículas de ACMV (*Begomovirus*, portanto transmitido por mosca branca) encapsidadas com a capa proteica de BCTV (*Curtovirus*) foram transmitidas por cigarrinha, vetor do BCTV, sugerindo que a CP é o fator que confere especificidade de transmissão. Funções envolvidas com o movimento a longa distância (Pooma *et al.*, 1996) e associada com infecção em hospedeiros não adaptados a alguns begomovírus (Hou *et al.*, 1998) têm sido atribuídas à proteína da capa.

Os genes *mp* e *ns* codificam dois polipeptídeos ambos essenciais para o movimento sistêmico do vírus e o desenvolvimento de sintomas que podem influenciar o círculo de hospedeiros (Hou *et al.*, 1998; Ingham & Lazarowitz, 1993). A proteína MP,

potencializa o movimento célula-a-célula e a proteína NS está envolvida no transporte do DNA via envelope nuclear (Schaffer, *et al.*, 1995). A proteína NS media a saída de ssDNA e dsDNA do núcleo para o citoplasma, enquanto a proteína MP, media o transporte do DNA através do plasmodesma (Noueiry *et al.*, 1994; Pascal *et al.*, 1994). No modelo proposto por Rojas *et al.* (1998), ocorre uma interação direta entre os complexos ssDNA/dsDNA- proteína NS e ssDNA/dsDNA- proteína MP no qual há transferência do complexo de NS para MP seguido de movimento célula-a-célula do complexo MP-DNA.

Mutações nos genes *ns* e *mp* podem restringir a especificidade de hospedeiros em alguns begomovírus (Inghan & Lazarowitz, 1993; Haley *et al.*, 1995). Aspecto interessante da função desses genes têm sido observado em agroinoculações em fumo com o DNA A. Evidenciou-se que a atividade das proteínas MP e NS no fumo elevaram os níveis do DNA A, favorecendo a infecção viral (Hou *et al.*, 1998).

3.3.4. Replicação

O mecanismo de replicação viral em membros da família *Geminiviridae* é diferente de todos os outros vírus de plantas. O genoma ssDNA e a presença de dsDNA em tecidos infectados indicam um mecanismo de replicação semelhante a bacteriófagos como o ØX174 e M13, denominado círculo rolante. Os vírus, tanto de genoma mono como bipartido, precisam ser conduzidos para o núcleo da planta hospedeira para sua replicação (Timmermans *et al.*, 1994). A replicação inicia-se com a síntese de uma fita complementar a partir de ssDNA, originando um intermediário de fita dupla, a forma replicativa (RF). Nessa etapa o vírus utiliza a DNA polimerase da hospedeira e a sua maquinaria de replicação (Sunter & Bisaro, 1997). A etapa seguinte consiste da replicação da RF (molde), acompanhada da RNA polimerase II da hospedeira, quando são obtidos mRNAs e novos ssDNA virais. Para tanto, a proteína REP cliva a fita adicional na seqüência conservada (TAATATT↓⁸AC), presente em todos membros da família *Geminiviridae*. Liga-se então na extremidade 5' da fita clivada, onde permanece durante toda a polimerização do DNA, disponibilizando a extremidade 3'-OH do último T daquela seqüência conservada, para início da síntese de uma nova fita. Na conclusão de cada etapa do círculo rolante, a Rep age como uma terminase liberando uma ssDNA viral e a origem

de replicação clivada é reconstituída (Palmer & Rybicki, 1998). A replicação e a transcrição desses vírus, portanto, são mediados por proteínas do vírus em conjunção com enzimas da hospedeira para catalizar esses processos (Fontes *et al.*, 1994). A transcrição é bidirecional (Behjatnia *et al.*, 1998; Timmermans *et al.*, 1994; Hanson & Maxwell, 1999).

Nos vírus monopartidos, a síntese da fita complementar parece ser iniciada a partir de um fragmento de DNA de aproximadamente 80 nucleotídeos, associada firmemente ao DNA do virion, como um "RNA primer", o qual possui homologia com a curta região intergênica (CRI), região com sinais *cis*-ativadores para a replicação. Em begomovírus, o fragmento iniciador não foi identificado (Timmermans *et al.*, 1994).

O núcleo celular está intimamente envolvido na replicação viral. Seções ultra-finas de células infectadas mostram acúmulos de partículas no núcleo, algumas vezes em arranjos cristalinos hexagonais. Anéis fibrilares contendo desoxinucleoproteína são observadas em associação com o nucléolo nos estágios iniciais da infecção. Inclusões granulares podem ocorrer no citoplasma. Em dicotiledôneas, as alterações envolvem reposicionamento da cromatina nas proximidades da membrana nuclear, hipertrofia do nucléolo e segregação dos componentes nucleares em regiões granulares e fibrilares. Tais mudanças precedem o acúmulo de partículas, e as alterações nucleolares podem refletir a substituição da fase de transcrição realizada pela hospedeira para a transcrição viral (Timmermans *et al.*, 1994; Harrison, 1985). Em virtude da relativa simplicidade da organização genômica e da relação com a maquinaria da hospedeira, os vírus da família *Geminiviridae* têm sido considerados um sistema ideal para estudo de replicação e transcrição de DNA celular (Fontes *et al.*, 1994; Sunter & Bisaro, 1997).

3.3.5. Variabilidade genética em *Geminiviridae*

Os vírus da família *Geminiviridae* podem produzir formas variantes de diversas maneiras: recombinação (troca intramolecular) de intermediários da forma replicativa, pseudo-recombinação (troca intermolecular) (Harrison, 1985) e mutação (inserção ou deleção de genes ou nucleotídeos).

A recombinação e a pseudorecombinação podem favorecer a evolução dos vírus de genoma bipartido a exemplo do que ocorre com os vírus de RNA multipartidos (Hou &

Gilbertson, 1996). Recombinação é uma significativa estratégia que contribui para a evolução em *Geminiviridae*. Outros fatores que também colaboram na evolução de um vírus de plantas incluem as interações vírus-vetor e vírus-hospedeira (Padidam *et al.*, 1999; Rybicki, 1994; Zhou *et al.*, 1998a).

Padidam *et al.* (1999), atribuem o surgimento de begomovírus recombinantes a três fatores: as infecções mistas, os altos níveis de replicação viral e a emergência de *B. argentifolii* nas culturas. A mosca branca, alimentando-se em elevado número de plantas hospedeiras, pode expandir os hospedeiros de begomovírus (Bedford *et al.*, 1994) o que aumenta a oportunidade de um recombinante emergir de uma nova hospedeira infectada. Análises realizadas por Padidam *et al.* (1999) revelaram ainda que a recombinação de fragmentos de DNA, principalmente entre os begomovírus, é muito freqüente e ocorre entre gêneros e entre espécies, aspecto que contribui significativamente para a evolução e para a recente emergência de novas espécies de vírus.

Comparações do genoma do *Horseradish curly top virus* (HrCTV), um *Curtovirus*, com outros membros da família indicaram que o vírus surgiu da recombinação envolvendo o BCTV (*Curtovirus*), ancestral que teria contribuído com genes orientadores do virion e com a ORF C2, e o *Squash leaf curl virus*, SLCV (*Begomovirus*), que teria colaborado com os genes *rep* e *c4*. O HrCTV é apontado como o melhor exemplo de recombinação entre esses vírus (Klute *et al.*, 1996). Tem sido sugerido ainda que BCTV e SLCV seriam também recombinantes, visto que a reconstrução de seus ancestrais é problemática (Torres-Pacheco *et al.*, 1993). Outro caso de pseudo-recombinação natural é TPCTV (*Topocuvirus*), que teria surgido de rearranjos modulares a partir do BCTV e que teria vantagens evolucionárias sobre o seu antecessor (Briddon *et al.*, 1996).

Outro exemplo interessante de pseudorecombinação pode ser observado para os vírus *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) e ToMoV. Os testes de patogenicidade conduzidos com os pseudorecombinantes resultantes de permutas entre o DNA A e DNA B de ToMoV e BDMV revelaram que a combinação DNA A de ToMoV + DNA B de BDMV era altamente patogênica e tinha elevados níveis de DNA B. Análise de seqüência do DNA B constatou que ocorreu recombinação intermolecular no pseudorecombinante, visto que a região comum do DNA B de BDMV, em sua maior parte, havia sido substituída pela região comum do DNA A do ToMoV. O experimento demonstrou que é possível a recombinação

entre espécies de genoma bipartido e estabeleceu que a bipartição genômica favorece a evolução destes vírus (Hou & Gilbertson, 1996).

As mutações têm sido empregadas no estudo de funções gênicas e podem provocar alterações de diversos tipos. Mudanças no gene *c4* (associado à patogênese) de monopartidos que infectam dicotiledôneas têm efeito hospedeiro-específico sobre a infectividade, sintomatologia e acúmulo de DNA viral (Pooma & Petty, 1996; Bridon *et al.*, 1996), enquanto que no gene da capa proteica, de mono e bipartidos, causa alteração na transmissão por vetor, nos níveis de ssDNA e na movimentação do vírus na planta (Pooma *et al.*, 1996; Briddon *et al.*, 1996; Hofer *et al.*, 1997a).

3.3.6. Movimento viral

As partículas dos *Mastrevirus* e *Curtovirus* são restritas ao floema, especialmente às células do parênquima, à exceção de MSV e de *Chloris striate mosaic virus* (CSMV) que também invadem as células do mesófilo (Harrison, 1985; Timmermans *et al.*, 1994). A ausência de componente análogo ao DNA B tem sido relacionada com a limitação ao floema de alguns vírus como o BCTV, curtovírus que não alcança as células do mesófilo, aspecto que dificulta a sua transmissão mecânica (Briddon *et al.*, 1989). Partículas de *Begomovirus*, porém, além do floema, infectam a maioria dos tipos de células, incluindo córtex, mesófilo e epiderme, o que explica o fato de ser o único gênero da família *Geminiviridae* que pode ser transmitido mecanicamente. Esse aspecto pode, inclusive, ser atribuído à presença do componente B (com uma ou ambas proteínas envolvidas) (Timmermans *et al.*, 1994). O número de partículas produzidas na planta, como consequência de infecção viral, é relativamente pequeno e não apresenta relação com o enorme dano que causa às plantas infectadas (Lastra, 1993), mas certamente contribui para o fato de, em geral, esses vírus serem muito difíceis de purificar (Van Regenmortel *et al.*, 1997).

O movimento de vírus da família *Geminiviridae* na planta pode ser dividido em duas fases: movimento célula-a-célula (via plasmodesma) e a longa distância, como parte do fluxo dos fotoassimilados no sistema vascular. Além desse, os vírus executam um movimento extra: entrada e saída do núcleo (Palmer & Rybicki, 1998).

Em *Mastrevirus*, a proteína V1 (movimento) está presente em todas as plantas infectadas, localizada na parede celular, associada com o plasmodesma secundário, como as proteínas de movimento de vários vírus de RNA. Além deste polipeptídeo, a proteína da capa proteica também está envolvida no movimento viral (Palmer & Rybicki, 1998). De acordo com Pooma *et al.* (1996), em monopartidos a proteína da capa é completamente requerida para a infectividade.

A maior parte das investigações de movimento viral tem sido centralizada nos begomovírus e nas funções das proteínas de movimento do DNA B (Palmer & Rybicki, 1998), porém os mecanismos que envolvem a NS, a MP e a CP não estão elucidados.

Pooma *et al.* (1996) demonstraram alguns aspectos relativos à dispersão de begomovírus na planta. De acordo com os autores, o movimento célula-a-célula desses vírus envolve as proteínas NS e MP, não necessitando da participação da proteína da capa. No movimento sistêmico desses vírus em hospedeira adaptada, ou seja suscetível, a CP é dispensável (ex. TGMV em *N. benthamiana*) sendo, porém, necessária nos casos de infecção sistêmica de bipartidos em hospedeira não adaptada (ex. BGMV em *N. benthamiana*). Mutantes do gene *cp* do TGMV, infectaram sistemicamente a *N. benthamiana*, porém ficaram confinados às folhas inoculadas de *N. tabacum* e *Datura stramonium*, sugerindo que o mecanismo das proteínas envolvidas no movimento sistêmico é mais sensível à adaptação a hospedeiros e difere funcionalmente daquele associado ao movimento célula-a-célula. Em estudos envolvendo a agroinoculação em feijão com o DNA A de BDMV, Noueir *et al.* (1994) observaram a ocorrência de infecção com ausência de sintomas, refletindo o limitado movimento célula-a-célula em plantas infectadas na ausência do DNA B do begomovírus.

Redução de níveis de DNA viral em hospedeiros não adaptados refletem a diminuição no movimento viral célula-a-célula ou a longa distância (Petty *et al.*, 1995), que pode ser em função do sistema de defesa da hospedeira (Wang *et al.*, 1996). Adaptação à hospedeira envolve, provavelmente, uma eficiente expressão das proteínas de movimento do DNA B (Hou *et al.*, 1998).

Observações do percurso de DNA de BDMV, marcado com gene repórter GFP ("green fluorescent protein"), após bombardeamento em radículas de feijão, revelaram o movimento do DNA na planta durante todo seu ciclo de vida. Inicialmente, GFP foi detectado em células isoladas das radículas e em grupos de células, 12 e 24h após

inoculação, respectivamente, indicando o movimento célula-a-célula. Posteriormente, GFP foi detectada movendo-se nas células corticais, atingindo o floema 48h após o bombardeamento. Uma vez no floema, o DNA seguiu rapidamente para a raiz. Contínua linha de células fluorescentes foi observada do ponto de inoculação ao ápice, evidenciando o movimento célula-a-célula e a longa distância. Células externas ao floema foram invadidas e flores, vagem e tegumento de sementes, mas não o embrião, foram visualizadas com a fluorescência verde típica de GFP (Gilbertson *et al.*, 1998).

3.3.7. Desenvolvimento de sintomas

Diversos estudos têm revelado que replicação e movimento viral estão envolvidos com o desenvolvimento de sintomas e círculo de hospedeiros (Timmermans *et al.*, 1994).

Os tipos de sintomas resultantes da infecção por vírus da família *Geminiviridae* apresentam grande variabilidade nas plantas. Harrison (1985) associou sintomas com o tipo de vírus: mosaico estriado em gramíneas (MSV, CSMV, *Wheat dwarf virus*, WDV); nanismo, amarelecimento, enrolamento foliar e distorção em dicotiledôneas (TYDV, BCTV); nanismo, enrolamento foliar e distorção em dicotiledôneas *Tobacco leaf curl virus* (TLCV), *Tomato leaf curl virus* (ToLCV), *Honeysuckle yellow vein mosaic* (HYVM), SqLCV); mosaico verde e amarelo (ACMV, BGMV, EuMV, *Mung bean yellow mosaic* (MYMV)) e TGMV.

Polston & Anderson (1997) observaram em tomate infectado com begomovírus, sintomas de mosaico dourado, clorose das nervuras, mosqueado clorótico, clorose da margem da folha, enrugamento e redução do limbo, abscisão foliar, mosaico amarelo brilhante. Sintomas de geminivírus podem variar com o vírus e a estirpe, cultivar e idade da planta por ocasião da infecção e condições ambientais.

Lastra (1993) acompanhou e descreveu a evolução da infecção e sintomatologia observada em tomate infectado pelo begomovírus que provoca o mosaico amarelo: clorofila e proteínas são substancialmente reduzidas, resultando em folhas amarelas; quantidade de açúcares e amido é alterada nas primeiras folhas, a translocação é prejudicada pela presença do vírus no floema e os metabólitos se acumulam na parte superior da planta conferindo às

folhas superiores uma consistência coriácea e bordos por vezes arroxeados; a taxa de fotossíntese é reduzida a um terço e ocorre aumento da respiração celular; há redução no crescimento e a morte pode ocorrer, se a infecção iniciou-se precocemente.

3.3.8. Diagnose viral e identificação de espécies

Infecção de begomovírus em tomate, por vezes, pode ser confundida com a de outros vírus, especialmente de vírus pertencente à família *Potyviridae* e *Tobamoviridae*. Dentre os critérios mais usados para diagnose da infecção, pode-se citar: a transmissão com a mosca branca, a observação em microscópio ótico de inclusões nucleares características em tecido foliar ou da flor corada com Azure A, a sorologia com emprego de anti-soro policlonal (incomum pela dificuldade de obter o anti-soro e imprecisão na diferenciação de espécies) ou monoclonal produzido contra a capa proteica (específicos, porém dispendiosos para uso em larga escala) (Harrison, 1985; Polston & Anderson, 1997; Morales *et al.*, 1990; Wyatt & Brown, 1996). Os métodos moleculares, apesar do custo, são considerados atualmente a forma mais rápida, eficiente e específica para a identificação dos vírus. A hibridização com "dot blot" ou "squash blot" com sonda preparada com DNA marcado com nucleotídeos radioativos (^{32}P) é um dos métodos mais usados. No entanto, a sonda não radioativa, biotina ou digoxigenina, apesar de menos sensível, vem sendo usada em substituição a anterior, pelo custo inferior e por apresentar menor risco à saúde. A técnica de PCR com oligonucleotídeos específicos é uma técnica precisa, sensível, que vem sendo utilizada para detecção e estudo de variabilidade genética, permitindo a diferenciação de begomovírus (Gilbertson *et al.*, 1991c; Wyatt & Brown, 1996).

Para identificação e distinção entre espécies, estirpes e isolados, todavia, têm sido adotadas a análise e a comparação de seqüência genômica total ou parcial, particularmente da região comum, região intergênica, da capa proteica e da proteína associada à replicação, regiões essas de importância taxonômica. Tem sido proposto com essa análise, que dois isolados com homologia superior a 90% em toda a seqüência de nucleotídeos do genoma e/ou na seqüência de aminoácidos da capa proteica, sejam considerados da mesma espécie (Padidam *et al.*, 1995; Czosnek & Laterrot, 1997).

A caracterização molecular de begomovírus isolados de tomateiro nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil vem sendo realizada mediante a análise da seqüência de nucleotídeos e aminoácidos dos isolados coletados, principalmente do DNA A, a qual tem permitido o conhecimento da distribuição e da diversidade genética de espécies novas de begomovírus que infectam o tomate no país (Simone Ribeiro, comunicação pessoal) .

O emprego da análise de seqüências genômicas possibilitou separar os *Begomovirus* já descritos em dois grandes grupos: os originados do Novo Mundo (bipartidos com homologia entre si de 61-97%) e os oriundos do Velho Mundo (mono ou bipartidos com 53-99% de identidade) (Brown *et al.*, 1999). Entre os dois grupos a homologia foi significativamente diferente, variando entre 44 e 56% (Padidam *et al.*, 1995). Hibridização DNA-DNA confirmam os grupos. Begomovírus das Américas e do Caribe hibridizam com sondas de outros begomovírus do Novo Mundo, mas não com aqueles do Velho Mundo (Brown, *et al.*, 1995).

3.4. MOSCA BRANCA, VETOR DE *BEGOMOVIRUS*

3.4.1. Histórico

A mosca branca, *B. tabaci*, foi descrita na Grécia por Gennadius, no ano de 1889, como uma praga ocorrendo na cultura do fumo (*Nicotiana* sp.), ocasião em que foi denominada *Aleyrodes tabaci*, a mosca branca do fumo. Poucos anos depois, em 1897, foi encontrada na batata doce (*Ipomoea batatas* Poir), nos EUA, sendo então denominada *Bemisia inconspicua*, a mosca branca da batata doce. Em 1957, Russel renomeia essas espécies e outras 18 previamente descritas em um único taxon, *B. tabaci* (Brown *et al.*, 1995).

B. tabaci tem como prováveis centros de origem o Paquistão ou a Índia, visto que espécies muito relacionadas, *B. capitata* e *B. graminosus*, são endêmicas na Índia, e uma diversidade de parasitóides de *Bemisia* é encontrada no Paquistão (Brown *et al.*, 1995). Nos anos 50, *B. tabaci* era praga esporádica em algodão (*Gossypium hirsutum* L.), no México, no sul dos EUA, em Cuba e no Caribe. No início dos anos 80, uma alta incidência do inseto e do BGMV foi observada em plantios de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), na República

Dominicana (Brown & Bird, 1992). Nos anos seguintes, a mosca branca é referida como uma praga séria e importante vetor de vírus para o algodão, cucurbitáceas, alface (*Lactuca sativa* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.) e tomate, por toda a região (Brown & Bird, 1992). A partir de então, surtos populacionais do inseto são relatados em vários países e culturas. Espécies raramente associadas à *B. tabaci* como pimentão, tomate, couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), repolho (*B. oleracea* L. var. *capitata*), couve-flor (*B. oleracea* L. var. *botrytis*) e alfafa (*Medicago sativa* L.) passam a ser frequentemente encontradas no campo com severas infestações (Johnson *et al.*, 1982; Perring *et al.*, 1992). Na Flórida, em 1987, poinsetia (*Euphorbia pulcherrima* Willd), planta ornamental antes não relatada como hospedeira, é mencionada dentre as mais atacadas pela mosca branca, sofrendo sérios danos nas estufas de produção (Perring, 1996).

As evidentes alterações na preferência de hospedeiros e as visíveis desordens fitotóxicas causadas em cucurbitáceas e no tomate sob infestação do inseto induziram à condução de pesquisas nos EUA, as quais sugeriram que as mudanças nos campos de cultivo decorriam da introdução de uma nova raça ou biótipo de *B. tabaci* (Perring *et al.*, 1992). Diferenças na biologia e no comportamento encontradas nos estudos entre essa nova praga e populações da conhecida *Bemisia tabaci* levaram à denominação desse novo biótipo de "biótipo B", "colônia Flórida", "raça Flórida", "raça poinsetia", "raça B", "espécie nova", "tipo B", "mosca-branca-da-folha-prateada", sendo a antiga forma denominada de "biótipo A", "raça Arizona", "raça algodão", "raça A", "espécie velha", "tipo A" (Bharathan *et al.*, 1990; Byrne & Miller, 1990; Bethke *et al.*, 1991; Perring *et al.*, 1993; Costa & Brown, 1991; Perring *et al.*, 1992; Perring, 1996).

Durante vários anos, as duas populações de mosca branca foram referidas, nos EUA, como raças ou biótipos de *B. tabaci*. Contudo, a sistemática de *Bemisia* retornava ao foco de pesquisas em vários países e comparações biológicas, morfométricas e comportamentais feitas por vários autores concorriam para a separação das moscas brancas em duas espécies (Bethke *et al.*, 1991; Byrne & Miller, 1990; Bharathan *et al.*, 1990; Gill, 1992).

Estudos comparativos, liderados por Perring e Bellows, objetivando elucidar as diferenças entre os biótipos A e B, possibilitaram as seguintes constatações: 1- é ausente a quarta seta na região anterior da pupa do biótipo B; 2- o biótipo B possui maior mobilidade e

dispersão dos indivíduos, tanto para curtas como para longas distâncias, que o biótipo A; 3 - é muito maior o número de hospedeiros e a capacidade de adaptação do biótipo B a novas espécies vegetais (ex. o tomate); 4- desordens fitotóxicas, como o prateamento em cucurbitáceas e o amadurecimento irregular do tomate, somente são induzidas pelo biótipo B; 5 - o biótipo B ingere maior quantidade de seiva durante a alimentação que o Biótipo A; 6 - a excreção de substância açucarada ("honeydew") é mais elevada no biótipo B; 7- a taxa de oviposição do biótipo B é duas vezes maior que o biótipo A; 8- em acasalamentos interespecíficos, não houve surgimento de fêmeas (diplóides) na progênie, indicando ausência de cópula, pois os machos (haplóides) são produzidos partenogenicamente; 9- análise da frequência alozímica e de produtos de PCR do DNA genômico detectaram diferenças genéticas (AxA ou BxB, 80-100% de similaridade; AxB menos de 10%) (Perring *et al.*, 1992; Perring *et al.*, 1993; Bellows *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995). Apesar dos relatos de diferenças na transmissão de begomovírus pelos biótipos A e B (Cohen *et al.*, 1992) os dados de transmissão não compuseram as avaliações comparativas dos autores. Com as informações resultantes dos estudos, Bellows *et al.* (1994) concluíram que as diferenças fenotípicas e genotípicas dos dois biótipos separam-nos em espécies diferentes e denominaram *B. argentifolii* Bellows & Perring à mosca branca da folha prateada.

A validade de status de espécie concedido ao biótipo B, com base nas avaliações de Bellows *et al.* (1994) é questionada e parece não conclusiva (Bartlett & Gawel, 1993; Byrne *et al.*, 1995; Henneberry *et al.*, 1998; Markham *et al.*, 1996), apesar das reconhecidas diferenças entre as duas moscas brancas. A espécie reconhecida como *B. tabaci* e a proposta como *B. argentifolii* podem representar um complexo de espécies ou de raças sob mudanças evolucionárias (Bellows *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995). Em virtude disso, terminologias de raças, biótipos, espécies e complexo são encontradas na literatura que aborda a mosca branca e deverão continuar até que sejam obtidos resultados conclusivos. No presente trabalho adotou-se a terminologia sugerida por Bellows e Perring, *B. argentifolii* para a mosca branca vetor de begomovírus para o tomateiro.

3.4.2. Dispersão da mosca branca

No Mundo

B. argentifolii tem sido documentada em regiões tropicais e subtropicais de todos os continentes, exceto na região equatorial da América do Sul. O transporte de plantas ornamentais, notadamente a poinsetia, disseminou e estabeleceu a mosca-branca-da-folha-prateada em áreas agrícolas de muitos países, tanto em ambientes protegidos como em cultivos de campo. Sua introdução na Bacia do Caribe ocorreu entre 1987 e 1988, dispersando-se como praga por toda a região, primariamente em plantas ornamentais, passando, posteriormente, para tomate e alcançando campos de feijão, algodão, pimentão, abóbora, fumo, melão (*Cucumis melo* L.), e quiabo (*Hibiscus esculentus* L.). Similarmente, por volta de 1988-1989, *B. argentifolii* foi documentada no Arizona, Califórnia, Flórida, Texas e em vários outros locais dos EUA e, em 1990-1991 estava largamente disseminada pelos quatro estados americanos. Zonas agrícolas da Bacia do Mediterrâneo, África, América Central (Panamá, Costa Rica, Nicarágua, República Dominicana, Guatemala, El Salvador, Cuba e Honduras), México e América do Sul (Argentina, Brasil, Colômbia e Venezuela) foram igualmente infestadas pela mosca branca, a partir do início da década de 90. Plantas cultivadas em casa de vegetação de toda a Europa e Japão, e de áreas de clima temperado dos EUA, foram rapidamente colonizadas pelo inseto como resultado do transporte de ornamentais infestadas (Brown & Bird, 1992, Bedford *et al.*, 1994; Costa *et al.*, 1993a; Brown *et al.*, 1995). A introdução de *B. argentifolii* nas diversas localidades dos continentes ocorreu de maneira praticamente simultânea, expressando-se como praga importante nos diferentes países entre 1986 e 1991 (Costa *et al.*, 1993a; Lastra, 1993; Lourenção & Nagai, 1994).

A dispersão da mosca branca nas diferentes regiões agrícolas tem sido relacionada à expansão da monocultura, às práticas agrícolas atuais com regime de cultivo intensivo, às mudanças das condições climáticas, ao transporte internacional de material vegetal infestado com *Bemisia* (Duffus, 1992; Duffus, 1996; Brown *et al.*, 1995) e ao uso indiscriminado de agrotóxicos. De acordo com Ditttrich *et al.* (1990), sob estresse do inseticida, indivíduos de *B. argentifolii*, resistentes a inseticidas, aumentam em várias vezes a sua taxa de oviposição. Esses aspectos, ao lado da grande facilidade de adaptação a novos

hospedeiros e dos danos resultantes como inseto sugador e vetor de vírus, conferiram-lhe a posição de uma das mais sérias pragas atuais, em nível mundial (Caballero, 1996).

No Brasil

Os primeiros relatos de ocorrência de *B. tabaci* no Brasil são atribuídos a Bondar em 1928, infestando *Euphorbia hirtella* L., *Nicotiana glauca* Graham. e *N. tabacum* L., na Bahia (Caballero, 1993). Surtos de mosca branca, no entanto, foram registrados nos estados de São Paulo e Paraná em 1968, em cultivos de algodão (Costa *et al.*, 1973) e, em 1972 e 1973, em plantios de feijão, quiabo, soja (*Glycine max* (L.) Merrill., girassol (*Helianthus annuus* L.), plantas daninhas como *Acanthospermum hispidum* DC., *Momordica charantia* L. e *Sida* sp. (Costa & Russel, 1975). Uma explosão do nível populacional de *B. tabaci*, sem precedentes, era registrada naqueles estados, decorrente da considerável expansão na área de plantio da soja, hospedeira favorável à colonização da mosca branca.

Apesar desses surtos, até início da década de 90, infestações de mosca branca, em culturas ou invasoras, não foram motivo de novos relatos. Porém, nos anos de 1991 e 1992, ressurgiram nas regiões de Paulínia, Jaguariúna, Artur Nogueira e Holambra (São Paulo) altas infestações da mosca branca com expressivo impacto nas culturas de tomate, brócolos, abóbora, algodão, feijão, poinsetia, berinjela (*Solanum melongena* L.) e crisântemo (*Chrysanthemum morifolium*) (Lourenção & Nagai, 1994). Foram constatados frutos de tomate com amadurecimento irregular e viroses em 100% das plantas de feijão.

Em consequência do considerável crescimento populacional da praga, notadamente em hortaliças e em plantas ornamentais, como também do prateamento observado nas folhas das aboboreiras, fitotoxemia associada a *B. argentifolii* nos EUA, levantou-se a hipótese da presença da nova espécie no país (Lourenção & Nagai, 1994). A introdução teria ocorrido possivelmente pela importação de plantas ornamentais no início da década de 90, no estado de São Paulo (Haji *et al.*, 1996; Oliveira & Faria, 2000).

No Distrito Federal, a praga foi relatada em 1993 em tomate indústria e em repolho, quando também foram observados sintomas de infecção por begomovírus nas plantas de tomate no campo (França *et al.*, 1996). Exemplares da mosca branca enviadas

para a Universidade do Arizona (EUA) revelaram que o inseto envolvido era *B. argentifolii*, indicando que a nova espécie já alcançara aquela região. Em 1995, os sintomas de virose foram também observados em até 80% de plantas de tomate para mesa (França *et al.*, 1996). No final desse mesmo ano, elevados níveis populacionais da mosca branca foram registrados no Submédio do Vale do São Francisco-Pe, tendo como hospedeiros principais cucurbitáceas, feijão, tomate, pimentão e videira (*Vitis vinifera* L.) (Haji *et al.*, 1996). Em Roraima, o primeiro registro da mosca branca ocorreu em 1998, atacando soja, berinjela, tomate, melão e melancia (*Citrullus lanatus* L.) (Moreira *et al.*, 1999a).

Segundo Oliveira & Faria (2000), nuvens do inseto têm sido relatadas em diversas regiões, indicando que a praga, em virtude das condições climáticas favoráveis existentes no país, estabeleceu-se, tornando difícil o seu controle nas culturas. Não há respostas imediatas para explicar esse fenômeno, porque diversos fatores têm influenciado essas mudanças, como aplicação massiva de inseticidas e abundância de hospedeiros, associados ao clima quente e úmido. O vento pode disseminar os adultos para curtas ou longas distâncias, enquanto que adultos e formas imaturas são involuntariamente transportadas pelo homem nos vegetais (Brown *et al.*, 1995).

Estudos realizados no Brasil têm indicado que *B. argentifolii* é encontrada na maioria dos estados. Empregando-se métodos morfológicos e moleculares para análise de mosca branca coletada em 20 estados, foi detectada a presença de *B. argentifolii* em todos os estados e de *B. tabaci* em apenas cinco deles (Lima *et al.*, 1999a; Lima *et al.*, 2000b; Oliveira, *et al.*, 1997). Villas-Bôas *et al.* (1999) e Villas-Bôas (2000) demonstraram que a grande maioria das populações coletadas no Brasil agrupa-se com o padrão de *B. argentifolii*. Essas informações confirmam que *B. argentifolii* é a espécie que comumente devasta os cultivos agrícolas nas várias regiões geográficas do país. Com relação à predominância de *B. argentifolii* sobre *B. tabaci*, também constatada nos EUA, especula-se que *B. tabaci* não consegue co-existir com *B. argentifolii* (Costa *et al.*, 1993a), uma vez que esta espécie é melhor competidora e, sendo assim, desloca *B. tabaci* (Perring *et al.*, 1991). Odum (1971), citado por Perring (1996), situa que "organismos muito relacionados em hábitos e forma de vida não ocorrem no mesmo lugar. Se ocorrem, possuem hospedeiros diferentes, agem em tempos diferentes, ou não ocupam o mesmo nicho".

3.4.3. Taxonomia e biologia da mosca branca

B. argentifolii está classificada na ordem Hemiptera, sub-ordem Homoptera, série Sternorrhyncha, família Aleyrodidae, sub-família Aleyrodinae (Campbell *et al.*, 1996; Costa, 1996). A identificação de espécies é problemática, pois ainda se adota a morfologia do quarto ínstar, que pode variar com o hospedeiro, e não há chaves para adultos (Brown *et al.*, 1995). A existência de biótipos tem incentivado o emprego de técnicas moleculares para a identificação específica (Caballero, 1996).

Os adultos da mosca branca *B. argentifolii* são pequenos, a fêmea atinge 0,9 mm de comprimento e o macho 0,8 mm com 2 a 3 mm de envergadura. O corpo tem coloração amarelada e possui quatro asas membranosas recobertas com uma pulverulência branca. Quando em repouso, as asas ficam paralelas sobre o abdômen, levemente separadas na linha média do dorso (Figura 3).

O inseto apresenta cinco estágios de desenvolvimento: ovo, primeiro, segundo, terceiro, quarto ínstar e o adulto (Figura 4). Os ovos, em número de 100-300 por fêmea, são colocados na superfície abaxial da folha (Brown & Bird, 1992). Ao final de sete dias, ocorre a eclosão das ninfas de 1º ínstar, a única fase móvel do inseto. Estas se alimentam introduzindo o estilete na folha até atingir o floema, de onde retiram aminoácidos e carboidratos, permanecendo no local durante os estádios ninfaís seguintes (Brown & Bird, 1992). No quarto ínstar o inseto possui 3 sub-estádios: 1º- a coloração do corpo é ainda translúcida, 2º- evolui para branca opaca e 3º- fase de "pupa"(não se alimenta) o corpo é amarelo e os ocelos vermelhos são bem visíveis. O adulto emerge da pupa através de uma abertura em forma de T invertido, deixando a exúvia presa à folha (Byrne & Bellows, 1991; Flint, 1995).

Sob condições favoráveis, *B. argentifolii* pode apresentar de 11-15 gerações por ano. Seu ciclo de vida pode variar influenciado pela hospedeira e, principalmente pela temperatura. Em geral, à temperatura de 25°C seu ciclo é de apenas 27 dias, enquanto que a 14°C demora 101 dias para se completar. Villas Bôas (2000) constatou que, à temperatura de 28 ±2° C e fotofase de 14h, o ciclo de *B. argentifolii*, em tomate foi de 22 dias, e em repolho de 20 dias. A longevidade da fêmea, nas mesmas condições, foi, em média, de 6 dias em

A



B



C



Figura 3- Adultos de mosca branca *Bemisia argentifolii* (A); vista ventral do macho (B) e da fêmea (C) da mosca branca.

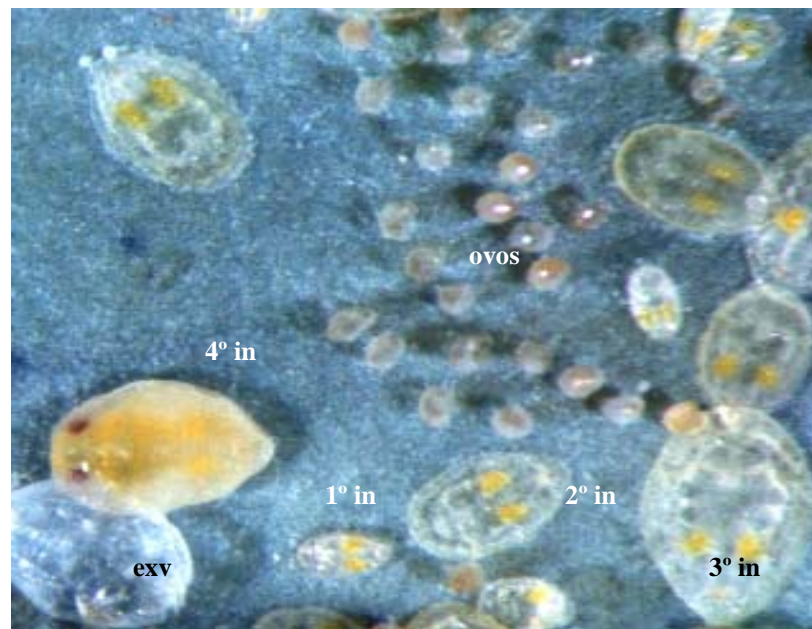


Figura 4- Ovos, ninfas do primeiro ao quarto ínstar (in) e exúvia (exv) de mosca branca, *Bemisia argentifolii* .

tomate e de 13 dias em repolho, tendo havido valores máximos de 28 e 36 dias, respectivamente (Villas-Bôas, 2000).

A mosca branca tem reprodução sexual e arrenótoca. Quando fecundadas, as fêmeas dão origem a machos e fêmeas, enquanto que ovos não fertilizados de fêmeas virgens produzem exclusivamente machos (arrenotoquia) (Byrne & Bellows, 1991). As fêmeas vivem mais que os machos e a razão sexual (fêmea:macho) varia de 1:1 a 4:1 com a hospedeira e as estações do ano, sendo maior a taxa em estação quente (Byrne & Bellows, 1991). Villas-Bôas (1998) encontrou para *B. argentifolii* uma razão sexual em tomate de 2,7:1 e em repolho de 3,7:1. Segundo Norman Jr. *et al.* (1997) essa razão pode, teoricamente, explicar o rápido aumento da população de mosca branca: de 140 ovos, adotando-se a razão de 2,7:1, no 1º ciclo serão originadas 100 fêmeas, no 2º ciclo 10.000 e no 3º ciclo 1.000.000 fêmeas (desconsiderando a mortalidade).

3.4.4. Plantas hospedeiras e sintomas causados pela praga

A mosca branca *B. argentifolii*, então *B. tabaci* biótipo B, foi relatada como uma espécie polífaga, cuja lista de hospedeiros, no ano de 1993, já superava 500 espécies vegetais pertencentes a 74 famílias botânicas, entre plantas cultivadas e silvestres (Salguero, 1993), com as quais mantém uma relação completa (trófica e reprodutiva), ou parcial (somente trófica) (Hilje, 1999). Dentre essas espécies, 17 são cucurbitáceas, 20 convolvuláceas, 32 euphorbiáceas, 33 solanáceas, 35 malváceas, 56 compostas e 96 leguminosas. Das mais de 1.200 espécies de mosca branca existentes, a vasta maioria tem por hospedeiros, plantas lenhosas. *B. argentifolii* é uma das poucas espécies que colonizam, predominantemente, plantas herbáceas e anuais (Markham *et al.*, 1996).

As espécies mais comumente relatadas como hospedeiros de *B. argentifolii* no Brasil e no mundo, são: abobrinha, algodão, alface, berinjela, couve-flor, crisântemo, feijão, fumo, melancia, melão, pimentão, poinsetia, quiabo, repolho, soja, tomate, videira, amendoim (*Arachis hypogaea* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), beterraba (*Beta vulgaris* L.), brócolos (*Brassica oleracea* L. var. *italica*); cenoura (*Daucus carota* L. var. *sativa* DC.); chuchu (*Sechium edule* Sw.), jiló (*Solanum ovigerum* Dun.) e pepino (*Cucumis sativus* L.). A grande maioria dessas plantas propiciam condições favoráveis à reprodução e manutenção de altas populações do aleirodídeo, sem interrupção do seu ciclo de vida. (Brown *et al.*, 1995; Perring, 1996; Tsai & Wang, 1996; Lourenção & Nagai, 1994; Haji,

1996). Segundo Costa e Russel (1974), a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) foi erroneamente citada como hospedeira de mosca branca no Brasil, em 1973, por Costa e Kitajima. Villas-Bôas (2000), constatou que tanto a mandioca como o milho (*Zea mays* L.) não são hospedeiros favoráveis à colonização de *B. argentifolii*. Haji (1996), contudo, cita sua ocorrência em milho e mandioca, no Brasil.

Algumas das plantas daninhas assinaladas como hospedeiros alternativos de *B. argentifolii*, no Brasil, de 1996 a 1999, são: amendoim bravo (*Euphorbia heterophylla* L.), amor de vaqueiro (*Desmodium molle* DC), breo (*Amaranthus viridis* L.), beldroega (*Portulaca oleraceae* L.), estramônio (*Datura stramonium* L.), ervanço preto (*Diodia teres* Walt.), guanxuma (*Sida rhombifolia* L.), *Ipomoea acuminata* Roem. e Schult, joá bravo (*Solanum viarum* Dun), joá de capote (*Nicandra physalodes* (L.) Gaertn.), malva de lavar prato (*Herissantia crispa* (L.) Brizicky), malva branca (*Waltheria americana* L.), melancia da praia (*Solanum ambrosiacum* Vell.), mussambê (*Cleome spinosa* Jacq), perpétua do mato (*Borreria verticillata* G.F.W. Mayer), picão preto (*Bidens pilosa* L.), vassourinha (*Sida carpinifolia* L.), serralha verdadeira (*Sonchus oleraceus* L.), *Merremia aegyptia* L., *Senna obtusifolia* (Lourenção & Nagai, 1994; Haji *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 1999b; Vasconcelos *et al.*, 1999).

Os sintomas da infestação da mosca branca em tomate indústria são de clorose, nanismo, encrespamento das folhas, pouca floração, frutos descoloridos e redução do grau brix (Alvarez *et al.*, 1993), além da desordem fitotóxica que provoca o amadurecimento irregular do fruto. O prateamento da folha na abobrinha é causado, particularmente, pela alimentação das ninfas de *B. argentifolii* (Shuster *et al.*, 1991; Yokomi *et al.*, 1990; Perring 1996) e o número de insetos imaturos tem relação com a severidade dos sintomas de fitotoxemia na abóbora e no tomate (Schuster *et al.*, 1989; Schuster *et al.*, 1991). As substâncias tóxicas injetadas pela mosca branca são translocadas para toda a planta, mas os sintomas são reversíveis e não aparecem nos tecidos que surgem após a remoção do inseto (Yokomi *et al.*, 1990).

Além de induzir desordens fitotóxicas em abobrinha e no tomate, *B. argentifolii* induz alterações fisiológicas em outras espécies vegetais (Yokomi *et al.*, 1990; Perring *et al.*, 1991; Lourenção & Nagai, 1994), a saber: embranquecimento do caule em brássicas, alface, e abóbora, *Cucurbita maxima* Duch.; clareamento das nervuras em poinsetia e clareamento da raiz em cenoura (Costa *et al.*, 1993b; Brown *et al.*, 1992; Costa & Brown, 1990; Brown

et al., 1995). Os sintomas dessas desordens são tão evidentes que sua ocorrência tem sido usada como um indicador da chegada da *B. argentifolii* em várias partes dos EUA (Perring, 1996).

3.4.5. Importância econômica da mosca branca

A mosca branca pode ocasionar nas plantas danos diretos e indiretos. Nos danos diretos, pela sucção da seiva do floema, causa debilidade às plantas hospedeiras, as quais apresentam deficiência mineral, queda de folhas, subdesenvolvimento, podendo chegar à morte ou a uma diminuição da produção superior a 50%, especialmente sob altas densidades populacionais (Byrne & Bellows, 1991). As desordens fitotóxicas causam a desuniformidade da maturação, dificultam o reconhecimento do ponto de colheita, ocasionando a redução na produção do tomate, no preço do produto e na qualidade da polpa que se torna "isoporizada" (Haji *et al.*, 1996). Um dos danos indiretos é consequência da excreção de substância açucarada, que serve como meio para o crescimento de fungos como o *Capnodium* spp., que causa fumagina sobre ramos, folhas, flores e frutos, depreciando-os para a comercialização ou consumo (Byrne & Bellows, 1991; Bethke & Redak, 1997). No entanto, o maior dano causado pela mosca branca é a transmissão de begomovírus, os quais causam, nas plantações, prejuízos ainda maiores, pois, mesmo sob baixas populações do inseto, um grande número de plantas podem ser infectadas redundando em perdas bastante elevadas para diversas culturas em toda extensão agricultável (Brown & Bird, 1992).

Embora difícil de quantificar o impacto causado pela *B. argentifolii* sobre a produção das culturas, algumas cifras dão uma idéia parcial da magnitude do dano. No sul dos EUA em 1991 e 1992, as perdas foram estimadas em US\$ 200 e US\$ 500 milhões, respectivamente. No Vale Imperial, Califórnia, de 1991 a 1995, as perdas na produção alcançaram US\$ 100 milhões anuais (Hilje, 1996; Bellows *et al.*, 1994; Hennberry *et al.*, 1998). No México, foram registradas para o ano de 1994, perdas parciais em soja, algodão, tomate, batata e abóbora em torno de 10.000 hectares e, em 1995, perdas totais em mais de 9.000 hectares (Robledo & Sagahón, 1999). Na Guatemala, as perdas na produção de tomate foram de 60% em 1992, enquanto na República Dominicana, as perdas na produção da hortaliça alcançaram 80% nos anos de 1993-1994.

No Brasil, ainda são escassos os dados de perdas na produção devido à *B. argentifolii*. No entanto, segundo Oliveira & Faria (2000), considerando as áreas e culturas, quebra de produção, gastos com insumos e desemprego gerado, os danos ultrapassam os R\$ 4 bilhões. O Nordeste é a região de maior ocorrência da praga, destacando-se os estados do Rio Grande do Norte, Pernambuco, Bahia e Ceará (Moreira *et al.*, 1999a). No Rio Grande do Norte, os danos provocados pelo aleirodídeo, na produtividade do tomate, no ano de 1998, foram de 40 a 50% (Moreira *et al.*, 1999b). No Submédio do Vale do São Francisco - Pe, os prejuízos ainda não foram quantificados, contudo, os numerosos hospedeiros, sob elevada infestação, constituem uma constante ameaça para a agricultura pernambucana, sobretudo em relação às hortaliças (Haji, 1996). Graves prejuízos em feijão, pimentão, cucurbitáceas e tomate industrial foram anteriormente relatados como consequência da praga naquela região (Haji, 1997). O tomate sofre o impacto da mosca branca como praga e como vetor de begomovírus. O amadurecimento irregular do fruto ocorre em todas as regiões onde a praga está presente. As viroses, por sua vez, têm provocado devastações e abandono de áreas tradicionalmente cultivadas pela hortaliça.

O controle do inseto exige um conjunto de medidas alternativas. A imediata remoção e destruição de restos culturais, alteração do período de plantio, rotação de cultura, período livre de hospedeiros, aplicação de bioinseticidas, reguladores de crescimento e óleos minerais (produtos biorracionais), alternância de inseticidas (carbamatos, organofosforados e piretróides) são alguns dos manejos recomendados (Oliveira & Faria, 2000). Contudo, a melhor alternativa para o controle da virose sempre será o uso de variedades resistentes.

3.5. RELAÇÃO VÍRUS-VETOR-PLANTA

3.5.1. Tipo de transmissão

Moscas brancas estão envolvidas na transmissão de vírus dos gêneros *Begomovirus*, *Closterovirus*, *Carlavirus*, *Potyvirus*, *Nepovirus*, *Luteovirus* e vírus de DNA com partículas em forma de bastão (Duffus, 1996). Porém, o *Begomovirus* é o único gênero transmitido somente por mosca branca do gênero *Bemisia*.

A mosca branca alimenta-se introduzindo o estilete no floema das plantas de onde extrai aminoácidos, carboidratos, proteínas vegetais, partículas de vírus e proteínas da capa proteica (Pham *et al.*, 2000). Essa alimentação especializada é a efetiva forma de adquirir e, subseqüentemente, transmitir begomovírus que, caracteristicamente, infectam tecidos associados aos floemas (Brown & Bird, 1992; Lastra, 1993). A modalidade de transmissão de begomovírus pela mosca branca é do tipo circulativa, não propagativa (Rubinstein & Czosnek, 1997; Brown, 1997; Ghanim *et al.*, 1998; Morin *et al.*, 1999; Rossell, *et al.*, 1999).

Evidências com relação à multiplicação do vírus no vetor, transmissão circulativa propagativa, são contraditórias. De um lado, o aumento no título de TYLCV na mosca branca, iniciado com 12h e terminado, com um pico, após 108h da aquisição tem, como explicação mais provável, a multiplicação do vírus no vetor (Metha *et al.*, 1994b). A análise de DNA viral contido no inseto virulífero, por outro lado, tem demonstrado que dsDNA do TYLCV (forma replicativa) não ocorre, indicando que o vírus não multiplica no inseto vetor (Czosnek *et al.*, 1989; Antignus *et al.*, 1994). Outros relatos, ainda que inconclusivos, mantêm a hipótese da replicação viral. A alta freqüência de transmissão do SqCLV após o período latente, associado com efeitos aparentemente nocivos ao vetor, favorecem a proposição da multiplicação no vetor (Cohen *et al.*, 1983). O fato de a concentração do TYLCV na mosca branca ser de no mínimo 1.000 vezes superior àquela encontrada na planta, também foi apresentada como mais um indício da relação propagativa (Navot *et al.*, 1989). Essa relação, contudo, foi questionada ao admitir-se que a referida concentração do TYLCV no vetor poderia estar mais associada ao processo de transferência do vírus da hemocoele para a glândula salivar, a qual é mais lenta que a taxa de acúmulo do vírus no vetor (Caciagli *et al.*, 1995), do que propriamente à replicação viral no inseto. Em outros casos, observou-se ainda que a mosca branca virulífera perde sua infectividade e o teste é negativo para a presença de DNA viral quando o vetor é alimentado em plantas sadias (Zeidam & Czosnek, 1991; Caciagli *et al.*, 1995). Caciagli & Bosco (1997) não excluem a hipótese de replicação do vírus no inseto, mas argumentam que se ela ocorre é por curto período de tempo, ou é mais lenta que a excreção e a degradação, considerando o decréscimo do DNA total que observaram nos indivíduos virulíferos em seus experimentos.

No modelo proposto por Hunter *et al.* (1998), os quais estudaram a localização dos begomovírus ToMoV e do *Cabbage leaf curl virus* (CabLCV) na mosca branca, o vírus

ingerido pelo inseto juntamente com os fluidos vegetais, alcança o esôfago, intestino anterior e entra na câmara filtro. O excesso de água é desviado para o íleo do intestino posterior, concentrando nutrientes e begomovírus. O vírus é adsorvido na membrana da câmara filtro ou da região anterior do intestino médio e passa para a hemocoele (aquisição). Uma vez na hemolinfa, alcança a glândula salivar, atravessa sua membrana e é liberado dentro de dutos salivares, sendo injetado no floema da planta com a saliva, durante a alimentação do inseto (inoculação). É provável que membranas da câmara filtro, do intestino médio e das glândulas salivares possuam sítios receptores, os quais agem como barreiras seletivas, para a aquisição e transmissão de begomovírus, porém o exato modo do vírus entrar nas células é desconhecido (Morin *et al.*, 1999; Hunter *et al.*, 1998).

3.5.2. Aspectos da aquisição e transmissão do vírus

A aquisição dos begomovírus não é um processo passivo (Zeidan & Czosnek, 1991) e a passagem do virion através do sistema digestivo da mosca branca é um componente crítico para a transmissão do vírus. A sua forma transmissível (virions, nucleoproteína ou ds DNA) não foi ainda elucidada, contudo, tem sido demonstrado que a capa proteica é necessária para o sucesso da transmissão, o que indica que o virion é a forma transmissível (Brown, 1997; Pham *et al.*, 2000).

Tem sido demonstrado que a capa proteica é essencial para o processo de aquisição viral, visto que, vírus não encapsidados não podem ser transmitidos (Liu *et al.*, 1997). O alto grau de conservação da CP e a exclusiva transmissão de begomovírus por *Bemisia* spp. sugerem uma precisa função da CP na especificidade do inseto vetor (Hofer *et al.*, 1997a). Begomovírus com deleção no gene *cp* não são adquiridos pela mosca branca (Markan *et al.*, 1996). A quimera de ACMV, resultante da substituição do gene *cp* do ACMV (begomovírus), pelo *cp* de BCTV (curtovírus), passou a ser transmitida pela cigarrinha (Brown, 1997).

Segundo alguns autores, a aquisição do vírus pela mosca branca é não-específica (Liu, *et al.*, 1997) e não implica na infectividade do inseto (Zeidan & Czosnek, 1991), pois *Trialeurodes vaporariorum* e *T. abutilonea* adquirem begomovírus, mas somente *Bemisia* spp. é capaz de transmiti-lo (Cohen *et al.*, 1989; Zeidan & Czosnek, 1991; Liu *et al.*, 1997). No não-vetor, o begomovírus não é detectado nas frações da hemolinfa,

indicando que não atravessa a interface intestino-hemocoele, ou, se atravessa, é rapidamente degradado na hemolinfa do não-vetor (Rossell *et al.*, 1999). Além de *T. vaporariorum*, a aquisição não específica de begomovírus tem sido demonstrada para o não-vetor *Myzus persicae*. A habilidade do afídeo em adquirir o vírus indica que o inseto alcança, por ocasião de sua alimentação na planta, os mesmos tecidos que a mosca branca, ingerindo as partículas virais (Liu *et al.*, 1997).

De acordo com Pham *et al.* (2000), no sistema digestivo da mosca branca há atividade proteolítica e, na rota pelo sistema digestivo do vetor, os virions não encontram as proteases (provavelmente do tipo cisteína), ou as encontram, mas estão protegidas da digestão enzimática, ou ainda são resistentes à sua ação digestiva. A hipótese da proteção é a admitida por Morin *et al.* (1999). Segundo esses autores, à semelhança dos afídeos, há em *B. tabaci* uma proteína homóloga à Groel, produzida por uma bactéria endossimbionte *Buchnera* sp. Evidenciou-se que a proteína tem afinidade com o vírus e forma com ele um complexo vírus-proteína, que impede a ação das proteases. A inativação daquela proteína interfere na transmissão do vírus pelo vetor (Morin *et al.*, 1999). Outros autores, no entanto, consideram que não há DNase, ou atividade proteolítica no lúmen do sistema do vetor, uma vez que quantidades detectáveis de DNA viral, independente se dsDNA, se virion ou ssDNA não encapsulado, são encontradas nas excreções açucaradas de mosca branca (Rossell *et al.*, 1999).

As fêmeas de mosca branca, em geral, são consideradas mais eficientes na transmissão de vírus que os machos (Caciagli & Bosco, 1997) e, provavelmente pelo seu hábito alimentar (Harrison, 1985), sua eficácia chega a ser seis vezes superior a dos machos (Cohen & Nitzany, 1966). Nateshan *et al.* (1996) encontraram um percentual de transmissão do CLCuV-K, para plantas de algodão, por fêmeas de 76% contra 46% de transmissão efetuadas por machos de mosca branca nas mesmas condições de inoculação. Costa (1976a) inoculando individualmente feijoeiros com *B. tabaci* observou percentagem média de transmissão do BGMV de 44% para fêmeas e de 22% para machos. Outros autores constataram que a taxa de DNA viral (SLCV) independe do sexo, mas que em machos o valor observado do DNA viral por peso (μg) do inseto foi um pouco superior que em fêmeas, não tendo sido comparada, no entanto, a transmissão do vírus pelos dois sexos (Polston *et al.*, 1990).

Em experimentos realizados com TYLCV estimou-se que aproximadamente 600 milhões de genomas de vírus (1 ng de DNA) pode ser ingerido pela mosca branca durante alimentação de uma a duas horas na planta infectada (Zeidan & Czosnek, 1991). A quantidade de DNA viral ingerida parece não ter relação com a concentração de vírus na região da planta em que o inseto se alimenta (Navot *et al.*, 1989; Zeidan & Czosnek, 1991). Porém, o acúmulo de vírus no inseto parece ser limitado, sugerindo uma regulação baseada na saturação de receptores de vírus ou na produção cíclica de fatores antivirais pela mosca branca virulífera (Zeidan & Czosnek, 1991; Picó *et al.*, 1995).

Estudos envolvendo transmissão do vírus à progênie têm apresentado resultados variáveis. Passagem transovariana de begomovírus não foi observada na progênie de mosca branca com SLCV (Cohen *et al.*, 1983) ou EuMV (Harrison, 1985). Polston *et al.* (1990) e Lastra (1993) admitiram que begomovírus não são transmitidos à progênie. Evidência da transmissão transovariana do TYLCV para pelo menos duas gerações de *B. argentifolii*, no entanto, foi relatada por Ghanim *et al.* (1998). A forma pela qual o TYLCV penetra no sistema reprodutivo da mosca branca, porém, não foi totalmente elucidada. Em experimentos envolvendo bombardeamento de ovos de *B. argentifolii* com partículas de TYLCV, Fridman & Czosnek (1998) constaram que o inseto, ao atingir a fase adulta, estava apto a transmitir o vírus para plantas de tomate, indicando que o TYLCV é expresso na forma adulta como uma entidade infectiva.

Admitindo que o TYLCV invade o sistema reprodutivo de *B. argentifolii*, Ghanim & Czosnek (1998) investigaram a transmissão via cópula do vírus entre indivíduos de mosca branca e constataram que o TYLCV passa de fêmeas virulíferas para machos avirulíferos e vice-versa, mas que não ocorre transmissão do vírus entre indivíduos do mesmo sexo.

O TYLCV é um dos begomovírus de tomate mais estudados com relação à interação com o vetor. Os trabalhos iniciais envolvendo a transmissão do vírus pela então *B. tabaci* datam do ano de 1966 (Cohen & Nitzani, 1966). Em pesquisas conduzidas no ano de 1997, foi relatado que a longa associação desse vírus com a citada mosca branca afetou a eficiência de transmissão do vírus, a longevidade e a fecundidade do inseto virulífero (Rubinstein & Czosnek, 1997). Os autores demonstraram que a capacidade do vetor transmitir o TYLCV para tomate decresceu de 100 para 20% ao longo de sua vida quando o adulto adquiriu o vírus logo após a emergência. O decréscimo na transmissão do vírus foi

menor (100 para 50%) quando o inseto adquiriu o vírus alguns dias após a sua emergência tendo sido, portanto, menor o período da aquisição viral. Com relação à vida média da população virulífera, os autores constaram que foi de cinco a sete dias menor que a média da população avirulífera, a qual se estendeu por 26 a 35 dias. Na fecundidade, outro processo afetado, a oviposição das fêmeas virulíferas foi reduzida em torno de 40% quando comparada a das fêmeas avirulíferas. Não houve, porém, interferência na emergência e hábito das ninfas. De acordo com Rubinstein & Czosnek (1997), o efeito negativo observado no vetor pode estar relacionado à progressiva invasão do vírus no sistema reprodutor do inseto.

Informações sobre o período de acesso de aquisição (PAA), de acesso de inoculação (PAI), de latência do vírus no vetor (PL), a concentração viral, a taxa de transmissão pela mosca branca e diversos outros parâmetros têm sido investigados para o TYLCV por Mansour & Al-Musa (1992), Metha *et al.* (1994b), McGrath & Harrison (1995), Caciagli & Bosco (1997) e Atzmon *et al.* (1998), os quais encontraram resultados variáveis, considerando o isolado viral, a região geográfica e as condições empregadas em cada pesquisa.

Ainda que a relação do vetor com diferentes begomovírus não seja a mesma, elas apresentam uma similaridade geral. Para uma eficiente transmissão, a maioria dos begomovírus requer um período de acesso de aquisição do vírus pelo vetor de 24 horas (Polston *et al.*, 1990, Nateshan *et al.*, 1996). O percentual de transmissão, após esse período de aquisição, varia com o vírus envolvido. A transmissão do STLCV para tomate a partir de moscas brancas que se tornaram virulíferas após 24 horas de PAA, por exemplo, ocorreu somente a partir de um PAI de pelo menos 1 hora em mudas sadias, tendo sido aumentada a frequência de transmissão com a maior duração do período de inoculação (Idris & Brown, 1998). Para outros begomovírus o período mínimo para haver a transmissão foi inferior a 1 hora de PAI. São exemplos o ToLCV, cuja infecção em tomate ocorreu após 20 minutos de PAI do vetor, e o CLCuV-K em que a infecção em algodão foi constatada após apenas 5 minutos de acesso de inoculação da mosca branca (Muniyappa *et al.*, 2000; Nateshan *et al.*, 1996). O período mínimo para a aquisição de begomovírus também apresenta variações. Foi de apenas 1 hora para o CLCuV-K e para o STLCV, com transmissões de 20% e de 9%, respectivamente, e de somente 10 minutos para o ToLCV, com 13% de plantas de tomate infectadas (Idris & Brown, 1998; Nateshan *et al.*, 1996; Muniyappa *et al.*, 2000). O período

latente varia entre os begomovírus de 4 a 21 horas, o que pode refletir a eficiência na transmissão de vírus pela mosca branca e não ser propriamente diferenças entre esses vírus (Duffus, 1996). Uma vez adquirido, os begomovírus são teoricamente transmitidos por um período de 10-20 dias ou por toda a vida do vetor (Cohen & Nitzani, 1966; Picó *et al.*, 1996).

Cohen & Harpaz (1964) citado por Brown (1997), descreveram a existência de um fenômeno na interação do TYLCV com a mosca branca, denominado *aquisição periódica*, na qual o inseto perde progressivamente a infectividade 10 dias após o PAA inicial. A capacidade de o vetor transmitir o vírus é readquirida com um novo PAA após a completa perda da carga viral do PAA anterior. O mecanismo é complexo e não está bem compreendido. No entanto, substâncias antivirais foram encontradas em homogeneizados de insetos que adquiriram o TYLCV e a introdução dessas substâncias no inseto reduziram a sua capacidade de adquirir ou transmitir o vírus. Fenômeno similar foi observado com o ToYMV na Índia (Duffus, 1996) e pode ocorrer com outros begomovírus.

No Brasil, dados da relação begomovírus-mosca branca foram inicialmente obtidos por Dr. Álvaro Santos Costa em experimentos envolvendo *B. tabaci* em associação com begomovírus de euforbiáceas (1950), de feijoeiro (1965) e de tomateiro (1974) (Costa & Bennett (1950), Costa (1965), Costa (1974) citados por Costa, 1976b). Em 1998, Yuki *et al.* compararam a eficiência da *B. argentifolii* com relação à *B. tabaci* na transmissão do BGMV e concluíram que ambas as espécies são eficientes na transmissão do vírus para o feijoeiro. Entretanto, apesar da ocorrência de *B. argentifolii* e da disseminação de begomovírus em diversas áreas da região Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste desde início da década de 90, o comportamento dessa nova espécie como vetor na relação estabelecida com begomovírus de tomate, bem como a interação desses vírus com o vetor nas diferentes fases de desenvolvimento do inseto, por serem ainda pouco conhecidos no país, necessitam ser investigados.

O conhecimento do modo de transmissão dos begomovírus de planta para planta pelo vetor é essencial, tanto para a epidemiologia viral como para estabelecer estratégias de manejo (Metha *et al.*, 1994b). De acordo com Zeidan & Czosnek (1991) o reconhecimento e a compreensão dos fatores envolvidos na relação planta-vírus-vetor pode colaborar nas medidas de controle dos begomovírus e no melhoramento para obtenção de cultivares resistentes.

4. OBJETIVOS DO TRABALHO

Considerando os problemas causados pelos begomovírus em associação com a mosca branca *B. argentifolii* para a cultura do tomateiro, a relativa escassez de informações sobre as espécies de begomovírus ocorrentes nessa hortaliça no Brasil, seus hospedeiros alternativos e, principalmente sobre o relacionamento desses vírus com o inseto vetor, o presente trabalho objetivou:

1 - A caracterização molecular de um begomovírus de tomate coletado na região de Anápolis-Goiás, GO-ANPL, e o seu relacionamento com as espécies de begomovírus já relacionadas para tomateiro no Brasil e no mundo;

2 - Determinação do círculo de hospedeiros do isolado GO-ANPL por meio de inoculação mecânica e da transmissão com o vetor, mosca branca, visando a avaliação de hospedeiros que podem constituir fontes alternativas do vírus no campo;

3 - Estudo da interação do isolado GO-ANPL com *B. argentifolii* nos aspectos relacionados à transmissão do vírus pelo vetor e à detecção do vírus no inseto;

4 - Estabelecimento de metodologia para estudo da interação begomovírus-mosca branca nas condições brasileiras.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM BEGOMOVÍRUS ISOLADO DE TOMATE COLETADO NO ESTADO DE GOIÁS

1- INTRODUÇÃO

A diversidade genética dos begomovírus de tomate tem sido estudada em vários países por meio de hibridização com sondas específicas preparadas com DNA desses vírus, da técnica de PCR usando "primers" degenerados para DNA viral e da análise do genoma viral (Roye *et al.*, 1998; Gilbertson *et al.*, 1991c, Padidam *et al.*, 1995). A caracterização molecular total ou parcial de um ou dos dois componentes genômicos de begomovírus bipartidos, ocorrendo em culturas ou plantas silvestres, tem sido largamente empregada para determinar o relacionamento genético entre diferentes begomovírus em várias regiões do mundo (Roye *et al.*, 1998; Frischmuth *et al.*, 1997; Höfer *et al.*, 1997).

Além de estabelecer o relacionamento viral, a análise de seqüências tem possibilitado a confirmação de pseudorecombinação e recombinação intermolecular entre begomovírus (Hou & Gilbertson, 1996) como também de infecções mistas de estirpes do mesmo vírus ou de vírus diferentes (Hong *et al.*, 1993). A detecção dessas combinações é inviabilizada nos estudos envolvendo a sintomatologia e o círculo de hospedeiros, em virtude da alta incidência de escapes, observada na transmissão de vírus pela inoculação mecânica, agroinoculação e transmissão pelo vetor (Harrison 1985; Frischmuth *et al.*, 1997).

A comparação de seqüências entre membros da família *Geminiviridae* tem contribuído para a apresentação de propostas de regras para distinção entre espécies e entre estirpes de um mesmo vírus (Rybicki, 1994). A análise da homologia na seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos de produtos gênicos, bem como na RC do DNA A e RI do DNA B é, provavelmente, a melhor forma de avaliar o relacionamento entre dois vírus, obtendo-se resultado detalhado da sua relação genética (Frischmuth *et al.*, 1997). Padidam *et al.* (1995) verificaram, pela comparação de seqüências completas e parciais de 36 vírus, que o percentual de homologia obtido na análise de seqüências de nucleotídeos totais, da região intergênica (RI), de nucleotídeos e aminoácidos dos genes *rep*, *cp*, *ren*, *trap*, *ac4*, *mp* ou *ns*, foi semelhante ao nível de identidade das análises com o genoma completo. Isso pode indicar que curtas regiões do genoma são suficientes para construção de árvores filogenéticas e classificação de vírus da família *Geminiviridae*.

A análise de seqüências de nucleotídeos do DNA A e do DNA B de dois isolados

de *Sida golden mosaic virus* (SiGMV), provenientes de Honduras, foi empregada na determinação da relação filogenética entre os vírus constatados na planta daninha. Foi observada elevada homologia na seqüência de nucleotídeos dos genes do DNA A e do DNA B (>90%) entre os isolados de Honduras, contudo, valores de 88% para a região comum e de 91% para o gene *mp*, levaram os autores a concluir que os isolados de *Sida* são relacionados, porém, constituem-se vírus distintos (Frischmudth *et al.*, 1997).

A caracterização molecular de TYLCV do Egito, do *Havana tomato virus* (HTV) em Cuba e de vários begomovírus na Jamaica tem sido baseada na análise e comparação das seqüências nucleotídicas obtidas de parte da RC, dos genes *rep*, *cp*, *mp* e *ns* desses vírus com a de outras espécies já descritas e depositadas em bancos de dados (GenBank, UK) (Nakhla *et al.*, 1992; Zubiatur *et al.*, 1998, Roye *et al.*, 1998). Outra região genômica usada na caracterização é a região hipervariável do DNA B, que está situada na região intergênica (300 a 400pb) entre o códon de iniciação da ORF MP e a extremidade 5' da região comum. Seu seqüenciamento foi empregado para a determinação da variabilidade genética de isolados de BGMV na República Dominicana (Gilbertson *et al.*, 1991c).

A partir da análise da capa proteica de vários begomovírus Czosnek & Laterrot (1997), constataram que, para vírus de diferentes regiões geográficas, a variação na identidade da CP foi de 65 a 80%, enquanto que para vírus provenientes da mesma região a identidade foi superior a 80%. Conforme os mesmos autores, estirpes de um begomovírus monopartido possuem, entre si, homologia na seqüência genômica superior a 90% e os isolados da mesma estirpe, homologia na região intergênica (RI) superior a 95%. Em vírus diferentes, a homologia nessa região é menor que 85%. Com base nessa regra, Czosnek e Laterrot (1997), consideraram o TYLCV de Israel e o do Egito como da mesma estirpe (homologia da RI maior que 95%) e os isolados de TYLCV de Sicília, Sardenha e Espanha, com homologia na RI de apenas 60%, como vírus de diferente identidade.

No Brasil, a distribuição e a diversidade genética de begomovírus de tomate coletados no Nordeste e Sudeste, têm sido avaliadas com base na análise de seqüências de fragmentos do DNA A compreendendo a região 5' da ORF Rep, a RC, a região 5' da ORF CP ou toda essa região. A análise dessas seqüências permitiu estudar a homologia entre os vírus e indicou a ocorrência de pelo menos quatro novas espécies, sendo possível que até sete espécies diferentes estejam infectando tomate nas diferentes regiões do país (Simone Ribeiro, comunicação pessoal).

2- OBJETIVOS

Identificação de uma espécie de begomovírus isolada de tomateiro em Anápolis-GO (GO-ANPL) por meio de clonagem e seqüenciamento de fragmentos do componente A e sua comparação com begomovírus de tomate já descritos no Brasil e no Mundo.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem do vírus, diagnose e manutenção do isolado GO-ANPL

Em visitas realizadas a lavouras de tomate para processamento industrial, localizadas no município de Anápolis-GO, foi constatada a presença de mosaico com clorose e deformação foliar do tipo enrolamento, na grande maioria das plantas das cultivares Jumbo, Seculus e Carmem cultivadas na área. Em virtude dos sintomas sugestivos de infecção por begomovírus, foram amostrados ramos de diversas plantas das três cultivares e plantas inteiras da cultivar Jumbo para realização de testes específicos para confirmação da etiologia.

Em laboratório, efetuou-se a diagnose do vírus coletado em tomate, empregando-se dois métodos: a hibridização de membranas por "dot-blot", nas quais foram distribuídas várias amostras de tomate infectado, usando sonda preparada com DNA A de begomovírus de tomate isolado no DF, e mediante a técnica de PCR, empregando-se, para a amplificação de fragmentos, oligonucleotídeos degenerados para begomovírus. A forte marcação na membrana com amostras de tomate infectado e a visualização de bandas específicas no gel após PCR confirmou a etiologia viral para todas as amostras (Santos *et al.*, 1998).

O begomovírus isolado de Anápolis foi mantido a partir da cultivar 'Jumbo' e passou a ser designado de GO-ANPL. O vírus foi propagado para plantas de tomate 'Rutgers' por meio de inoculações com o vetor, precaução que assegurava a infecção isolada do vírus. As plantas do tomate 'Santa Clara' infectadas exibiam, igualmente, sintomas característicos de mosaico com clorose internerval, enrolamento foliar e nanismo da planta (Figura 1). As plantas foram confinadas, juntamente com moscas brancas, em insetário

isolado e cercado por tela de náilon à prova de insetos onde, periodicamente, eram acrescentadas novas plantas de tomate sadio para que a propagação do vírus fosse mediada pelo próprio vetor.

A condução de todos os experimentos deste trabalho foram realizados em casa-de-vegetação e nos laboratórios de Virologia Vegetal e Biologia Molecular da Embrapa-Hortaliças-DF e no laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.

As moscas brancas empregadas nos ensaios foram provenientes da criação avirulífera de *B. argentifolii*, mantida em repolho, cuja população inicial foi cedida pela Dra. Geni Villas-Bôas, entomologista da Embrapa-Hortaliças que por intermédio da Dra. Judith K. Brown da Universidade do Arizona (EUA) obteve a identificação específica do vetor.

3.2. Caracterização molecular do isolado GO-ANPL

Para a caracterização molecular do GO-ANPL, foram executadas as seguintes etapas: extração do DNA viral, amplificação de fragmentos do DNA A e do DNA B por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para begomovírus (Rojas *et al.*, 1993), clonagem no vetor pGEM-T (Promega), transformação em *E. coli*, purificação plasmidial, digestão com enzimas de restrição, seqüenciamento dos clones obtidos e a conseqüente análise e identificação das espécies mediante comparação com outros begomovírus já descritos.

3.2.1. Extração do DNA viral

O método adotado para a extração de DNA de plantas de tomate infectadas com o begomovírus foi o desenvolvido por Dellaporta *et al.* (1983), com modificações. Discos foliares de 1 cm de diâmetro foram triturados em microtubos na presença de tampão de extração (100 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, pH8,0, 500 mM NaCl e 0,07% de 2-β-mercaptoetanol) usando-se 500 µl do tampão para cada disco foliar. Ao extrato foram acrescentados 33 µl de SDS 20%, seguindo-se forte agitação (vortex) e incubação a 65° C por

A



B



Figura 1 - Tomate 'Santa Clara' infectado com o isolado GO-ANPL exibindo sintomas de mosaico e clorose internerval (A), mosaico e enrolamento foliar (B).

10 minutos. Adicionaram-se, em seguida, 160 µl de acetato de potássio (3 M K e 5 M Ac) e, após uma agitação rápida e incubação no gelo por 20 minutos, os tubos foram centrifugados a 10.000g por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi tratado com clorofane (fenol:clorofórmio, 1:1), depois centrifugado e a fase superior recolhida para a adição de isopropanol. Seguiram-se uma agitação rápida e uma centrifugação por 15 minutos a 10.000g. O precipitado obtido foi lavado com etanol 70% e seco ao ar. Fez-se uma adição final de 300 µl de água milli-Q estéril ou TE (10mM Tris, 1mM EDTA pH 8,0) para ressuspensão do DNA total o qual foi acondicionado a -20°C.

3.2.2. Amplificação dos fragmentos do DNA A e do DNA B via PCR

Após a extração, diluições do DNA total de 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100 foram preparadas visando testar a concentração adequada do DNA para uso nas amplificações com os diversos pares de oligonucleotídeos. As reações foram preparadas usando-se, por tubo, 3 µl do DNA diluído, 2,5 µl de tampão 10X da enzima *Taq* polimerase (Pharmacia), 1 µl de dNTP (Pharmacia) a 2,5 mM, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador, 1U (0,2 µl) de *Taq* polimerase (Pharmacia), ajustando o volume da reação para 25 µl com água (filtro Milli-Q) estéril. Óleo mineral (30 µl) foi acrescentado ao tubo para evitar perdas por evaporação.

Para amplificação do DNA A do GO-ANPL, foram utilizados oligonucleotídeos degenerados e específicos para geminivírus desenhados por Rojas *et al.* (1983), combinados com oligonucleotídeos que se anelam ao gene da capa proteica: o par PAL1c1996/PAv368(CP1), o qual origina um fragmento de 1,6 kb e o par PAL1v1978/PAc1320 (CP2), que amplifica um fragmento maior ou igual a 1,9 kb. Em algumas ocasiões, o par CP1/CP2, que amplifica o gene da capa proteica (0,9 kb), foi também utilizado. Para amplificar o fragmento do DNA B, utilizou-se do par PCRC2/PB1200v, o qual resulta em um fragmento de 1,4kb.

As seqüências dos oligonucleotídeos usados para amplificação de fragmentos do DNA A e do DNA B dos isolados estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1- Oligonucleotídeos empregados na amplificação de fragmentos do DNA A e do DNA B do isolado GO-ANPL.

PAL1v1978 -	5' GCAT <u>CTGCAGG</u> CCCACTYGTCTTYCCNGT 3'
PAv1320 ou CP2 -	5' CCC <u>CTGCAGA</u> ACTTCCAAGTCTGGACG 3'
PAL1c1996 -	5' GCAT <u>CTGCAGAC</u> NGGRAAGACRATGTGGGC 3'
PAc368 ou CP1 -	5' CCC <u>GTCGACAT</u> GYCTAAGMGKGAKGCCCC 3'
CRc2	5' CTAG <u>CTGCAGC</u> ATATTTACRARWATGCC 3'
PBR1c1200 -	5' CGC <u>CTGCAGT</u> AYTAYTGYTGGATGTC 3'

Nucleotídeos nas posições degeneradas são representados por uma única letra do código de ambiguidade da IUPAC como segue: Y =C ou T; N= A, C, T ou G; R= A ou G; M= A ou C; K= G ou T; D = A, T ou G; W= A ou T.

Sublinhados, os sítios de restrição de enzimas: CTGCAG= *Pst*I, GTCGAC = *Sal*I.

As regiões de anelamento dos oligonucleotídeos empregados na amplificação de fragmentos dos componentes A e B de GO-ANPL estão esquematizados na Figura 2.

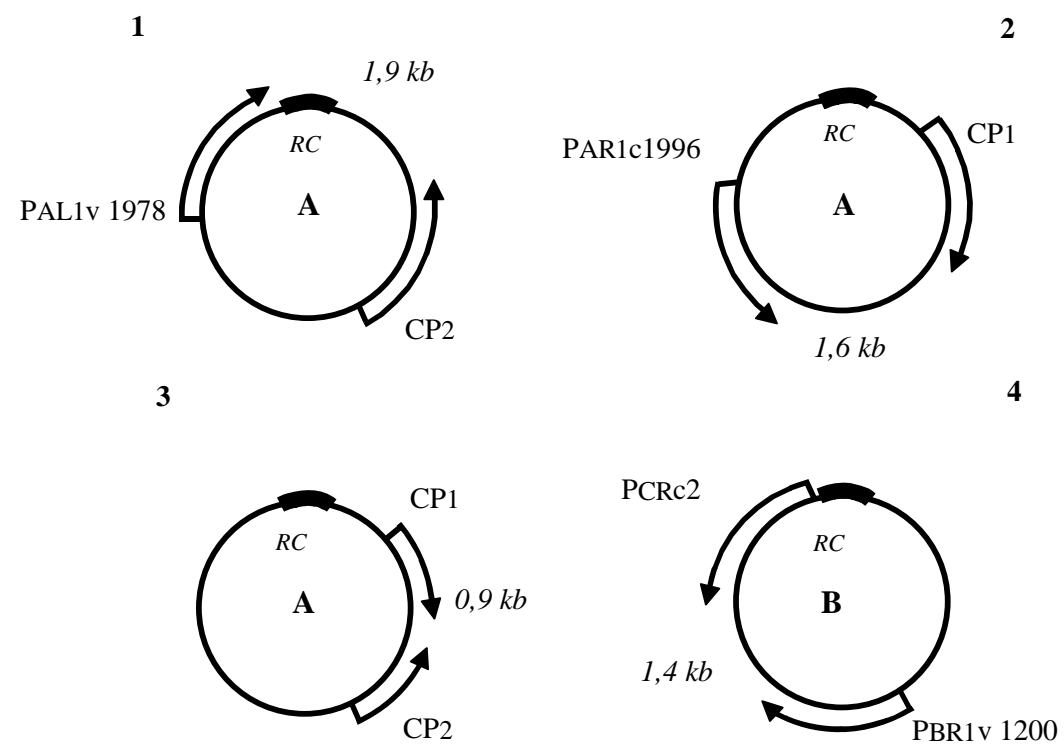


Figura 2- Regiões de anelamento dos oligonucleotídeos, no DNA A e no DNA B, usados para amplificação, via PCR, de fragmentos do isolado GO-ANPL e os respectivos tamanhos de fragmentos amplificados, em itálico. Pares: 1 - PAL1v1978/CP2; 2 - PAR1c1996/CP1; 3 - CP1/CP2; 4 - PCRC2/PBv1200.

(Adaptado de Idris & Brown, 1998)

Na amplificação do DNA com os oligonucleotídeos que anelam no componente A, as amostras foram submetidas a PCR no termociclador modelo PTC 100 MJ Research, adotando-se um programa com aquecimento inicial de 94°C por 3 minutos e 35 ciclos compostos de: desnaturação (94°C/1 minuto), anelamento (55°C/1,5 minuto) e extensão (72°C/1,5 minuto). Concluídos os 35 ciclos, seguiu-se uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Na amplificação do fragmento do DNA B, a temperatura de anelamento foi ajustada para 50°C.

Para visualização dos produtos do PCR, as amostras, acrescidas de 3 µl de corante (azul de bromofenol 0,25% + xileno cianol 0,25% + glicerol 30% em água), foram aplicadas em gel de agarose a 1% preparado em tampão Tris-Acetato 0,04 M e EDTA 0,001 M (TAE) e submetidos a eletroforese em cubas com esse tampão. Como marcador molecular, foram utilizados, em um único poço, 5-10 µl de 1 Kb DNA Ladder (100 ng/µl) (GIBCO BRL). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo preparado em TAE, visualizado em luz ultravioleta (UV) e, em seguida, fotografado.

3.2.3. Purificação e clonagem do DNA no vetor pGEM-T

Visando a obtenção de DNA do begomovírus para uso na clonagem em vetor, realizaram-se várias PCRs e, após eletroforese, as bandas com o fragmento viral foram cortadas, recolhidas em microtubos e, em seguida, eluídas empregando-se o SephaglasTM BandPrep Kit (Pharmacia), seguindo-se as recomendações do fabricante. Após a purificação, procedeu-se à quantificação do DNA, utilizando comparação em gel de agarose com o marcador High DNA Mass Ladder (GIBCO BRL), cujas bandas de variada intensidade permitem estimar a concentração do DNA do vírus.

Para a obtenção de clones, foram realizadas, inicialmente, ligações do fragmento de DNA no vetor pGEM-T-Easy (Promega). Nas reações de ligação do isolado GO-ANPL foram empregados os fragmentos do DNA A amplificados com o par PAL1v1978/CP2, anteriormente citados.

O preparo das reações de ligação seguiu as recomendações do fabricante do vetor pGEM-T Easy (Promega). Misturaram-se 1-2 µl de DNA (95 ng), 5 µl de tampão da enzima T4 DNA ligase (TBE 2x), 1 µl (3 unidades) da enzima T4 ligase, 1 µl (50 ng) do vetor pGEM-T (Promega) e água Milli-Q completando a reação para um volume final de 10 µl. A quantidade de DNA foi calculada observando-se uma relação mínima de 1:3 (vetor : inserto), conforme fórmula recomendada pelo fabricante:

$$\frac{\text{ng vetor} \times \text{kb do inserto}}{\text{kb do vetor}} \times \text{relação desejada} = \text{ng do DNA}$$

As ligações, assim preparadas, foram incubadas em banho a 4°C por toda a noite, para otimização da reação.

3.2.4. Transformação de células competentes de *E.coli* com o vetor pGEM-T recombinante

Para a transformação, utilizaram-se células competentes de *E. coli* cepa DH5α, preparadas para eletroporação ou para choque térmico, empregando-se 1-2 µl da ligação para cada 50 µl de células competentes. Os microtubos com as células e cada uma das ligações permaneceram no gelo por 30 minutos, após o qual as células foram submetidas à eletroporação em eletroporador Cell-Porator da GIBCO BRL ou ao banho-maria a 42°C por 2 minutos, nesse caso retornando ao gelo por mais 5 minutos. Após a adição de 500 µl de meio LB líquido e incubação a 37°C por 1-2 horas sob agitação constante, 100 µl da suspensão turva foram distribuídos em placas de Petri estéreis contendo 25 ml de LB acrescido de 25 µl de ampicilina, (100 mg/ml), 40 µl X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-inolil-β-D-galactosídeo) (20 mg/ml) e 4 µl de IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside) (200 mg/ml). Após o plaqueamento da suspensão bacteriana, as placas invertidas foram incubadas em estufa a 37°C por toda a noite.

3.2.5. Seleção dos clones recombinantes e purificação do plasmídeo

Colônias de coloração branca (recombinantes), observadas após 16 horas de incubação a 37°C, foram repicadas para tubos de ensaio contendo 10 ml de LB líquido autoclavado e 10 µl de ampicilina (100 mg/ ml), com auxílio de ponteiras plásticas ou de palitos estéreis. Os tubos de ensaio com as bactérias transformadas foram incubados a 37°C, sob agitação a 200 rpm, por 16 a 20 horas.

A purificação do DNA plasmidial foi realizada com o kit FlexiPrep (Pharmacia), seguindo as recomendações de uso dos produtos. O procedimento consistiu da transferência de 1,5 ml da suspensão bacteriana para microtubos, uma rápida centrifugação para sedimentar a bactéria, ressuspensão do sedimento em Tris-EDTA (TE), adição de solução de 0,2N NaOH contendo 1% SDS, seguida da adição de acetato de potássio (5M ac. potássio 60 ml+ ac. acético glacial 11,5 ml+ água 28,5ml). Após nova centrifugação, obteve-se o sobrenadante ao qual foi adicionado isopropanol para precipitar o DNA. Seguiram-se centrifugação, secagem do DNA ao ar, adição de suspensão contendo a resina do kit (sephaglas), e nova centrifugação. O precipitado foi lavado com TE e depois com etanol 70%. À resina, seca ao ar, foram acrescentados 40 µl de água Milli-Q estéril para ressuspensão do DNA, o qual, em seguida, foi quantificado para uso na digestão enzimática do plasmídeo.

3.2.6. Digestão com enzimas de restrição

Para confirmação da presença do fragmento de DNA A nos clones recombinantes procedeu-se à digestão do mesmo com a enzima de restrição *EcoRI*, a qual libera o inserto do sítio de clonagem do vetor pGEM-T. Em cerca de 4 µl de cada amostra de DNA do mini-prep adicionou-se 0,1 µl (2 unidades) da enzima, incubando-se a mistura a 37°C por 2 horas. Ao final desse período, todas as amostras supostamente digeridas, foram distribuídas em gel de agarose a 1% para se efetuar a eletroforese que permitiria a visualização do plasmídeo e do inserto liberado.

As amostras que continham o plasmídeo recombinante foram, então, repicadas para erlenmeyer contendo 20 ml de LB líquido e ampicilina, usando-se 500 µl de inóculo, de

cada recombinante selecionado, por frasco, com fins de obtenção de DNA plasmidial em maiores quantidades. O meio inoculado foi levado para agitador a 200 rpm onde permaneceu a 37°C por toda a noite. Foi realizado midi-prep com as amostras empregando-se o mesmo kit FlexiPrep (Pharmacia). Seguiu-se uma purificação adicional do DNA plasmidial em colunas do QIAGEN-Plasmid Kit e quantificação em gel de agarose, procedimentos recomendados para o DNA a ser seqüenciado. Alternativamente, na purificação do plasmídeo, foi utilizado o kit Concert™ Rapid Plasmid Purification Systems (GIBCO BRL).

3.2.7. Seleção de clones para seqüenciamento

Uma vez purificados e selecionados, os clones foram enviados para o sequenciamento. Oligonucleotídeos internos desenhados para outros begomovírus (Rojas *et al.*, 1993; Inoue-Nagata, dados não publicados) foram remetidos juntamente com os clones com o objetivo de permitir o seqüenciamento total do fragmento (Quadro 2). As amostras foram remetidas para análise no Laboratório de Seqüenciamento do Instituto Biológico de São Paulo em seqüenciador automático modelo ABI -377 (Applied Biosystems).

Quadro 2 - Oligonucleotídeos internos do DNA A utilizados no sequenciamento dos clones do GO-ANPL .

P1 - PARc496 - 5' AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG 3'
P2 - PAL1c715 - 5' GATTTCTGCAGTTDATRTTYTCRTCCATCCA 3'
P3 - CP1 - 5' CCCGTGACATGYCTAAGMGKGAKGCCCC 3'
P4 - PALv2270 - 5' CCCCTGCAGCCTCCTTTAGCTGATCTGG 3'

Nucleotídeos nas posições degeneradas são representados por uma única letra do código de ambiguidade da IUPAC como segue: Y =C ou T; R= A ou G; M= A ou C; K= G ou T; D = A, T ou G.

Sublinhados: sítios de restrição de enzimas: CTGCAG= *Pst*I, GTCGAC = *Sal* I.

3.3. Análise e comparação da seqüência do isolado GO-ANPL com a de outros begomovírus

Para a análise e comparação das seqüências dos clones do GO-ANPL com as seqüências de begomovírus de outros países depositadas no Banco de dados GenBank ou com aquelas concedidas por Dr. Murilo Zerbini (UFV-MG) para as espécies de begomovírus descritas no Brasil, foi utilizado o programa GCG (Genetics Computer Group, Inc. da Universidade de Wisconsin (EUA), Devereux *et al.*, 1985). Árvores filogenéticas foram construídas com o programa ClustalW versão 1.8 e visualizado no TreeView 1.61.

Foram comparadas as seqüências de nucleotídeos de todo o fragmento clonado, da região intergênica (RI) - região do DNA com vários elementos *cis*-ativadores envolvidos na origem viral e iniciação da replicação - da seqüência de aminoácidos deduzidos da proteína da Rep e de aminoácidos da região N-terminal da CP, regiões sugeridas para a análise de relações taxonômicas (Padidam *et al.*, 1995, Czosnek & Laterrot, 1997).

4 - RESULTADOS

4.1 Obtenção dos fragmentos do DNA A do isolado GO-ANPL

Reações de PCR preparadas com o DNA extraído de plantas infectadas com o isolado GO-ANPL e os pares de oligonucleotídeos, PAL1v 1978/CP2 e o PAL1c1996/CP1, possibilitaram a obtenção de fragmentos de 2,1 kb e de 1,6 kb, respectivamente. O par CP1/CP2 amplificou um fragmento de 0,9 kb, o qual inclui o gene da proteína do capsídeo, e o par CRc2/PBRv1200 originou fragmento de 1,4 kb referente ao componente B (Figura 3).

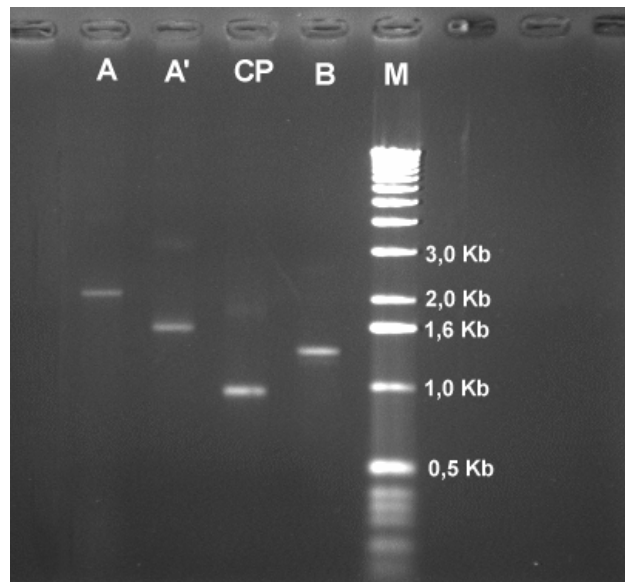


Figura 3 – Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR do isolado GO-ANPL amplificados com o pares de oligonucleotídeos: A - PAL1v 1978/CP2; A' - PAL1c1996/CP1; CP - CP1/CP2; B- CRc2/PBR1200; M - Marcador (DNA Ladder). Os tamanhos dos fragmentos amplificados estão indicados na figura.

4.2 Seleção de clones recombinantes

Os fragmentos amplificados de 2,1 kb, compreendendo a região intergênica, o gene Rep e o gene da capa proteica, foram clonados em pGEM-T. Dos 22 possíveis clones contendo DNA plasmidial recombinante (colônias brancas) e digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*, dois clones, B2 e C4, foram selecionados para seqüenciamento, considerando-se a qualidade e a concentração do DNA. A Figura 4 mostra a análise dos clones obtidos.

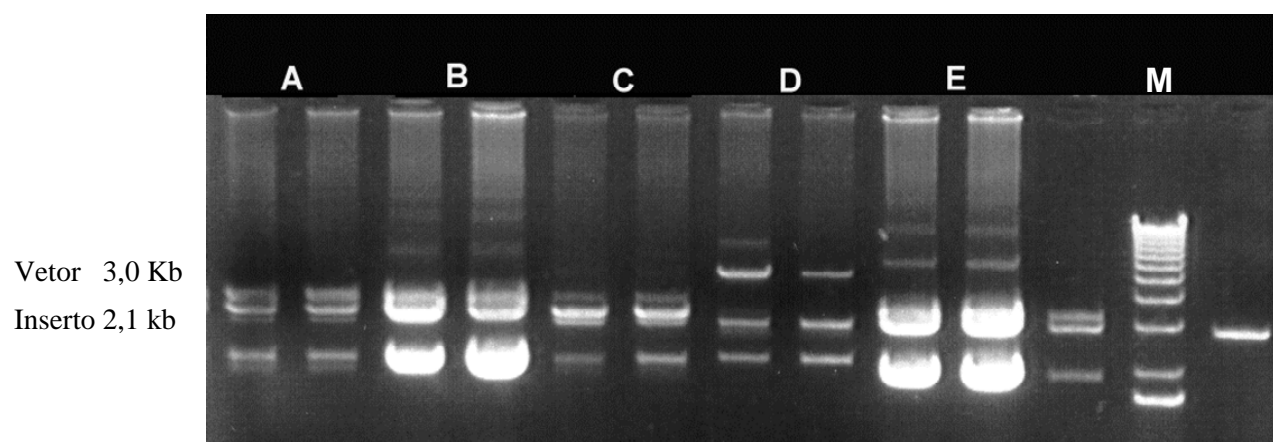


Figura 4– Análise eletroforética em gel de agarose da digestão, com a endonuclease *EcoRI*, de cinco plasmídeos (A-E) contendo os fragmentos de 2,1 kb do GO-ANPL, amplificados com o par de oligonucleotídeos PAL1v1978/CP2. M= Marcador DNA Ladder.

4.3. Análise da seqüência do isolado GO-ANPL e comparação com outros begomovírus já descritos no Brasil e no Mundo

Neste trabalho, o isolado de begomovírus de tomate, GO-ANPL, foi parcialmente caracterizado e geneticamente comparado com begomovírus das Américas, Europa, Ásia e África e com espécies de begomovírus que infectam o tomate recentemente identificadas no Brasil.

As seqüências dos dois clones obtidos a partir do fragmento do DNA A amplificado pelo par de oligonucleotídeos PAL1v1978/CP2 de GO-ANPL mostraram-se idênticos. O comprimento do fragmento seqüenciado foi de 2.130 nucleotídeos compreendendo 80% do gene *rep* (região 5'), a região intergênica, todo o gene que codifica para a CP e parte da região 3' do gene *ren*. O fragmento do DNA A seqüenciado compreende a região do genoma dos begomovírus mais utilizada na caracterização molecular.

A seqüência obtida do DNA A do GO-ANPL (Figura 5) é apresentada no sentido viral e está dividida em duas partes: A e B. Na parte A tomou-se por nucleotídeo número 1 o primeiro nucleotídeo da região intergênica/região comum e por último, o nucleotídeo 1.292 pertencente ao gene *ren*. A seqüência do DNA é descontínua a partir desse nucleotídeo em virtude de não ter sido sequenciada parte da região 5' do gene *ren*, o gene *trap* e 20% do gene *rep*. A parte B da seqüência inicia-se na região 5' do gene *rep* e possui um total de 840 nucleotídeos.

O DNA A do vírus em estudo ficou assim organizado: a região intergênica (RI) estende-se do nucleotídeo 1 ao 339; a RC dentro da RI, do nucleotídeo 1 ao 185, contendo a seqüência invariável de nove nucleotídeos presente em todos os begomovírus; o ATG da CP inicia-se no nucleotídeo 340 e o gene finaliza em 1095, ponto final também para a região 3' do gene *ren* (reverso). O gene *rep*, também no sentido complementar, reinicia a seqüência e a finaliza após um total de 840 nucleotídeos. A seqüência do DNA A do GO-ANPL, não incluiu a região 3' do gene *rep*, o gene *trap* e a região 5' do gene *ren*. A provável organização genômica do DNA A do GO-ANPL está representada na forma circular e linear na Figura 6.

Para avaliação da homologia entre o isolado GO-ANPL com outros begomovírus, toda a seqüência do vírus foi inicialmente submetida ao programa BLAST

(ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e, em seguida, selecionados 12 begomovírus relacionados e/ou frequentemente associados ao tomate. A homologia na sequência nucleotídica total, em todos os casos, foi inferior a 80%.

Foram comparados com o GO-ANPL, a sequência completa do DNA A das espécies do Novo Mundo (BGMV, TGMV, PYMV, ToMoV, SiGMV) e a sequência incompleta disponível do SqLCV, do LBGMV, do LeMV e do TDLCV do Novo Mundo, como também das espécies do Velho Mundo (AbMV, TLCV, TYLCV) registrados no GenBank. A sequência do DNA A obtida para a maioria das espécies de begomovírus caracterizadas no Brasil, compreende a região 5' da Rep, a RI e a região 5' da CP. Considerando-se que o fragmento do GO-ANPL sequenciado continha um total de 2.130 bases, estabeleceu-se que, para a análise da homologia de nucleotídeos, seria comparada toda a sequência do GO-ANPL com a sequência disponível dos vírus anteriormente mencionados. Na análise da região N-terminal da CP e da proteína Rep, porém, comparou-se o mesmo número de aminoácidos entre o GO-ANPL e cada um dos begomovírus já referidos. Portanto, as comparações para a região N-terminal da CP, foram realizadas ora com 47, ora com 70 aminoácidos e com a REP, o número de aminoácidos variou de 151 a 280. A Tabela 1 mostra os resultados das comparações realizadas entre o GO-ANPL e os begomovírus do Novo e do Velho Mundo e a Tabela 2, as avaliações da homologia com as espécies de begomovírus de tomate parcialmente caracterizadas do Brasil.

A	1	ATTTGTAATA	ATAGTTGGGC	ACCGATTGGG	GTCTTCTCAA	ACTTACTAAA
	51	GCAATTGGGG	ACTGGGGTCT	TATATATACT	AGAACCCTCT	ATAGAACTTT
	101	CAATCTCGTT	CACACACGTG	GCGGCCATCC	GATATAATAT	TACCGGATGG
	151	CCGCGCGATT	TTTTCAAGGC	CCATTTATGT	TGGGCTCTC	TTTTGGGCCT
	201	TCACCTTTAA	TTTTATTGAA	AGTATATTTG	GCCAATCATG	ATGCATTTGA
	251	CGAGCTAAGA	TATTTACAAC	TACCTAACGC	CCAAAGTTGC	ATAACGGCTA
	301	TAAATTAAAC	GTGCAATTGG	TCGATAACTT	<u>TAATTCAAAA</u>	TG CCTAAGCC
	351	CGATGCCCCA	TGGCGCCAAC	TGGCTTATAC	ATTTAAAATT	AGCCGGGGCG
	401	TTAATAATTC	TTCTCGAGCA	GGATTTGGGC	CACGGTCCAA	CAAGGCCTCT
	451	GACTGGGTAA	ACAGGCCCAT	GTACAGGAAG	CCCAAGATAT	ATCGGATGTA
	501	TAGAACCCCC	GATGTTCCAA	GGGGTTGTGA	AGGCCCATGT	AAAGTCCAAT
	551	CGTTTGAACA	GCGTCACGAT	ATTTCCATA	CTGGTAAGGT	GATGTGTGTT
	601	TCCGATGTTA	CACGTGGTAA	CGTATTACA	CACCGTGTGG	GTAAGCGTTT
	651	CTGTGTTAAG	TCTGTGTATA	TCTGGGTAA	GATATGGATG	GATGAGACCA
	701	TCAAGTTGAA	GACCCACACG	AACAGTGCCA	TGTTCTGGTT	GGTCAGGGAC
	751	CGTAGACCGT	ATGGCACCCC	TATGGACTTT	GGCCAGGTGT	TTAACATGTT
	801	CGATAACGAG	CCTAGCACCG	CCACTGTGAA	AAACGATCTC	CGTGATCGTT
	851	TTCAAGTTAT	GCACAAGTTC	TATGCTAAGG	TCACAGGTGG	ACAATACGCA
	901	AGTAACGAAC	AGGCGCTTGT	CAAGCGTTTC	TGGAAGGTCA	ACAATCATGT
	951	CGTTTACAAC	CATCAAGAAG	CCGGGAAATA	CGAGAATCAT	ACGGAGAAGG
	1001	CCCTGTTATT	GTATATGGCA	TGTAATCATG	CCTCAAACCC	CGTGTATGCA
	1051	ACTTTAAAAA	TTCGGATCTA	TTTTTATGAT	TCGATAACAA	ATTA ATAAAT
	1101	TTTGAATTTT	ATTGAATGAT	TCTCCAGTAC	AGCATTTACA	TATTGTTTGT
	1151	CTGTTGCGTA	GCGAACAGCT	CTAATTACAT	TATTAACTGA	AATAACGCCT
	1201	AGCTGATCAA	TGTACAACAT	AAGTAAATAT	TTAAATCTAT	TTAAATATGT
	1251	CATCCCAGAA	GCTCTCAGGG	ATGTCGTCCA	GACTTGGAAG	TT.....
	
	
B	1	AGGCCACAT	ACGTCTTTCC	CGTGCTTTAA	CTTTAGATAG	TGCGGTGCGA
	51	CATCATCAAT	GACGTTATAT	TGCACATCGT	TTGAGTATAC	CTTTGAATTG
	101	AAATCGAGGT	GACCACTTAA	GTAATTATGG	GACCCTAATG	CACGTGCCCA
	151	CATTGTTTTG	CCACTTCGAG	AATCACCCCTC	GATTATTATA	CTGATAGGTC
	201	TCTCCGGCCG	CGCAGCGGCA	TCTCTTCCGA	AATAGTCATC	TACCCAAACT
	251	TGCATCTCGA	CAGGCACGTT	AGTGAACGAC	GAGAGTGGAA	ACGGAGGAAC
	301	CCAAGGTTCT	GGAGCCTTTG	CGAAAATACG	CTCTAAATTT	GACCTAATGT
	351	TATGATGTTG	AAGCACGAAA	TCTTTGGGTT	GTCTTTCTTT	TAATATATTG
	401	AGTGCTTCCA	TGACTGATCC	TGCATTGAGA	ACCTTGGCGT	ACGTGTCGTT
	451	TGCAGATCGC	TGACCTCCTC	TAGCTGATCT	GCAATCGATC	TGGAAAACCTC
	501	CATGATCAAC	GAAGTCTCCG	TCTTTTCCA	CGTATGATTT	GACGTCCGAC
	551	GAGCTCTTAG	CTCCCTGTAT	GTTTGGATGG	AAATGTGCTG	ACCTACTTGG
	601	GGAGACGAGG	TCGAAGAACT	TGTTGTTTTT	GCAGTTGTAT	TTACCTTCGA
	651	ATTGGATGAG	CACGTGGAGA	TGAGGTTGCC	CATCTTCGTG	TAGTTCTCTC
	701	GAGACACGAA	TGAACAATTT	ATTAGTTGGG	GTGTTTAGGG	CTAATAATTG
	751	GGAAAGTGCT	TCTTCTTTGG	AAAGAGAACA	GTGTGGATAT	GTTAGAAAAT
	801	AATTTTGGGA	ATTTACTCGG	AAATGTCTGG	<u>GCGGTGGCAT</u>	

Figura 5 - Sequência de nucleotídeos do DNA A do isolado GO-ANPL amplificado com o par de oligonucleotídeos PAL1v1978/CP2. **A** - nucleotídeo 1- início da região intergênica/região comum. Em vermelho, motivo conservado de 32 nucleotídeos situados na região comum. Em negrito vermelho, a sequência invariável de nove nucleotídeos, sítio de clivagem da Rep para o início da replicação do DNA viral. Em negrito e sublinhado, o ATG da capa proteica e em negrito e itálico, o códon de terminação desse gene. Intervalo descontínuo é região do genoma não sequenciada. **B** - Sequência de 840 nucleotídeos (numerada de 1 a 840) reiniciada com a região 5' do gene *rep* e finalizada com o ATG do gene *rep* (complementar), sublinhado.

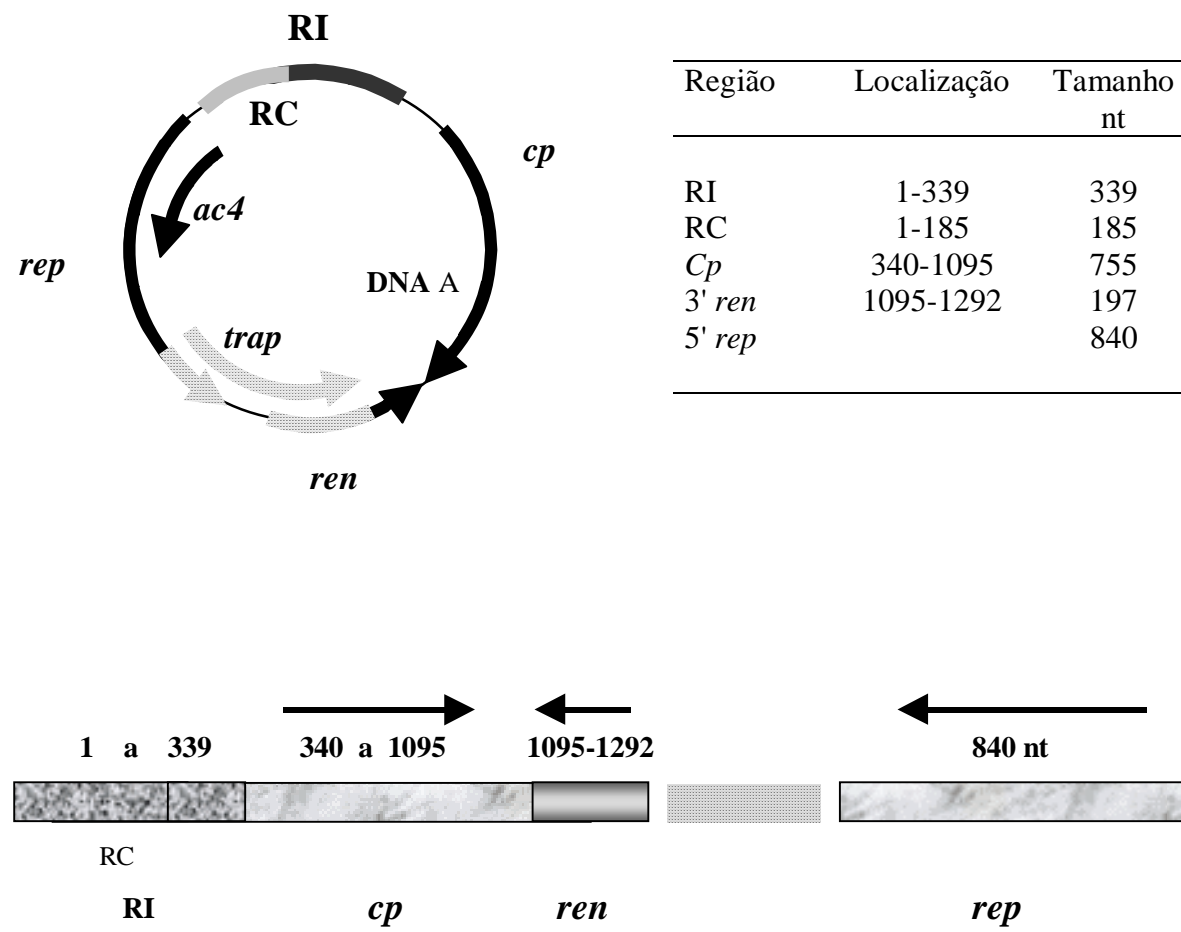


Figura 6 - Provável organização genômica circular e organização linear do DNA A do isolado GO-ANPL, com a localização, orientação e tamanho dos fragmentos seqüenciados. RI- região intergênica; RC- região comum; *cp*- gene da capa proteica; *ren*- gene da proteína de amplificação da replicação; *rep*- gene da proteína associada à replicação; 840 nt- número de nucleotídeos seqüenciados do gene *rep*. Setas indicam sentido da tradução da proteína. Intervalos numéricos referem-se ao nucleotídeo inicial e final das regiões. Intervalo pontilhado corresponde à região não seqüenciada.

Tabela 1- Percentual de homologia das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de regiões do DNA A do isolado GO-ANPL comparado com a de begomovírus caracterizados em outros países.

Vírus	Acesso GenBank	Percentual de homologia com o GO-ANPL			
		NT*	RI	Cp N-term	Rep aa
AbMV-WI	X15983	75,3	60,3	73,3	33,3
BGMV- BR	M88686	75,5	60,3	75,7	79,2
LBGMV	U92531	66,6	60,0	75,7	72,2
LeMV	U92532	63,8	53,4	63,8	74,6
PYMV	AF039031	76,6	44,3	78,5	81,1
SiGMV	Y11099	76,8	62,8	78,5	81,8
SqLCV	M38183	70,7	51,3	75,7	67,2
TDLCV	AF035224	70,2	65,8	77,1	76,8
TGMV	K02029	75,9	52,7	72,7	77,5
TLCV	Y15034	77,5	42,8	81,4	81,5
ToMoV	L14460	77,0	60,3	75,7	82,9
TYLVC-Is	X76319	56,0	45,9	40,6	63,6

AbMV-WI -*Abutilon mosaic virus* (Índia); BGMV-BR - *Bean golden mosaic virus* (Brasil); LBGMV - *Lima bean golden mosaic virus* (Brasil); LeMV - *Leonorus mosaic virus* (Brasil); PYMV - *Potato yellow mosaic virus* (América Central); SiGMV- *Sida golden mosaic virus* (América Central); SqLCV - *Squash leaf curl mosaic virus* (América Central); TDLCV - *Tomato dwarf leaf mosaic virus* (América Central); TGMV - *Tomato golden mosaic virus* (América Central); TLCV - *Tomato leaf curl virus* (Austrália); ToMoV -*Tomato mottle virus* (América do Norte); TYLVC-Is-*Tomato yellow leaf curl virus* (Israel).

Valores relativos ao DNA de GO-ANPL: NT* - nucleotídeo total, 2.130 nucleotídeos; RI- região intergênica, 339 nucleotídeos; CP N-term- 47 a 70 aminoácidos; .Rep aa- 149 a 280 aminoácidos.

O GO-ANPL difere de todos os 12 begomovírus acima comparados. A homologia na seqüência de nucleotídeos (NT) entre o isolado GO-ANPL e os demais vírus, variou de 56,0 a 77,5%. A região de maior variabilidade foi a RI cujos valores estiveram entre 42,8 e 65,8%. Na região N-terminal da CP a similaridade com o GO-ANPL variou de 40,6% para o TYLVC-Is, begomovírus monopartido, a um máximo de 81,4% para o TLCV. Apesar do TLCV ter apresentado uma homologia de 81,5% com a proteína Rep do isolado de Goiás, sua RI mostrou-se totalmente diferente (42,8%). Da análise de aminoácidos da Rep do GO-ANPL com os demais vírus constatou-se uma baixa similaridade com a maioria das espécies, contudo, valores acima de 80% foram também observados para PYMV (81,1%), SiGMV (81,8%) e ToMoV (82,9%) (Tabela 1).

Tabela 2 - Percentual de homologia das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos do DNA A do isolado GO-ANPL comparado com outros begomovírus de tomate caracterizados no Brasil.

Vírus	Isolado/Acesso GenBank	Percentual de homologia com o GO-ANPL			
		NT*	RI	CP N-term	Rep aa
TCIVV*	DF-BR1	71,0	66,2	77,1	78,3
ToCV*	PE-Pq3	79,0	70,0	63,8	88,7
TCMV*	PE-Pt4	83,0	74,5	87,1	89,6
TMoLCV*	PB-Cg1	78,0	60,3	80,0	89,1
TIYV*	MG-Bi 1	72,4	70,2	70,2	80,0
TRMV*	AF291705	91,8	81,1	90,0	79,6
TSMV*	MG-Ig2	71,6	60,9	70,2	81,1
TYVSV	U79998	74,1	59,4	74,2	62,1
-	DF-BR2	98,2	98,2	91,4	97,5

*TCIVV – *Tomato chlorotic vein virus*; ToCV – *Tomato crinkle virus*; TCMV – *Tomato chlorotic mottle virus*; TMoLCV – *Tomato mottle leaf curl virus*; TRMV – *Tomato rugose mosaic virus*; TIYV - *Tomato infectious yellows virus*; TSMV – *Tomato severe mosaic virus* - begomovírus de tomate oriundos das regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, propostos como novas espécies (Simone Ribeiro, comunicação pessoal); TYVSV- *Tomato yellow vein streak virus*- begomovírus relatado em São Paulo (Faria *et al.*, 1997); DF-BR2- begomovírus de tomate isolado no Distrito Federal (Inoue-Nagata, dados não publicados). Valores relativos ao DNA de GO-ANPL: NT* -nucleotídeo total, 2.130 nucleotídeos; RI- região intergênica, 339 nucleotídeos; CP N-term - 43 a 70 aminoácidos; Rep aa- 151 a 280 aminoácidos. Em verde, homologia igual ou superior a 90% .

Nas comparações da seqüência do GO-ANPL com a dos begomovírus de tomate do Brasil, observou-se uma homologia maior do que com os 12 begomovírus do GenBank, em todos os casos analisados. As comparações de toda a seqüência obtida do GO-ANPL (2.130 nt) ou com parte dela (1.364 nt), neste último caso compreendendo a mesma região disponível do genoma A dos begomovírus do Brasil, permitiram constatar um percentual de homologia com o GO-ANPL variando entre 71 e 83%, exceto para o TRMV (91,8%) e para o DF-BR2 (98,2%) (Tabela 2). Na RI, a variabilidade entre os vírus foi maior, exceto para o DF-BR2 que também apresentou homologia de 98,2% com o GO-ANPL. Nas comparações com a região N-terminal da CP constatou-se homologia a partir de 80% nos vírus TMoLCV

(80%), TCMV (87%), TRMV (90%) e 91,4% (DF-BR2). A similaridade em aminoácidos da Rep, variou de 62,1% (TYVSV) a 97,5% (DF-BR2) sendo também elevados os percentuais para o ToCV (88,7%), TCMV (89,6%) e TMoLCV (89,1%) (Tabela 2).

Considerando-se que os dados da Tabela 2 indicam alta homologia de nucleotídeos e aminoácidos entre os isolados GO-ANPL, DF-BR2 e o TRMV, foram feitas comparações detalhadas visando-se avaliar a homologia entre as três seqüências virais. Analisaram-se a seqüência total obtida do GO-ANPL de 2.130 nucleotídeos (NT) e parte dela (NTp) de 1.364 nucleotídeos, a RI, a RC, a seqüência de nucleotídeos da CP, a seqüência de aminoácidos da CP, a região N-terminal da CP e a seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da Rep (Tabela 3). A seqüência parcial de 1.364 nucleotídeos inclui as regiões consideradas de maior variabilidade do componente A: a Rep, a RI e a região 5' da CP.

Tabela 3- Homologia do DNA A entre o GO-ANPL, DF-BR2 e TRMV.

Regiões do DNA	GO-ANPL x DF-BR2	GO-ANPL x TRMV	DF-BR2 x TRMV
NT*	98,2	91,8	88,7
NTp	97,8	79,0	80,0
RI	98,2	81,1	82,6
CP nt	98,0	95,9	97,3
CP aa	96,8	96,4	99,6
CP N-terminal	91,4	90,0	98,0
Rep nt	97,3	72,1	78,9
Rep aa	97,5	79,6	84,9
RC do Comp. A	99,5	69,9	69,9

GO-ANPL – begomovírus de tomate isolado em Anápolis; DF-BR2- begomovírus de tomate isolado do DF (Inouye-Nagata, dados não publicados); TRMV – *Tomato rugose mosaic virus* (GenBank acesso AF 291705).

NT* – seqüência de 2.130 nucleotídeos; NTp- seqüência parcial de 1.364 nt; RI- 339 nucleotídeos, CPnt -760 nucleotídeos da Capa proteica , Cpa- 252 aminoácidos da Capa proteica; CP N-terminal - 70 aminoácidos, Rep nt - 840 nucleotídeos; Rep- 352 aminoácidos; RC- região comum -185 nucleotídeos. Em verde, homologia superior a 90%.

A homologia entre o GO-ANPL e o DF-BR2 foi superior a 91% nas diversas regiões do DNA comparadas, destacando-se a região comum do componente A com 99,5% de identidade. A região N-terminal da CP, ainda que elevada, foi a menor nessa comparação com 91,4% de homologia. Quando o GO-ANPL e TRMV foram comparados, encontrou-se similaridade de 91,8% no NT, os quais foram reduzidos para 79%, quando se considerou a análise conjunta das regiões de maior variabilidade dentro da seqüência nucleotídica, região 5' da Rep, a RI e a região 5' da CP. Entre estes vírus, a homologia da CP foi de 90% na N-terminal, e acima de 95% para CP nucleotídeos e aminoácidos totais. Na RI, porém, a homologia foi de 81,1% e inferior a 80% para a Rep, nucleotídeos e aminoácidos. A homologia entre a RC do GO-ANPL e do TRMV, foi de apenas 69,9%. Na análise do NT os valores caem de 88,7% para 80% na NTp, porém, valores similares à comparação anterior (GO-ANPL e DF- Br2) são observados para a RI (82,6%) e RC (69,9%) (Tabela 3).

O alinhamento de parte da região comum dos três vírus (Figura 7), ressalta o sítio de transcrição da Rep, a seqüência repetida TGGGG separada por AC, que em GO-ANPL e DF-BR2 apresenta-se de maneira idêntica, porém distinta do TRMV, cuja seqüência repetida é TGGTAG separada por TTA. Apesar das diferenças nas seqüências repetidas do GO-ANPL e DF-BR2 com o TRMV, o motivo conservado de 32 nucleotídeos localizados na região comum e destacados na Figura 5, foi idêntico para os três vírus (dados não apresentados).

↓1112	↓1123	
. . TTACTAAAGCAATT <u>TGGGG</u> GAC . <u>TGGGG</u> TCTT TATATA CTAGAACCCCTCTA . . GO-ANPL		
. . TTACTAAAGCAATT <u>TGGGG</u> GAC . <u>TGGGG</u> TCTT TATATA CTAGAACCCCTCTA . . . DF-BR2		
. . ACTCATATGAATT <u>TGGTAG</u> TTAT <u>TGGTAG</u> CTCT TATATA CTAGAAAGTTCCTT TRMV		

Figura 7- Alinhamento de parte da região comum do GO-ANPL, DF-BR2 e TRMV, destacando o TATA box da ORF Rep em negrito, e a seqüência repetida, provável sítio de ligação da proteína associada a replicação, Rep, sublinhada. A posição da região repetida na seqüência do isolado GO-ANPL está indicada com setas.

A comparação das seqüências traduzidas de 70 aminoácidos da região N-terminal da CP de GO-ANPL, DF-BR2 e TRMV são apresentadas na Figura 8. Observa-se que na primeira metade dessa seqüência, entre GO-ANPL e DF-BR2, há diferenças em sete aminoácidos e, entre GO-ANPL e TRMV, em oito aminoácidos (incluindo os sete anteriores). Tais constatações foram resultantes das diferenças de nove nucleotídeos na seqüência da região 5' da CP em GO-ANPL com relação a DF-BR2 e de 10 bases com relação ao TRMV. Essas variações resultaram no percentual de homologia da N-terminal da CP de 91,4% e 90%, respectivamente, para GO-ANPL e DF-BR2 e para GO-ANPL e TRMV (Tabela 3). Entre DF-BR2 e TRMV a diferença foi em apenas um aminoácido gerando, nessa região da proteína, 98% de homologia entre esses vírus (Tabela 3). Após o aminoácido de número 37, as três seqüências traduzidas foram idênticas.

1	37	70
<hr/>		
MPKPDAPWRQLAYTFKISRGNNSSRAGFGPRSNKASDWVNRPMYRKPKIYRMYRTPDVPRGCEGPCKVQ	GOANPL	
MPKRDAPWRHMASTSKISRGNNSPRAGVGPRSNKASDWVNRPMYRKPKIYRMYRTPDVPRGCEGPCKVQ	DF-BR2	
MPKRDAPWRHMASTSKISRGNNSPRAGVGPRSNKATDWVNRPMYRKPKIYRMYRTPDVPRGCEGPCKVQ	TRMV	
<hr/>		

Figura 8 – Alinhamento dos 70 aminoácidos deduzidos da região N-terminal da Capa Proteica do isolado GO-ANPL, do DF-BR2 e do TRMV. Os aminoácidos diferentes estão destacados em verde (GO-ANPL), em vermelho demais vírus.

As árvores filogenéticas apresentadas nas Figuras 9 e 10 foram obtidas a partir do alinhamento da região N-terminal da CP e do alinhamento de parte da Rep, respectivamente, envolvendo o isolado GO-ANPL e os begomovírus do Novo e do Velho Mundo (Tabela 1) e das espécies do Brasil (Tabela 2). Na Figura 11, a árvore foi construída alinhando a RI do GO-ANPL e dos begomovírus de tomate do Brasil explorados na Tabela 2. Na árvore filogenética representada na Figura 12, o alinhamento utilizou uma seqüência em torno de 1364 nucleotídeos, a qual incluiu a região 5' da Rep, a RI e a região 5' da CP, para o GO-ANPL e os mesmos begomovírus do Brasil.

A análise filogenética resultante do alinhamento da região N-terminal da CP (Figura 9) apresentou uma distribuição heterogênea dos begomovírus formando cinco conjuntos constituídos de espécies do Brasil e do mundo. Em um mesmo agrupamento, porém, foram dispostos os vírus GO-ANPL, DF-BR2 e TRMV, esses dois últimos juntos no mesmo ramo, visto que, nessa região, são mais relacionados (98%). O TCMV foi a segunda espécie, dentre as caracterizadas no Brasil, que apresentou maior proximidade genética com o GO-ANPL na N-terminal da CP. As demais espécies do Brasil e do mundo apresentaram maior distanciamento genético com o GO-ANPL, com homologia inferior a 82% destacando-se o ToCV o qual, dentre os vírus do Brasil, foi agrupado com o TYLCV espécie do Velho Mundo, o mais distante de todos os vírus comparados.

Considerando o alinhamento de aminoácidos da Rep (Figura 10), a árvore obtida mostrou, como a análise anterior, uma distribuição heterogênea dos begomovírus comparados. Os vírus GO-ANPL e DF-BR2 foram agrupados no mesmo ramo e, ao contrário da análise anterior, distantes do TRMV, vírus cuja homologia com o GO-ANPL foi de 79,6% e com o DF-BR2, 84,9%. O agrupamento mais próximo ao ramo com o GO-ANPL inclui o TCMV, o TMoLCV e o ToCV, begomovírus do Brasil com homologia de 88,7 a 89,1% com o isolado de Goiás.

A árvore filogenética que agrupa somente os vírus do Brasil com relação à análise da RI (Figura 11) revelou que o GO-ANPL e DF-BR2 são mais estreitamente relacionados entre si, também nessa região, que com as demais espécies de begomovírus de tomate comparadas. Em ramos próximos estão, isoladamente, o TRMV e o TCMV, cuja homologia com o GO-ANPL foi de 81,1 e 74,5%, respectivamente. Por outro lado, os vírus TMoLCV e o ToCV, posicionados próximos ao GO-ANPL pela análise da Rep, com relação à RI mostram relacionamento genético mais distante.

A análise da árvore gerada pelo alinhamento dos 1.364 nucleotídeos, que incluem parte da Rep, a RI e parte da CP, conforme citado anteriormente, separou os begomovírus do Brasil em quatro grupos, ficando o GO-ANPL e o DF-BR2 juntos no mesmo ramo, enquanto que o TRMV foi agrupado em outro conjunto com os vírus TIYV, TSMV e TCIVV. Com essa seqüência, a homologia entre o TRMV e o GO-ANPL foi de apenas 79%. Os demais vírus dos grupos restantes apresentaram-se isolados (ToCV) ou em ramos distantes do GO-ANPL (TCMV, TMoLCV e TYVSV) (Figura 12).

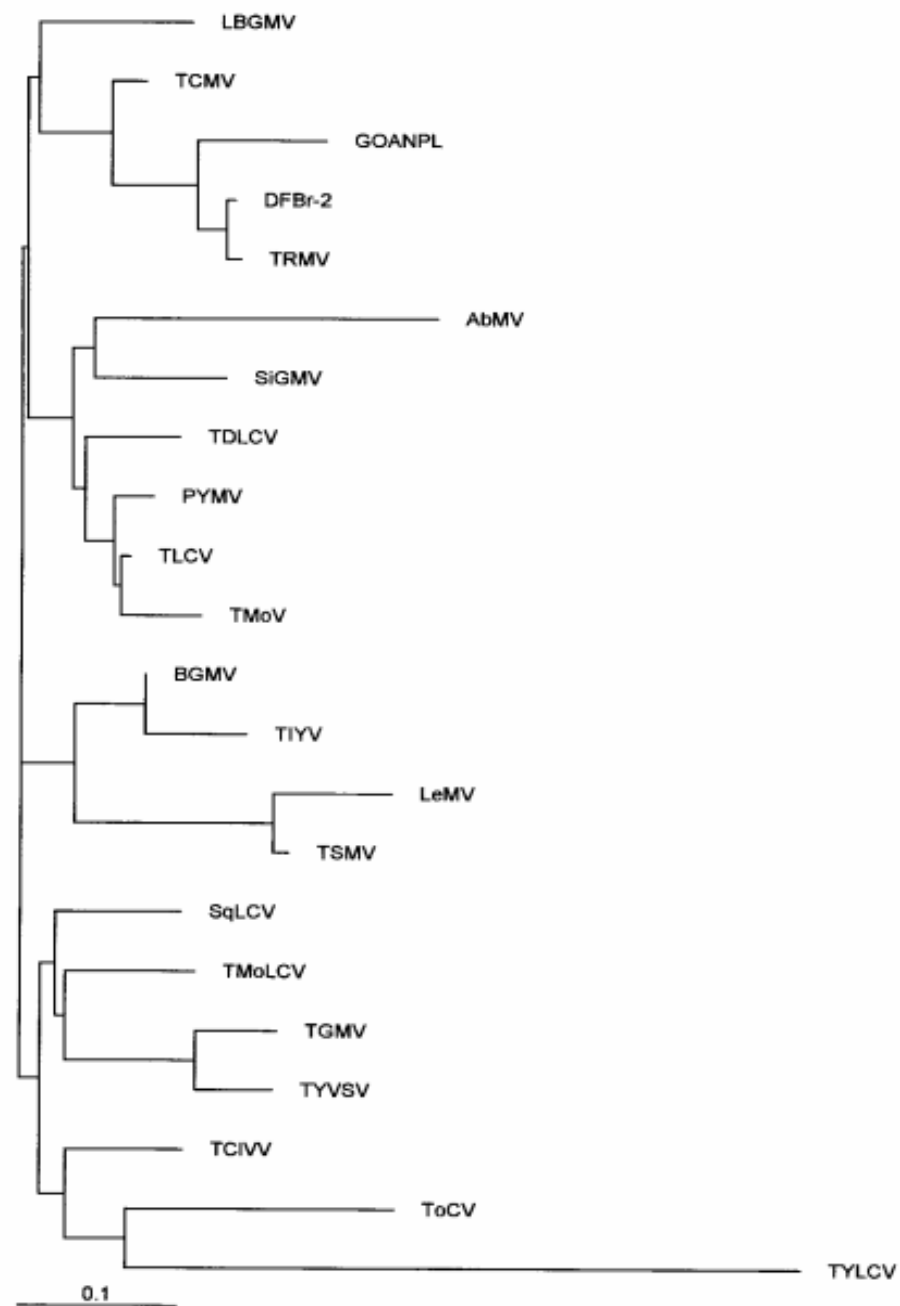


Figura 9 – Árvore filogenética (obtida via programa ClustalW 1.8) resultante do alinhamento das seqüências de aminoácidos da região N-terminal da capa proteica de GO-ANPL e de outros begomovírus do Brasil e de outros países. As distâncias verticais são arbitrárias e as horizontais refletem o percentual de aminoácidos diferentes entre os vírus dos ramos distintos. AbMV-WI -*Abutilon mosaic virus*; BGMV-Bz - *Bean golden mosaic virus*; LBGMV - *Lima bean golden mosaic virus*; LeMV - *Leonorus mosaic virus*; PYMV - *Potato yellow mosaic virus*; SiGMV-*Sida golden mosaic virus*; SqLCV - *Squash leaf curl mosaic virus*; TDLCV - *Tomato dwarf leaf mosaic virus*; TGMV - *Tomato golden mosaic virus*; TLCV - *Tomato leaf curl virus*; ToMoV -*Tomato mottle virus*; TYLCV-Is-*Tomato yellow leaf curl virus*. TCIVV - *Tomato chlorotic vein virus*; ToCV - *Tomato crinkle virus*; TCMV - *Tomato chlorotic mottle virus*; TMoLCV - *Tomato mottle leaf curl virus*; TRMV - *Tomato rugose mosaic virus*; TIYV - *Tomato infectious yellows virus*; TSMV - *Tomato severe mosaic virus*; TYVSV- *ato yellow vein streak virus*; DF-BR2 - begomovírus de tomate isolado no Distrito Federal.

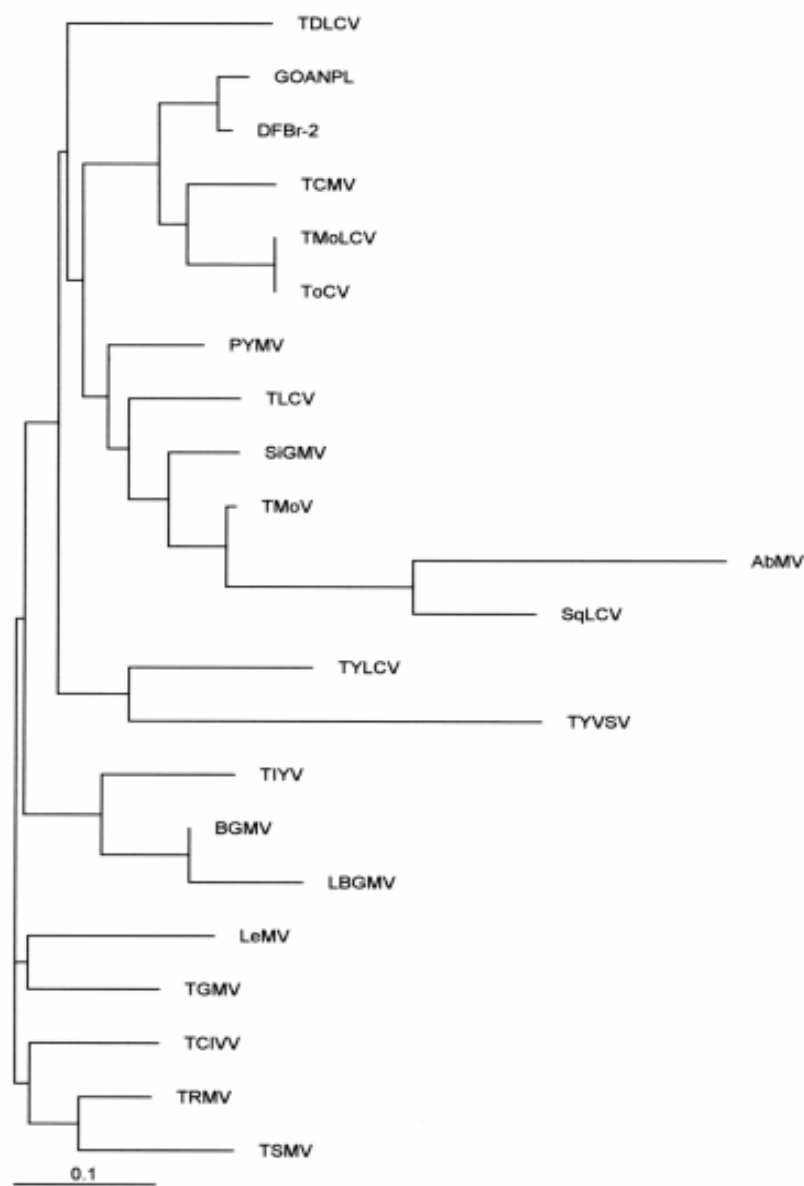


Figura 10 – Árvore filogenética (obtida via programa ClustalW 1.8) resultante do alinhamento das seqüências de aminoácidos da região Rep de GO-APL com outros begomovírus do Brasil e de países. As distâncias verticais são arbitrárias e as horizontais refletem o percentual de aminoácidos diferentes entre os vírus dos ramos distintos.

AbMV-WI -*Abutilon mosaic virus*; BGMV-Bz - *Bean golden mosaic virus*; LBGMV - *Lima bean golden mosaic virus*; LeMV - *Leonorus mosaic virus*; PYMV - *Potato yellow mosaic virus*; SiGMV - *Sida golden mosaic virus*; SqLCV - *Squash leaf curl mosaic virus*; TDLCV - *Tomato dwarf leaf mosaic virus*; TGMV - *Tomato golden mosaic virus*; TLCV - *Tomato leaf curl virus*; ToMoV - *Tomato mottle virus*; TYLCV-Is - *Tomato yellow leaf curl virus*. TCIVV - *Tomato chlorotic vein virus*; ToCV - *Tomato crinkle virus*; TCMV - *Tomato chlorotic mottle virus*; TMoLCV - *Tomato mottle leaf curl virus*; TRMV - *Tomato rugose mosaic virus*; TIYV - *Tomato infectious yellows virus*; TSMV - *Tomato severe mosaic virus*; TYVSV - *Tomato yellow vein streak virus*; DF-BR2 - begomovírus de tomate isolado no Distrito Federal.

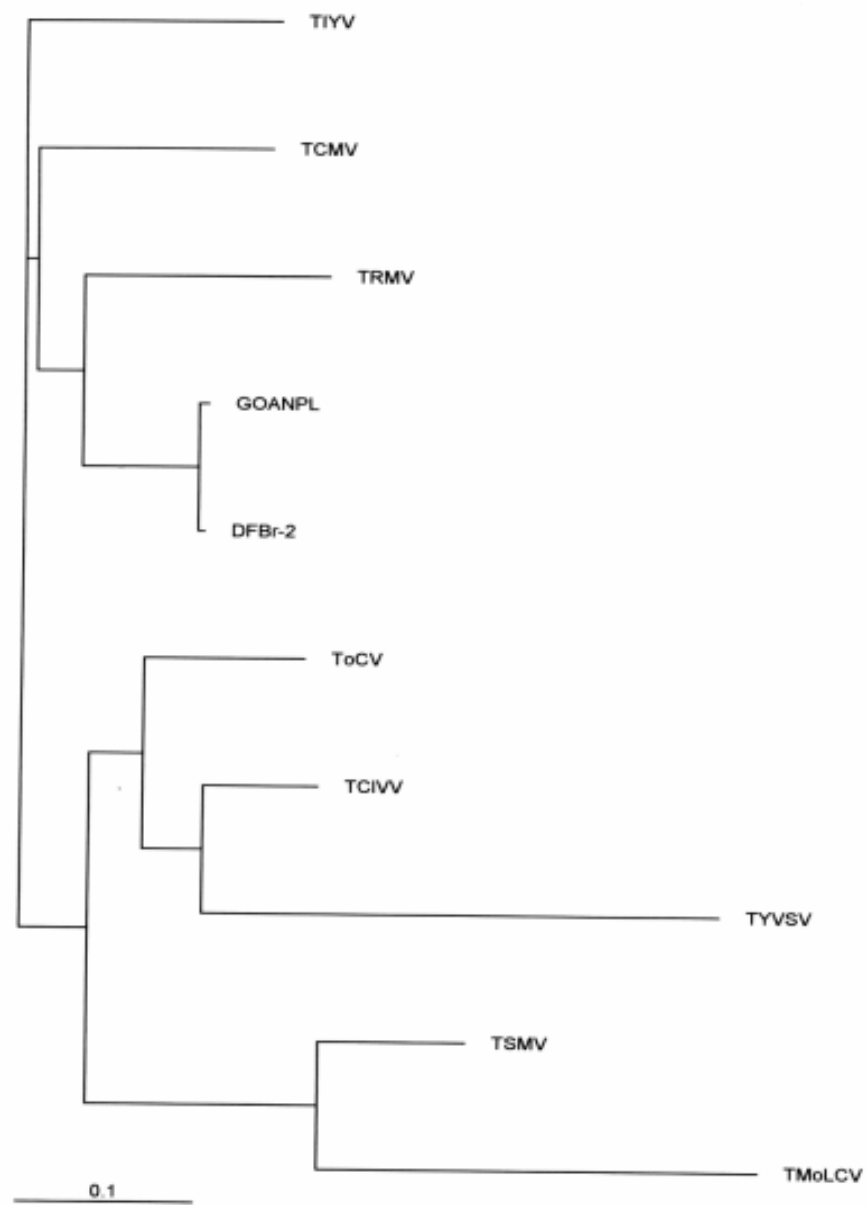


Figura 11 – Árvore filogenética (obtida via programa ClustalW 1.8) resultante do alinhamento da região intergênica (RI) de GO-ANPL com outros begomovírus de tomate do Brasil. As distâncias verticais são arbitrárias e as horizontais refletem o percentual de nucleotídeos diferentes entre os vírus dos ramos distintos.

TCIVV – *Tomato chlorotic vein virus*; ToCV – *Tomato crinkle virus*; TCMV – *Tomato chlorotic mottle virus*; TMoLCV – *Tomato mottle leaf curl virus*; TRMV – *Tomato rugose mosaic virus*; TIYV - *Tomato infectious yellows virus*; TSMV – *Tomato severe mosaic virus*; TYVSV- *Tomato yellow vein streak virus*; DF-BR2- begomovírus de tomate isolado no Distrito Federal.

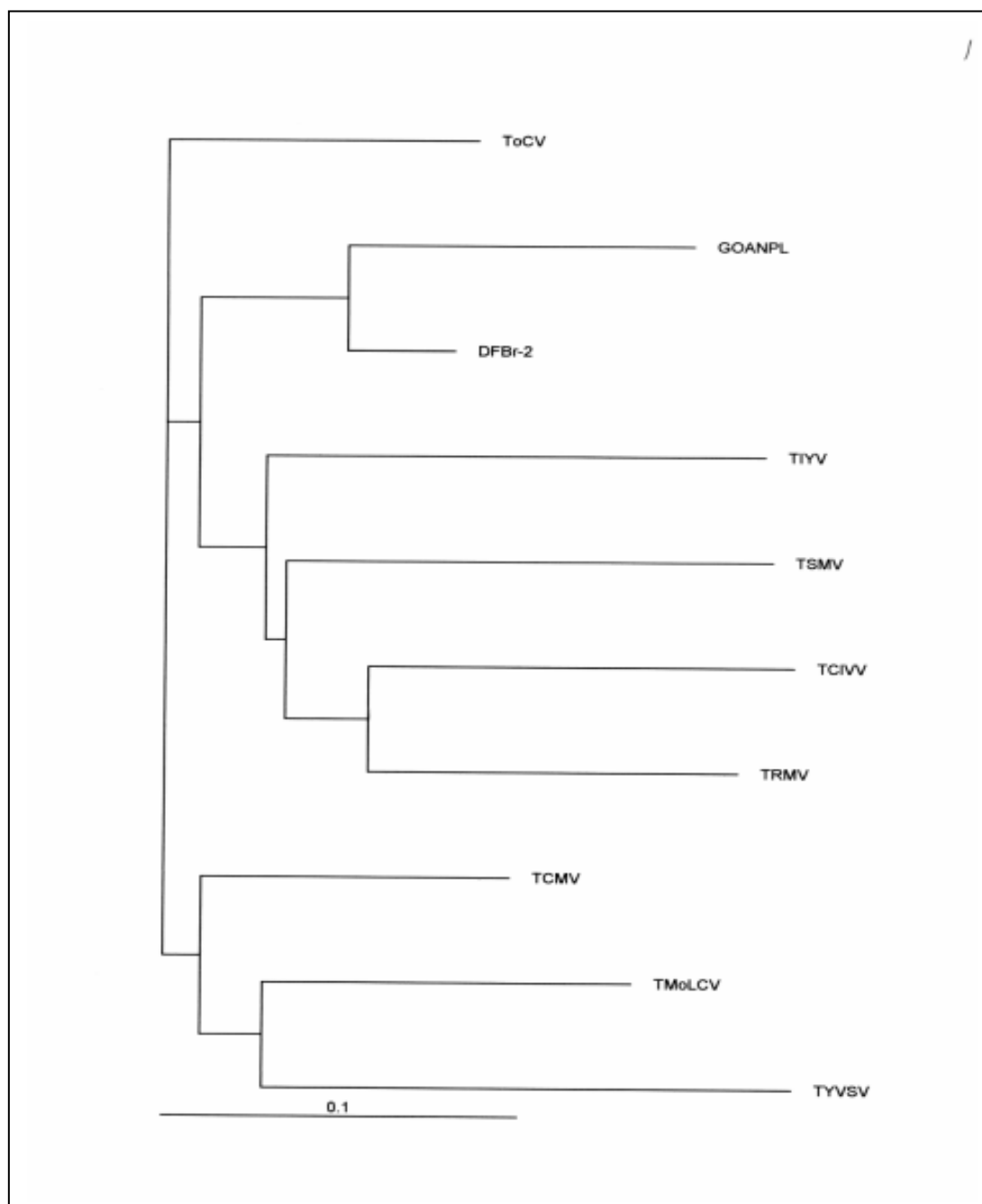


Figura 12 – Árvore filogenética (obtida via programa ClustalW 1.8) resultante do alinhamento das seqüências de 1300 nucleotídeos de GO-ANPL com outros begomovírus ocorrentes no Brasil. As distâncias verticais são arbitrárias e as horizontais refletem o percentual de nucleotídeos diferentes entre os vírus dos ramos distintos.

TCIVV – *Tomato chlorotic vein virus*; ToCV – *Tomato crinkle virus*; TCMV – *Tomato chlorotic mottle virus*; TMoLCV – *Tomato mottle leaf curl virus*; TRMV – *Tomato rugose mosaic virus*; TIYV - *Tomato infectious yellows virus*; TSMV – *Tomato severe mosaic virus*; TYVSV- *Tomato yellow vein streak virus*; DF-BR2- begomovírus de tomate isolado no Distrito Federal.

5. DISCUSSÃO

Os critérios sugeridos por Van Regenmortel *et al.* (1997) para distinguir espécies dentro da família *Geminiviridae* consideram, entre outros aspectos de elevada importância, o percentual de homologia na análise do componente A ou na análise da capa proteica (CP).

Em virtude da importância econômica dos begomovírus para as culturas e a relativa facilidade com que os genomas podem ser clonados, vários desses vírus têm sido seqüenciados (Torres-Pacheco *et al.*, 1993, Höfer *et al.*, 1997 Berrie *et al.*, 2001).

Para os membros da família *Geminiviridae*, são particularmente importantes as análises realizadas na região intergênica, região do genoma menos conservada; na CP, necessária para o reconhecimento pelo inseto vetor, com destaque para a região N-terminal (local de alta variabilidade) e na Rep, requerida para replicação viral (Czosnek & Laterrot, 1997, Padidam *et al.*, 1995).

A análise eletroforética, inicialmente realizada com os fragmentos de DNA do GO-ANPL amplificados por PCR com os oligonucleotídeos PAL1v1978/CP2, PAL1c1996/CP1, CP1/CP2 e CRC2/Bv1200, permitiram a observação de fragmentos dos componentes A e B, os quais foram nitidamente visualizados no gel sob luz UV (Figura 3). As regiões amplificadas com aqueles oligonucleotídeos foram facilmente obtidas tanto a partir do DNA total extraído de plantas do tomate 'Jumbo,' coletadas no campo, como de 'Rutgers' ou 'Santa Clara' para as quais o vírus em estudo foi transferido em inoculações efetuadas com o emprego da mosca branca. A organização dos genes do componente A obtida para o fragmento seqüenciado confirma que o GO-ANPL é um begomovírus de genoma bipartido (Figura 6). O estudo da região seqüenciada do genoma A do GO-ANPL permitiu a constatação de que os genes estão ordenados de modo compatível com a organização genômica dos begomovírus do Novo Mundo. Somente a ORF do gene *trap* e a região 5' do gene *ren* não estavam contidas nesse fragmento. O componente A é mais seqüenciado e estudado na caracterização molecular de begomovírus bipartidos que o componente B, provavelmente em virtude do maior número de genes presentes e das particularidades do genoma.

As comparações do GO-ANPL foram inicialmente realizadas com o isolado DF-BR2, begomovírus coletado em lavouras na região do entorno do Distrito Federal, distantes

aproximadamente 120 km do município de Anápolis, local da coleta do GO-ANPL. A análise conjunta das seqüências do GO-ANPL com o DF-BR2, permitiu a observação da elevada homologia (91 a 99%) entre os vírus, nas diversas regiões do genoma comparadas (Tabela 3). Nas regiões mais empregadas para a distinção entre espécies de begomovírus, a RI e a RC (Padidam *et al.*, 1995; Brown, 1997), os dois vírus apresentaram uma homologia de 95,6% e 99,5%, respectivamente. A identidade na seqüência repetida localizada na RC (Figura 7) e os 10% de aminoácidos diferentes na região N-terminal da CP (Figura 8), confirmam o estreito relacionamento entre o GO-ANPL e o DF-BR2, agrupados no mesmo ramo em todas as árvores filogenéticas construídas.

De acordo com os critérios relatados para *Geminiviridae* por Van Regenmortel (1997) e Padidam (1995), vírus de uma mesma espécie, portanto estirpes, possuem identidade na seqüência de todo o componente A e na proteína da CP acima de 90%. Com base nesses critérios e considerando os percentuais de homologia acima de 95% alcançados nessas regiões para GO-ANPL e DF-BR2, supõe-se que esses dois isolados sejam estirpes da mesma espécie de begomovírus. A similaridade na N-terminal da CP de 91,4% reforça esse dado e uma homologia de 99,5% entre a RC dos vírus endossa essa constatação. Aspectos biológicos, tanto como dados de seqüência, são considerados na definição de espécies de vírus pelo ICTV; a pseudorecombinação e a transcomplementação dos produtos gênicos, são igualmente observados na determinação de mesma espécie em *Geminiviridae* (Van Regenmortel, *et al.*, 1997).

A distância existente entre as lavouras de tomate (\simeq 100 km) onde foram coletados os tomateiros infectados com o GO-ANPL e o DF-BR2, sugere que essa espécie de begomovírus pode estar ocorrendo em plantios de tomate indústria e de mesa, em crescente exploração na região, sendo disseminado pela mosca branca, que comumente está presente em brássicas cultivadas próximas aos plantios da hortaliça. No entanto, diferente do observado com o isolado DF-BR2, o TCIVV (DF-BR1), possível espécie também constatada em tomateiro nas proximidades do Distrito Federal, foi um dos vírus com relacionamento genético mais distante do GO-ANPL.

A diversidade de begomovírus ocorrendo em tomateiro em regiões muito próximas pode estar associada às plantas daninhas, das quais a mosca branca poderia adquirir o vírus para transmití-lo ao tomateiro no campo. A dispersão ou predomínio de uma ou outra espécie de begomovírus infectando o tomate na região, porém, requer um

levantamento com coletas de amostras em lavouras afetadas de outros municípios do estado, envolvidos no cultivo da solanácea.

A análise detalhada das comparações efetuadas com o GO-ANPL e os 12 begomovírus caracterizados no mundo, indica um relacionamento genético mais distante do GO-ANPL com as espécies das Américas, da Europa e da Ásia, uma vez que a homologia na seqüência de nucleotídeos total (NT) com o isolado de Anápolis variou de 56 a 77,5% e a RI máxima foi 65,8% homóloga a do GO-ANPL (Tabela 1). No entanto, homologia acima de 80%, observada com alguns vírus para a região N-terminal da CP (TLCV) e para a Rep (TLCV, PYMV, SiGMV e ToMoV), pode significar que o GO-ANPL possua, com esses vírus, um ancestral comum com origem em regiões geográficas mais distantes. De forma semelhante ao que se tem constatado com outros begomovírus, o GO-ANPL teria sofrido recombinações e se adaptado a novas condições, adquirido novos hospedeiros, como as plantas daninhas, e vetor (Rybicki, 1994). Um exemplo próximo é observado para o SqLVCV. Sua capa proteica é altamente similar a de outros begomovírus do hemisfério ocidental, no entanto, a proteína da Rep não o enquadra no mesmo grupo de vírus. Baixo grau de similaridade em outras regiões do genoma também sugere que os possíveis eventos de recombinações não são recentes e que, ao longo do tempo, os vírus da família *Geminiviridae* divergiram até a condição em que se encontram no campo (Torres-Pacheco *et al.*, 1993).

Com relação às árvores filogenéticas derivadas do alinhamento das seqüências da CP e da Rep (Figura 9 e 10) dos 12 begomovírus do GenBank, caracterizados em diferentes regiões do mundo, com os begomovírus de tomate do Brasil, observou-se que não houve formação de agrupamentos de vírus associados à região geográfica onde ocorrem. Uma distribuição heterogênea com pares formados por espécies do Brasil e do mundo compuseram os ramos de ambas as árvores. Esse comportamento sugere a existência de alguma similaridade genética na região da CP e da Rep entre espécies do Brasil e aquelas oriundas do Novo ou Velho Mundo.

Alguns autores relatam que maior similaridade na CP é observada entre begomovírus distintos de uma mesma região geográfica que entre isolados do mesmo vírus de regiões distintas (Padidam *et al* 1999, Czosnek & Laterrot, 1997). A árvore construída

com o resultado da análise da CP para os vírus acima citados parece divergir dessa proposta. Segundo McGrath & Harrison (1995), as diferenças na seqüência da CP podem levar a alterações da transmissibilidade do vírus pelo vetor.

O relacionamento genético do isolado de Goiás foi aparentemente maior com as oito espécies de begomovírus caracterizadas no Brasil (não incluindo o DF-BR2) que com os 12 begomovírus anteriormente comparados. Uma baixa homologia, contudo, foi evidenciada na análise da seqüência de nucleotídeos para a maioria das espécies, excetuando o TRMV, com o qual a homologia foi de 91,8% (Tabela 2). Com a análise da região N-terminal da CP e da Rep, o número de espécies com similaridade de pelo menos 80% com o GO-ANPL foi de três e de cinco, respectivamente (Tabela 2). Quando se considerou a RI, a divergência foi mais acentuada, sendo contudo, superior aos 80% com o TRMV. Segundo alguns autores, a comparação de seqüência da RI possibilita uma informação mais precisa da extensão de similaridades e diferenças existentes entre begomovírus (Rybicki, 1994; Zhou *et al.*, 1998a).

Considerando os critérios publicados por Van Regenmortel *et al.* (1997) relativos à identidade da seqüência de todo o componente A e da CP para definição da espécie em *Geminiviridae*, constata-se que GO-ANPL não se enquadra em nenhuma das espécies de begomovírus de tomate identificadas anteriormente no Brasil. As árvores filogenéticas construídas a partir do alinhamento da NT ou RI com as espécies do Brasil (Figura 11 e 12), visando melhor observar o relacionamento entre esses vírus, revelou que, conforme a região analisada, as posições dos vírus nos ramos foram bastante alteradas. Para Padidam *et al.* (1999), a variação da posição dos membros submetidos à análise filogenética em diferentes regiões do genoma, sugere a possibilidade de significativa recombinação entre os begomovírus avaliados.

O TRMV, no entanto, apresentou um relacionamento genético próximo tanto do GO-ANPL como do DF-BR2, razão pela qual os três vírus foram analisados separadamente e com mais detalhes. Nessa comparação, as maiores homologias do TRMV com o GO-ANPL foram observadas para seqüência total de 2.130 nucleotídeos e capa proteica (Tabela 3). Na análise da RI, da Rep e da NTp (seqüência nucleotídica contendo juntos o 5' da Rep, a RI e o 5' da CP, regiões mais variáveis), a relação TRMV e GO-ANPL praticamente não ultrapassou os 81%. A RC, região analisada somente para esses três vírus, apresentou a menor homologia dentre todas as regiões (69,9%) nas combinações do TRMV com cada um dos vírus (Tabela 3). Dentro da RC, as seqüências repetidas de 12 nucleotídeos (Figura 7), apresenta-se idêntica entre GO-ANPL e o DFBr2, e distinta para o TRMV na qual esse

motivo possui 15 nucleotídeos. A RC é a região responsável pelos principais eventos para a replicação viral. Assim, apesar dos percentuais de homologia na seqüência de nucleotídeos e na CP estarem próximos à faixa estabelecida por Van Regenmortel *et al.* (2000) e dos estudos de Rybicki (1994) para uma mesma espécie, as diferenças na homologia das demais regiões, principalmente na RC, são consideráveis para a avaliação geral do relacionamento dos três vírus. Essas informações sugerem, portanto, que o TRMV é uma espécie relacionada, porém distinta de GO-ANPL e DF-BR2.

O componente B, mais utilizado nos estudos envolvendo recombinações (Frischmuth *et al.*, 1997), não foi empregado nas avaliações comparativas de seqüências com o GO-ANPL. A obtenção do componente B, como também a complementação do componente A, permitiriam a realização de ensaios para investigar a pseudocombinação e trans-replicação entre os vírus como forma de esclarecer os possíveis eventos e confirmar a taxonomia proposta neste trabalho. Todavia, os ensaios para a produção de pseudorecombinantes viáveis como forma de investigar melhor a relação genética do GO-ANPL com o TRMV, considerando a diferença na RC e nas seqüências repetidas, sítio da Rep, possivelmente não seriam bem sucedidos.

Segundo Lazarowitz *et al.* (1992), a incapacidade para formar pseudorecombinantes entre vírus distintos se deve à incompatibilidade na seqüência da RC, a qual é totalmente conservada (>95% de identidade) entre o DNA A e o DNA B. A RC, requerida para várias funções básicas, pode explicar porque recombinantes entre DNA A e DNA B com RC divergente não são infecciosos. São exemplos de pseudorecombinantes inviáveis o BGMV-BR e BGMV-GA (a RC do DNA A de BGMV-BR é 75% homóloga ao BGMV-GA) (Lazarowitz *et al.*, 1992). Sucesso na obtenção de pseudorecombinantes infecciosos entre BDMV e o ToMoV, vírus distintos, foi possível pelo fato de serem bastante relacionados (Hou & Gilbertson, 1996).

De acordo com as observações realizadas, entende-se que para o estudo do relacionamento entre vírus é importante a análise de várias regiões do genoma, especialmente a RI, considerada específica para o reconhecimento da Rep (Rybicki, 1994) e por ser particularmente propensa a variação (Zhou *et al.*, 1998a). A comparação conjunta de nucleotídeos de regiões intergênicas e aminoácidos de produtos dos genes é, provavelmente, a melhor forma de avaliar o relacionamento e interpretar a proximidade genética entre os begomovírus.

A taxonomia proposta para a diferenciação de espécies dentro do gênero *Begomovirus* apresenta, em alguns casos, semelhanças e, em outras, distinções com gêneros de vírus pertencentes a outras famílias. Para se estabelecer a posição taxonômica de um novo vírus, como uma nova espécie dentro de um gênero, o ICTV orienta que as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos que compõem esse novo táxon, sejam comparadas com aquelas apresentadas por espécies relacionadas, as quais já possuem a sua classificação elucidada. Para a proposição de novas espécies dentro do gênero *Sobemovirus*, por exemplo, o ICTV considera homologia na seqüência igual a 60% como o limite requerido entre duas espécies (Hull *et al.*, 2000). Referida porcentagem é muito distinta daquela utilizada para o DNA A e para a CP dos begomovírus, de 90% (Van Regenmortel *et al.*, 1997). Considerando os valores baixos de homologia, a determinação da posição taxonômica de vírus isométricos está ligada, principalmente, à elucidação da organização genômica dos vírus como também à identificação da presença de motivos conservados existentes nas proteínas codificadas pelos vírus, notadamente a poliproteína e a proteína do capsídeo (Morozov & Solovyev, 1999). Os critérios para a diferenciação de espécies empregados para os sobemovírus, tombusvírus, necrovírus e polerovírus, diferem significativamente daqueles empregados para diferenciar novas espécies pertencentes a gêneros em outras famílias como os *Tospovirus* (Bezerra *et al.*, 1999) e *Potyvirus* (Shukla *et al.*, 1994). No gênero *Tospovirus*, além das características biológicas, como círculo de hospedeiras e especificidade com o tripes vetor, aspectos moleculares, como a homologia inferior a 90 % no gene do nucleocapsídeo, são critérios considerados confiáveis para a separação de espécies de tospovírus. Para os potyvírus, identidade abaixo de 90% nos aminoácidos da capa protéica, e inferior a 85% na seqüência total, também são considerados suficientes para distinção entre espécies (Van Regenmortel *et al.*, 1997). Portanto, as proposições adotadas para a diferenciação de espécies na família *Geminiviridae* apresentam-se mais semelhantes àquelas apresentadas para tospovírus e potyvírus, sendo igualmente confiáveis para o estabelecimento de relações entre os seus membros emergentes.

Tomando por base a elevada homologia constatada entre o GO-ANPL e DF-BR2 e a distinção dos mesmos com relação às outras espécies de begomovírus já caracterizadas, propõe-se que esses isolados constituam estirpes de uma mesma e nova espécie do gênero *Begomovirus* sugerindo-se, para a mesma, a denominação *Tomato chlorotic mosaic virus*, ToCMV.

CAPÍTULO II

**DETERMINAÇÃO DO CÍRCULO DE HOSPEDEIROS DO BEGOMOVÍRUS
ISOLADO DE TOMATEIRO
E
ESTUDO DA SUA INTERAÇÃO COM A MOSCA BRANCA,
*Bemisia argentifolii***

**DETERMINAÇÃO DO CÍRCULO DE HOSPEDEIROS DO BEGOMOVÍRUS
ISOLADO DE TOMATEIRO**

1. INTRODUÇÃO

Na inoculação experimental de begomovírus para o estudo do círculo de hospedeiros têm sido usadas a inoculação mecânica, a transmissão via vetor (Wu *et al.*, 1996; Mansour & Al-Musa, 1992), a agroinoculação de DNA viral (Höfer *et al.*, 1997b; von Arnim & Stanley, 1992) e a transmissão por enxertia (Lotrakul *et al.*, 1998).

Os hospedeiros naturais de vírus transmitidos por mosca branca, podem ser plantas cultivadas ou silvestres, geralmente restritas a uma ou poucas famílias botânicas entre as dicotiledôneas. A limitação de número de hospedeiros podem ser exemplificada com alguns vírus como o BGMV, o qual é restrito a leguminosas; o SqLCV, que tem por hospedeiros algumas leguminosas e cucurbitáceas, o ACMV que infecta somente a mandioca e *Datura* spp. e o *Cotton leaf crumple*, CLCV, cujos hospedeiros são o feijão, o algodão, *Hibiscus* sp. e *Malva parviflora* L. O TYLCV, um dos begomovírus mais virulentos, não é uma exceção. Apesar de seus hospedeiros pertencerem a seis famílias botânicas diferentes, não são muitas as espécies infectadas pelo vírus, destacando-se as solanáceas e particularmente o tomate. Espécies como a lentilha, o feijão e o fumo, são infectados experimentalmente por esse vírus (Picó *et al.*, 1996).

A infecção por begomovírus resulta em alterações nas células e organelas vegetais e inclusões virais podem ser observadas no citoplasma de células afetadas. Necrose e degeneração de parênquima vascular como também vesículas citoplasmáticas indicam danos extensos ao sistema vascular expresso por sintomas severos e uma redução do crescimento das plantas (Hoefert, 1987; Brown, 1997).

Os sintomas freqüentemente observados em plantas infectadas por begomovírus são os de mosaico, amarelecimento, mosqueado, espessamento de nervuras, deformações foliares, enrugamento, enrolamento foliar, epinastia e redução do desenvolvimento da planta (Picó *et al.*, 1996).

Estudos de fatores determinantes que influenciam a suscetibilidade de hospedeiros, consideram a premissa de que o fenótipo exibido pelas plantas infectadas são resultantes de interações compatíveis envolvendo produtos de genes virais e genes da planta hospedeira, os quais possibilitam a penetração, a replicação em determinados tipos de células e o movimento viral, célula-a-célula e a longa distância. A adaptação e

especificidade de hospedeiros podem envolver proteínas virais ou elementos reguladores presentes no DNA A e no DNA B, assim como fatores da hospedeira (Hou *et al.*, 1998). Contudo, ainda não está esclarecido para begomovírus se um gene da planta hospedeira possibilita ou previne a invasão de suas células ou tecidos (Brown, 1997).

A identificação dos determinantes virais que definem o círculo de hospedeiros de begomovírus tem sido estudada com base em estirpes relacionadas, as quais diferem nas suas propriedades de infectar hospedeiros. As relevantes diferenças entre essas estirpes podem ser constatadas por meio de experimentos envolvendo trocas genéticas e mapeamento de regiões associadas com um particular fenótipo do círculo de hospedeiros (Lazarowitz, 1992).

Experimentos conduzidos por Ingham & Lazarowitz (1993) com estirpes do SqLCV ressaltam a importância da proteína sintetizada pelo gene *ns* (movimento viral) na determinação do círculo de hospedeiros. Segundo os autores, a atividade da proteína no SqLCV poderia ser estendida a todos os begomovírus, embora a sua função, nesse contexto, não esteja totalmente elucidada.

Mais recentemente, em estudos conduzidos por Morra & Petty (2000) com o begomovírus BGMV, o qual é limitado ao floema e restrito às células do sistema vascular, e o TGMV, que invade as células do mesófilo, os autores identificaram determinantes genéticos virais envolvidos na associação com o tecido infectado. Nos experimentos constataram-se que as diferenças dos tipos de tecidos de *N. benthamiana* infectados pelo BGMV e TGMV são geneticamente determinadas por três elementos: a região dos genes *trap* e *ren* do DNA A, a região dos genes *mp* e *ns* do DNA B e uma região não codificante (RI) do genoma B.

Um aspecto interessante na infecção ocorre com o BGMV. Esse vírus, tipicamente, induz mudanças citopáticas somente em células associadas ao floema de plantas de feijão. Contudo, infecta células do mesófilo e da epiderme da leguminosa quando o *Tobacco mosaic virus*, TMV (estirpe de leguminosas), está presente (Brown, 1997). A invasão de células do mesófilo pelo BGMV é também observada em *N. benthamiana* por ocasião da co-infecção com o TGMV (Morra & Petty, 2000). A perda da especificidade de tecido de um begomovírus na presença de um segundo vírus pode ocorrer em plantas daninhas ou cultivadas, aspecto importante do ponto de vista evolucionário e

epidemiológico, visto que a localização do vírus na hospedeira é essencial para a aquisição do mesmo pelo vetor (Brown, 1997).

O vetor tem um importante papel na seleção de hospedeiros, ao introduzir o seu estilete na epiderme ou células do floema, inoculando o vírus que veicula. O processo de interação genética vírus-planta inicia-se a partir desse momento. As restrições que definem o círculo de hospedeiros não são bem compreendidas, mas sabe-se que a replicação viral é um fator decisivo na determinação dos hospedeiros e que o movimento viral colabora na restrição das espécies suscetíveis (Timmermans *et al.*, 1994; Brown, 1997).

O comportamento de *B. argentifolii*, o seu hábito polífago e os hospedeiros de sua preferência, em princípio, ditam a seleção de hospedeiros naturais de begomovírus e podem estar associados à emergência de vários novos begomovírus no campo (Brown, 1997).

2. OBJETIVOS

Objetivou-se a determinação do círculo de hospedeiros e dos sintomas induzidos pelo begomovírus isolado de tomateiro em Anápolis, GO-ANPL, mediante inoculação mecânica e transmissão do vírus pelo inseto vetor, *B. argentifolii*, para diferentes espécies vegetais com posterior comparação do seu comportamento com outros begomovírus.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem e fonte do isolado de begomovírus

O isolado empregado na determinação do círculo de hospedeiros foi coletado em lavouras de tomate indústria 'Jumbo' no município de Anápolis-GO, cujas plantas apresentavam sintomas sugestivos de infecção por begomovírus. O diagnóstico viral foi comprovado com a técnica de PCR e por hibridização com sonda radioativa preparada com DNA de um begomovírus isolado do DF (Santos *et al.*, 1998a), o qual foi posteriormente denominado DF-BR2. O begomovírus de Anápolis, GO-ANPL, foi mantido em plantas de

tomate 'Santa Clara', as quais apresentaram os sintomas típicos da infecção pelo vírus, em telado à prova de insetos na Embrapa Hortaliças-DF.

O isolado DF-BR2, previamente identificado no Distrito Federal e cuja similaridade genética com o GO-ANPL foi discutida no capítulo I, teve seu círculo de hospedeiros igualmente investigado neste trabalho, sendo os resultados das inoculações posteriormente utilizados para comparar com aqueles obtidos para o GO-ANPL.

3.2. Determinação do círculo de hospedeiros do GO-ANPL

Os ensaios para a determinação do círculo de hospedeiros do isolado GO-ANPL, foram conduzidos em casa-de-vegetação ou em insetários, segundo a modalidade de inoculação do vírus: inoculação mecânica ou com o vetor, *B. argentifolii*. As plantas a serem testadas foram distribuídas em vasos de 1 kg de capacidade contendo uma mistura autoclavada de solo e esterco (2:1). As mudas apresentavam estágio de desenvolvimento que variava entre duas e seis folhas verdadeiras, conforme a espécie vegetal envolvida. A temperatura mínima e a máxima durante o período variaram de 16 a 19°C e 22 a 30°C, respectivamente. Foram inoculadas quatro a cinco plantas de cada espécie, mantendo-se um vaso com quatro plantas não inoculadas (testemunhas). O experimento foi repetido por duas vezes nas mesmas condições.

Na inoculação mecânica, foram inicialmente testados dois tipos de solução tampão: o de fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,8, com 0,2% de 2-mercaptoetanol usado para transmissão de ToMoV e BDMV (Gilbertson *et al.*, 1993) e o tampão de fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5, e 0,1% Na₂SO₃, comumente utilizado em inoculações de vários gêneros de vírus. Para o inóculo, folhas jovens e infectadas do tomate 'Santa Clara' foram trituradas em almofariz na presença de tampão, sendo o extrato obtido friccionado com pedaço de gaze na superfície adaxial das folhas polvilhadas com carborundum. Após a inoculação, as folhas foram lavadas com água corrente e as plantas mantidas em casa-de-vegetação para observação dos sintomas. Uma vez que os tampões apresentaram, em ensaios preliminares, os mesmos resultados, optou-se pelo uso do segundo tampão nas inoculações.

Na inoculação com o vetor, 15-25 moscas virulíferas, com um período de acesso de aquisição do vírus de 72h, foram confinadas às mudas sadias por meio de gaiolas individuais de PVC revestidas na parte superior do tubo com voal (Figura 1), e assim mantidas por um período de 48h em insetários reservados para este fim. Após a inoculação, as plantas foram pulverizadas com inseticida sistêmico e conduzidas para casa-de-vegetação para acompanhamento do desenvolvimento de sintomas.

Decorridos 10 a 15 dias da inoculação foram anotados os sintomas iniciais da virose. Esta observação foi repetida aos 20 a 30 dias da inoculação mecânica ou com o vetor, ocasião em que foram coletadas amostras foliares das novas brotações para realização dos testes visando a detecção do vírus nas plantas.



Figura 1- Inoculação de muda de tomate com a mosca branca utilizando gaiola de tubo PVC revestida em sua parte superior com voal.

Na investigação do círculo de hospedeiros do isolado GO-ANPL, foram inoculadas mecanicamente e com o vetor, 46 espécies vegetais pertencentes a nove diferentes famílias botânicas: Amaranthaceae, *Gomphrena globosa* L.; Brassicaceae, *Brassica oleraceae* L. var. *capitata*; Chenopodiaceae, *Chenopodium amaranticolor* L., *C. quinoa*; Compositae, *Bidens pilosa* L.; Cucurbitaceae, *Cucumis anguria* L., *C. melo* L. 'Eldorado', *C. sativus* L. 'Shibata', *Cucurbita pepo* L. 'Caserta', híbrido *C. moschata* Duch. x *C. maxima* Duch. 'Jabras'; Euphorbiaceae, *Euphorbia heterophylla* L.; Leguminosae, *Canavalia ensiformis* DC, *Cassia occidentalis* L., *Centrosema brasilianum* Benth., *Clitoria ternatea* L., *Lens esculenta* 'Silvina'; *Macroptilium atropurpureum*, *M. lathyroides* (L.) Urban, *Phaseolus vulgaris* L. 'Jambo', *Pisum sativum* L. 'Frevó', *Vigna mungo*, *Vigna unguiculata* Walp. 'Pitiuba' e 'Macaibo'; Malvaceae, *Sida rhombifolia* L. e Solanaceae, *Capsicum annuum* L. 'Ikeda', *C. chinense* acesso CNPH 0679, *C. frutescens* L., *Datura stramonium* L., *Lycopersicon esculentum* Mill. 'Rutgers' e 'Santa Clara', *Solanum americanum* Mill., *S. tuberosum* L. 'Monalisa', *S. melongena* L. 'Diamante Negro', *S. ovigerum* Dun. 'Morro Redondo', *Nicotiana benthamiana* D., *N. clevelandii*, *N. tabacum* L. 'Turkish NN', 'Xanthi NN' e 'Xanthi NC', *N. silvestris*, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. rustica*, *Nicandra physalodes* (L.) Gaertn., *Physalis floridana* Rydb.

3.3. Círculo de hospedeiros do isolado DF-BR2

O procedimento adotado para a distribuição de plantas e para inoculação do DF-BR2 foi o mesmo empregado nas transmissões, mecânica e com o vetor, do isolado GO-ANPL. Para a definição do círculo de hospedeiros do DF-BR2, foram inoculadas 32 espécies vegetais pertencentes a 10 famílias botânicas, a maioria delas empregada nos ensaios com o isolado de Anápolis: Amaranthaceae, *G. globosa*; Brassicaceae, *B. oleraceae*; Cariofilaceae, *Dianthus barbatus*, *D. caryophyllus*; Chenopodiaceae, *Beta vulgaris*, *C. amaranticolor*, *C. murale*, *C. quinoa*; Compositae, *Bidens pilosa*, *Helianthus annuus*, *Lactuca sativa*, *Zinnia elegans*; Cucurbitaceae, *Citrullus lanatus* 'Charlston Gray', *C. sativus* 'Shibata', *C. pepo* 'Caserta'; Leguminosae, *P. sativum*, *V. unguiculata*, Malvaceae,

Gossypium sp.; Solanaceae, *C. annuum* 'Ikeda', *D. stramonium*, *L. esculentum* 'IPA 05', *N. benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* 'TNN', *N. occidentalis*, *N. rustica*, *N. physalodes*, *Petunia* sp, *P. floridana*, *S. melongena* 'Diamante Negro', *S. ovigerum* 'Morro Redondo'; Portulacaceae, *Portulaca oleraceae*.

3.4. "Dot-Blot" para confirmação dos resultados

3.4.1. Preparo da membrana para hibridização

A confirmação da suscetibilidade ou não das plantas inoculadas, foi realizada por meio da técnica "dot-blot" (Rom *et al.*, 1993). As amostras foram preparadas triturando-se, em microtubos de 1,5 ml, um disco foliar de 1 cm de diâmetro, obtido de folhas inoculadas ou de brotações, de cada planta inoculada, na presença de 20 µl de NaOH 0,4 N e centrifugando-se a 2.000g por 2 minutos. Três microlitros do sobrenadante de cada amostra foram aplicados em membrana de nylon (Hybond N + da Amersham/Pharmacia) com uma grade perfurada que demarcava orifícios para separação das amostras. Como controle negativo foram empregados o extrato de planta sadia de cada uma das espécies testadas e o tampão da amostra, NaOH a 0,4N e, como controle positivo, gotas do suco de planta de tomate sabidamente infectada e de DNA viral purificado (15-30 ng).

3.4.2. Lavagem da membrana

A membrana, assim preparada, foi lavada por 5 minutos em cada uma das soluções de: 1) Tris-HCl, pH 7,5; 2) solução de 2X SSC (NaCl 3M, Citrato de Sódio 0,3 M, pH 7,0) e 3) etanol 95% . Após as três lavagens, a membrana foi seca à temperatura ambiente e o DNA das amostras foi fixado à membrana por ação de luz UV por 5 minutos ou em forno a 80°C por 2 horas.

3.4.3. Pré-hibridização da membrana

A membrana foi pré-hibridizada a 50°C por 2 horas em 25 ml de solução constituída da mistura de SSC 5X, solução de Denhart's a 0,1% (Ficoll tipo 400 0,1%, polivinilpirrolidona 0,1% e albumina de soro bovino 0,1%) e 0,5% SDS, acrescida de 500 µg de DNA de esperma de salmão desnaturado (100°C/5minutos).

3.4.4. Marcação radioativa do fragmento de PCR e Hibridização

A sonda utilizada na hibridização radioativa foi preparada utilizando-se o kit de marcação "Ready-to-go" da Pharmacia. Inicialmente, aos 50 ng de DNA (fragmento do DNA A amplificado com os oligonucleotídeos PAL1v1978/PAR1c715) do isolado GO-ANPL, foram acrescidos 20 µl de água milli-Q e a diluição foi desnaturada (100°C/por 5 minutos) e imediatamente resfriada em gelo. Ao DNA desnaturado foram acrescentados outros 20 µl de uma mistura contendo hexanucleotídeos aleatórios, dATP, dTTP, dGTP e DNA polimerase. Finalmente, acrescentou-se à mistura 5 µl de dCTP marcado com α -³²P, a 250 µCi, deixando a polimerização do DNA ocorrer a 37°C por 15 minutos. A sonda, assim obtida, foi desnaturada antes de ser adicionada à solução de pre-hibridização, compondo então a solução de hibridização. Nessa solução, as membranas com as amostras permaneceram por 16-24 horas a 52°C. Decorrido o período de hibridização, as membranas foram lavadas com 2X SSC e 0,1% SDS por 10 minutos à temperatura ambiente e com 1X SSC e 0,1% SDS por 10 minutos a 50°C, monitoradas com contador Geiger e então avaliadas por autoradiografia.

Ocasionalmente, a PCR foi utilizada nas confirmações de infecção viral, conforme metodologia anteriormente descrita no capítulo I, empregando oligonucleotídeos CP1/CP2 que amplificam todo o gene da capa proteica.

Na confirmação da infecção ou não com o isolado DF-BR2, as plantas inoculadas foram submetidas à técnica "dot blot" empregando sonda preparada com o fragmento de DNA A desse vírus.

4. RESULTADOS

Nos ensaios preliminares de inoculação mecânica com os tampões de fosfato de potássio e fosfato de sódio, constatou-se que ambas as soluções apresentaram os mesmos resultados, ao que se preferiu a inoculação com o segundo tampão, que não continha o 2-mercaptoetanol, por ser menos tóxico para manipulação.

Com base nos sintomas das 46 espécies inoculadas com o begomovírus, GO-ANPL, e nos resultados do "dot blot" usado para confirmação da suscetibilidade ou não das plantas, constatou-se que somente espécies vegetais pertencentes à família Solanaceae foram infectadas pelo vírus e que foi maior o número de solanáceas suscetíveis quando se utilizou o vetor, 12 espécies, que quando a inoculação foi realizada mecanicamente, apenas quatro espécies (Tabela 1). Os pimentões 'Ikeda' e CNPH 0679, *N. physalodes*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. tabacum* 'TNN', 'Xanthi nc' e 'Xanthi nn' foram infectados somente quando submetidos à transmissão com a mosca branca. De outra forma, as duas variedades de tomate 'Rutgers' e 'Santa Clara', a *D. stramonium* e a *N. benthamiana* foram infectadas com as duas modalidades de inoculação.

Os sintomas mais expressivos da infecção por GO-ANPL foram observados nos tomateiros 'Rutgers' (Figura 2) e 'Santa Clara', os quais apresentaram, nas folhas mais novas, mosaico com leve clorose 10 a 15 dias após a inoculação. Esses sintomas evoluíram para mosaico com amarelecimento, mais intenso em 'Rutgers', enrolamento e redução do limbo foliar, epinastia, e redução do desenvolvimento da planta, em torno de 20 a 30 dias após a inoculação. Os sintomas foram os mesmos, tanto para a infecção oriunda da inoculação mecânica como daquela resultante da inoculação com o vetor. A resposta às duas modalidades de infecção também foi similar em *N. benthamiana*, a qual exibiu sintomas de mosaico nas plantas infectadas (Figura 3). A *D. stramonium*, inoculada com o GO-ANPL exibiu pontos cloróticos sistêmicos de aproximadamente 2 mm, tanto na inoculação mecânica como na inoculação com a mosca branca, sendo esses pontos mais numerosos nas inoculações com o vetor (Figura 4). Um clareamento nas nervuras foi também constatado nas plantas de *D. stramonium* inoculadas com o emprego do inseto (Tabela 1).

Além destas quatro espécies e/ou cultivares infectadas por ambos os métodos de inoculação, oito solanáceas, entre espécies e cultivares, foram infectadas somente pela inoculação com a mosca branca. Os sintomas exibidos pelas plantas foram variados. Clareamento de nervuras acompanhado de mosaico foi observado em *N. physalodes* (Figura 5) e *N. tabacum* 'TNN'. Sintomas de mosqueado foram constatados em *N. glutinosa*, *N. tabacum* 'Xanthi nn' e 'Xanthi nc'. *N. rustica*, no entanto, apresentou manchas cloróticas difusas de 1 a 2 cm em várias folhas. O pimentão *C. annuum* 'Ikeda', infectado somente nas inoculações com a mosca branca, apresentou sintomas de manchas cloróticas locais, enquanto que o *C. chinense* CNPH 0679, na mesma modalidade de inoculação, não exibiu sintomas de infecção pelo begomovírus (infecção latente) (Tabela 1).

Os resultados obtidos com o "dot blot", para as membranas preenchidas com extrato foliar das solanáceas infectadas, permitiu a confirmação desses resultados a notar pelas evidentes marcações positivas da sonda no filme raio x (Figura 6). Quando necessário, a hibridização foi repetida para confirmação das informações. Os resultados da infecção local nos pimentões foram confirmados mediante a PCR (dados não apresentados).

Todas as outras 34 espécies vegetais e variedades distribuídas nas nove famílias botânicas testadas, independente do método de inoculação, não foram infectadas local ou sistemicamente pelo GO-ANPL, nas duas ocasiões em que foram inoculadas (Tabela 2). O resultado da não infecção dessas plantas também foi confirmado por ensaios com sondas moleculares ("dot blot").

Os resultados das inoculações em solanáceas com o isolado DF-BR2, estão apresentados na Tabela 3. A Figura 7 e 8 ilustram sintomas em *D. stramonium* e em *N. benthamiana* observados em espécies infectadas por esse isolado. Os hospedeiros, incluindo os tipos de sintomas induzidos pelo DF-BR2, foram comparados com o círculo de hospedeiros do GO-ANPL.

TABELA 1 – Sintomas em solanáceas infectadas com o begomovírus isolado de tomate, GO-ANPL, mediante transmissão mecânica e, ou com *Bemisia argentifolii*.

ESPÉCIE VEGETAL		INOCULAÇÃO MECÂNICA	INOCULAÇÃO COM <i>B. argentifolii</i>
<i>Capsicum annuum</i>	'Ikeda'	S/S	LCL
<i>C. chinense</i>	CNPH 0679	S/S	S/S (IL)
<i>Datura stramonium</i>		Ptos Cls	Cln, Ptos Cls
<i>Lycopersicon esculentum</i>	'Rutgers'	M, Am, Ef, RdC	M, Am, Ef, RdC
	'Santa Clara'	M, Cli, Df, RdC	M, Cli, Df, ,RdC
<i>Nicandra physalodes</i>		S/S	Cln, M
<i>Nicotiana benthamiana</i>		M	M
<i>N. glutinosa</i>		S/S	Mq
<i>N. rustica</i>		S/S	MCI
<i>N. tabacum</i>	'TNN'	S/S	Cln, M
	'Xanthi nn'	S/S	Mq
	'Xanthi nc'	S/S	Mq

Sintomas apresentados:

S/S – sem sintomas (não infectado); **LCL** – lesões cloróticas locais; **IL** – infecção latente; **Ptos Cls** – pontos cloróticos sistêmicos; **Cln** – clareamento de nervuras; **M** – mosaico; **Am-** amarelecimento; **Ef-** enrolamento foliar; **RdC-** redução do crescimento; **Cli-** clorose internerval; **Df** – distorções foliares; **Mq** –mosqueado; **MCI** – manchas cloróticas.

TABELA 2 – Relação das espécies vegetais não infectadas com o begomovírus isolado de tomate, GO-ANPL, mediante transmissão mecânica e, ou com *Bemisia argentifolii*.

FAMÍLIA BOTÂNICA	ESPÉCIE VEGETAL
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i>
Brassicaceae	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i>
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i> <i>C. quinoa</i>
Compositae	<i>Bidens pilosa</i>
Cucurbitaceae	<i>Cucumis anguria</i> <i>C. melo</i> 'Eldorado' <i>C. sativus</i> 'Shibata' <i>Cucurbita pepo</i> 'Caserta' <i>C. moschata</i> x <i>C. maxima</i> 'Jabras'
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia heterophylla</i>
Leguminosae	<i>Canavalia ensiformis</i> <i>Cassia occidentalis</i> <i>Centrosema brasilianum</i> <i>Clitoria ternatea</i> <i>Lens esculenta</i> 'Silvina' <i>Macroptilium atropurpureum</i> <i>M. lathyroides</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> 'Jambo' <i>Pisum sativum</i> 'Frevo' <i>Vigna unguiculata</i> 'Pitiuba ' 'Macaibo'
Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i>
Solanaceae	<i>Capsicum frutescens</i> <i>Solanum americanum</i> <i>S. tuberosum</i> 'Monalisa' <i>S. melongena</i> 'Diamante Negro' <i>S. ovigerum</i> 'Morro Redondo' <i>Nicotiana clevelandii</i> <i>N. silvestris</i> <i>N. occidentalis</i> <i>Physalis floridana</i>



Figura 2– Tomateiro 'Rutgers' infectada com GO-ANPL apresentando sintomas de mosaico e amarelecimento enrolamento foliar.



Figura 3 - *Nicotiana benthamiana* infectada com o GO-ANPL exibindo sintomas de mosaico.



Figura 4- *Datura stramonium* infectada com o isolado GO-ANPL exibindo pontos cloróticos sistêmicos.



Figura 5 – *Nicandra physalodes* infectada com o isolado GO-ANPL com sintomas de mosaico nas brotações

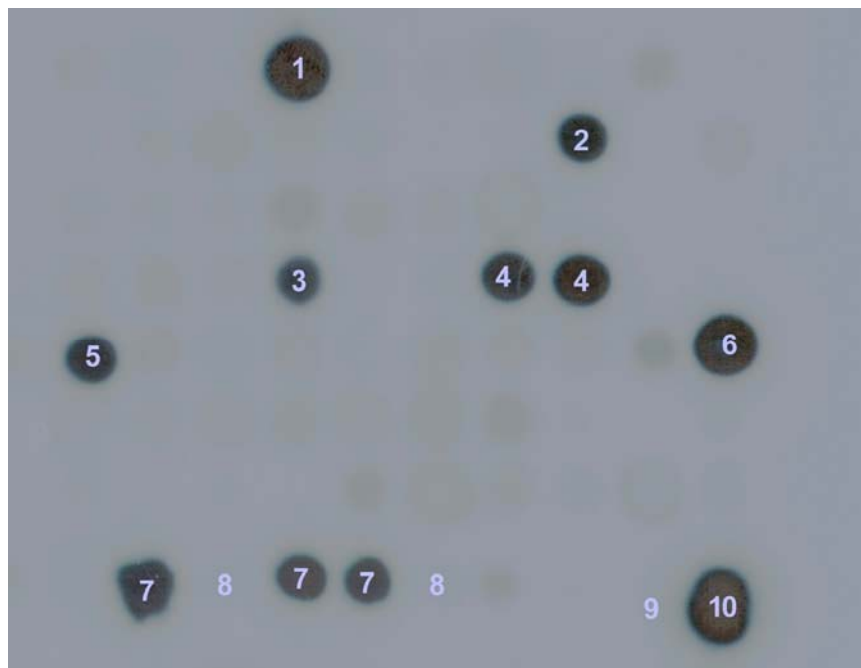


Figura 6- Detecção autoradiográfica do isolado de geminivírus GO-ANPL em amostras foliares de plantas infectadas com o GO-ANPL: 1- Tomate 'Rutgers'; 2- *N. benthamiana*; 3- *N. physalodes*; 4 - *N. tabacum* 'TNN'; 5- *N. glutinosa*; 6- *D. stramonium* 7- Tomate 'Santa Clara'; 8- tomate sadio; 9- tampão da amostra, 10- DNA- 20ng (controle).

TABELA 3 - Resultados das inoculações com o isolado DF-BR2 efetuadas mecanicamente ou empregando o vetor, *B. argentifolii*, em plantas da família Solanaceae.

ESPÉCIE VEGETAL	SINTOMAS DA INFECÇÃO POR TRANSMISSÃO MECÂNICA OU COM O VETOR
<i>Capsicum annuum</i> 'Ikeda'	LCL
<i>Datura stramonium</i>	Cln, M, Rg
<i>Lycopersicon esculentum</i> 'IPA – 05'	M, Am, Ep, RdC
<i>Nicotiana benthamiana</i>	M, B, Ep, RdC
<i>N. glutinosa</i>	S/S
<i>N. occidentalis</i>	S/S
<i>N. rustica</i>	Mq
<i>N. tabacum</i> 'TNN'	S/S
<i>Nicandra physalodes</i>	M, RdC
<i>Petunia</i> sp	S/S
<i>Physalis floridana</i>	Cl, Ep, RdC
<i>Solanum melongena</i> 'Diamante Negro'	S/S
<i>S. ovigerum</i> 'Morro Redondo'	S/S

Sintomas apresentados:

LCL – lesões cloróticas locais; **Cln** – clareamento de nervuras; **M**- mosaico; **Rg** – rugosidade; **Am** – amarelecimento; **Ep** – epinastia; **RdC** – redução do crescimento; **B** – bolhosidade; **Mq** – mosqueado; **Cl** - clorose; **S/S** – sem sintomas (não foram infectadas).

As espécies pertencentes às famílias Amaranthaceae, *Gomphrena globosa*; Brassicaceae, *Brassica oleraceae*; Cariofilaceae, *Dianthus barbatus*, *D. caryophyllus*; Chenopodiaceae, *Beta vulgaris*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. murale*, *C. quinoa*; Compositae, *Bidens pilosa*, *Helianthus annuus*, *Lactuca sativa*, *Zinnia elegans*; Cucurbitaceae, *Citrullus lanatus* 'Charlston Gray', *Cucumis sativus* 'Shibata', *Cucurbita pepo* 'Caserta'; Leguminosae, *Pisum sativum*, *Vigna unguiculata*, Malvaceae, *Gossypium* sp.; Portulacaceae, *Portulaca oleraceae* não foram infectadas pelo isolado DF-BR2.



Figura 7 – *Datura stramonium* infectada pelo isolado, DF-BR2, apresentando sintomas de mosaico.



Figura 8 – *Nicotiana benthamiana* infectada com o isolado DF-BR2 exibindo sintomas de mosaico com bolhosidade e redução do crescimento.

DISCUSSÃO

Considerando a evolução viral, as hospedeiras naturais foram subdivididas em hospedeiras adaptadas, nas quais há eficiente replicação viral e sintomas, e hospedeiras não adaptadas, freqüentemente caracterizadas por baixo nível de DNA e sintomas fracos ou ausentes (Hou *et al.*, 1998). Dessas, são exemplos o feijão com TGMV e soja com BDMV ou BGMV (Petty *et al.*, 1995; Gilbertson *et al.*, 1991a). O significado desse tipo de hospedeiras na epidemiologia de begomovírus é desconhecido, contudo, essas plantas podem se tornar fontes adicionais de inóculo, particularmente na ausência de hospedeiras naturais, ou de infecções mistas com outros begomovírus os quais facilitarão a evolução viral por meio de recombinações (Hou *et al.*, 1998).

O círculo de hospedeiros de um vírus compreende as espécies de plantas suscetíveis à infecção viral ocorrendo naturalmente ou em condições experimentais (Brown, 1997). A identificação de plantas hospedeiras é parte da caracterização biológica de vírus que contribui para distinção de espécies e estirpes de diversos gêneros de vírus. A sintomatologia exibida por plantas infectadas são importantes nesse tipo de investigação, assim como a determinação do círculo de hospedeiros amplo ou restrito de um determinado isolado viral.

Em geral, membros da família Geminiviridae são patógenos virulentos de plantas cultivadas causando perdas elevadas que variam de 80-90%. O *Begomovirus* é o único gênero de vírus da família *Geminiviridae* cujas espécies, com algumas exceções, são transmitidas mecanicamente, o que reflete a sua habilidade de infectar células da epiderme, além do floema (Timmermans *et al.*, 1994) e que tende a manter níveis similares de DNA A e DNA B nas hospedeiras adaptadas (Hou & Gilbertson, 1996).

Os efeitos de begomovírus em plantas daninhas hospedeiras, apesar dessas desenvolverem sintomas foliares e exibirem redução no crescimento da planta, são menos severos que nas plantas cultivadas (Brown, 1997).

O begomovírus isolado de tomate, GO-ANPL, apresentou círculo de hospedeiros bastante restrito, infectando somente plantas da família Solanaceae, principalmente tomate, pimentão e fumo, dentre as cultivadas. Esses resultados corroboram alguns trabalhos que têm constatado que begomovírus, isolado de tomate, podem infectar somente solanáceas

(Rojas *et al.*, 1993). Outros vírus de tomate, entretanto, podem incluir, entre os hospedeiros, espécies de diferentes famílias como Leguminosae, Malvaceae, Asclepiadaceae e Compositae, (Paplomatas *et al.* 1994; Picó *et al.*, 1996). As espécies e cultivares de tomate 'Rutgers', *D. stramonium*, *N. benthamiana*, *N. tabacum* 'Xanthi NC' e *N. physalodes*, infectadas com o GO-ANPL, estão também presentes nas listas de hospedeiras do outros begomovírus relatados em outros países (Picó *et al.*, 1996, Harrison *et al.*, 1997; Nateshan *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1999).

Os begomovírus geralmente possuem círculo restrito de hospedeiros entre as dicotiledôneas (Harrison, 1985). No entanto, em ensaios de transmissão com a mosca branca para plantas testes, o *Tobacco leaf curl virus* (TLCV), caracterizado na Índia, infectou 35 espécies vegetais entre cultivadas, ornamentais e plantas daninhas (Valand e Muniyappa, 1992). O círculo de hospedeiros pode também variar com a estirpe ou isolado viral. O TYLCV, isolado de Israel, infecta o feijão, mas esta leguminosa não é suscetível ao isolado da Jordânia (Picó *et al.*, 1996).

As variedades de tomate 'Santa Clara' e 'Rutgers' apresentaram os mesmos sintomas da infecção pelo GO-ANPL, tanto mediante a inoculação mecânica quanto com a transmissão empregando-se o vetor. O tempo requerido para o surgimento de sintomas foi também similar nos dois casos. Nos pimentões 'Ikeda' e CNPH 0679 não surgiram sintomas sistêmicos. Pequenas manchas cloróticas observadas apenas no 'Ikeda' foram restritos às folhas inoculadas. A infecção local, porém, foi detectada, por PCR, tanto em 'Ikeda' como no CNPH0679 (dados não apresentados), o que sugere uma infecção latente para esse último. Em inoculações mecânicas efetuadas com extrato foliar de tomate infectado com begomovírus em variedades de pimentão, não foi constatada infecção viral em nenhuma das plantas inoculadas (Paulo de Tarso Ferreira, comunicação pessoal). Contudo, pimentão com infecção natural por begomovírus e exibindo sintomas da virose foram observados nos anos de 1997 e 1998 no Submédio do Vale São Francisco-Pe, região de freqüentes relatos de surtos de mosca branca e de begomovírus em tomate (Lima *et al.*, 2001). No entanto, infecções posteriores àqueles anos não foram mais relatadas no pimentão país, indicando que a virose possui pouca ou nenhuma importância econômica para a cultura.

Semelhante ao constatado para o pimentão CNPH 679 com o GO-ANPL, várias plantas hospedeiras de begomovírus podem ser infectadas e não apresentar sintomas. São exemplos a berinjela com o vírus STLCV e a silvestre *Cynanchum acutum*, a qual é

importante reserva de TYLCV em Israel. Em inoculações com o TYLCV, várias plantas, entre leguminosas e solanáceas, foram infectadas e não exibiram sintomas (Brown, 1997).

As solanáceas *D. stramonium* e *N. physalodes* foram as únicas plantas silvestres, dentre as testadas, suscetíveis ao GO-ANPL. Essas espécies mostraram-se também, em condições de telado, hospedeiras da mosca branca, e uma vez infectadas podem constituir fontes de inóculo do GO-ANPL para o tomateiro em condições de campo. Relatos de *D. stramonium* em freqüentes associações com begomovírus foram registrados em várias ocasiões (Picó *et al.*, 1996). *Sida rhombifolia* é um outro exemplo de planta silvestre que pode se constituir reserva natural de begomovírus no campo. O SiGMV (isolado da Costa Rica) é um begomovírus que infecta essa planta e que pode ser transmitido para as culturas do tomate e feijão suscetíveis ao vírus (Höfer *et al.*, 1997b). No Brasil, espécies de plantas daninhas do gênero *Sida* são importantes reservatórios de begomovírus para feijão, algodão, quiabo, soja e outras (Costa, 1976). Segundo Costa (1976), o BGMV se dissemina para o feijão por meio do vetor, *B. tabaci*, a partir de plantas daninhas do gênero *Phaseolus* e de outras leguminosas (Costa, 1976). No entanto, begomovírus infectando *S. rhombifolia* e *E. heterophylla*, plantas daninhas presentes próximas às lavouras de tomate em Anápolis exibindo mosaico amarelo, não foram transmitidos mecanicamente ou com a mosca branca para plantas de tomate 'Rutgers' (dados não apresentados), indicando tratar-se de vírus diferente do GO-ANPL.

Além de *Sida* e *Euphorbia*, são comumente encontradas nos campos em diversas regiões do país várias espécies silvestres dos gêneros *Amaranthus*, *Phaseolus*, *Physalis*, *Ipomoea*, *Solanum*, *Borreria*, as quais têm sido relatadas como hospedeiras da mosca branca, *B. argentifolii* (Moreira *et al.*, 1999c; Oliveira & Faria, 2000).

São poucas as informações sobre o círculo de hospedeiros de begomovírus de tomate identificados no Brasil, o que dificulta as comparações do GO-ANPL com os demais já descritos no país, sendo exemplos apenas o isolado DF-BR2 testado neste trabalho e três outros begomovírus de tomate do Submédio do São Francisco-Pe caracterizados por Rocha (1999).

Nas comparações com o DF-BR2, constatou-se que a maioria das espécies que compõem a restrita lista do GO-ANPL foi também infectada pelo isolado do DF. Diferenças foram observadas para as espécies *N. tabacum* 'TNN' e *N. glutinosa*, as quais não foram suscetíveis ao DF-BR2 (Tabela 3) e para *P. floridana*, hospedeira do isolado do DF, não

infectada pelo GO-ANPL. Acrescenta-se ainda que, em geral, o DF-BR2 induziu sintomas mais severos que o isolado de Anápolis nas demais plantas suscetíveis a ambos os vírus, particularmente em *N. benthamiana* a qual apresentou mosaico com bolhosidade, epinastia e redução do crescimento da planta (Figura 8) contrastando com o mosaico induzido na mesma espécie vegetal pelo GO-ANPL (Figura 3). Embora esses vírus tenham apresentado elevada homologia genética, conforme discutido no capítulo I, apresentaram diferenças visíveis na sintomatologia induzida nas plantas hospedeiras. Resultado semelhante foi observado com estirpes do TGMV. Quando inoculado mecanicamente com o TGMV-Cs (estirpe comum), *N. benthamiana* apresentou clorose, intensa atrofia do caule e acentuado enrolamento foliar, enquanto que com TGMV-yv (estirpe amarela) os sintomas na planta foram bem menos evidenciados (von Arnim & Stanley, 1992). Variações nos sintomas apresentados em uma planta hospedeira por estirpes diferentes de um mesmo vírus foram também relatadas por Timmermans *et al.* (1994).

Com relação aos três isolados de begomovírus de Pernambuco provenientes de Pesqueira (PQ), São José do Belmonte (BL) e Petrolina (PE), estudados por Rocha (1999), o círculo de hospedeiros de GO-ANPL apresentou também algumas diferenças. Dois dos isolados (PQ e PE) infectaram apenas o tomateiro e somente quando a transmissão ocorreu via mosca branca. O isolado BL infectou tomate, *N. physalodes*, *N. benthamiana* e *N. rustica* (as três últimas só por inoculação mecânica), mas não foi patogênico ao pimentão, *D. stramonium* e *N. tabacum* 'TNN', espécies infectadas pelo GO-ANPL. Espécies de outras famílias botânicas não foram suscetíveis aos isolados pernambucanos.

N. benthamiana é hospedeira experimental comum à maioria dos begomovírus. É infectada pelos vírus quando inoculada com o vetor ou mecanicamente com virions, com DNA viral ou com clones infecciosos (Brown, 1997; von Arnim & Stanley, 1992; Hou *et al.*, 1998; Hou & Gilbertson, 1996; Padidam *et al.*, 1996). É provável que essa espécie de fumo possua características genéticas únicas que, em conjunção com genes virais compatíveis, permitem a replicação e o movimento de diversos begomovírus em seus tecidos, razão pela qual tem sido selecionada para estudos de funções gênicas, determinantes do hospedeiro e de patogenicidade desses vírus (Brown, 1997).

Ainda que não tenham sido infectadas com o vírus, algumas espécies dentre as testadas, *S. americanum*, *C. brasiliense*, *C. occidentalis*, quando mantidas no insetário por

um período mais prolongado, pareceram ser boas hospedeiras da mosca branca, a julgar pelo considerável número de ninfas do 4º ínstar vivas presentes nas sua folhas.

A maior eficiência da mosca branca na transmissão do GO-ANPL, quando comparada com a inoculação mecânica do vírus, pode estar associada ao fato de o vírus ser introduzido diretamente na célula do floema, onde se alimenta, possibilitando o maior sucesso para o início da replicação e movimento viral (Picó *et al.*, 1996; Brown, 1997). A transmissão do *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) para cultivares de feijão foi mais eficiente nas inoculações com a mosca branca que com a inoculação mecânica (Morales *et al.*, 1990). A transmissão pelo vetor parece ser um processo altamente específico que envolve a localização dos virions no sítio apropriado do tecido do hospedeiro, o que também possibilita a aquisição do mesmo pelo inseto (Brown, 1997).

Inoculação mecânica e com grupos de mosca branca são igualmente empregados na definição das hospedeiras, sendo que o emprego somente do vetor, tem sido bem mais freqüente na investigação do círculo de hospedeiros de begomovírus (Brown & Nelson, 1987; Brown *et al.*, 1999; Valand & Muniyappa, 1992).

Sabe-se que as condições ambientais e a idade da planta interferem nos resultados das inoculações artificiais. Um gradiente de suscetibilidade existe e decresce com a idade da planta, cujos tecidos vão se tornando impróprios para a replicação e dispersão viral (Picó *et al.*, 1996). A possibilidade de escapes empregando-se o método da inoculação mecânica existe e, por esta razão, nos ensaios com o GO-ANPL, foram repetidas a fricção do extrato infectado nas folhas das mudas, decorridas 24h da primeira inoculação. No caso da transmissão via vetor, embora a mosca branca tenha preferência por folhas mais novas, a transmissão do vírus pode não ser completamente eficiente, portanto, para evitar escapes no caso de definição de plantas hospedeiras, sugere-se a adoção de período de acesso de aquisição e de inoculação pelo inseto de pelo menos 24 horas (Mansour & Al-Musa, 1992; Idris & Brown, 1998) e repetição dos experimentos com inoculações em novo grupo de plantas. Nas inoculações do GO-ANPL procedidas com o emprego do vetor, os períodos de alimentação do inseto foram superiores àquele, com 72h (aquisição) e 48h (inoculação). Períodos de alimentação mais prolongadas aumentam a eficiência do inseto na transmissão dos begomovírus (Muniyappa *et al.*, 2000). O número de insetos usado nos testes de plantas hospedeira, 15-25 insetos, é considerado adequado uma vez que 10 a 40 insetos/planta têm

sido usados em testes para definição de plantas hospedeiras com resultados satisfatórios (Mansour e Al-Musa, 1992; Idris e Brown, 1998; Rom *et al.*, 1993).

A hibridização de membranas, pelo método "dot blot", permitiu uma segura confirmação dos resultados das inoculações do GO-ANPL nas plantas testadas. Esse método tem sido adotado para detecção de vírus em mosca branca e em tecido de tomate (folhas, raízes, caule, cotilédones e brotações) infectado por diferentes begomovírus (Picó *et al.*, 1996) e estudo do acúmulo de DNA viral em relação à expressão de sintomas (Rom *et al.*, 1993). O "dot blot", além de utilizado em ensaios de detecção de plantas tolerantes e suscetíveis a begomovírus (Rom *et al.*, 1993) e em confirmação de transmissão viral em inoculações artificiais (Gilbertson *et al.*, 1991b), é considerado adequado para monitorar epidemias de begomovírus, contudo não diferencia os seus isolados (Czosnek *et al.*, 1988; Picó *et al.*, 1996).

Os diferentes componentes da interação planta hospedeira–begomovírus–mosca branca, têm colaborado para as estratégias de controle desse vírus. Tolerância ou resistência genética parcial tem sido encontrada dentro de espécies hospedeiras para os vírus BGMV, TYLCV e ToMoV (Brown, 1997), no entanto, esses dados são ainda escassos para os begomovírus de tomate ocorrentes no Brasil.

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DO BEGOMOVÍRUS ISOLADO DE TOMATEIRO
COM A MOSCA BRANCA, *Bemisia argentifolii***

1 – INTRODUÇÃO

Considerando as recentes epidemias de begomovírus e as ameaças que representam para a produção de tomate nas áreas tropicais e subtropicais, têm sido desenvolvidos procedimentos para uma detecção rápida e específica dos vírus, tanto para plantas como para o inseto vetor. Os métodos sorológicos, tradicionalmente, têm sido usados na detecção e diagnose de vários vírus, porém, apesar de relatado, seu uso para *Begomovirus* é limitado (Metha *et al.*, 1994a).

Em estudos conduzidos com o ToMoV e TYLCV, Metha *et al.* (1994a) desenvolveram dois procedimentos para PCR que permitiram a detecção dos vírus em amostras compostas na proporção de um adulto virulífero para 24 avirulíferos. O método sorológico, TAS-ELISA, foi empregado para detecção de ToLCV em insetos coletados no campo, enquanto que a PCR, seguida de hibridização, foi usada no estudo do tempo requerido para a aquisição do vírus pelo vetor (Muniyappa *et al.*, 2000). Variações da PCR, squash-PCR, foram aplicadas em estudos similares com o TYLCV. No preparo das reações para uso com essa técnica, a extração do DNA total foi substituído pela adoção de fragmentos de membranas de nylon de 1 x 2 mm com o esfregado de seções do inseto (cabeça, tórax, e abdome). O squash-PCR permitiu a detecção do TYLCV em diferentes partes da mosca branca com período de acesso de aquisição, PAA, de 5 minutos (na cabeça), 10 minutos (no tórax) e 25 minutos (no abdome). Nesse procedimento, a extração de DNA é dispensada e é possível utilizar-se do mesmo "squash" em novos testes. Contudo, a técnica exige que a enzima *Taq* polimerase seja adicionada aos tubos contendo os componentes da reação, somente após 10 minutos de desnaturação do DNA, etapa que requer uma interrupção da PCR antes dos ciclos de temperaturas alternadas (Atzmon *et al.*, 1998). O ELISA, com anti-soro para a capa proteica, juntamente com "squash" e "dot blot", foram empregados em pesquisas com o SLCV. Os autores relataram vantagens da hibridização com ácido nucleico sobre o método sorológico na detecção do vírus, e do "dot blot" sobre o "squash" na frequência de detecção viral para amostras individuais da mosca branca. Diferentes métodos visando elucidar a localização de begomovírus na mosca branca têm sido empregados. Hunter *et al.* (1998), usando da marcação com imunofluorescência indireta, detectaram o CabLCV e o ToMoV em adultos da mosca branca em 16% e 3% das amostras

de inseto alimentados com cada vírus, respectivamente. Ambos os vírus foram evidenciados na câmara filtro e na região anterior do intestino médio, prováveis sítios de entrada dos vírus para a hemocoele. O ToMoV foi também detectado na membrana da glândula salivar. Segundo os autores, as diferenças entre a detecção de ToMoV e CabLCV podem estar associadas com as taxas de movimentação dos vírus no corpo do vetor.

Apesar da identificação de sítios de reconhecimento no vetor para begomovírus, a replicação do vírus em seu vetor não foi elucidada e as propostas para o tipo de relação são bastante variáveis. Segundo Metha *et al.* (1994b), o aumento no título de TYLCV na mosca branca, iniciado com 12h e terminado, com um pico, após 108 h da aquisição tem, como explicação mais provável, a multiplicação do vírus no vetor. Outros relatos sugerem que o SLCV pode replicar na mosca branca, baseados na alta frequência de transmissão do vírus após o período de latência, associada com efeitos aparentemente nocivos do vírus ao vetor. No mesmo trabalho, porém, os autores não observaram transmissão transovariana em 1.000 moscas brancas da primeira geração provenientes de fêmeas virulíferas (Cohen *et al.*, 1983). Estudos posteriores com o SLCV sugeriram o modelo circulativo para a relação com o vetor, visto que, em um não vetor o acúmulo do vírus atingiu níveis mais altos que para a *B. tabaci* (Polston *et al.*, 1990). Para Navot *et al.*, a constatação de uma concentração do TYLCV na mosca branca 1.000 vezes superior àquela encontrada na planta, também foi apresentada como mais um indício da propagação do vírus no vetor. Essa relação, contudo, foi questionada por outros autores, os quais admitiram que a referida concentração do TYLCV no vetor poderia estar mais associada a um lento processo de transferência do vírus para a glândula salivar do que propriamente à replicação viral (Caciagli *et al.*, 1995). Outras pesquisas demonstraram ainda que mosca branca virulífera perde sua infectividade e o teste é negativo para a presença de DNA viral quando o vetor é alimentado em plantas sadias (Zeidam & Czosnek, 1991; Caciagli *et al.*, 1995). Caciagli & Bosco (1997), não excluíram a hipótese de replicação do vírus no inseto, mas argumentam que se ela ocorre é por curto período de tempo, ou é mais lenta que a excreção e a degradação, considerando o decréscimo do DNA total que observaram nos indivíduos virulíferos em seus experimentos. Acrescentam ainda que seria mais prudente considerar a transmissão de TYLCV como circulativa do que como circulativa propagativa. Rubinstein & Czosnek (1997), por sua vez, sugerem que o TYLCV possui traços reminescentes de um patógeno da mosca branca, em virtude da significativa redução que provoca na expectativa de vida do inseto virulífero, da

interferência na fecundidade, da retenção do vírus por prolongado tempo no vetor e do progressivo decréscimo na sua capacidade de transmitir o vírus.

Um modelo de movimentação de begomovírus pelo corpo do vetor foi proposto por Hunter *et al.* (1998). De acordo com suas observações, o vírus ingerido pelo inseto juntamente com a seiva, alcança o esôfago e o intestino anterior e a câmara filtro. Em seguida, o vírus é adsorvido em sítios específicos na membrana da câmara filtro ou na região anterior do intestino médio e passa para a hemocoele (aquisição). Uma vez na hemolinfa, alcança a glândula salivar, atravessa sua membrana e é liberado dentro de dutos salivares, sendo injetado no floema da planta com a saliva, durante a nova alimentação do inseto (inoculação). É provável que membranas da câmara filtro, do intestino médio e das glândulas salivares possuam sítios receptores os quais agem como barreiras seletivas, para a aquisição e transmissão de begomovírus (Morin *et al.*, 1999; Hunter *et al.*, 1998). A especificidade na transmissão parece ser determinada pela passagem do vírus da hemocoele para dentro das glândulas salivares (Picó *et al.*, 1996).

Membros do gênero *Begomovirus* diferem nas relações de aquisição e persistência na mosca branca e podem diferir em outras interações com o vetor (Duffus, 1996). Aquisição e inoculação do vírus pela mosca branca pode ser conseguida em períodos tão curtos quanto 10 minutos, mas a eficiência aumenta com o aumento do período de alimentação do vetor até 24 horas (Markham *et al.*, 1996). Período latente em begomovírus, contado do início da aquisição do vírus ao momento em que o inseto está apto a infectar plantas, varia de 4 a 21 horas (Duffus, 1996). Para o TYLCV, o begomovírus mais estudado, o período mínimo de aquisição e de inoculação varia de 15 a 60 minutos, o período latente de 17 a 24 horas e a persistência no vetor de 8 a 20 dias, conforme o isolado viral e as diferentes regiões geográficas. Um mínimo de 10 a 20 insetos/planta são requeridos para uma eficiência de 100% na transmissão do TYLCV (Picó *et al.*, 1996). Vários begomovírus têm sido adquiridos pelos estágios ninfais da mosca branca e transmitidos para plantas saudáveis pelos adultos emergentes. Em outros casos, tanto a detecção do vírus nessas ninfas como a passagem transestadial do vírus, ocorre em taxas muito reduzidas, sendo obtidos percentuais baixos de transmissão viral (Polston *et al.*, 1990).

Estudos envolvendo transmissão do vírus à progênie têm apresentado resultados variáveis. Passagem transovariana de begomovírus não foi observada na progênie de mosca branca com SLCV (Cohen *et al.*, 1983) ou EuMV (Harrison, 1985). Polston *et al.* (1990) e

Lastra (1993) admitiram que begomovírus não são transmitidos à progênie. No entanto, evidência da transmissão transovariana do TYLCV, para pelo menos duas gerações de *B. argentifolii*, foi relatada por Ghanim *et al.* (1998). A dissecação e análise do sistema reprodutivo de moscas brancas virulíferas mostraram que ambos os ovários e ovos em amadurecimento continham o DNA do TYLCV. Segundo os autores, endossimbiontes presentes no inseto parecem estar envolvidos na transmissão transovariana, uma vez que passam de uma para outra geração somente por meio de ovos. O vírus, possivelmente, penetraria no ovo pela abertura da membrana no momento da incorporação dos endossimbiontes (Ghanim *et al.*, 1998). Outro aspecto importante observado na relação com o TYLCV é que o DNA viral permaneceu associado com as moscas brancas por toda a vida, porém a capa proteica não foi detectada após 12 dias da aquisição do vírus (Rubinstein & Czosnek, 1997).

Os fatores que contribuem para a aquisição e transmissão de begomovírus são em geral, complexos e envolvem um número de interações entre vírus, planta e vetor (Duffus, 1996).

No Brasil, os parâmetros básicos relativos à aquisição e transmissão de begomovírus de tomate pela *B. argentifolii* necessitam ser investigados. Os fatores envolvidos na transmissão de vírus de uma planta para outra pelo inseto vetor é aspecto de elevada importância para o entendimento da epidemiologia viral, assim como o estudo do relacionamento vírus-vetor para o estabelecimento de estratégias que limitem a dispersão do vírus no campo.

2 – OBJETIVOS

Estudar o relacionamento do begomovírus isolado de tomateiro em Anápolis-Go, GO-ANPL, caracterizado anteriormente no capítulo I, com o inseto vetor *B. argentifolii*, visando determinar o período de acesso de aquisição do vírus, PAA; o período de acesso de inoculação, PAI e o período de latência no vetor, PL.

Detectar o vírus nas diversas fases de desenvolvimento de *B. argentifolii* e de sua passagem transovariana, aspectos importantes da interação do vírus com o vetor, como também avaliar a importância da transmissão do vírus por insetos virulíferos após a passagem transestadial.

Estabelecer metodologia para estudo das interações de begomovírus-mosca branca nas condições brasileiras.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem do isolado de begomovírus

A fonte do begomovírus utilizada para os estudos de aquisição e transmissão pelo vetor foi constituída de plantas de tomate 'Santa Clara' infectadas com o GO-ANPL por inoculação com a mosca branca e mantidas em insetário isolado protegido por telas de náilon à prova de insetos.

O estudo da transmissão do isolado GO-ANPL pela *B. argentifolii* foi conduzido em condições de laboratório e em telados nas dependências da Embrapa Hortaliças com temperaturas variando entre 14-e 20°C no primeiro semestre e 20 a 28°C no segundo semestre do ano de 2000.

3.2. Manutenção das moscas brancas avirulíferas

As moscas brancas empregadas na condução de todos os experimentos foram provenientes da colônia avirulífera de *B. argentifolii*, cuja população inicial foi cedida pela Dra. Geni Villas-Bôas, entomologista da Embrapa Hortaliças.

As populações avirulíferas foram mantidas em plantas envasadas de repolho e couve, *Brassica* spp., em compartimentos isolados de insetários confeccionados com malha de náilon à prova de insetos. Periodicamente, vasos com as brássicas, nas quais a mosca branca multiplica-se bem, foram transferidos para esses compartimentos visando-se, com isso, manter elevada a população do vetor e dispor de um maior número de insetos avirulíferos em curtos intervalos de tempo (Figura 9).

Para a realização dos testes com o vetor, os adultos, com idade de até 3 dias após a emergência, foram coletados com o auxílio de um aspirador adaptado para insetos (Figura 10) e conduzidos para folhas de tomate infectado.

Para a determinação do período de acesso de aquisição do vírus, PAA, do período de acesso de inoculação do vírus, PAI ou do período de latência no vetor, PL, foram adotados procedimentos semelhantes para a aquisição e inoculação do vírus pelo vetor, variando-se basicamente o tempo concedido do PAA e PAI para cada tratamento e conforme o objetivo.

A



B



Figura 9 - Insetário onde foram mantidas as moscas brancas avirulíferas em repolho e couve (A); folhas de couve com numerosas moscas brancas (B).

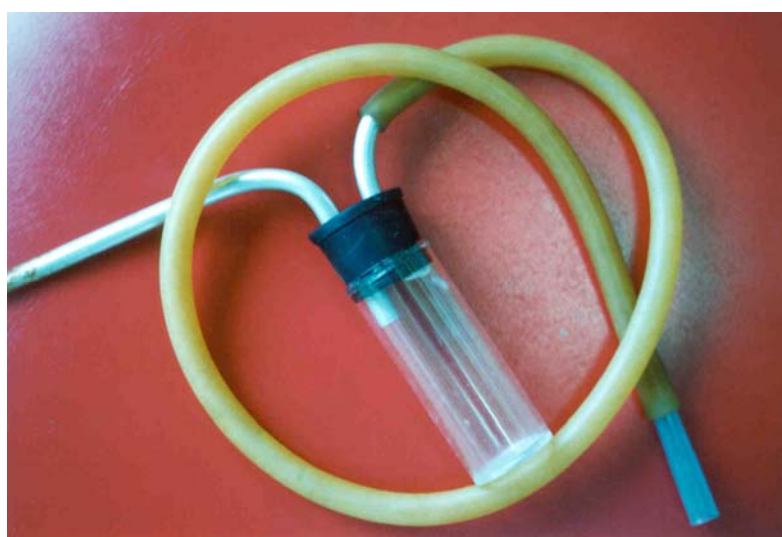


Figura 10 – Aspirador utilizado na coleta de moscas brancas.

A seguir, são descritos os procedimentos comuns para a aquisição do vírus pelas moscas brancas e o método adotado para transferência das mesmas da fonte de vírus para as plantas de tomate sadio (inoculação). Posteriormente, são descritos os tratamentos estabelecidos para cada uma das três situações investigadas: PAA (item 3.6), PAI (item 3.7) e PL (item 3.8).

3.3. Procedimento adotado para os ensaios de aquisição do vírus pela mosca branca

Em geral, como fonte para aquisição do vírus, foram utilizadas folhas novas de tomate 'Santa Clara' (1ª a 3ª, do ápice para a base) apresentando sintomas de mosaico e distorção. Para os ensaios visando a determinação do PAA e o PL, as folhas foram destacadas de plantas de tomate com 3 a 4 semanas da inoculação e dispostas em vários tubos falcon previamente identificados com relação a cada PAA (Figura 11). Grupos de pelo menos 100 moscas brancas avirulíferas foram transferidos para cada tubo contendo as folhas o qual era, em seguida, fechado com a própria tampa plástica. Antes da passagem para os

tubos falcon, as moscas brancas foram transferidas, ainda no insetário, das plantas de repolho para plantas de tomate com finalidade de prévia adaptação do inseto à solanácea. Portanto, nos ensaios de aquisição do vírus as moscas brancas foram transferidas de tomate sadio para tomate infectado.

Nos ensaios conduzidos para determinação do PAI, considerando a necessidade de um número bem maior de insetos e de um PAA bem mais prolongado, as folhas destacadas não foram dispostas em tubos falcon, mas em vidros pequenos e de boca estreita contendo água para manter as folhas túrgidas durante um período mais extenso. Os vidros com as folhas foram postos no interior de recipientes plásticos aos quais foram também adicionados tubos contendo numerosas moscas brancas. Os recipientes foram, finalmente, cobertos com o tecido voal (Figura 12) para evitar a fuga dos insetos ali dispostos, os quais se alimentaram nas folhas de tomate infectado até o momento em que foram usados para a inoculação. Para esses experimentos, as moscas brancas aviculíferas foram transferidas diretamente de repolho ou de couve do insetário para as folhas de tomate infectadas.

3.4. Procedimento adotado para as transmissões do vírus pelas moscas brancas

Em todos os ensaios, as inoculações com a mosca branca foram efetuadas em mudas individuais de tomate 'Santa Clara' no estágio de duas folhas verdadeiras (mudas de 15 dias) distribuídas em copinhos descartáveis de café perfurados e contendo solo e esterco (2:1) autoclavado. Os copinhos com as mudas foram numerados e dispostos em bandejas plásticas em grupos de 10 a 12 e de acordo com o tratamento. Em algumas ocasiões os cotilédones foram cobertos com filme plástico para que o inseto tivesse acesso somente às folhas verdadeiras (Figura 13). As mudas de tomate foram semanalmente produzidas e transplantadas para uso nos vários experimentos conduzidos.

Ao final de cada PAA, nos ensaios para determinação do período de acesso de aquisição ou do período de latência (itens 3.6. e 3.8 a seguir), os tubos falcons foram conduzidos e cuidadosamente abertos no interior de uma caixa de papelão revestida com papel duplex preto (Figura 14), a qual facilitava a captura das moscas brancas que deixavam os tubos em direção ao teto da referida caixa. O mesmo procedimento foi



Figura 11 – Tubos falcon contendo folhas de tomate infectadas e moscas brancas, utilizados nos ensaios para determinação do período acesso de aquisição do vírus, PAA e do período de latência, PL.



Figura 12- Folhas de tomate infectadas e recipiente onde foram mantidas juntamente com moscas brancas para a aquisição do vírus para posterior uso na determinação do período acesso de inoculação do vírus, PAI.



Figura 13- Mudas de tomate usadas para inoculação com o vetor, mostrando folhas cotiledonares com ou sem o filme plástico.

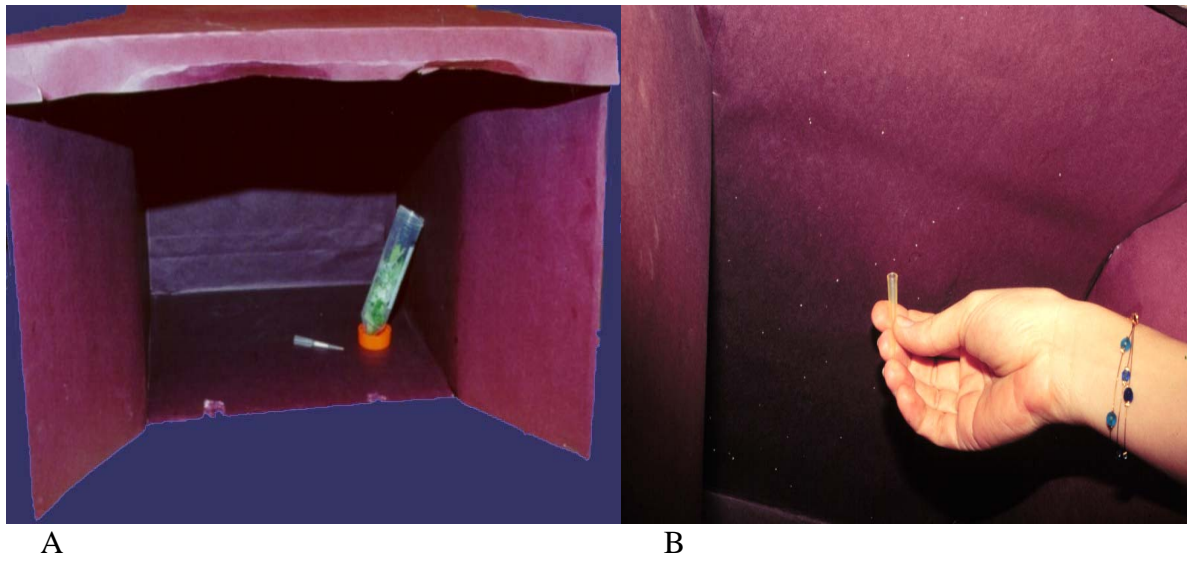


Figura 14- Caixa de papelão revestida com duplex preto (A) utilizada para a coleta de grupos de moscas para inoculação (B).

adotado para os recipientes contendo os vidros com folhas e moscas brancas a serem usadas na definição do período de acesso de inoculação do vírus (item 3.7). Nesse caso, o voal que cobria os recipientes foi lentamente retirado para permitir a liberação das moscas com mínima fuga das mesmas.

Em ensaios preliminares de inoculação do vírus foram testadas, por planta, uma, três, cinco e dez moscas brancas. Considerando que houve falha na inoculação usando-se uma e três moscas brancas e que a eficiência de transmissão foi similar com cinco e dez insetos por planta, optou-se pelo uso de cinco moscas brancas/planta, número que facilitaria a condução dos experimentos.

Em todos os casos, grupos de cinco moscas brancas, foram facilmente coletados do teto da caixa de papelão preta com auxílio de ponteiros plásticos descartáveis, utilizadas no pipetador automático P-20, nas quais foram previamente introduzidos pequenos pedaços de papel fino para evitar a fuga do inseto pela sua ponta. A outra extremidade da ponteira, após coleta dos insetos, foi fechada com o auxílio do dedo indicador e, dessa forma, a ponteira foi conduzida e parcialmente enterrada nos copinhos contendo a muda de tomate. Para que os insetos ficassem confinados às plantas, gaiolas individuais confeccionadas com copos descartáveis de 300 ml, cujo fundo foi substituído por voal, foram imediatamente colocadas sobre as mudas inoculadas (Figura 15).

Ao final das inoculações, as moscas brancas de cada muda, geralmente presentes na superfície abaxial das folhas verdadeiras, foram contadas e em seguida coletadas com auxílio do aspirador, o que evitava que se dispersassem no ambiente. As mudas foram então pulverizadas com inseticidas sistêmicos e transferidas em bandejas plásticas (Figura 16A) para telados (Figura 16B) onde permaneceram para as observações do surgimento de sintomas.

3.5. Detecção do GO-ANPL nas amostras foliares infectadas

Para a detecção do begomovírus nas plantas submetidas aos diferentes ensaios, PAA, PAI e PL, foram realizados testes empregando-se sondas moleculares "dot-blot". Para tanto, diversas membranas de náilon (Hybond N + da Amersham/Pharmacia) em tamanhos de 10 cm x 8cm, foram preparadas aplicando-se o suco foliar, extraído na presença de 20µl de NaOH 0,4N, das novas brotações de cada uma das plantas testadas. Cada membrana



Figura 15- Muda inoculada, ponteira e gaiola confeccionada com copo plástico descartável de 300 ml.

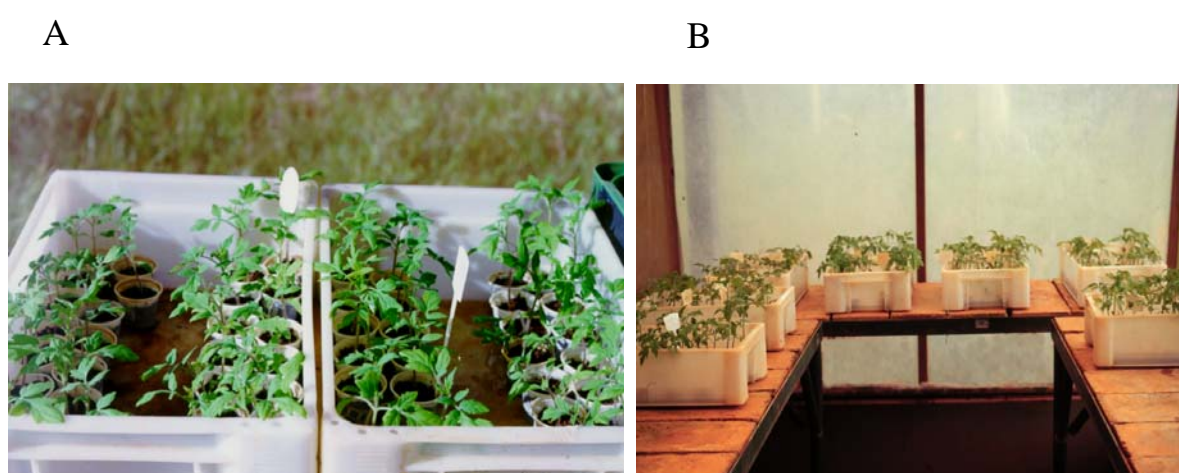


Figura 16- Bandejas plásticas com mudas de tomate 'Santa Clara' inoculadas com o GO-ANPL e separadas conforme o tratamento (A); telado onde permaneceram as plantas inoculadas (B).

continha todas as repetições de um mesmo tratamento, como também o controle negativo, plantas sadias e o tampão da amostra (NaOH) e o controle positivo, DNA do preparo da sonda ou planta de tomate sabidamente infectada. Em seguida, as membranas, assim preparadas, foram submetidas ao mesmo procedimento de lavagem, pré-hibridização e hibridização descritas no anteriormente neste capítulo I. Após a exposição em filme raio-X e a obtenção do registro autoradiográfico, foi calculado o percentual de plantas infectadas de cada variável, PAA, PAI e PL, para análise e interpretação dos resultados.

3.6. Determinação do período de acesso de aquisição do vírus pelo vetor, PAA

Para a determinação do PAA foram avaliados nove períodos de acesso de aquisição do vírus pelo vetor: 15', 30', 1h, 2h, 4h, 8h, 16h, 20h, 24h visando-se identificar o período mínimo para o inseto adquirir o vírus. Mudas inoculadas com moscas avirulíferas e mudas não inoculadas, compuseram as testemunhas. Decorrido cada PAA do inseto em folhas destacadas (postas em tubos falcon), grupos de cinco moscas brancas foram transferidos para mudas de tomate, onde permaneceram por um período contínuo de 48h. O experimento foi constituído de cinco repetições de parcelas de 8-12 plantas submetidas a nove tratamentos, com um total aproximado de 450 plantas inoculadas. Por repetição, manipularam-se pelo menos 500 espécimens do inseto. Ao final do período de 15 dias, amostras foliares de novas brotações de cada planta foram coletadas e testadas individualmente com relação à infecção com o emprego de sondas moleculares "dot-blot", conforme citado anteriormente. Cada repetição constituiu uma membrana com os nove tratamentos e os controles, em geral, dispostos em fileiras horizontais. O percentual de plantas infectadas foi definido para cada tratamento e analisado estatisticamente.

3.7. Determinação do período de acesso de inoculação do vírus pelo vetor, PAI

Visando-se identificar o período mínimo para a transmissão do vírus pelo vetor, foi adotado um único PAA de 72h para a aquisição do vírus pelo inseto. Nove períodos de acesso de inoculação do vírus (PAI) foram estabelecidos: 15', 30', 1h, 2h, 4h, 8h, 16h, 20h e

24h. Grupos de cinco moscas brancas virulíferas, após as 72h de PAA (em folhas destacadas postas em recipientes plásticos), foram transferidos para mudas individuais de tomate onde permaneceram durante o período determinado por cada um dos tratamentos. O experimento consistiu de cinco repetições de parcelas de 8-12 plantas submetidas a nove tratamentos num total aproximado de 450 plantas testadas quanto ao período mínimo de alimentação do vetor para a inoculação do vírus. Da mesma forma que os ensaios anteriores, decorridos 15 dias dessas inoculações, amostras foliares foram coletadas de cada planta para a confirmação de infecção por "dot-blot" e análise estatística dos resultados.

3.8. Determinação do período de latência do vírus no vetor, PL

O período de latência é definido como o tempo decorrido entre o início do período de acesso de aquisição do vírus pelo vetor e o momento em que o inseto é capaz de transmiti-lo para as plantas. Para esse estudo, inicialmente foram empregados quatro períodos de acesso de aquisição do vírus pelo vetor: 4h, 8h, 16h e 20h em folhas destacadas de tomate infectado (contidas em tubos falcon). Ao final de cada período, grupos de cinco moscas brancas foram transferidos para mudas de tomate 'Santa Clara'. A cada 4h, durante 24h, foram feitas transferências consecutivas do inseto, de cada PAA, para novas plantas sadias de tomate de maneira que fosse possível detectar o PAI em que ocorria o término da latência no vetor. A freqüente manipulação do inseto, no entanto, não permitiu a uniformidade dos experimentos e modificações na sua condução foram necessárias.

Os ensaios seguintes foram realizados sem a adoção de transferências consecutivas dos insetos. Observou-se, nos testes preliminares, o surgimento de plantas infectadas com o tempo total (PAA+ PAI) mais próximo de 16h e, em virtude disso, optou-se por eliminar o PAA de 4h, mantendo-se o de 8h, 16h, 20h e 24h. Ocasionalmente um PAA de 12h foi também incluído. Assim, após cada PAA estabelecido, os insetos foram transferidos e permaneceram em mudas de tomate sadio por 4h, 8h, 12h, ou 16h continuamente. Por exemplo, grupos de cinco insetos com PAA de 8h foram transferidos para tomate e nestas plantas permaneceram por 4h (totalizando, no vetor, 12h da aquisição do vírus) sendo, em seguida, eliminados. Um novo grupo de insetos em outro grupo de plantas permanecia por 8h (totalizando, no vetor, 16h da aquisição do vírus) e assim com os demais. Posteriormente,

outras combinações diferentes de PAA + PAI: 12h + 20h, 16h + 20h e 16h+ 24h foram também acrescentadas para investigar os possíveis aumentos nos percentuais de transmissão que pudessem ser associados à determinação do PL. Ao término de cada tempo previsto para inoculação, as moscas foram coletadas e as plantas pulverizadas e levadas para telados para observação do surgimento de sintomas. A confirmação dos resultados foi obtida com o "dot-blot" e o percentual de transmissão avaliado para cada caso. Um total aproximado de 500 plantas foram testadas na determinação dessa variável.

3.9. Detecção do vírus no vetor

Foram investigadas a presença do vírus nas diversas fases de desenvolvimento da mosca branca e nos adultos com diferentes PAA, a transmissão do vírus à sua progênie e a passagem transtadial do vírus. Os insetos desenvolveram-se ora em de planta infectada, ora em repolho, espécie não hospedeira do vírus. Todas as amostras de insetos coletadas foram testadas mediante a técnica PCR.

3.9.1. Detecção do vírus em ovos e ninfas do 1º ao 4º ínstar da mosca branca

Cerca de 50 fêmeas avirulíferas com até três dias da emergência foram transferidas de repolhos, mantidos nos insetários, para plantas jovens de tomate infectadas com o GO-ANPL, mantidas em laboratório. As plantas com as moscas brancas foram cobertas com gaiolas de tubo PCV (ilustrado anteriormente na Figura 1 deste capítulo) para o confinamento dos insetos na planta por um período de 20h, para a oviposição. Ao final desse período, as moscas brancas foram removidas e as plantas mantidas em laboratório. O número de ovos presentes em todas as folhas de cada planta foi registrado e, a partir de então, o desenvolvimento do inseto foi acompanhado de ovo à ninfa de 4º ínstar.

Diversas amostras de ovos recém ovipositados e de ovos com três a quatro dias após a oviposição foram coletados, como também ninfas de 1º, 2º, 3º e do 4º ínstar foram amostradas à medida que iam alcançando essas fases. A coleta foi feita com o auxílio de um

pincel fino e microscópio estereoscópio. Os exemplares foram transferidos da folha infectada para água destilada em placas, depois em microtubos, os quais foram centrifugados (10.000g/30") e a água substituída por TE (Tris – EDTA ph 9,0 + SDS 1%), tampão de extração de DNA. Essa prática tinha por objetivo eliminar qualquer contaminação de seiva nas amostras. Os insetos imersos em 100 µl de TE foram acondicionados em freezer a -20°C para posterior extração do DNA e teste de detecção do vírus mediante PCR. Esse procedimento foi adotado em virtude do elevado número de amostras obtido de cada fase do vetor não permitir o seu imediato processamento.

3.9.2. Detecção da retenção do vírus no inseto a partir da ninfa do 1º ínstar

Ninfas de 1º ínstar, oriundas da oviposição de moscas brancas avirulíferas em tomate infectado, foram cuidadosamente retiradas, aproximadamente 24h após sua fixação na folha, e transferidas do tomate infectado para mudas de repolho dispostas em vasos de 0,5 kg, as quais foram cobertas com gaiolas de copos plásticos. Amostra de ninfas do 1º ínstar e de fases posteriores de desenvolvimento do inseto (2º ao 4º ínstar) até a fase adulta foram coletadas, separadamente, direto para microtubos identificados e contendo 100 µl de TE, os quais foram igualmente acondicionados a -20°C, para posteriores testes de detecção do vírus.

3.9.3. Detecção do vírus em adultos com diferentes PAA

Adultos de mosca branca submetidos a períodos de acesso de inoculação, como anteriormente empregados: 15', 30', 1h, 2h, 4h, 8h, 16h, 20h e 24h, foram também incluídos na detecção de vírus no vetor. Concluído cada PAA, tubos falcon contendo folhas destacadas e os insetos foram transferidos para freezer a -20°C para um rápido resfriamento o qual paralisava o inseto permitindo sua coleta para microtubos com TE para serem testados quanto à presença de vírus. Em outras ocasiões, após a aquisição do vírus, as folhas infectadas foram substituídas por sadias por um período de 24h, para a posterior coleta do vetor.

3.9.4. Detecção de transmissão do vírus à progênie da mosca branca

Fêmeas virulíferas com PAA de 48h em planta infectada com o GO-ANPL foram individualmente transferidas para mudas numeradas de repolho plantado em copinhos descartáveis de café, para realizarem postura por 48h. Terminado o período para oviposição, as fêmeas foram individualmente coletadas em microtubos com TE para detecção do vírus por PCR. Amostras de ovos e de ninfas do 1º ao 4º ínstar foram igualmente coletados dos diversos repolhos, contudo, somente as amostras provenientes de fêmeas comprovadamente virulíferas foram processadas para detecção do vírus.

Ocasionalmente, ninfas do 4º ínstar foram também coletadas de plantas não hospedeiras do vírus, poinsettia, berinjela, couve e repolho presentes em insetários onde eram mantidas as plantas de tomate 'Santa Clara' infectadas com o GO-ANPL.

3.9.5. Detecção da passagem transestadial do vírus

Este ensaio teve por objetivo constatar se o vírus adquirido pela mosca branca até o 3º ínstar permanece no inseto após a emergência do adulto (passagem transestadial). Para tanto, exemplares do 4º ínstar e " pupa" (fase em que o inseto não se alimenta) provenientes de oviposição de fêmeas avirulíferas em planta infectada, foram transferidos com pincel para folhas destacadas de repolho, planta não-hospedeira, dispostas em placas de Petri com papel de filtro umedecido. Um a três dias depois, os adultos emergentes foram coletados em tubos com TE, para posterior detecção do vírus por PCR.

3.10. Extração de DNA a partir da mosca branca e PCR das amostras

Para os testes de detecção acima descritos, cada um dos quatro ínstars do inseto foi coletado, separadamente, em grupos de até 10 exemplares, ovos em grupos de até 20, e adultos em conjunto de até 6, tanto de plantas de tomate como de repolho. Em alguns casos, como o das fêmeas usadas nos ensaios da progênie, os insetos foram coletados

individualmente. O número de espécimens existentes em cada amostra composta foi anotado para controle na etapa de ressuspensão do DNA.

O DNA total foi extraído de ovos a adultos baseando-se na metodologia empregada para *B. tabaci* por Metha *et al.*(1994a). Para tanto, as amostras acondicionadas a -20°C foram descongeladas e os insetos triturados com auxílio de pistilo plástico. Seguiram-se a imediata adição de 1 μl de proteinase K (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), incubação a 65°C por 30 minutos, adição de 3,5 μl de acetato de potássio 8 M, incubação em gelo por mais 30 minutos e centrifugação a 10.000 g por 15 minutos. O sobrenadante recolhido foi tratado com 200 μl de clorofane (clorofórmio: fenol, 1:1) e novamente centrifugado. À fase aquosa obtida acrescentaram-se 500 μl de etanol absoluto e, em seguida, os tubos foram conduzidos para -80°C por 15 minutos. Após centrifugação a 10.000g por 15 minutos, o DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e o sedimento seco ao ar. Finalmente, o DNA de todas as amostras foi ressuspensão com a adição de 20 μl de água milli-Q estéril por espécime, não por tubo, e acondicionado em freezer a -20°C .

A PCR das amostras foi realizada a partir de reações preparadas com 5,0 μl de DNA total do inseto, 2,5 μl tampão 10X da enzima *Taq* polimerase (Pharmacia), 1 μl de dNTP (Pharmacia) a 2,5 mM, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador, 1U (0,2 μl) de *Taq* polimerase (Pharmacia), ajustando o volume da reação para 25 μl com água (filtro Milli-Q) estéril. Para a amplificação, foi mais comumente utilizado o par de oligonucleotídeos CP1/CP2, empregados no capítulo I, que amplificam fragmentos de 0,9kb do DNA A, referente ao gene da capa proteica do vírus. As amostras foram submetidas a PCR no termociclador modelo PTC 100 MJ Research, adotando-se um programa com aquecimento inicial de 94°C por 3 minutos e 33 ciclos compostos de: desnaturação ($94^{\circ}\text{C}/1\text{minuto}$), anelamento ($52^{\circ}\text{C}/1\text{minuto}$) e extensão ($72^{\circ}\text{C}/1\text{minuto}$). Concluídos os 33 ciclos, seguiu-se uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Como controle positivo foram usados DNA plasmidial de BGMV e DNA extraído de inseto com PAA de 48 horas, e como controle negativo amostra de planta sadia e insetos avirulíferos (adultos, ninfas e ovos).

Para visualização dos produtos da PCR as amostras, acrescidas de 3 μl de corante (azul de bromofenol 0,25%+ xileno cianol 0,25%+ glicerol 30% em água), foram aplicadas em de gel de agarose a 1% preparado em tampão Tris-Acetato 0,04 M e EDTA 0,001 M (TAE)

e submetidos a eletroforese em cubas com esse tampão. Como marcador molecular, foram utilizados, em um único poço, 5-10 µl de 1 Kb DNA Ladder (100 ng/µl) (GIBCOBRL). Após a eletroforese os géis foram corados com brometo de etídeo 1% em TAE, visualizado em luz UV e, em seguida, fotografado.

3.11. Transmissibilidade do vírus pelos adultos

◆ Oriundos da progênie de fêmeas virulíferas

Adultos da progênie de fêmeas virulíferas que ovipositaram nos repolhos (item 3.10.4) foram coletados a partir das ninfas de 4º ínstar transferidas de repolho para placas de Petri, onde ocorria a emergência desses adultos. Na inoculação, grupos de 10-15 moscas brancas foram transferidos para mudas sadias de tomate onde permaneceram por 48h. Após esse período, os insetos foram coletados em microtubos com TE para detecção de vírus via PCR. As plantas inoculadas foram pulverizadas e conduzidas para o telado para observação do surgimento de sintomas. Todas as plantas foram testadas por meio de hibridização com sondas moleculares "dot blot" para constatação ou não da infecção viral.

◆ Emergentes de estádios ninfais em plantas infectadas

Procedimento similar foi adotado para esse ensaio. Ninfas de 4º ínstar foram coletados de plantas de tomate infectadas e dispostas sobre folhas de repolho em placas de Petri. Os adultos emergentes foram transferidos da placa para plantas de tomate sadio por 48h e igualmente recolhidos para os testes de detecção no vetor. As plantas foram pulverizadas e levadas para telado onde permaneceram por 15 dias para observação do surgimento de sintomas. Todas as plantas inoculadas foram testadas com hibridização com sondas moleculares "dot blot" .

4. RESULTADOS

4.1. Período de acesso de aquisição do vírus, PAA

Os resultados dos ensaios conduzidos com tomate 'Santa Clara' para identificação do período de acesso de aquisição do begomovírus GO-ANPL por *B. argentifolii* foram registrados para todos os tratamentos nas cinco repetições. As plantas de tomate infectadas com o GO-ANPL transmitido pelas moscas brancas do ensaio para determinação do PAA e do PAI apresentaram sintomas iniciais da infecção aos oito dias da inoculação, quando se observou mosqueado com clareamento de nervuras nas folhas novas. Ao décimo quinto dia, os sintomas de mosaico e deformação foliar das mudas infectadas já estavam definidos, independente do tempo de inoculação concedido (Figura 17). As plantas desenvolveram-se bem nos copinhos de café, e somente apresentaram sintomas de deficiência mineral com três semanas da inoculação, quando estavam com quase 45 dias do plantio.

Os resultados dos experimentos realizados para a determinação do PAA, confirmados com o "dot blot" (Figura 18) estão resumidos na Tabela 4. A análise estatística dos dados, usando o modelo de regressão não linear está ilustrado na Figura 19.



Figura 17- Sintomas de mosaico e deformação foliar observados em mudas de tomate, 15 dias após inoculação do GO-ANPL com a mosca branca.

Tabela 4- Percentual de plantas de tomate 'Santa Clara' infectadas com o GO-ANPL após diferentes períodos de acesso de aquisição do vírus (PAA) pela mosca branca, *B. argentifolii*, com período de acesso de inoculação (PAI) fixo de 48h.

PAA (Horas)	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Rep.4	Rep.5	Pl. infectada/ *Pl. inoculada	Percentual de Infecção
0,25	18	0	10	0	0	3/50	6
0,5	10	10	20	14	9	6/50	12
1h	20	20	16	20	10	9/52	17
2h	22	18	20	22	21	10/51	20
4h	40	30	30	30	30	17/51	33
8h	40	20	40	40	50	19/50	38
16h	35	70	50	60	50	26/49	53
20h	70	50	40	60	60	28/50	55
24h	75	90	60	40	60	32/49	65

* cinco moscas brancas / muda de tomate

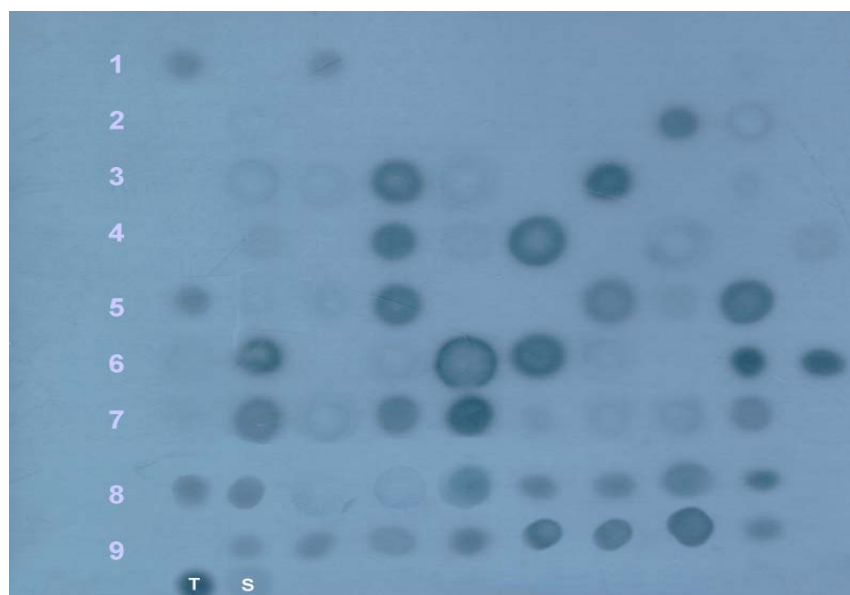


Figura18 -Resultado da análise da detecção por "dot-blot" do isolado de begomovírus GO-ANPL em amostras foliares de tomate 'Santa Clara' inoculadas pela mosca branca após diferentes períodos de acesso de aquisição do vírus, PAA, e um período de acesso de inoculação, PAI, fixo de 48h. Linhas de 1 a 8 -amostras de plantas com PAA de 15' a 24h; T = Tomate infectado; S= planta sadia.

De acordo com os resultados apresentados na tabela acima, constatou-se que *B. argentifolii* foi capaz de adquirir o begomovírus de tomate infectado já a partir de um PAA de 15 minutos, quando foi obtido, após 48h de inoculação em mudas saudáveis, um percentual de 6% de transmissão do vírus. Considerando a média calculada para todas as repetições, observou-se que o número de plantas infectadas aumentou à medida que foi também estendido o PAA dos insetos na planta infectada. Com o PAA máximo de 24h, a transmissão do vírus ocorreu para 65% das mudas de tomate. Os percentuais de 18%, 16%, 14% e 9% observados na Tabela 4 correspondem a 2 plantas infectadas/11 inoculadas, 2/12, 1/7, 1/11, respectivamente.

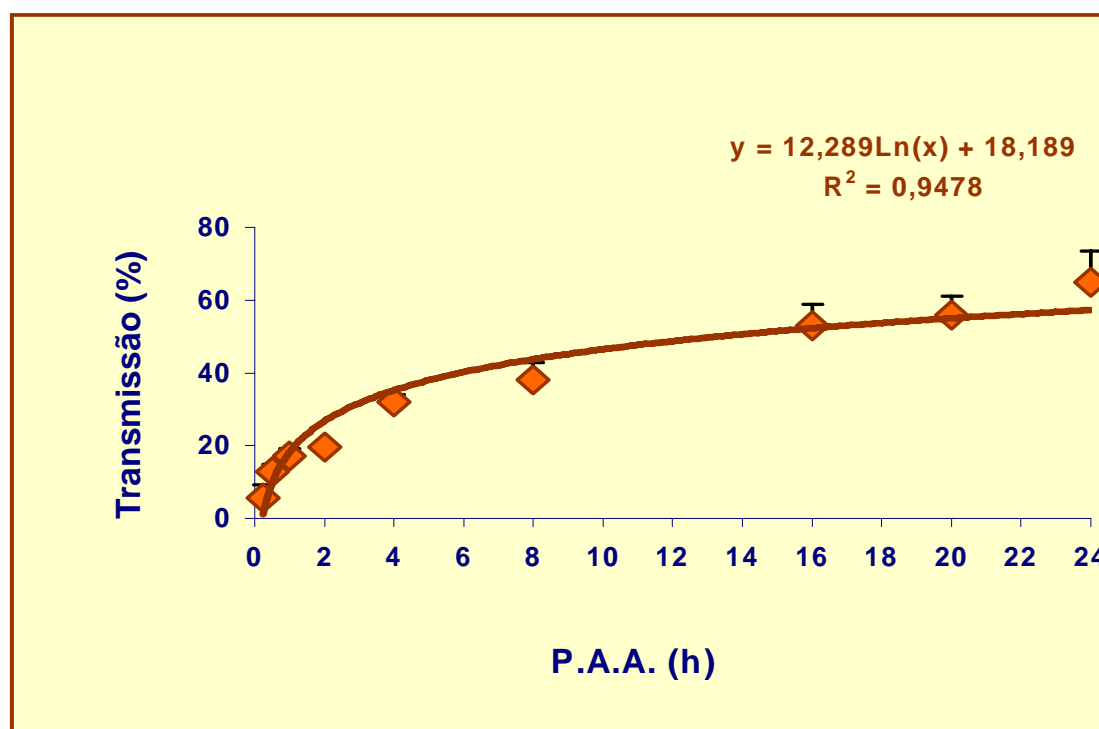


Figura 19- Transmissão do begomovírus GO-ANPL por *Bemisia argentifolii* para tomate 'Santa Clara' após diferentes períodos de acesso de aquisição (PAA) do vírus pelo vetor e empregando-se um período acesso de inoculação (PAI) fixo de 48h.

A curva ilustrada na Figura 19 é resultante da média das cinco repetições e representa o percentual de transmissão do vírus com os períodos crescentes de acesso de aquisição do vírus empregados nesse estudo. Para análise estatística foi utilizada a regressão não linear e o modelo logarítmico foi o que melhor se adequou à avaliação dos dados. O elevado coeficiente de determinação (r^2) obtido para a curva (0,9478), o qual mede a excelência do ajustamento da equação encontrada, sugere que percentuais de infecção são explicados pela variação do PAA. Existe, portanto, uma associação positiva entre as duas variáveis (percentual de infecção e PAA) expresso pela equação $Y = 12,289 \ln(x) + 18,189$.

4.2. Período de acesso de inoculação do vírus, PAI

Na avaliação dos dados obtidos nos experimentos para definição do PAI, foram feitas as mesmas considerações relativas ao número de insetos por planta e ao intervalo de tempo para o surgimento de sintomas. A Tabela 5 resume os resultados das observações realizadas para determinação do PAI, a Figura 20 a confirmação dos mesmos como o "dot blot" e a Figura 21 ilustra o resultado da análise estatística realizada com as médias dos nove tratamentos.

No caso da determinação do PAI do vírus pela mosca branca constatou-se pelos resultados, que o inseto virulífero, nas condições desses experimentos, não foi capaz de transmitir o vírus com 15 minutos de acesso de inoculação. Apesar do período ser curto, em 57% das plantas inoculadas com esse PAI, o número de insetos contados, após a retirada da gaiola, esteve entre três e quatro por planta. Por outro lado, a transmissão do vírus aos 30 minutos de PAI atingiu 19% das plantas inoculadas. Como observado para o ensaio anterior, o percentual de plantas infectadas aumentou com a extensão do período concedido para a alimentação do vetor em plantas saudáveis, de modo que com 24h de PAI, 67% das plantas foram infectadas pelo begomovírus. No entanto, apesar de infreqüentes, percentuais de 70% ou superiores foram observados a partir de 8h de PAI.

Tabela 5- Percentual de plantas de tomate 'Santa Clara' infectadas com o GO-ANPL após diferentes períodos de acesso de inoculação do vírus, PAI, pela mosca branca, *B. argentifolii*, com período de acesso de inoculação, PAA, fixo de 72h.

PAI (Horas)	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Rep.4	Rep.5	Pl. Infectada/ *Pl Inoculada	Percentual de Infecção
0,25	0	0	0	0	0	0/50	0
0,5	30	20	10	13	20	10/53	19
1h	30	22	30	22	30	13/48	27
2h	60	20	30	44	30	18/49	37
4h	60	30	40	30	44	20/49	41
8h	70	64	40	40	60	28/51	55
16h	80	70	70	33	40	29/49	59
20h	100	50	40	38	70	29/48	60
24h	90	67	60	50	70	34/51	67

* cinco moscas brancas / muda de tomate

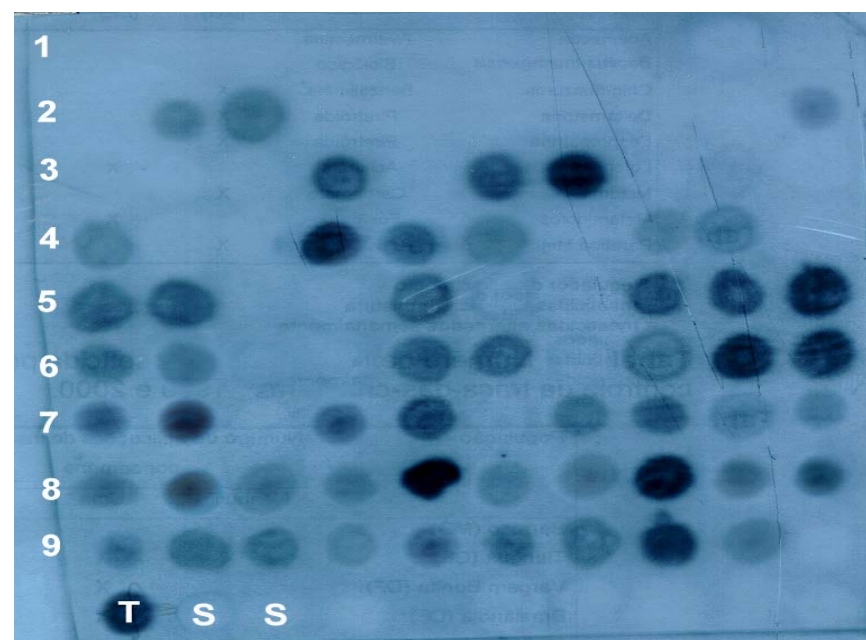


Figura 20 – Resultado do “dot blot” do begomovírus GO-ANPL em amostras foliares de tomate 'Santa Clara' inoculadas pela mosca branca após período de acesso de aquisição do vírus, PAA, fixo de 72h e diferentes períodos de acesso de inoculação, PAI. Linhas de 1 a 9 - amostras de plantas com PAI de 15' a 24h; T = Tomate infectado; S= planta sadia.

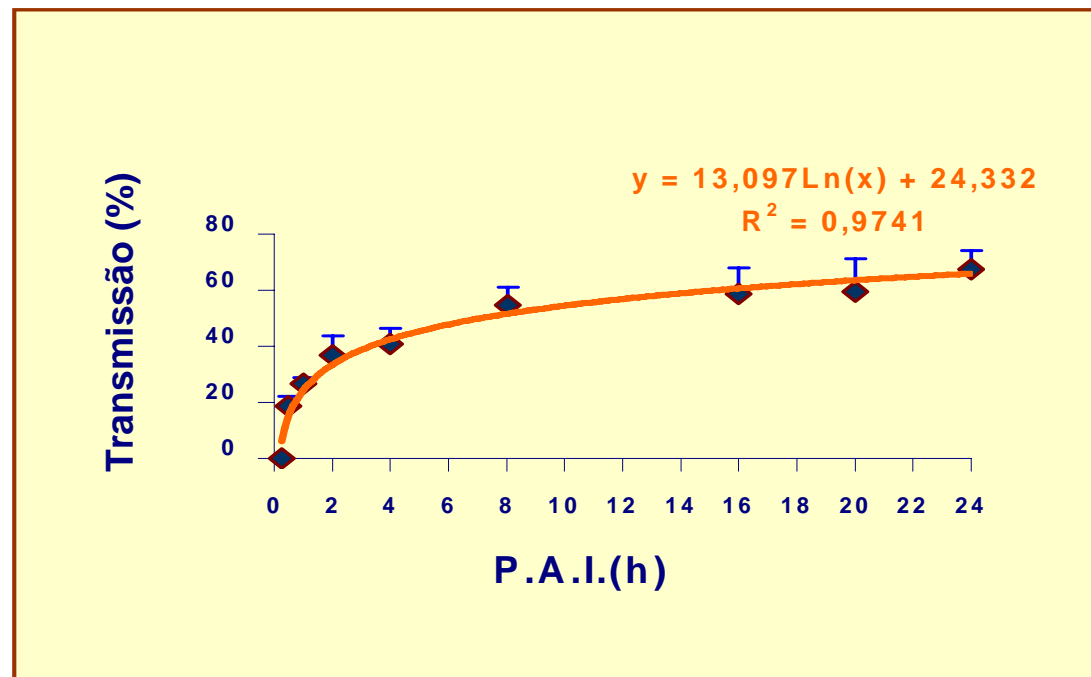


Figura 21- Transmissão do begomovírus GO-ANPL por *Bemisia argentifolii* para tomate 'Santa Clara' após diferentes períodos de acesso de inoculação, PAI, pelo vetor que adquiriu o vírus por um período fixo de 72h em tomate infectado.

A curva ilustrada na Figura 21 é resultante da média das cinco repetições e representa o percentual de transmissão do vírus com o aumento do PAI. Da mesma forma que o gráfico anterior, a análise estatística foi realizada adotando-se a regressão logarítmica. Nessa avaliação, o coeficiente de determinação (r^2) obtido (0,9741) foi um pouco superior àquele resultante da análise do PAA. Assim, observa-se uma associação positiva entre as variáveis: percentual de infecção e PAI, cuja relação é expressa pela equação $Y = 13,097 \text{ Ln}(x) + 24,332$.

4.3. Período de Latência

Os resultados observados nos experimentos para determinação do período de latência, nas diferentes combinações testadas para mosca branca e o isolado GO-ANPL estão representados na Tabela 6.

Tabela 6– Transmissão do isolado GO-ANPL em diferentes combinações de período de acesso de aquisição do vírus (PAA) e período acesso de inoculação do vírus (PAI) na determinação do período de latência em *B. argentifolii*.

PAA	PAI	Horas após a Aquisição do Vírus pelo Vetor	Plantas Infectadas/Plantas Inoculadas*	Transmissão %
8h	4h	12h	0/36	0
8h	8h	16h	1/29	3
8h	12h	20h	1/20	5
8h	16h	24h	1/21	5
12	20h	32h	4/32	13
16h	4h	20h	1/30	3
16h	8h	24 h	2/30	7
16h	16h	32h	4/30	13
16h	24h	40h	14/55	25
16h	48h	64h	12/20	60
20h	4h	24h	1/10	10
20h	8h	28h	1/9	11
20h	12h	32h	9/79	11
24h	4h	28h	4/33	12
24h	8h	32h	5/32	16
24h	16h	40h	8/33	24

Cinco moscas brancas /muda de tomate 'santa Clara'.

Combinações em destaque: vermelho (24h), verde (28h), negrito (32h).

Na avaliação desta variável, considerou-se o tempo total do vírus na mosca branca, dado pela soma do PAA e PAI, para se verificar o início da transmissão do vírus, ou seja, o término do período de latência no vetor, fazendo-se uma relação do percentual de transmissão com o PAA e o PAI combinados em cada situação. Desta forma e de acordo com os resultados organizados na Tabela 7, observou-se que o tempo completado no vetor de 12h não resultou na transmissão de vírus. O término do período de latência foi observado a partir da combinação que somou 16h no vetor, ainda que com percentuais reduzidos (3%). Parece

não ocorrer diferença com o tempo total de 20h (4%) alcançado no vetor dado pela média das duas combinações 8h+12h e 16h+4h. Um percentual mais elevado de plantas infectadas, foi observado com o total de 24h no vetor (em vermelho), sendo crescente com o aumento do PAA e infectando 10% das plantas inoculadas quando a combinação foi 20h+4h. Essa taxa de transmissão cresceu no tempo total de 28h (em verde) e no período em que se completaram 32h no vetor (em negrito) sendo mais evidente para a combinação 24h+8h, a qual resultou em 16% de infecção. Considerável aumento nos percentuais de transmissão foram observados quando o tempo total no vetor foi de 40h, sendo praticamente iguais nas combinações de 16h+24h (25%) ou de 24h + 16h (24%). A combinação única para 64h (16h+48h) foi utilizada como controle, resultando em 60% de transmissão do vírus. Ficou então definido que o GO-ANPL pode ser transmitido pela mosca branca para plantas sadias a partir de 16h após a sua aquisição pelo inseto vetor.

Tomados separadamente, observa-se que o vetor com um PAA de 16h ou 24h, transmite o vírus em percentual maior à medida que o PAI é aumentado, semelhante ao que ocorreu nos ensaios com PAA fixo de 72h, na Tabela 5.

Em geral, houve pouca variação nos percentuais de transmissão do vírus entre as combinações que resultaram em um mesmo número de horas no corpo do inseto vetor, exceto para o total de 32h. Assim as combinações e o controle de 64h foram agrupadas na Tabela 7, para efeito de melhor acompanhar o limiar da latência com os crescentes valores resultantes das médias de transmissão do vírus em cada tempo.

4. 4. Detecção do begomovírus no vetor

Os testes para detecção do vírus no vetor envolveram mais de 350 extrações de DNA de mosca branca e a manipulação de pelo menos 2.500 espécimes, sendo 1.120 ovos, 850 ninfas de 1º ao 4º instar e cerca de 550 adultos. Todas as amostras foram submetidas à detecção viral com a PCR utilizando os oligonucleotídeos CP1/CP2, que amplificam fragmentos de 0,9kb, conforme mencionado anteriormente.

Os resultados dos testes de detecção de vírus com PCR em amostras de ovos e ninfas do 1º ao 4º instar coletados de planta infetada, ninfas e adultos testados com relação à

retenção no vetor, adultos com diferentes PAA, adultos com relação à transmissão do vírus à progênie e passagem transestadial, são ilustrados nos géis das Figuras 22 e 23 e resumidos na Tabela 8. As Figura 24 A e B ilustram o resultado de PCR em outro ensaio para detecção do vírus em diversas amostras de mosca branca com o respectivo "Southern blot" efetuado com sonda específica, confirmando o DNA do begomovírus.

Tabela 7 – Percentual de transmissão do GO-ANPL para tomate 'Santa Clara' em diferentes tempos após aquisição do vírus pelo vetor na determinação do período de latência.

Combinações PAA + PAI*	Horas após a Aquisição do Vírus pelo Vetor	Nº de plantas infectadas/ plantas inoculadas**	Percentual médio de transmissão
8h+4h	12h	0/36	0%
8h+8h	16h	1/29	3%
8h+12h, 16h+4h	20h	2/50	4%
8h+16h, 16h+8h, 20h+4h	24h	4/61	7%
20h+8h, 24h+4h	28h	5/42	12%
12h+20h, 16h+16h, 20h+12h	32h	17/141	12%
24h+8h	32h	5/32	16%
16+24h, 24+16h	40h	22/88	25%
16h+48h	64h	12/20	60%

*PAA= período de acesso de aquisição do vírus na planta; PAI= período de acesso de inoculação do vírus na planta.

**Inoculação de cinco moscas brancas / muda de tomate 'Santa Clara'.

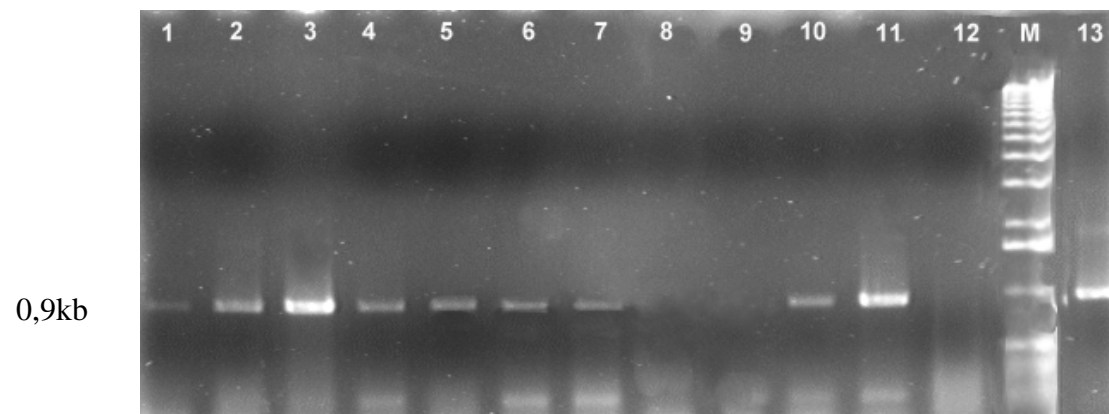


Figura 22- Análise eletroforética em gel de agarose de amostras de mosca branca submetidas a PCR. Colunas 1 a 4 - amostras de ninfas provenientes de fêmeas avirulíferas e desenvolvidas em planta infectada: 1º, 2º, 4º e 3º ínstar, respectivamente; 5 a 7 - amostras oriundas de progênie de fêmeas virulíferas: 1º, 2º e 4º ínstar, respectivamente; 8 - 4º ínstar do ensaio de retenção de vírus (após aquisição no 1º ínstar); 9 - adulto do ensaio de retenção de vírus; 10 - adultos provenientes da progênie de fêmea virulífera e que se desenvolveram em planta não hospedeira; 11- adultos provenientes de ninfas que se desenvolveram em plantas infectadas (passagem transtadial); 12 - inseto avirulífero; M= marcador DNA Ladder; 13- 'Santa Clara' infectada (controle).

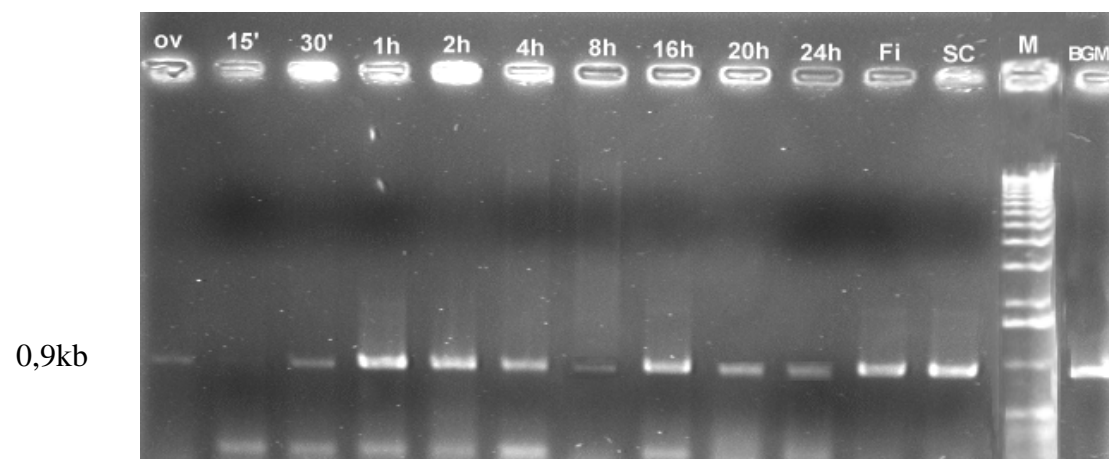


Figura 23- Análise eletroforética em gel de agarose de amostras de mosca branca submetidas à PCR: ov = ovos de progênie de fêmea virulífera; 15' a 24h- adultos com período de acesso de aquisição do GO-ANPL de 15 minutos a 24 horas; fi= fêmea virulífera (individual); SC = tomate 'Santa Clara infectada, M = marcador DNA Ladder; BGMV- controle positivo.

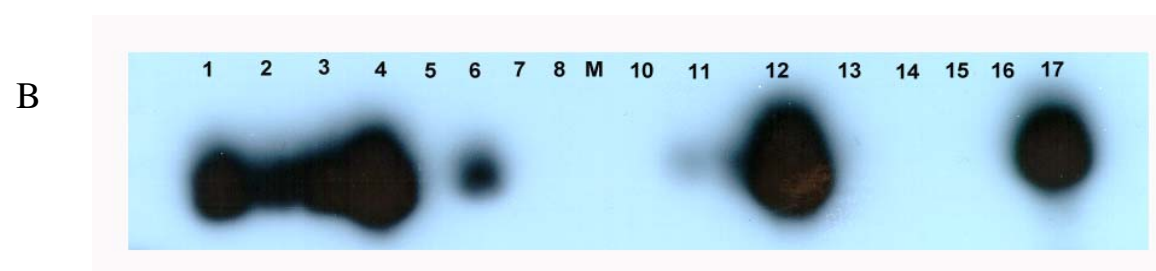


Figura 24- Análise eletroforética em gel de agarose de amostras de mosca branca submetidas à PCR. Colunas de 1 a 4 – adultos com período de acesso de aquisição do vírus em planta infectada de 20h, 16h, 8h e 4h, respectivamente, 5- inseto avirulífero; 6- adulto com PAA de 2h; 7- ovos coletados em planta infectada; 8- ovos de fêmeas avirulíferas; M- Marcador DNA Ladder; 10 – adulto macho; 11- ovos de fêmea virulífera; 12- ninfa de 4^o instar desenvolvida em planta infectada; 13 e 14- ovos coletados 7 dias após oviposição de avirulíferas em planta infectada; 15 e 16 -planta sadia; 17- Santa Clara infectada (A).

Southern blot do mesmo material realizado com sonda preparada com DNA A do begomovírus GO-ANPL (B).

Tabela 8 - Resultados da detecção do begomovírus isolado de tomate, GO-ANPL em diferentes estádios de desenvolvimento de *B. argentifolii* em planta infectada, em planta não hospedeira e com períodos de acesso de aquisição do vírus (PAA) variados.

Condição da fêmea e planta hospedeira	Fase de Desenvolvimento do Vetor	Amostras Positivas ^A / Amostras Testadas	Detecção Por PCR (%)
Fêmea avirulífera c/ oviposição em 'Santa Clara' infectada	Ovos	0/27	0
	1º Ínstar	2/13	15
	2º Ínstar	8/14	57
	3º Ínstar	7/10	70
	4º Ínstar	11/16	69
	Adulto (transestadial ^B)	8/8	100
Fêmea virulífera c/ oviposição em repolho ou couve teste da progênie)	Ovos ^C	4/29	13
	1º Ínstar	1/12	8
	2º ínstar	1/17	6
	3º Ínstar	1/23	4
	4º Ínstar	4/17	23
	Adulto (emergente)	4/25	16
Adulto	Adultos com PAA:		
	15 min	0/3	0
	30 min	3/8	37
	1h	2/6	33
	2h	4/6	66
	4h	5/8	62
	8h	4/7	50
	16h	5/7	71
	20h	3/4	75
	24h	6/6	100
Fêmeas Individuais ^D	PAA de 24h	26/42	62
Avirulíferos ^E	ovos	0/12	0
	1º ao 4º ínstar	0/15	0
	Adulto	0/13	0

A = detecção por PCR: ovos, até 20 por tubo, ninfas até 10 por tubo, adultos até 6 por tubo; **B** = ninfa de 4º ínstar transferida de planta infectada para repolho para emergência do adulto; **C** = todas as fases do inseto desenvolveram-se em planta não hospedeira; **D** = fêmeas empregadas na oviposição para avaliação da transmissão do vírus à progênie; **E** = controle negativo.

Conforme os resultados observados nos géis após eletroforese (Figura 22) e na Tabela 8, constatou-se que o begomovírus GO-ANPL pode ser detectado em todos os estágios de desenvolvimento da mosca branca que se desenvolveram a partir de ovos de fêmeas avirulíferas em plantas infectadas. Dos quatro estágios ninfais, a menor frequência de detecção do vírus ocorreu para o 1º ínstar (15%), enquanto que o 4º ínstar foi a fase do inseto em que a amplificação do DNA viral foi sempre mais facilmente visualizada. O percentual de amostras positivas tanto no 3º quanto no 4º ínstar, foi de praticamente 70%. O begomovírus, contudo, não foi detectado em ovos, com três a sete dias após a postura em plantas infectadas, em nenhuma das 27 amostras testadas nas quais foram envolvidos mais de 500 ovos amostrados de diferentes plantas de tomate com o vírus.

Além de ter sido detectado em diversas fases de desenvolvimento do inseto, o begomovírus foi constatado nos adultos que emergiram das ninfas do 4º ínstar que haviam sido transferidas da folha infectada, onde se alimentaram, para folhas destacadas de repolho. A passagem transestadial do vírus foi detectada em todas as amostras testadas, sugerindo que a passagem do vírus da fase de ninfa para o adulto ocorre com elevada frequência em condições naturais.

Os ensaios para se detectar a retenção do vírus no vetor, a partir de ninfas do 1º ínstar (crawler) em desenvolvimento em planta infectada foram limitados pelo insucesso da sua sobrevivência após a transferência para o repolho, ainda que sob cuidadosa manipulação. Desta forma, poucas amostras das fases posteriores foram obtidas (7 em 30 tentativas), optando-se por permitir o desenvolvimento das mesmas até o 4º ínstar ou adulto. Nestas fases, porém, o resultado da PCR foi negativo (Figura 22). O percentual de amostras positivas para o 1º ínstar coletado de planta infectada foi de 15% (Tabela 8), valor que sugere a necessidade de um maior número de sobreviventes para a constatação do vírus em estágios posteriores.

O vírus foi constatado nos adultos de mosca branca que se alimentaram em plantas infectadas por diferentes períodos de acesso de aquisição, PAA, de 30 minutos a 24 horas (Tabela 8), sendo maior o percentual de moscas brancas virulíferas quando o PAA foi mais prolongado. Os testes para detecção do vírus em adultos com PAA de 15 minutos, foram feitos em número menor de amostras, o que possivelmente contribuiu para o resultado ter sido negativo. A transmissão do vírus após esse PAA, porém, ocorreu em 6% das plantas inoculadas (Tabela 5).

Com os testes realizados para todas as fases do vetor após a oviposição de fêmeas virulíferas em plantas de couve ou repolho (não hospedeiras do vírus), teste de transmissão à progênie, constatou-se a presença do begomovírus em ovos, ninfas e adultos em diferentes ocasiões. Em ovos, o percentual foi de 13%, sendo menos freqüente a detecção nas ninfas de 1º ao 3º ínstar. No 4º ínstar, o vírus foi constatado em um percentual mais elevado, 23%, e na fase adulta em 16% dos casos testados. Os resultados obtidos para as amostras de ovos e adultos da progênie nas PCRs com os oligonucleotídeos CP1/CP2, foram confirmados com o par PAL1c1996/PAR1v733, o qual amplifica fragmento de 1,3 kb do DNA A (resultados não apresentados). Ocasionalmente, foram realizadas PCRs com o DNA de amostras foliares obtidas do local onde se alimentavam as fases ninfais. O resultado do teste, para todas as amostras vegetais, foi negativo.

Nos testes de transmissão do vírus, em que foram empregados, por planta, 10-15 adultos da progênie de fêmeas virulíferas durante 48h, não foi verificado nenhum caso de infecção dentre as 23 plantas de 'Santa Clara' inoculadas. Por outro lado, nos casos em que os adultos usados na inoculação foram provenientes do 4º ínstar e para os quais se confirmou, posteriormente, a passagem transestadial, as inoculações resultaram num percentual de 33% de plantas infectadas.

5. DISCUSSÃO

A metodologia empregada para a inoculação do begomovírus GO-ANPL com a *B. argentifolii* em tomate foi estabelecida e adotada neste trabalho após alguns ensaios preliminares, possibilitando a determinação das variáveis utilizadas no estudo da interação do vírus com o vetor, com relativa facilidade e praticabilidade. O estabelecimento do local e das espécies vegetais para manutenção das colônias de moscas brancas avirulíferas objetivando disponibilizar semanalmente grande quantidade de adultos, foi essencial na condução dos experimentos. Outro aspecto importante na condução dos ensaios foi a manutenção de várias plantas jovens de tomate infectadas, uma vez que suas folhas novas eram periodicamente destacadas e usadas como fonte de inóculo para o vetor.

A adoção de folhas destacadas em frascos para a aquisição do vírus por numerosas moscas brancas, facilitou a uniformização de tempo de aquisição do vírus pelo vetor para as posteriores inoculações das mudas com PAIs variados. Com relação aos tubos falcon, onde eram dispostas as folhas destacadas, observou-se que, para os ensaios que exigiam longos PAAs, (16 -24 horas), os tubos fechados com a própria tampa plástica, satisfaziam a condição necessária para a permanência da turgidez da folha, requerida para a alimentação do inseto e a aquisição do vírus. A adoção de ponteiras plásticas para coleta dos grupos de insetos e a confecção de caixa de papelão preta, foram definidos à medida que se conhecia a biologia e o comportamento do vetor. As gaiolas individuais confeccionadas a partir de copos plásticos descartáveis para uso nas inoculações das plantas com as moscas brancas, mostraram-se práticas e adequadas para o confinamento do inseto à muda evitando a fuga do vetor.. Constatou-se, portanto, que a metodologia estabelecida para as diversas etapas que compunham as inoculações do vírus, colaborou para estudo da relação GO-ANPL com a *B. argentifolii* e os resultados obtidos, neste trabalho, certamente traduzem a interação do begomovírus com o seu vetor, considerando os aspectos ora propostos na investigação e a seguir discutidos.

De acordo com o número de insetos observados em cada planta ao término das 48 horas de PAI de todos os experimentos em que se avaliou o PAA (Tabela 4) como também nos experimentos em que se variou o PAI (Tabela 5), constatou-se que em 70% das mudas estavam presentes, na mesma proporção, um, dois ou três insetos nas folhas verdadeiras. Quatro a cinco insetos foram mais comuns nos tratamentos com PAI de 15 minutos a 2 horas. Grupo de cinco moscas brancas só foi recuperado em 8% das plantas inoculadas, enquanto que plantas com zero inseto foram observadas em 13% do total de plantas inoculadas. No entanto, plantas infectadas foram obtidas em todas as ocasiões, sendo mais frequentes nos casos em que três insetos foram contados na superfície abaxial das folhas. Essa observação indica que, não necessariamente, o inseto permanece na planta durante todo o período que lhe é concedido para a inoculação. Porém, como observado nos ensaios preliminares, a adoção de três insetos por planta, causou mais escapes que quando se usaram grupos de cinco insetos, e com este número os resultados foram similares ao uso de 10 insetos. Casos isolados de 90 e 100% de transmissão do vírus com grupos de cinco moscas brancas foram obtidos nos experimentos de transmissão para os tempos de PAA de 20 e 24 horas, respectivamente (Tabela 5). Para alguns vírus, como o ToLCV-Ban4, a transmissão com um único adulto pode alcançar 40 a 65%, no entanto, cinco insetos foram requeridos para

os 100% de infecção (Muniyappa *et al.*, 2000). Para o TYLCV a eficiência máxima de 97% foi obtida com 20 adultos por planta (Metha *et al.*, 1994b).

O emprego de fêmeas nos experimentos de transmissão foi mais freqüente que o uso de machos por três aspectos: as fêmeas são mais numerosas nas populações avirulíferas, são mais facilmente capturadas e são consideradas mais eficientes na inoculação de begomovírus (Muniyappa *et al.*, 2000; Polston *et al.*, 1990, Harrison, 1985). Experimentos para testar a eficiência de machos na transmissão do GO-ANPL não foram conduzidos.

A proteção com filme plástico foi usada para que a mosca branca se dirigisse para as folhas verdadeiras, uma vez que, segundo Costa (1976) e Zeidan & Czosnek (1991), a transmissão do vírus é menos eficiente quando os insetos se alimentam em folhas cotiledonares. Contudo, observou-se, em testes com cotilédones descobertos, que os insetos preferiam justamente as folhas verdadeiras para alimentação tornando o trabalhoso emprego do filme plástico desnecessário.

Tanto nos ensaios do PAA como do PAI, o período noturno para a inoculação não apresentou diferenças com relação às plantas inoculadas no período diurno. Ensaios preliminares com plantas inoculadas com moscas brancas virulíferas sob escuro total e sob luz natural, resultou em percentuais próximos de 50-55% para escuro e de 60% para luz.

O tempo para inoculação fixo em 48h, após PAA variados, foi considerado adequado para a realização dos experimentos. O aumento do PAA de 15 minutos até 24 horas aumentou o percentual de transmissão de 6 para 65% (Tabela 4). Similarmente, quando o tempo para a aquisição do vírus foi constante em 72 horas e o PAI se estendeu de 30 minutos para 24 horas, a transmissão passou de 19 para 67% (Tabela 5).

Observou-se que o período mínimo para a aquisição do GO-ANPL pelo vetor em plantas de 'Santa Clara' infectada foi inferior (15 minutos) ao período mínimo para a transmissão do mesmo para plantas sadias de tomate (30 minutos). De acordo com Brown (1997), na aquisição o conteúdo do floema (seiva, proteínas, carboidratos, partículas de vírus, proteínas do capsídeo (Pham *et al.*, 2000)) é adquirido através do canal alimentar, enquanto que a saliva é injetada na planta (com o vírus) pelo canal salivar. Segundo Costa (1976), durante a inoculação poucas partículas infectivas injetadas no mesmo tipo de tecido foliar poderiam ser suficientes para iniciar a infecção. A constatação de períodos curtos para aquisição e para efetuar a transmissão de begomovírus em tomate, reforçam a importância de *B. argentifolii* na rápida disseminação do vírus no campo.

Um percentual crescente da infecção de vírus em plantas com a extensão do período de acesso de aquisição como também do período de acesso de inoculação tem sido comumente relatado para diferentes espécies de begomovírus que infectam culturas como algodão, tomate e cucurbitáceas (Nateshan *et al.*, 1996; Metha *et al.*, 1994b; Cohen *et al.*, 1983; Idris & Brown, 1998). Os valores obtidos do PAA e o PAI pela mosca branca, assim como para o percentual de plantas infectadas, variam bastante com a espécie e/ou o isolado do begomovírus envolvido. Para o *Cotton leaf curl virus* isolado de Karnataka, CLCuV-K, o período mínimo para a aquisição do vírus foi de 1 hora quando ocorreu 20% de transmissão do vírus para plântulas de algodão. Quando o PAA foi elevado para 24 horas o percentual de plantas infectadas foi de 86%. De modo similar a transmissão do CLCuV-K, com o PAI estendido de 5 minutos para 24 horas, foi aumentada de 13 para 73% nas plantas inoculadas (Nateshan *et al.*, 1996). Um outro exemplo da variação do PAA e do PAI pode ser observado para o ToLCV. Com um PAA mínimo de 10 minutos e após 24 horas de PAI, o percentual de plantas infectadas foi de 7%, passando para 100% quando o PAA foi elevado para 8 horas. Para esse mesmo vírus, tendo havido 24 horas de PAA pelo vetor, observou-se uma infecção crescente de 13% para 100% quando o PAI mínimo de 20 minutos foi elevado para 12 horas (Muniyappa *et al.*, 2000). Para o TYLCV os valores de PAA de 15 minutos, seguidos de 72 horas de PAI, como também um PAI mínimo de 15 minutos, este antecedido de 24 horas para a aquisição do vírus, resultaram em 25% de infecção em tomate, em ambos os casos (Metha *et al.*, 1994b). Para o begomovírus de cucurbitácea, SLCV, 100% de transmissão para plantas de abóbora foram conseguidos em duas ocasiões: com 6 horas de PAA seguidos de 48h de PAI e com 2 horas de PAI antecidos de 48h de PAA (Cohen *et al.*, 1983). De acordo com Brown & Nelson (1987), o PAI mínimo pode estar em função da extensão do PAA, caso observado para o CLCuV isolado do Arizona. Com um PAA de 24 horas e um PAI mínimo de 4 horas o vetor transmitiu o vírus para somente 10% das plantas de algodão inoculadas, enquanto que com 48 horas de PAA, o PAI foi reduzido para 10 minutos, ocasião em que a transmissão do CLCuV foi constatada em 31% das plantas.

O número de insetos usados também altera o percentual de infecção das plantas pelo vírus. Para o GO-ANPL, quando mudas de tomate, em algumas ocasiões, foram

inoculadas com número elevado de moscas brancas (15 a 80 insetos/planta) em condições de insetários telados, o percentual de infecção variou de 19% com 15 minutos de PAI a 90% quando o período de inoculação se estendeu para 4 horas (dados não apresentados). Essa observação sugere que, sob condições de elevada população de insetos virulíferos no campo, maior número de plantas podem ser infectadas em menor espaço de tempo. Exemplo semelhante a esse pode ser observado para o SLCV por Cohen *et al.*, (1983). Quando os autores empregaram cinco indivíduos e um PAI de 30 minutos foi constatado pequeno número de plantas infectadas. Quando o número de indivíduos foi elevado para 100, 66% de infecção foi conseguida com o mesmo PAI de 30 minutos para o vetor em plantas de abóbora.

A comparação dos resultados nos parâmetros adotados na investigação da relação vírus-vetor de alguns begomovírus de tomate, algodão e cucurbitáceas de outros países com o begomovírus de Anápolis, GO-ANPL são exemplificados e podem ser melhor observados na Tabela 9.

Uma correlação positiva observada entre a extensão do período de acesso de aquisição e a duração do período de inoculação com relação à probabilidade de transmissão do vírus (Figuras 19 e 21), tem sido observada em outros begomovírus estudados (Duffus, 1996).

Para o período de latência, constatou-se que o tempo de 12 horas foi insuficiente para o início da transmissão de GO-ANPL para tomate, o que veio ocorrer a partir de 16 horas com 3% de infecção (Tabela 6). Resultados próximos a estes foram obtidos para o TYLCV, isolado da Jordânia, cujo período de latência mínimo foi alcançado com 20 horas havendo transmissão do vírus para 4% das plantas (Mansour & Al-Musa, 1992), e para o SLCV com uma latência de 19h, contudo infectando em torno de 50% das plantas de abóbora inoculadas. Com o PAA de 16 horas, o percentual de infecção do GO-ANPL obtido aumentou de 3 para 60% com o PAI variando de 4 horas para 48 horas (Tabela 7). Intervalo superior ao do GO-ANPL foi observado para avaliações com o TYLCV isolado do Egito, no qual se relata o final do período latente a partir de 24h da aquisição, independente do PAA utilizado para o vetor, com os percentuais de transmissão variando de 24 a 39% (Metha *et al.*, 1994 b). Período inferior (6 horas), contudo, foi observado para o ToLCV (Muniyappa *et al.*, 2000) ocasião em que os autores constataram 13% de plantas infectadas. Quando moscas brancas individuais são usadas em inoculações seriadas o período de latência pode variar. Cohen *et al.* (1983) fizeram essa observação para o SLCV cujo período de latência chegou, em alguns casos, a 48 horas.

Em ensaio realizado em casa de vegetação, foi observado que a persistência do GO-ANPL no vetor, após 72 horas de PAA em tomate infectado com o GO-ANPL foi de 8 dias (dados não apresentados) após os insetos deixarem a fonte de inóculo. A persistência do vírus no vetor é avaliada pela duração de dias em que o inseto virulífero é capaz de transmitir o vírus. Os dados não foram conclusivos em virtude do número de moscas brancas sobreviventes, observados até o 18º dia após o início do ensaio, ter decrescido com as consecutivas trocas de plantas a cada 24 horas, realizada por duas semanas. Com isso não se descartou a hipótese da persistência do vírus no vetor ser superior a 8 dias. Sabe-se porém que, no campo, a mosca branca poderá adquirir o vírus novamente. Para o TYLCV a persistência na mosca branca varia de 8 a 20 dias, conforme o isolado (Picó *et al.*, 1996). Para Mansour & Al-Musa (1992), uma persistência de 11 dias no vetor para o TYLCV pode explicar o rápido desenvolvimento e elevado nível de doença no campo. De acordo com Rubinstein & Czosnek (1997), o decréscimo na transmissão do vírus com o tempo pode estar associado com a rápida redução nos níveis da proteína do capsídeo no vetor. Os autores observaram a ausência da proteína do capsídeo do TYLCV em mosca branca aos 12 dias após a aquisição do vírus. Níveis detectáveis de DNA viral, porém, foram associados ao vetor por toda a sua vida.

Nos testes de detecção por PCR, as amostras de insetos avirulíferos usadas como controle não apresentaram nenhum tipo de amplificação, confirmando a especificidade dos oligonucleotídeos empregados na detecção do vírus. PCR, seguida de hibridização, em grupos de cinco insetos foi empregado no estudo do tempo requerido para a aquisição do ToLCV pelo vetor (Muniyappa *et al.*, 2000).

O GO-ANPL foi detectado em todas as fases do vetor desenvolvidas em planta infectada, tendo sido transmitido para a fase adulta em elevados percentuais. Observou-se que o percentual de detecção do vírus aumentou conforme avançava a fase da ninfa. Os adultos emergentes dessas ninfas transmitiram o vírus para 33% das plantas de tomate inoculadas. Para Polston *et al.* (1990), a taxa de detecção de begomovírus no vetor parece estar associada com o período de aquisição do vírus e com o estágio morfológico do inseto. Os autores, porém, encontraram resultados bem diferentes do GO-ANPL para o SLCV. O DNA deste begomovírus de cucurbitácea foi detectado em apenas uma ninfa dentre as 196 testadas individualmente e em nenhuma das 335 ninfas agrupadas de 10 em 10. O DNA viral também não foi detectado em nenhum dos 63 adultos que emergiram das "pupas" que se

formaram em plantas infectadas. A baixa frequência na detecção do vírus foi consistente com a reduzida taxa transmissão do vírus (5%) dos adultos para plantas sadias. As técnicas ELISA, dot-blot e squash blot foram as empregadas nos ensaios para detecção do SLCV. Para os autores, as ninfas adquirem o vírus em taxas muito menores que os adultos e alguns vírus não são retidos dentro das ninfas como são em adultos. Além do SLCV, um outro exemplo de begomovírus que não é retido após a última ecdise é o CLCuV (Costa, 1976). Segundo Lastra (1993), ainda que as ninfas possam adquirir o vírus alimentando-se em planta infectada, seu hábito sésil a impede de ter algum papel na transmissão do vírus do ponto de vista epidemiológico. De modo diferente, observa-se que para o GO-ANPL a participação das ninfas na aquisição do vírus, contribui indiretamente para a transmissão do vírus em condições de campo, uma vez que, pela passagem transestadial, o adulto pode promover o início da inoculação em campos novos.

Em nenhuma amostra de grupos de 20 ovos resultantes de postura de fêmea de *B. argentifolii* avirulífera em planta infectada o GO-ANPL foi detectado (Tabela 8). Os dados sugerem que não ocorre a passagem do vírus juntamente com a água levada para os ovos através de pedicelos ou hastes, o que confirma a constatação feita por Ghanim *et al.* (1998) em ensaios realizados para o TYLCV. Segundo Weber (1931), citado por Byrne & Bellows (1991), a água passa osmoticamente através de uma massa coloidal e entra no ovo de *Trialeurodes vaporariorum* através do pedicelo. Gameel (1974), citado pelos mesmos autores, relatou que processo similar ocorre com *B. tabaci*. Vários autores têm sugerido que aleirodídeos usam o pedicelo como forma de absorver água para dentro do ovo (Byrne & Bellows, 1991).

A investigação da retenção do vírus a partir do 1º ínstar não foi possível em virtude de morte frequente do inseto após transferência de plantas. Segundo Horowitz *et al.* (1984) citados por Rubinstein & Czosnek (1997), a maior mortalidade em mosca branca ocorre na fase de ovos e ninfas de 1º ínstar.

A detecção do GO-ANPL usando-se da PCR foi possível para os adultos que se alimentaram por 30 minutos a 24 horas na planta infectada, observando-se um aumento no percentual de detecção com o aumento do tempo para a aquisição do vírus (Tabela 8). O GO-ANPL não foi detectado somente para os adultos com PAA de 15 minutos. Para esse PAA, porém, a transmissão do vírus foi possível em 6% dos casos (Tabela 4). Resultados semelhantes foram observados para o ToLCV com dois pares de oligonucleotídeos. O DNA

do ToLCV foi amplificado em insetos com PAA de 30 minutos em plantas infectadas, mas não em insetos com 15 minutos de PAA (Muniyappa *et al.*, 2000). Os resultados obtidos com o GO-ANPL indicam que a PCR pode ser empregada na detecção de insetos virulíferos coletados no campo, uma vez que períodos tão curtos quanto 30 minutos de alimentação em plantas infectadas já permitem que o vírus seja detectado pelo teste. A detecção de vírus no inseto, no entanto, não deve ser associada à sua capacidade de transmitir vírus. Rosell *et al.* (1999) detectaram, por PCR, o SLCV em *B. tabaci* como também em *T. vaporariorum*, mosca branca não vetora de begomovírus. Por outro lado, Polston *et al.* (1990), detectaram DNA de SLCV em 40/41 adultos de mosca branca que transmitiram o vírus. Porém, o DNA viral foi também detectado em 165/219 adultos que não transmitiram o SLCV dentro de um período de 48h. Isto sugere que a presença do DNA viral não é um indicador para a habilidade em transmitir o vírus. Esta hipótese parece ser confirmada para o GO-ANPL nos casos em que elevada taxa de detecção do vírus em adultos que emergiram de pupas, cujas fases ninfais se desenvolveram em planta infectada, contrasta com os 33% de infecção obtidos quando esses adultos foram empregados para a inoculação do vírus em tomate.

Em fêmeas de mosca branca com um PAA de 24 horas em plantas infectadas com o GO-ANPL e testadas individualmente, o vírus foi detectado em 63% dos casos, indicando que é possível que haja variação na aquisição de DNA viral entre fêmeas de mosca branca. Isso pode, em parte, explicar as variações nos percentuais de transmissão do vírus observados nas Tabelas 4 e 5.

Nos ensaios para detecção de transmissão do vírus à progênie, o vírus foi constatado em ovos, ninfas e adultos. A frequência em geral foi baixa, ovos (13%), ninfas de 1º a 3º ínstar (4 - 8%), 4º ínstar (23%) e adultos (16%) quando comparados aos dados de Ghanim *et al.* (1998), para o TYLCV que obtiveram 80% para ovos, 50% para ninfas e 40% para adultos. Contudo, demonstra claramente a passagem do GO-ANPL para a progênie, aspecto este de elevada importância epidemiológica e que exprime Conforme especula Ghanim *et al.* (1998), o vírus invade o sistema reprodutivo da mosca branca e alcança os ovos por auxílio de endossimbiontes que os penetrasria na fase de maturação dos mesmos. Este aspecto é de elevada importância no estudo da epidemiologia dos begomovírus. Apesar da transmissão transovariana, resultados que sugerissem a multiplicação do GO-ANPL no vetor não foram observados.

A transmissão transovariana não foi observada por diversos autores para vários begomovírus. Costa (1976), em sua revisão sobre a transmissão de vírus por mosca branca cita a ausência da passagem transovariana em begomovírus que infectam euforbiáceas e malváceas no Brasil. Outros relatos mais recentes da ausência da passagem transovariana em *Bemisia* sp foram feitos para o EuMV (Harrison, 1985). Cohen *et al.* (1983) concluíram a ausência de passagem transovariana pela não detecção do SLCV em pelo menos 1.000 adultos de primeira geração oriundos de fêmeas virulíferas. Idris & Brown (1998) obtiveram a mesma conclusão com base no insucesso da transmissão do STLCV para tomate com os adultos provenientes da progênie de fêmeas virulíferas de *Bemisia tabaci*.

Contudo, a constatação da passagem transovariana por Ghanim *et al* (1998) para o TYLCV, begomovírus monopartido, reforça a informação obtida para o GO-ANPL de que, na interação do vírus com o vetor, a transmissão à progênie pode ocorrer. A transmissão do GO-ANPL para tomate pelo adulto da progênie de fêmeas virulíferas de *B. argentifolii* não foi constatada. Este resultado foi baseado na ausência de infecção dentre as 23 plantas submetidas às moscas brancas por um PAI de 48 horas. Resultado diferente foi constatado para o TYLCV isolado de Israel. Com esse vírus ocorreu a transmissão do vírus para plantas de tomate pelos adultos da progênie, apesar de ter sido em baixo percentual (10%). Tomando por base esse valor, é provável que os resultados obtidos para o GO-ANPL diferissem de zero caso a inoculação do vírus, com os adultos da progênie, tivesse sido realizada com um maior número de plantas. Ghanim *et al.* (1998) observaram que para o TYLCV, em alguns ensaios, nenhuma planta de tomate dentre 20 inoculadas foi infectada pelos adultos da progênie.

Constata-se, com os resultados obtidos e avaliações realizadas, que conforme afirma Duffus (1996), os begomovírus diferem em suas relações de aquisição e persistência no vetor e podem diferir em outras interações com o vetor.

Tem sido sugerido, apesar de ainda não relatadas as espécies, que plantas daninhas são fontes primárias de begomovírus no campo para o tomate. Para Costa (1976) plantios velhos e plantas daninhas são usualmente as principais fontes das quais o vetor adquire o vírus e o introduz em novos plantios. Segundo o autor, o vetor é mais eficiente na transmissão, quando adquire o vírus de reservas da natureza que dentro da própria cultura. Um aspecto interessante foi relatado para a epidemia de ToMoV na Flórida. A dispersão primária do ToMoV ocorreu a partir de campos vizinhos, os quais tem um papel

predominante na incidência do vírus em plantios comerciais de tomate. Plantas em senescência, inadequadas para a alimentação pela mosca branca, podem servir como fonte de moscas brancas virulíferas para novas áreas de tomate. Em estudos epidemiológicos com o ACMV, foi demonstrado que elevada proporção de plantas de mandiocas afetadas tinham, nos campos vizinhos, a mais importante fonte de inóculo para novas plantas. A dispersão secundária na área foi mínima (Polston, *et al.*, 1996). Para os autores, a aplicação de inseticidas provoca alterações nos padrões de dispersão de insetos e como medida para reduzir a ameaça do vetor, foi sugerida a remoção de plantios velhos infectados várias semanas antes de estabelecer o próximo plantio.

Com base nessas constatações e com as observações efetuadas neste trabalho, é possível imaginar que os adultos de mosca branca, cuja taxa de passagem transestadial do GO-ANPL foi bastante elevada, migrariam de plantas em senescência para plantios novos e inoculariam, inicialmente pelo menos 33% das plantas de tomate. A cultura, segundo Lastra (1993), é suscetível durante as cinco primeiras semanas no campo, aspecto que favoreceria a disseminação da virose. Insetos avirulíferos alcançando essas plantas infectadas, segundo o que foi observado, adquiririam o vírus em um período de pelo menos 15 minutos de alimentação. Os adultos que se alimentassem por 24 horas estariam aptos, caso migrassem, a transmitir o vírus para pelo menos 67% das plantas em plantios vizinhos. Assim, as plantas infectadas dessa área passariam a servir de fonte de inóculo para outros campos. Segundo Costa (1976), plantios antigos ao lado de plantas daninhas suscetíveis são, geralmente, as principais fontes nas quais as moscas brancas adquirem os vírus e os introduzem em novos plantios. Contudo, a presença de *N. physalodes* e *D. stramonium*, plantas daninhas suscetíveis ao GO-ANPL e comumente encontradas próximas a plantios de tomate, poderiam constituir fonte do vírus no campo. Além disto, elevados níveis de transmissão de vírus associados com baixo número de moscas brancas no campo têm sido observado em tomate (Markhan *et al.*, 1996).

As informações obtidas neste trabalho, mediante a metodologia empregada, são importantes para o conhecimento dos aspectos relacionados à interação de begomovírus e *B. argentifolii* e apresentam contribuições para o estudo epidemiológico das viroses provocadas por esses vírus nos plantios de tomate em nossas condições.

TABELA 9 – Comparação de alguns resultados nos parâmetros adotados no estudo da relação vírus-vetor envolvendo a mosca branca, *Bemisia spp.*, e begomovírus que infectam tomate, algodão e cucurbitáceas em outros países com os resultados obtidos para o begomovírus GO-ANPL.

Vírus	Nº de moscas brancas empregado	PAA mínimo/ % infecção (seguido de PAI de 24h* ou ≥ 48h**)	PAI mínimo/% infecção (antecedido de PAA de 24h* ou de ≥48h**)	PL (hora)	PV (dias)	^A Detecção em ninfas	^B Passagem transtadial/transmissão pelos adultos	^C Transmissão à progênie/transmissão pelos adultos
TYLCV-E ¹	10	15 min/ 24% *	15 min/ 24%**	24	NR	+	+/+	NR
TYLCV-Is ^{2,8}	20-25	30 min/ 27%**	30 min/ 6%	24-27	20	+	+/+	+/+
CLCuV-K ³	10	1 hora/ 20% *	5 min/ 13% *	8	9	NR	NR	-/NR
CLCuV-A ⁴	20	1 hora/ 24%**	4 horas/ 10%* e 10 min/ 31%**	24	6-8	NR	NR	NR
SLCV ⁵	5-20	30 min/ NR	30 min /65%**	19	26	-	-/+	-/NR
ToLCV-Ban ⁶	5	10 min/ 7%*	20 min /13% *	6	12	NR	NR	NR
STLCV ⁷	15	1 hora/ 9%**	1 hora /13%*	NR	9	NR	NR	-/-
GO-ANPL	5	15 min/ 6%**	30 min /19%**	16	8	+	+/+	+/-

TYLCV-E – *Tomato yellow leaf curl virus* isolado do Egito; TYLCV-Is – isolado do Israel ; CLCuV-K – *Cotton leaf curl virus* isolado da Índia; CLCuV-A – isolado do Arizona; SLCV – *Squash leaf curl virus*; ToLCV-Ban – *Tomato leaf curl virus* isolado de Bangalore; STLCV– *Sinloa tomato leaf curl virus*; GO-ANPL– begomovírus de tomate isolado em Goiás.

PAA = período de acesso de aquisição; PAI = período de acesso de inoculação; PL = período de latência; PV = persistência no vetor; **A**- detecção por ELISA, Dot-blot ou PCR; **B**- Detecção do vírus em adultos, cujas ninfas se desenvolveram em planta infectada e transmissão do vírus pelos adultos para plantas saudas; **C**- Detecção em ovos, ninfas e adultos e transmissão pelos adultos para planta sadia; + = positivo; – = negativo; NR= não relatada.

1-Metha *et al.*, 1994b; 2- Cohen & Nitzani, 1966; 3- Nateshan *et al.*, 1996; 4- Brown & Nelson, 1987; 5- Cohen *et al.*, 1983; 6- Muniyappa *et al.*, 2000; 7- Idris & Brown, 1998; 8- Ghanim *et al.*, 1998.

CONCLUSÕES

- Na caracterização biológica, observou-se que o isolado GO-ANPL infectou preferencialmente plantas da família Solanacea, particularmente *Nicotiana benthamiana*, *Datura stramonium* e *Nicandra physalodes*. O número de espécies infectadas foi maior quando a inoculação foi realizada por meio da mosca branca, *B. argentifolii*, do que por inoculação mecânica.
- Na caracterização parcial do GO-ANPL foram seqüenciados 2.180 nucleotídeos do DNA A que correspondem à parte do genoma viral amplificada com o par de oligonucleotídeos PAL1v1978/CP2, a qual compreende parte do gene da replicase, a região intergênica e o gene da capa proteica, regiões comumente empregadas na distinção entre espécies de begomovírus.
- Na análise filogenética o GO-ANPL foi considerado de relacionamento distante dos begomovírus da Ásia, Europa e África e próximo a alguns begomovírus do Brasil, especialmente TRMV e DF-BR2. Com este último apresentou alta homologia em todo o genoma, o que sugere que pertençam a uma mesma e nova espécie.
- Na relação GO-ANPL x *B. argentifolii* os resultados dos ensaios com diferentes períodos de acesso de aquisição do vírus sugerem uma associação precoce vírus x vetor, visto que houve transmissão de isolado quando o período de acesso de aquisição (PAA) foi de apenas 15 minutos (6% de transmissão). O número de plantas de tomate infectadas aumentou com a extensão do PAA atingindo 65% nos casos em que 24 horas de período de acesso de inoculação (PAI) foram fornecidos ao vetor em tomate sadio.
- Após um PAA fixo de 72 horas constatou-se que a mosca branca é capaz de transmitir o vírus em um curto período de inoculação (30 minutos) para pelo menos 19% das plantas inoculadas. O percentual atingiu 67% das plantas quando o PAI concedido ao vetor em plantas sadias foi de 24 horas.
- O período de latência do vírus foi de 16 horas, ocasião em que 3% das plantas de tomate inoculadas foram infectadas. Um pequeno aumento na transmissão (5%) foi observado quando o período total (PAA+ PAI) foi de 20 horas atingindo os 7% das plantas quando esse período foi de 24 horas.

- A detecção do begomovírus foi facilmente realizada, por meio de PCR, em ninfas do 1º ao 4º ínstar desenvolvidas em plantas infectadas e em adultos com 30 minutos a 24 horas de período de acesso de aquisição do vírus.
- A detecção individual do vírus em fêmeas virulíferas usando a PCR foi de 63%. Isto sugere que podem existir variações na forma de aquisição do vírus pelas fêmeas da mosca branca.
- A transmissão do vírus à progênie foi detectada em ovos (13%), ninfas de 1º ao 4º ínstar (8 a 23%) e em adultos (16%). Os testes com a PCR foram realizados com dois diferentes pares de oligonucleotídeos, obtendo-se os mesmos resultados para as amostras testadas. A transmissão do vírus para plantas de tomate, a partir do adulto da progênie, não foi observada.
- A passagem transtadial do begomovírus foi detectada em todos os adultos testados sugerindo que, nessa relação, a passagem do vírus de ninfa para a fase adulta ocorra com elevada frequência. A transmissão do vírus a partir desses adultos para tomateiro ‘Santa Clara’ foi constatada em 33% das plantas inoculadas o que pode indicar que, na migração do inseto para plantios novos, um percentual semelhante de infecção possa ser introduzido na área com a cultura.
- A metodologia adotada no trabalho para o estudo da interação do GO-ANPL e a *B. argentifolii* foi considerada adequada para a determinação das variáveis estudadas com relativa facilidade e prática.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALVAREZ, P.; ALFONSECA, L. ; ABUD, A. VILLAR, A. ; ROWLAND, R. ; MARCANO, E. BORBON, J.C.; GARRIDO, L. Las moscas blancas en la República Dominicana. In: TALLER DEL CENTROAMERICANO Y DEL CARIBE SOBRE MOSCAS BLANCAS, 1992. Turrialba, Costa Rica. **Memoria**. Turrialba: CATIE, 1993. p.34-37.(CATIE. Série Técnica. Informe Técnico 205).
- ANTIGNUS,Y.; PERSLMAN, M.; BEN-JOSEPH, R.; COHEN, S. Association of the nucleic acid and coat protein of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) with the whitefly vector *Bemisia tabaci*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GEMINIVIRUS, 1., 1994. El Ejido, Almería, Spain. Almeria: Consejería de Agricultura y Pesca-Junta de Andalucía, / Universidad de Malaga, 1994. p.66.
- ATZMON, G; van OSS, H.; CZOSNEK, H. PCR-amplification of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) DNA from squashes of plants and whitefly vectors: Application to the study of TYLCV acquisition and transmission. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.189-194, 1998.
- BARTLETT, A. C.; GAWEL N. J.. Determining whitefly species. **Science**, v. 261, p. 1333-1334, 1993.
- BHARATHAN, N.; GRAVES, W.R.; NARAYANAN, K. R.; SCHUSTER, D. J.; BRYAN, H. H.; McMILLAN, JR. R.T. Association of double-strand RNA with whitefly-mediated silvering in squash. **Plant Pathology** , v.39, p.530-538, 1990.
- BEDFORD, I. D. ; BRIDDON, R.W., BROWN, J. K.; ROSELL, R. C. ; MARKHAM, P. G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. **Annals of Applied Biology** , v.125, p. 311- 325, 1994.
- BEHJATNIA, S. A. A.; DRY, A. B.; REZAIAN, M. A. Identification of the replication-associated protein binding domain within the intergenic region of tomato leaf curl geminivirus . **Nucleic Acids Research** , v.26,n.4, p. 925-931, 1998.
- BELLOWS JUNIOR, T. S.; PERRING, T. M. ; GILL, R. J. HEADRICK, D. H. Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, v.2, p. 195-206, 1994.
- BERRIE, L. C.; RYBICKI, E. P.; KEY, M. E. C. Complete nucleotide sequence and host range of South African cassava mosaic virus: further evidence for recombination amongst begomoviruses. **Journal of General Virology**, v. 82, p.53-58, 2001.

- BETHKE, J. A.; REDAK, R. Effect of imidacloprid on the silverleaf whitefly, *B. argentifolii* Bellows and Perring (Homoptera: Aleyrodidae), and whitefly parasitism. **Annals of Apply Biology**, v. 130, p. 397-407, 1997.
- BETHKE, J. A.; PAINE, T. D.; NUSSLY, G. S. Comparative biology, morphometrics, and development of two populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on cotton and poinsettia. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 84, n.4, p.407-411, 1991.
- BEZERRA, I. C.; LIMA, M. F. ; RIBEIRO, S. G.; GIORDANO, L. B.; ZERBINI, F. M.; ÁVILA, A.C. Occurrence of geminivirus in tomato-producing areas in Submédio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília v. 22, p. 331, 1997. Resumo.
- BEZERRA, I. C.; RESENDE, R. O.; POZZER, L.; NAGATA, T.;KORMELINK, R.; DE ÁVILA, A. C. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. **Phytopathology**, v.89, n.9, p. 823-830, 1999.
- BEZERRA, I. C.; RIBEIRO, S. G.; ÁVILA, A. C.; GIORDANO, L. B. Survey of geminivirus in tomato producing areas in Federal District. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 8., 1996, São Lourenço, MG. **Resumos...** São Lourenço:1996. p.289.
- BHARATHAN, N.; GRAVES, W. R.; NARAYANAN, K. R.; SCHSTER, D.J.; BRYAN, H. H.; MCMILLAN JUNIOR, R. T. Association of double-stranded RNA with whitefly-mediated silvering in squash. **Plant Pathology**, v. 39, p. 530-538, 1990.
- BOCK, K. R.; GUTHRIE, E. J.; WOODS, R. D. Purification of maize streak virus and its relationship to viruses associated with streak diseases of sugar cane and *Panicum maximum*. **Annual Apply of Biology**, v. 77, p.: 289-296, 1974.
- BRIDDON, R. W.; BEDFORD, I. D.; TSAI, J H.; MARKHAM, P. G. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, Tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. **Virology** 219: 387-394. 1996.
- BRIDDON, R. W.; STANLEY, J.; MARKHAM, P. G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, v. 177, p. 85-94, 1992.
- BRIDDON, R. W.; WATTS, J.; MARKHAN, P. G.; STANLEY, J. The coat protein of beet curly top virus is essential for infectivity. **Virology**, v. 172, p. 628- 633, 1989.
- BROWN, J. K. The biology and molecular epidemiology of the Geminiviridae subgroup III. In: STACEY, G. E KEEN, N. T., eds. **Plant-Microbe Interactions**. New York: ITP, 1997. v. 2. p125-195.
- BROWN, J. B.; BIRD, J. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. **Plant Disease**, v.76, n.3, p. 220-225, 1992.

- BROWN, J. K.; FROHLICH, D.R.; ROSSEL, R.C. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? **Annual Review of Entomology**, v. 40 p.511-534, 1995.
- BROWN, J. K.; NELSON, M. R. Host range and vector relationship of Cotton leaf crumple virus. **Plant Disease**, v. 71, p. 522-524, 1987.
- BROWN, J.K.; OSTROW, K. M.; IDRIS, A. M.; STENGER, D. C. Biotic, molecular, and phylogenetic characterization of bean calico, mosaic virus, a distinct *Begomovirus* species with affiliation in the squash leaf curl virus cluster. **Phytopathology**, v. 89, p. 273-280, 1999.
- BYRNE, D. N.; BELLOWS JUNIOR, T. S. Whitefly biology. **Annual Review of Entomology**, v. 36, p. 431-457,1991.
- BYRNE, F. J. CAHILL, M. DENHOLLIM, I.; DEVONSHIRE, A. L. Biochemical identification of interbreeding between B-type and B type strains of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci*. **Biochemical Genetics**, v.33, n. 1/2, p.13-23, 1995.
- BYRNE, D. N.; MILLER, W. B. Carbohydrate and amino acid composition of phloem sap and honeydew produced by *Bemisia tabaci*. **Journal of Insect Physiology**, v.36, p.443-439, 1990.
- CABALLERO, R. Identificación de moscas blancas. In: HILJE, L. ed. Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus. Turrialba: CATIE, 1996. P.1-10. (CATIE. Série Materiales de Enseñanza, 37).
- CABALLERO, R.; RUEDA, A. Las moscas blancas en Honduras. In: TALLER CENTROAMERICANO Y DEL CARIBE SOBRE MOSCAS BLANCAS, 1992, Turrialba. **Memorias...** Turrialba: CATIE, 1993. p.50-53. (CATIE. Série Técnica. Informe Técnico, 205).
- CACIAGLI, P.; BOSCO, D. Quantification over time of tomato yellow leaf curl geminivirus DNA in its whitefly vector. **Phytopathology**, v. 87, p. 610-613, 1997.
- CACIAGLI, P.; BOSCO, D.; AL-BITAR, L. Relationships the Sardinian isolate of Tomato yellow leaf curl geminivirus with its whitefly vector *Bemisia tabaci* Gen. **European Journal of Plant Pathology**, v. 101, p. 163-170, 1995.
- CAMPBELL, B. C. STEFFEN-CAMPBELL, J. D. ; GILL, R. J. Origin and radiation of whiteflies: na initial molecular phylogenetic assessment. In: GERLING, D.; MAYER, R.T., ed. **Bemisia 1995: taxonomy, biology, damage, control and management**. Andover: Intercept, 1996. p.30-51.
- COHEN, S.; DUFFUS, J. E.; LIU, H. Acquisition, interference, and retention of cucurbit leaf curl viruses in whiteflies. **Phytopathology**, v.79, p.109-113, 1989.

- COHEN, S.; DUFFUS, J. E.; LARSEN, R. C.; LIU, H.; FLOCK, R. A. Purification, serology and vector relationships of squash leaf curl virus, a whitefly-transmitted geminivirus. **Phytopathology**, v. 73, p.1669-1673, 1983.
- COHEN, S.; DUFFUS, J. E.; LARSEN, R. C.; LIU, H.; Y.A new *Bemisia tabaci* biotype in the southwestern United States and its role in silverleaf of squash and transmission on lettuce infectious yellows virus. **Phytopatolology** v.82, p.86-90.1992.
- COHEN, S.; NITZANY, F. E. Transmission and host range of the Tomato yellow leaf curl virus. **Phytopathology**, v. 56, p.1127-1131, 1966.
- COSTA, A. S. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. **FAO Plant Protection Bulletin**, v.13, n.6, p. 3-11, 1965.
- COSTA, A. S. Comparação de machos e fêmeas de *Bemisia tabaci* na transmissão do mosaico dourado do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.1, p.99-103, 1976a.
- COSTA, A. S. Whitefly-transmitted plant diseases. **Annual Reviews Phytopathology**, v. 14, p. 429-449, 1976b.
- COSTA, A. S.; COSTA, C. L.; SAUER, H. F. G. Surto de mosca-branca em culturas do Paraná e São Paulo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Itabuna, v.2, n.1, p. 20-20, 1973.
- COSTA, A. S.; OLIVEIRA, A. R.; SILVA, D. M. Transmissão mecânica do mosaico dourado do tomateiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v.6/7/8, p.147, 1975 Resumo.
- COSTA, A. S.; RUSSEL, L. M. Failure of *Bemisia tabaci* to breed on cassava plants in Brazil (Homoptera: Aleyrodidae). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.27, n.4, p.388-390, 1975.
- COSTA, C. L. Vetores de vírus de plantas. In: Luz, W. C. (ed.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.6, p.103-171, 1998.
- COSTA, H. S. ; BROWN, J. K. Variability in biological characters, isozyme patterns and virus transmission among populations of *Bemisia tabaci* in Arizona. **Phytopatolology**, v.80, p.88, 1990.
- COSTA, H. S. ; BROWN, J. K. Variation in biological characteristics and esterase patterns and virus transmission of *Bemisia tabaci*, and the association of population with silverleaf symptom induction. **Entomological Experimentalis et Applicata**, v.61, p.211-219, 1991.
- COSTA, H. S. BROWN, J. K. SIVASUPRAMANIAM, S.; BIRD, J. Regional distribution, insecticide resistance, and reciprocal crosses between the A and B biotypes of *Bemisia tabaci*. **Insect Science and Application**, v.14,p. 255- 266, 1993a.

- COSTA, H. S.; ULLMAN, D. E.; JOHNSON, M. W.; TABASHNIK, B. E. Association between *Bemisia tabaci* density and reduced grown yellowing, and stem blanching of lettuce and kai choy. **Plant Disease**, v.77, p. 969-972, 1993b.
- CZOSNEK, H.; BER, R.; NAVOT, N.; ANTIGNUS, Y.; ZAMIR, D. Detection of tomato yellow leaf curl virus in lysates of plants and insects by hybridization with a viral DNA probe. **Plant Disease**, v. 72, p. 949-951, 1988.
- CZOSNEK, H. BER, R.; NAVOT, N.; ANTIGNUS, Y.; COHEN, S.; ZAMIR, D. Tomato yellow leaf curl virus DNA forms in the viral capsid, in infected plants and in the vector. **Phytopathology**, v.125, p. 47-54, 1989.
- CZOSNEK, H.; LATERROT, H. A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. **Archives of Virology**, v. 142, p.1391-1406, 1997.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, p.19-21, 1983.
- DEVEREUX, J. HAERBERLI, P. SMITHIES, O. A comprehensive set of sequence analysis program for the VAX. **Nucleic Acids Research**, v.12, p. 387-395, 1984.
- DITTRICH, V.; UK, S.; ERNST, G. H. Chemical control and insecticide resistance in whiteflies. In: GERLING, D.,ed. **Whiteflies, their bionomics, pest status and management**.. Andover: Intercept, 1990.
- DUFFUS, J. E. Whitefly vectors: increasing threat to world agriculture. INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 19., 1992, Beijing. **Proceedings...** Beijin, China, 1992. p. 352.
- DUFFUS, J. E. Whitefly-borne viruses. In: GERLING, D.; MAYER, R. T., ed. : **Bemisia 1995: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management**. Andover: Intercept, 1996. p.255-263.
- FARIA, J. C.; SOUZA-DIAS, J. A. C. ; SLACK, S. A.; MAXWELL, D. P. A new geminivirus associated with tomato in the state of São Paulo, Brazil. **Plant Disease** 81: 423.1997, (Abstract).
- FAUQUET, C. M.; MAXWELL, D. P.; GRONENBORN, B.; STANLEY, J. Revised proposal for naming geminiviruses. **Archives of Virology** , v.145, n.8, p.1743-1761, 2000.
- FAUQUET, M. C.; MAYO, M. A. Abbreviations for plant virus names-1999. **Archives of Virology**, v. 144, n.6, p.1249-1272, 1999.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. 402p.

- FLINT, M. L. **Whiteflies in California**: a resource for cooperative extension: Statewide Integrated Pest Management Project. Gainesville: University of California 1995. 53 p. (UC IPM Publication, 19) .
- FNP Consultoria e Comércio (São Paulo, SP). Tomate para mesa, a prioritária exigência de qualidade. **Agriannual 2001**: anuário da agricultura brasileira, São Paulo. 2000. 545p.
- FONTES, E. P. B.; EAGLE, P. A.; SIPE, P. S.; LUCKOW, V. A. HANLEY-BOWDOIN, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n.11, p. 8459-8465, 1994.
- FRANÇA, F. H.; VILLAS-BÔAS, G. L.; CASTELO BRANCO, M. Ocorrência de *B. argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.25, n.2, p. 369-372, 1996.
- FRANCKI, R. B. I.; FAUQUET, C. M. KNUDSON, D. L.; BROWN, F. Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, 1991. Suplemento 2.
- FRIDMAN, V.; CZOSNEK, H. Delivery of cloned Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IS) DNA to eggs of Bemisia tabaci by bombardment and microinjection. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON *BEMISIA* AND GEMINIVIRAL DISEASES, 2., 1998, San Juan, Puerto Rico. **Program & Abstracts...** San Juan, 1998. p10.
- FRISCHMUTH, T.; ENGEL, M.; LAUSTER, S.; JESKE, H. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, Sida-infecting bipartite geminivirus in Central America. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2675-2682, 1997.
- FRISCHMUTH, T.; STANLEY, J. African cassava mosaic virus DI DNA interferes with replication of both genomic components. **Virology**, v.183, p. 539-544, 1991.
- GALVÃO, R.M.; J. A. ALMEIDA; CAMINI, N., ZERBINI, F. M.; FONTES, E. P. B. Molecular detection and biobalistic propagation of novel Malvaceae and tomato-infecting geminivirus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília v. 22, p. 335, 1997. Resumo.
- GHANIM, M.; CZOSNEK, H. Transmission of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IS) from whitefly to whitefly by copulation. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON *BEMISIA* AND GEMINIVIRAL DISEASES, 2., 1998, San Juan, Puerto Rico. **Program & Abstracts...** San Juan. 1998. P-11.
- GHANIM, M.; MORIN, S.; ZEIDAN, M; CZOSNEK, H. Evidence for transovarial transmission of Tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. **Virology** , v.240, p. 295-303, 1998.

- GILBERTSON, R. L.; HIDAYAT, S. H.; MARTINEZ, R. T.; LEONG, S. A.; FARIA, J. C.; MORALES, F.; MAXWELL, D. P. Differentiation of bean-infecting geminivirus by nucleic acid hybridization probes and aspects of bean golden mosaic in Brazil. **Plant Disease**, v.75, p. 336- 342, 1991b.
- GILBERTSON, R. L.; ROJAS, M. R.; RUSSELL, D. R.; MAXWELL, D. P. Use of the asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of bean golden mosaic geminivirus in the Dominican Republic. **Journal of General Virology**, v.72, p. 2843-2848, 1991c.
- GILBERTSON, R. L.; FARIA, J. C.; HANSON, S. F.; MORALES, F. J.; AHLQUIST, P.; MAXWELL, D. P.; RUSSELL, D. R. Cloning of the complete DNA genomes of four bean-infecting geminiviruses and determining their infectivity by electric discharge particle acceleration. **Phytopathology**, v. 81, p. 980-985, 1991a.
- GILBERTSON, R. L.; HIDAYAT, S. H., PAPLOMATAS, E. J.; ROJAS, M. R.; HOU, Y.; MAXWELL, D. P. Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminivirus. **Journal of General Virology**, v.74, p.23-31, 1993.
- GILBERTSON, R. L.; SUDARSHAN, M. R.; WANG, H. L.; LUCAS, W. J. Illuminating the cell-to-cell and long-distance movement of a bipartite geminivirus. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON *BEMISIA* AND GEMINIVIRAL DISEASES, 2., 1998, San Juan, Puerto Rico. **Program & abstracts...** San Juan, 1998. p. L-63.
- GILL, R. J. A review of the sweetpotato whitefly in southern California. *Pan-Pacific Entomologist* 68: 144-152, 1992.
- GIORDANO, L. B.; B.; SILVA, J.B.C; BARBOSA, V. Escolha de cultivares e plantio. In: SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L. B., org. **Tomate para processamento industrial**. Brasília: EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia / EMBRAPA-Hortaliças, 2000. p.36-57.
- HAI, F.N.P.; ALENCAR, J. A.; LIMA, M.F. **Mosca branca**: danos, importância econômica e medidas de controle. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 1996. 9p. (EMBRAPA CPATSA. Documentos, 83).
- HAI, F.N.P.; ALENCAR, J. A.; LIMA, M.F.; MATTOS, M. A. A.; HONDA, O. T.; HAI, A. T. **Avaliação de produtos para controle da mosca branca (*Bemisia spp.*) na cultura do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 1997. 6p. (EMBRAPA CPATSA. Pesquisa em andamento, 84).
- HALEY, A. RICHARDSON, K. ZHAN, X.; MORRIS, B. Mutagenesis of the BC1 and BV1 genes of Africa cassava mosaic virus identifies conserved amino acids that are essential for spread. **Journal of General Virology**, v. 76, p.1292-1298, 1995.

- HANSON, S. F.; MAXWELL, D. P. *Trans*-Dominant inhibition of geminiviral DNA replication by Bean Golden Mosaic geminivirus *rep* gene mutants. **Phytopathology**, v. 89, p.480-486, 1999.
- HARRISON, B. D. Advances in geminivirus research. **Annual Review of Phytopathology** v.23, p. 55-82, 1985.
- HARRISON, B. D.; BARKER, H.; BOCK, K. R.; GUTHRIE, E. J.; MEREDITH, G.; ATKINSON, M. Plant viruses with circular single-stranded DNA. **Nature**, v. 270, p. 760-762, 1977.
- HARRISON, B. D.; LIU, Y. L.; KHALID, S.; HAMEED, S.; OTIM-NAPE, G. W.; ROBINSON, D. J. Detection and relationships of cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan. **Annual Applied of Biology**, 130: 61-75, 1997.
- HATTA, T.; FRANCKI, R. I. B. The fine structure of Chlorosis striate mosaic virus. **Virology**, v.92, p. 428-435, 1979.
- HENNEBERRY, T. J.; TOSCANO, N. C. CASTLE, S.J. *Bemisia* spp. (Homoptera: Aleyrodidae) in the United States, pest status and management. **Recent Research Development Entomology**, v.2, p.151-161, 1998.
- HILJE, L. Un enfoque preventivo para el manejo sostenible del complejo mosca blanca-geminivirus en tomate. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO E DO CARIBE SOBRE MOSCAS BRANCAS E GEMINIVIRUS, 8., 1999, Recife. **Anais [e] mini-resumos...** Recife: IPA, 1999. p.27-44.
- HILJE, L. Introduccion. In: **Metodologias para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus**. Turrialba: CATIE, 1996. p. vii-xv (Serie Materiales de Ensenanza, 37).
- HOEFERT, L. L. Association of squash leaf curl virus with nuclei of squash vascular cells. **Phytopathology**, v. 77, p.1596- 1600, 1987.
- HÖFER, P.; BEDFORD, I. D. MARKHAM, P. G.; JESKE, H.; FRISCHMUTH, T. Coat protein gene replacement results sin whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. **Virology**, v. 236, p. 288-295, 1997a.
- HÖFER, P.; ENGEL, M.; JESKE, H.; FRISCHMUTH, T. Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. **Journal of General Virology**, v. 78, p.1785-1790, 1997b.
- HÖNG, Y. G.; ROBINSON, D. J.; HARRISON, B. D. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted geminiviruses in cassava. **Journal of General Virology**, v.74, p. 2437-2443, 1993.

- HOU, Y. GILBERTSON, R. L. Increase pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. **Journal of Virology**, v.70, n.8, p.5430-5436, 1996.
- HOU, Y.; PAPLOMATAS, E. J.; GILBERTSON, R. L. Host adaptation and replication properties of two bipartite geminiviruses and their pseudorecombinants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, p. 208-217, 1998.
- HULL, R.; FAUQUET, C. M.; GERGERICH, R. C.; LOMMEL, S. A.; THOTAPILLY, G. Genus *Sobemovirus*. In: VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M., MANILOFF, J.; MAYO, M. A., McGEOCH, D. J., PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B., eds. **Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 764-769.
- HUNTER, W. B.; HIEBERT, E.; WEBB, S. E.; TSAI, J. H. POLSTON, J. E. Location of geminivirus in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Plant Disease**, v. 82, p.1147-1151, 1998.
- IDRIS, A. M.; BROWN, J. K. *Sinaloa tomato leaf curl* geminivirus: biological and molecular evidence for a new subgroup III virus. **Phytopathology**, v. 88, p. 648-657, 1998.
- INGHAM, D. J.; LAZAROWITZ, S. G. A single missense mutation in the BR1 movement protein alters the host range of Squash leaf curl geminivirus. **Virology**, v.196, p. 694-702, 1993.
- JOHNSON, M. W., TOSCANO, N. C. REYNOLDS, H. T.; SYLVESTER, E. S.; KIDO, K.; NATWICK, E. T. Whiteflies cause problems for southern California growers. **California Agriculture**, v. 36, p. 24-26, 1982.
- KLUTE, K. A.; NADLER, S. A.; STENGER, D. C. Horseradish curly top virus is a distinct subgroup II geminivirus species with rep and C4 genes derived from a subgroup III ancestor. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 1369-1378, 1996.
- KRAUSE, R.; FERNANDES, J. J.; AVILA, A. C.; BEZERRA, I. C.; RIBEIRO, S. G.; RESENDE, R. O. ; LIMA, M. F.; FONTES, E. P. B.; ZERBINI, F. M. Widespread occurrence of tomato geminivirus in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON *BEMISIA* AND GEMINIVIRAL DISEASES, 2., 1998, San Juan, Puerto Rico. **Program & abstracts...** San Juan, 1998. P-46.
- LASTRA, R. Los geminivirus: un grupo de fitovirus com características especiales. IN: TALLER CENTROAMERICANO Y DEL CARIBE SOBRE MOSCAS BLANCAS, 1992, Turrialba, **Memorias...** Turrialba: CATIE, 1993. p. 16-19. (CATIE. Série Técnica. Informe Técnico, 205).

- LAZAROWITZ, S. G. Geminiviruses: genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 11, n.4, p. 327-349, 1992.
- LIMA, J. A. A.; GONÇALVES, M. F.B.; OLIVEIRA, V. B.; TORRES-FILHO, J.; MIRANDA, A. C. M. M. Serological and PCR detection of a Begomovirus infecting tomato plants fields in Ibiapaba Mountain, Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília v.24, p.104-108. 2000a.
- LIMA, L. H. C.; CAMPOS, L.; NÁVIA, D.; OLIVEIRA, M. R. V. Estudo da variabilidade genética da mosca branca *Bemisia* spp (Hemiptera: Aleyrodidae) no Brasil. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO E DO CARIBE SOBRE MOSCAS BRANCAS E GEMINIVIRUS, 8., 1999, Recife. **Anais [e] mini-resumos...** Recife: IPA, 1999a. p.114.
- LIMA, L. H.C.; NÁVIA, D.; INGLIS, P. W.; OLIVEIRA, M. R. V. Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n.4, p.1-5, 2000b.
- LIMA, M. F. ; BEZERRA, I. C.; RIBEIRO, S. G.; ÁVILA, A. C. Distribuição de geminivirus em tomateiro no Submédio do Vale São Francisco. In: ENCONTRO LATINO -AMERICANO E DO CARIBE SOBRE MOSCAS BRANCAS E GEMINIVIRUS, 8., 1999, Recife. **Anais...** Recife: IPA, 1999b. p.93.
- LIMA, M. F.; BEZERRA, I. C.; RIBEIRO, S. G.; AVIAL, A. C. Distribuição de geminivírus nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale do São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 81-85, 2001.
- LIU, H.; BOULTON, M. I. DAVIES, J. W. Maize streak virus coat protein binds single- and double DNA in vitro. **Journal of General Virology**, v.78, p.1265-1270, 1997.
- LIU, L. PINNER, M. S.; DAVIES, J. W.; STANLEY, J. Adaptation of the geminivirus bean yellow dwarf virus to dicotyledonous involves both virion-sense and complementary-sense genes. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 501-506, 1999.
- LIU, S. BEDFORD, I. D.; BRIDDON, R. W. MARKHAM, P. G. Efficient whitefly transmission of African cassava mosaic geminivirus requires sequences from both genomic components. **Journal of General Virology**, v. 78, p.1791-1794, 1997.
- LOTRAKUL, P.; VALVERDE, R. A.; CLARK, C. A. SIM, J.; DE LA TORRE, R. Detection of a geminivirus infecting sweet potato in the United States. **Plant Disease**, v. 82, p. 1253-1257, 1998.
- LOURENÇÃO, A. L.; NAGAI, HIROSHI. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v.53, n.1, p. 53-59. 1994.

- MAYO, M A.; MARTELL, G. P. New families and genera of plant viruses. **Archives of Virology** , v.133, p. 496-498, 1993.
- McGRATH P. F. HARRISON, B. D.. Transmission of tomato leaf curl geminiviruses by *Bemisia tabaci*: effects of virus isolate and vector biotype. **Annual Applied of Biology**, v.126, p. 307-316, 1995.
- MANSOUR, A.; AL-MUSA, A. Tomato yellow leaf curl virus: host range and virus-vector relationships. **Plant Pathology**, v. 41, p.122-125, 1992.
- MARKHAM, P. G.; BEDFORD, I. D. LIU, S.; FROLICH, D.; ROSELL; BROWN, J.K. The transmission of geminiviruses by biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius). In: GERLING, D.; MAYER, R.T., ed. **Bemisia 1995: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Managment**. Andover: Intercept, 1996. p.3-16.
- MATYIS, J. C.; SILVA, D. M. OLIVEIRA, A. R. COSTA, A. S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 1, p.267-275, 1975.
- MATTHEWS, R. E. F. Classification and nomenclature of viruses. **Intervirolgy**, v. 12, p.129-196, 1979.
- MATYIS, J. C.; SILVA, D. M.; OLIVEIRA, A. R. ; COSTA, A. S. Purificação e morfologia do vírus do moaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopatologica**, Piracicaba, v.1, p. 267-274, 1975.
- MAYO, M. A.; HORZINEK, M. C. A revised version of the international code of virus classification and nomenclature. **Archives of Virology**, v. 143, p.1645-1654, 1998.
- MAYO, M. A.; PRINGLE, C. R. Virus taxonomy: 1997. **Journal of General Virology**, v.79 p.649-657, 1998.
- METHA, P.; WYMAN, J. A.; NAKHLA, M. K.; MAXWELL, D. P. Polymerase chain reaction detection of viruliferous *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) with two tomato-infecting geminiviruses. **Journal of Economic Entomology**, v.87, n.5, p. 1285-1290, 1994 a.
- METHA, P.; WYMAN, J. A.; NAKHLA, M. K.; MAXWELL, D. P. Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Journal of Economic Entomology**, v.87, n.5, p. 1291-1297, 1994b.
- MOUND, L. A.; HALSEY, S. H. **Whitefly of the Word: A systematic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with host plant and natural enemy data**. New York: Wiley, 1978. 340p.

- MORALES, F. J. The emergence of whitefly-transmitted geminivirus as important pathogens of cultivated plants in Latin America In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON *BEMISIA* AND GEMINIVIRAL DISEASES, 2., 1998, San Juan, Puerto Rico. **Program & Abstracts...** San Juan, 1998. p. L-81 .
- MORALES, F.; NIESSEN, A.; RAMIREZ, B. CASTAÑO, M. Isolation and partial characterization of a geminivirus causing Bean dwarf mosaic. **Phytopathology**, v. 80, p. 96-101, 1990.
- MOREIRA, M. A. B.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. O. L.; MEDEIROS, R. D.; MATTIONI, J. A. Avaliação da infestação da mosca branca, *B. argentifolii* (Hemiptera: Aleyrodidae), sob diferentes cultivares/ linhagens da cultura da soja em Roraima. . In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO E DO CARIBE SOBRE MOSCAS BRANCAS E GEMINIVIRUS, 8., 1999, Recife. **Anais [e] mini-resumos...** Recife, PE: IPA 1999a. p.81.
- MOREIRA, M. A. B.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. O. L.; MEDEIROS, R. D. BARRETO, M. F. P.; SILVA SOBRINHO, J. F. Avaliação da incidência, sintomas e manejo da mosca branca, *B. argentifolii* (Hemiptera: Aleyrodidae) nas culturas do tomate e do melão no Rio Grande do Norte. . In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO E DO CARIBE SOBRE MOSCAS BRANCAS E GEMINIVIRUS, 8., 1999, Recife. **Anais [e] mini-resumos...** Recife, PE: IPA, 1999b. p.80.
- MOREIRA, M. A.; MEDEIROS, R. D.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. O. L.; CHAGAS, M. C. M.; BARRETO, M. F. P.; SILVA SOBRINHO, J. F. Ocorrência de plantas nativas como hospedeiros alternativos da mosca branca, (*Bemisia argentifolii*) (Homoptera: Aleyrodidae), no Rio Grande do Norte. IN: ENCONTRO LATINO-AMERICANO E DO CARIBE SOBRE MOSCAS BRANCAS E GEMINIVIRUS, 8., 1999, Recife. **Anais [e] mini-resumos...** Recife, PE: IPA, 1999c. p.144.
- MORENO, L. L. V. Mosca blanca-geminivirus en el Caribe: estado actual y perspectivas. . In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO E DO CARIBE SOBRE MOSCAS BRANCAS E GEMINIVIRUS, 8., 1999, Recife. **Anais [e] mini-resumos...** Recife, PE: IPA, 1999. p.45-58.
- MORIN, S.; GHANIM, M; ZEIDAN, M; CZOSNEK, H; VERBEEK, M; VAN DEN HEUVELT, F.J.M. A Groel homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. **Virology**, v.256, p. 75-84, 1999.
- MOROZOV, S. & SOLOVYEV, A. Genome organization in RNA viruses. In: MANDAHAR, C. L., ed. **Molecular biology of plant viruses**. Boston: Kluwer, 1999. p. 281.
- MORRA, M. R.; PETTY, T. D. Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. **The Plant Cell**, v.12, p. 2259-2270, 2000.

- MORRIS, B. A. M.; RICHARDSON, K. A.; HALEY, A.; ZHAN, X.; THOMAS, J. E. The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA component of Tobacco yellow dwarf virus reveals features of geminivirus infecting monocotyledonous plants. **Virology**, v. 187, p. 633-644, 1992.
- MUMFORD, D L. Purification of beet curl top virus. **Phytopatology**, v. 64, p. 136-139, 1974.
- MUNIYAPPA, V. VENKATESH, H. M.; RAMAPPA, H. K.; KULKARNI, R. S.; ZEIDAN, M. TARBA, C. Y.; GHANIM, M. CZOSNEK, H. *Tomato leaf curl virus* from Bangalore (ToLCV-Band4); sequence comparison with Indian isolates, detection in plants and insects, and vector relationships. **Archives of Virology**, v.145, p.1583-1598, 2000.
- NAKHLA, M. K.; ROJAS, M. R.; McLAUGHLIN, W.; WYMAN, J.; MAXWELL, D. P. ; MAZYAD, H. M. Molecular characterization of tomato yellow leaf curl virus from Egypt. **Plant Disease**, v.76, n.5, p. 538, 1992.
- NATHESAN, H. M.; MUNIYAPPA, V. SWANSON, M. M.; HARRISON. Host range, vector and serological relationships of cotton leaf curl virus from southern India. **Annual Applied Biology**, v. 128, p. 233-244, 1996.
- NAVOT, N.; BER, R.; CZOSNEK, H. Rapid detection of tomato yellow leaf curl virus in squashes of plants and insect vectors. **Phytopathology**, v. 79, p. 562-568, 1989.
- NAVOT, N.; PICHERSKY, E.; ZEIDAN, M.; ZAMIR, D.; CZOSNEK, H. Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. **Virology**, v. 185, p.151-161, 1991.
- NORMAN Jr., W.; RIDLEY, D. G.; STANSLY, P. A.; ELLSWORTH, P. C.; TOSCANO, N. C. Management of silverleaf whitefly: a comprehensive manual on the biology, economic impact and control tactics. Washington, DC: [s.n.], 1997.13p.
- NOUEIRY, A. O.; LUCAS, W. J.; GIBERTSON, R. L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell** , v.76, p. 925-932, 1994.
- OLIVEIRA, M. R. V; FARIA, M. R. **Mosca branca do complexo *Bemisia tabaci* (*Gennadius*) (*Hemiptera*, *Aleyrodidae*): bioecologia e medidas de controle na agricultura brasileira**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 111 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 48).
- OLIVEIRA, M. R. V.; LIMA, L. H. C.; FERREIRA, L. T. **Análise eletroforética de populações da mosca branca, *Bemisia tabaci* raça B (= *B. argentifolii*) (*Homoptera*, *Aleyrodidae*)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Pesquisa em andamento, 11).1997.

- OLIVEIRA, M.R.V.; FERNANDES, E. R.; ROCHA, H.G.C. I. **Alternativas ao controle da mosca branca, *B.tabaci* raça B, em plantas de melão.** Brasília. EMBRAPA-CENARGEN 14p. (Pesquisa em Andamento, 23). 1999a.
- OLIVEIRA, M. R. V.; NÁVIA, D.; LIMA, L. H. C.; OLIVEIRA, M. A. S.; ICUMA, I. M.; CAMPOS, L.; FERNANDES, E. R. Monitoramento das populações de *B. tabaci* raça B (*B. argentifolii*), nas áreas produtoras de melão e melancia, em Mossoró, RN. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO E DO CARIBE SOBRE MOSCAS BRANCAS E GEMINIVIRUS, 8., 1999, Recife. **Anais [e] mini-resumos...** Recife: IPA, 1999b. p.134.
- PADIDAM, M. BEACHY, R.N.; FAUQUET, C. M. Classification and identification of geminivirus using sequence comparisons. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 249-263, 1995.
- PADIDAM, m. BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. M. The role of AV2 ("precoat") and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. **Virology**, v. 224, p. 390-404, 1996.
- PADIDAM, M.; MAXWELL, D. P.; FAUQUET, C. M. A proposal for naming geminiviruses **Archives of Virology**, v.142, n.12, p. 2553-2562, 1997.
- PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C. M. Possible emergence of new geminivirus by frequent recombination. **Virology**, v.265, p. 218-225, 1999.
- PALMER, K. E.; RYBICKI, E. P. The molecular biology of *Mastrevirus*. **Advances in Virus Research**, v.50, p.183-234, 1998.
- PALANICHELVAN, K.; KUNIK, T.; CITOVSKEY, V.; GAFNI, Y. The capsid protein of tomato yellow leaf curl virus binds cooperatively to single-stranded DNA. **Journal of General Virology**, v.79, p. 2829-2833, 1998.
- PAPLOMATAS, E. J. PATEL, V. P.; HOU, Y. M.; NOUERY, A. O.; GILBERTSON, R. L. Molecular characterization of a new sap-transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. **Phytopathology**, v. 84, p.1215-1224, 1994.
- PASCAL, E. SANDERFOOT, A. A.; WARD, B. M.; MEDVILLE, R. TURGEON, R.; LAZAROWITZ, S. G. The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. **Plant Cell**, v. 6, p.995- 1006, 1994.
- PERRING, T. M., COOPER, A.; KAZMER, D. J. SHIELDS, C.; SHIELDS, J. New strain of sweetpotato whitefly invades California vegetables. **California Agriculture**, v.45, p.10-12, 1991.
- PERRING, T. M., COOPER, A.; KAZMER, D. J. Identification of the poinsettia strain of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on broccoli by electrophoresis. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, n.4, p.1278-1284, 1992.

- PERRING, T. M. Biological differences of two species of *Bemisia* that contribute to adaptative advantage. In: GERLING, D.; MAYER, R.T., eds. ***Bemisia 1995***: taxonomy, biology, damage, control and management. Andover: Intercept, 1996. p.3-16.
- PERRING, T. M.; COOPER, A; RODRIGUEZ, R. J.; FARRAR, C. A.; BELLOWS JUNIOR, T. S. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. **Science** v.259, p.74-77, 1993.
- PETTY, I. T. D.; MILLER, C. G.; MEADE-HASH, T. J.; SCHAFFER, R. L. Complementable and noncomplementable host adaptation defects in bipartite geminivirus. **Virology** , v.212, p. 264- 268, 1995.
- PHAM, T., FROHLIC, D. R.; ROSSELL, R. C. Identification of proteolytic activity in *Bemisia tabaci* B type (Homoptera: Aleyrodidae). In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21.; BRAZILIAN CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 18., 2000, Foz do Iguassu, PR. **Abstracts...** Londrina: SEB/EMBRAPA Soja, 2000. p. 80.
- PICÓ, B.; DIEZ, M.J.; NUEZ, F. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II Tomato yellow leaf curl virus-a review. **Scientia Horticulturae**, v. 67, p.151-196, 1996.
- POOMA, W., PETTY, I.T.D. Tomato golden mosaic virus open reading frame AL4 is genetically distinct from its C4 analogue in monopartite geminiviruses. **Journal of General Virology**, v.77, p.1947-1951, 1996.
- POOMA, W. GILLETTE, W. K.; JEFREY, J. L.; PETTY, I.T.D. Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus systemic movement. **Virology**, v. 218, p.264-268, 1996.
- POLSTON, J. E.; AL-MUSA,A.; PERRING, T. M.; DODDS, J.A. Association of the nucleic acid of Squash leaf curl geminivirus with the whitefly *Bemisia tabaci* . **Phytopathology** v.80, p. 850-856, 1990.
- POLSTON, J. E.; ANDERSON, P. A. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. **Plant Disease**, v. 81, p.1358-1369, 1997.
- POLSTON, J. E.; McGOVERN, R. J.; BROWN, L. G. Introduction of Tomato yellow leaf curl virus in Florida and implications for the spread of this and other geminivirus of tomato. **Plant Disease**, v. 83, n.11, p. 9084-988, 1999.
- RESENDE, R.O.; CUPERTINO, F.P. Doenças causadas por vírus em tomateiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.184, p. 19-27, 1996.
- RESENDE, E.A. FIGUEIRA, F.A.R.; ZERBINI, F. M. ZAMBOLIM, E.M. FERNANDES, J.J; GILBERTSON, R. Tomato infected with geminivirus under greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília v.21, p. 214, 1996. Resumo.

- REZENDE, E. A.; FILGUEIRA, F. A. R.; ZERBINI, F. M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; FERNANDES, J. J.; GILBERTSON, R. L. Widespread occurrence of tomato geminivirus in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease**, v. 82, p.830, 1998. Resumo.
- RIBEIRO, S. G.; ÁVILA, A. C.; BEZERRA, I. C.; FERNANDES, J. J.; FARIA, J. C.; LIMA, M.F.; GILBERTSON, R. L.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZERBINI, F. M. Widespread occurrence of tomato geminivirus in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease**, v.82, p. 830, 1998.
- RIBEIRO, S. G.; BEZERRA, I. C.; LIMA, M. F.; ÁVILA, A. C.; GIORDANO, L. B. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia.. ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 8., 1996, São Lourenço, MG. **Programa e Resumos...** São Lourenço: A Sociedade, 1996. p. 290.
- RIBEIRO, S. G.; AMBROZEVÍCIUS, L. P.; ÁVILA, A. C.; CALEGARIO, R. F.; FERNANDES, J. J.; LIMA, M. F. MELLO, R. N., ROCHA, H. C. G.; ZERBINI, F. M. Distribution and diversity of tomato-infecting geminivirus in Brazil. **Phytopathology**, 2001. Submetido para publicação.
- RILEY, D. G.; PALUMBO, J. C. Interaction of silverleaf whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) with cantaloupe yield. **Journal of Economic Entomology**, v.88, n.6, p.1726-1732, 1995.
- ROBLEDO, C.T.; SAGAHÓN, J. C. R. Campaña contra la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae) en Mexico. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO E DO CARIBE SOBRE MOSCAS BRANCAS E GEMINIVIRUS, 8., 1999, Recife. **Anais [e] mini-resumos ...** Recife: IPA, 1999. p.165-174.
- ROCHA, H.G.C. **Caracterização de três isolados de geminivirus transmitidos por mosca branca (*Bemisia argentifolii* Bellows e Perring) infectando tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) na região do Submédio do São Francisco.** 1999. 78p. Tese (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, UNB, Brasília- DF.
- ROJAS, M. R.; NOUEIRY, A. O.; LUCAS, W. J.; GILBERTSON, R. L. Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. **Cell** v.95, p.105-113, 1998.
- ROJAS, M. R. ; GILBERTSON, R. L.; RUSSEL, D. R.; MAXWELL, D. P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminivirus. **Plant Disease**, v. 77, p.340-347, 1993.
- ROM, M.; ANTIGNUS, Y.; GIDONI, D.; PILOWSKY, M.; COHEN, S. Accumulation of Tomato yellow leaf curl virus DNA in tolerant and susceptible tomato lines. **Plant Disease**, v. 77, p. 253-257, 1993.

- ROSSELL, R.C. TORRES-JEREZ, I.; BROWN, J. K. Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph, and honeydew. **Phytopathology**, v.89, p. 239-246, 1999.
- ROYE, M. E. McLAUGHLIN, W. A.; NAKHLA, M. K.; MAXWELL, D. P. Molecular characterization of geminiviruses from Jamaica. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON *BEMISIA* AND GEMINIVIRAL DISEASES, 2., 1998, San Juan, Puerto Rico. **Program & abstracts...** San Juan, 1998. P-64.
- RUBINSTEIN, G. CZOSNEK, H. Long-term association of Tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2683-2689, 1997.
- RYBICKI, E. P. A phylogenetic and evolutionary. justification for tree genera of Geminiviridae. **Archives of Virology**, v. 139, p. 49-78, 1994.
- RYBICKI, E. P. A proposal for naming geminiviruses: a reply by the Geminiviridae study group chair. **Archives of Virology**, v. 142, p.421-424, 1998.
- SALGUERO, V. Perspectivas para el manejo del complejo mosca blanca-virosis. In TALLER CENTROAMERICANO Y DEL CARIBE SOBRE MOSCAS BLANCAS, 1992, Turrialba, **Memorias...** Turrialba: CATIE, 1993. p. 20-26. (CATIE. Série Técnica. Informe Técnico, 205).
- SANTOS, C. D. G.; BEZERRA, I. C.; ÁVILA, A. C.; RESENDE, R. O. Occurrence of geminivirus in tomato crops in the state of Goiás. **Journal of Brazilian Society for Virology**, v.3, p.144, 1998a. Resumo
- SANTOS, C.D.G; RESENDE, R. O.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C. Círculo parcial de hospedeiros do geminivírus de tomateiro do Distrito Federal determinado por transmissão mecânica e pelo vetor *Bemisia argentifolii*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 325, 1998b. Suplemento.
- SCHAFFER, R., MILLER, C. G.; PETTY, IAN T. D. Virus and host-specific adaptations in the BL1 and BR1 genes of bipartite geminiviruses. **Virology**, v. 214, p. 330-338, 1995.
- SCHUSTER, D. J.; EVERETT, P. H.; PRICE, J. F. KRING, J. B. Suppression of the sweetpotato whitefly on commercial fresh market tomatoes. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 102, p. 374- 379, 1989.
- SCHUSTER, D. J.; KRING, J. B; PRICE, J. F. Association of the sweetpotato whitefly with a disorder of squash. **HortScience** , v.26, p. 155-156, 1991.
- SHUKLA, D. D.; WARD, C. W. Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. **Journal of General Virology** v.106, p.171-200, 1988.

- SHUKLA, D. D., WARD, C. W. & BRUNT, A. A. **The Potyviridae**. Cambridge: CAB International, 1994. 516p
- SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L. B. Produção mundial e nacional: SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L. B., org.. **Tomate para processamento industrial**. Brasília: EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia / EMBRAPA-Hortaliças, 2000. p.8-11.
- SINISTERRA, X. H., POLSTON, J. E.; ABOUZID, A. M. HIEBERT, E. Tobacco plants transformed with a modified coat protein of tomato mottle Begomovirus show resistance to vírus infection. **Phytopathology**, v.89, p.701-706, 1999.
- SOUZA-DIAS, J. A. C.; YUKI, V. A.; RIBEIRO, S. G.; RAVAGNANE, V. A. Risca amarela da nervura do tomateiro é causada por geminivirus que infecta a batata. **Summa Phytopathologica**, v.22, p.57, 1996. Resumo.
- SUNTER, G.; BISARO, D. M. Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (Trap): evidence for activation and derepression mechanisms. **Virology**, v. 232, p.269- 280, 1997.
- TIMMERMANS, M. C. P.; PREM DAS, O.; MESSING, J. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p.79-112, 1994.
- TORRES-PACHECO, I.; GARZON-TIZNADO, J. A.; HERRERA-ESTRELLA, L.; BUSTAMANTE, R. F. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus analysis and comparison with bipartite geminivirus . **Journal of General Virology**, v.74, p. 2225-2231, 1993.
- TSAI, J. H.; WANG, K. Development and reproduction of Bemisia argentifolii (Homoptera:Aleyrodidae) on five host plants. **Environmental Entomology**, v.25, n.4, p.810-816, 1996.
- VALAND, G. B.; MUNIYAPPA, V. Epidemiology of tobacco leaf curl virus in India. **Annual Applied of Biology**, v.120, p.257- 267, 1992.
- VASCONCELOS, S. D.,BEZERRA, M. S., OLIVEIRA, D. L. Ocorrência de predadores associados à mosca branca *Bemisia tabaci* raça B (=B. *argentifolii*) em plantas invasoras do semi-árido. . In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO E DO CARIBE SOBRE MOSCAS BRANCAS E GEMINIVIRUS, 8., 1999, Recife. **Anais [e] mini-resumos ...** Recife: IPA, 1999. P.142.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V.; BISHOP, D. H. L.; FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J. CALISHER, C. H. Guidelines to the demarcation of vírus species. **Archives of Virology**, v.142, n. 7, p.1505-1518, 1997.

- VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E. ; ESTES, M. K.; LEMON, S.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; McGEOCH, D.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. **Virus Taxonomy**: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York: Academic Press, 2000. 1121p.
- VILLAS-BÔAS, G. L. **Caracterização molecular da mosca branca, *Bemisia argentifolii*, Bellows e Perring, 1994 (Homoptera: Aleyrodidae) e determinação do potencial biótico da plantas hospedeiras: abobrinha, poinsetia, repolho e tomate**. 2000. 170 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade de São Carlos, São Carlos.
- VILLAS-BÔAS, G. L.; FRANÇA, F. H. *Bemisia argentifolii* in Brazil: biology and characterization of geographical distribution. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON *BEMISIA* AND GEMINIVIRAL DISEASES, 2., 1998, San Juan, Puerto Rico. **Program & abstracts...** San Juan, 1998. P-30.
- VILLAS-BÔAS, G. L.; FRANÇA, F. H.; NEWTON, M. ELIAS, M. F. Predominância do biótipo B de mosca branca (*Bemisia argentifolii*) em diversos hospedeiros e regiões do Brasil. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO E DO CARIBE SOBRE MOSCAS BRANCAS E GEMINIVIRUS, 8., 1999, Recife. **Anais [e] mini-resumos ...** Recife: IPA, 1999. p.150.
- VON ARNIM, A; STANLEY, J. Determinants of Tomato golden virus symptom development located on DNA B. **Virology**, v.186, p.286-293, 1992.
- WANG, H. L.; GILBERTSON, R. L.; LUCAS, W.J. Spatial and temporal distribution of bean dwarf mosaic geminivirus in *Phaseolus vulgaris* and *Nicotiana benthamiana* **Phytopathology**, v. 86, p.1204-1214, 1996.
- WU, Z.C.; HU, J.S.; POLSTON, D. E.; ULMAN, D. E. ; HIEBERT, E. Complete nucleotide sequence of a nonvector-transmissible strain of *Abutilon* mosaic geminivirus in Hawaii. **Phytopathology**, v. 86, p. 608-613, 1996.
- WYATT, S. D.; BROWN, J. K. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate and polymerase chain reaction. **Phytopathology**, v. 86, p.1288-1293, 1996.
- YUKI, V. A.; LOURENÇÃO, A. L.; KUNIYUKI, H.; BETTI, J. A. Transmissão Experimental do vírus do mosaico dourado do feijoeiro por *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** , v.27, n.4, p. 675- 678, 1998.
- YOKOMI, R. K.; HOELMER, K. A.; OSBORNE, L. S. Relationships between the sweetpotato whitefly and squash silverleaf disease. **Phytopathology**, v.80, p.895-900, 1990.
- ZEIDAN, M.; CZOSNEK, H. Acquisition of Tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci*. **Journal of General Virology**, v.72, p. 2607-2614, 1991.

- ZERBINI, F. M.; FONTES, E. P. B.; AVILA, A. C.; BEZERRA, I. C. ;RIBEIRO, S. G. ; RESENDE, R. O.; LIMA, M. F.; FARIA J. C.; FERNADES, J. J. ; GOULART FILHO, L. R. The emergence of tomato geminivirus in Brazil: the need for a collaborative research effort. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON *BEMISIA* AND GEMINIVIRAL DISEASES, 2., 1998, San Juan, Puerto Rico. **Program & abstracts...** San Juan, 1998. p.L-106.
- ZERBINI, F. M.; ZAMBOLIM, E. M.; CARRIJO, I.V.; GILBERTSON, R. L. A new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Minas Gerais State, Brazil. **Phytopathology** v.86, p.S1-S2, 1996. Resumo.
- ZHOU, X.; LIU, Y. ROBINSON, D. J.; HARRISON, B. D. Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 915- 923, 1998a.
- ZHOU, X.; ROBINSON, D. J.; HARRISON, B. D. Types of variation in DNA A among isolates of East African cassava mosaic vírus from Kenya, Malawi and Tanzania. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 2835-2840, 1998b.
- ZUBIAUR, Y.M.; DE BLAS, C.; QUIÑONES, M.; CASTELLANOS, C.; PERALTA, E. L. ROMERO, J. Havana tomato virus, a new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Cuba. **Archives of Virology**, v.143, p.757-1772, 1998.
- ZUBIAUR, Y.M.; FONSECA, D.; QUINÔNES, M.; DEPESTRE, T. Presencia del TYLCV en *Phaseolus vulgaris* y *Phyllanthus amarus*: IN ENCONTRO LATINO-AMERICANO E DO CARIBE SOBRE MOSCAS BRANCAS E GEMINIVÍRUS,8., 1999, Recife, PE. **Anais [e] mini-resumos...** Recife: IPA, 1999. p.151.