

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**ASSOCIAÇÃO DE BEGOMOVÍRUS E CRINIVÍRUS COM *Bemisia tabaci*
ESPÉCIE NEW WORLD 2 E *Trialeurodes vaporariorum*.**

BRUNO ROSSITTO DE MARCHI

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP
Setembro – 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**ASSOCIAÇÃO DE BEGOMOVÍRUS E CRINIVÍRUS COM *Bemisia tabaci*
ESPÉCIE NEW WORLD 2 E *Trialeurodes vaporariorum*.**

BRUNO ROSSITTO DE MARCHI

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renate Krause-Sakate
Co-orientador: Dr. Julio Massaharu Marubayashi

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP
Setembro – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

D372a De Marchi, Bruno Rossitto, 1988-
Associação de begomovírus e crinivírus com *Bemisia tabaci* espécie New World 2 e *Trialeurodes vaporariorum* / Bruno Rossitto De Marchi. - Botucatu : [s.n.], 2014
ix, 71 f. : fots. color., grafs., ils. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2014

Orientador: Renate Krause-Sakate

Coorientador: Julio Massaharu Marubayashi

Inclui bibliografia

1. Mosca branca. 2. Fitopatologia. 3. Vírus. 4. Inseto como transmissor de doenças de plantas. I. Krause-Sakate, Renate. II. Marubayashi, Julio Massaharu. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ASSOCIAÇÃO DE BEGOMOVÍRUS E CRINIVÍRUS COM *Bemisia tabaci*
ESPÉCIE NEW WORLD 2 E *Trialeurodes vaporariorum*"

ALUNO: BRUNO ROSSITTO DE MARCHI

ORIENTADORA: PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE
COORIENTADOR: DR JÚLIO MASSAHARU MARUBAYASHI

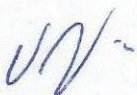
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE



PROF. DR. EDSON LUIZ LOPES BALDIN



PROF. DR. VALDIR ATSUSHI YUKI

Data da Realização: 26 de setembro de 2014.

"É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós, onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão. O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem saber ver."

Gabriel Garcia Marquez

*A meus pais Adriano e Rosane e meu irmão Adriano pelo imenso apoio e eterna
confiança.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Adriano F. De Marchi e Rosane A. Rossitto De Marchi, por todo o reconhecimento, confiança, amor e imenso apoio em todas as tomadas de decisões.

A meu irmão, Adriano F. De Marchi Jr., meu maior sinônimo de companheirismo e amizade.

A todos meus familiares, pela amizade e suporte que foi dado sempre que necessário.

À professora Renate Krause-Sakate, pela amizade, ensinamentos, orientações e imenso apoio ao longo de toda a minha formação.

A todos os professores do Departamento de Proteção Vegetal, pelos ensinamentos. Em especial aos Professores Marcelo A. Pavan e Edson Luiz Lopes Baldin, pela amizade, apoio e ensinamentos.

Aos companheiros do “grupo da mosca”, Dr. Valdir Atsushi Yuki, Julio Massaharu Marubayashi e Leonardo da Fonseca Barbosa. Obrigado pela grande amizade, apoio, ensinamentos e pela ótima companhia.

A todos os companheiros de laboratório de hoje e de ontem, Tatiana Mituti, David Spadotti, Daiana Bampi, Mônica Fecury, Denise Nozaki, Márcio M. Sanches, Kelly Rocha, Milena Leite, Késsia Pantoja, Cristiane Melo, Letícia Moraes, Gerson Suzuki, Leysimar Pitzr, Evelynne Urzedo, Marcelo Soman, Ricardo Gonçalves, Tadeu e João César. Agradeço a todos vocês pela amizade e pelos momentos compartilhados.

Aos estagiários, Maria Isabel M. Hoffmann, Luiz Fernando M. Watanabe e Gabriel Madoglio Favara, pela amizade, momentos compartilhados e pela ajuda imprescindível.

A todos os funcionários do Departamento de Proteção Vegetal por todo o apoio prestado, também ao Paulinho pela amizade e apoio.

Aos amigos de longa data, Rafael Bissacott, Pedro Sales, Marcos Paulo, Gustavo Forti, João Delevedove, Verônica Canuto, Livia Antunes. Obrigado pela amizade e companhia em todos os momentos.

A Maria José De Marchi, pela amizade, orientação profissional e apoio durante toda a graduação e mestrado.

Aos amigos da graduação que estiveram presentes durante o mestrado, Vinicius F. Canassa e Marina M. Gouvea. Obrigado pela amizade e apoio nos experimentos.

A Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” por todo o apoio institucional e disponibilidade da estrutura.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Mestrado.

A todos os produtores rurais que sempre nos receberam de portas abertas em suas propriedades ao longo das coletas.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS e TABELAS	IX
RESUMO	1
SUMMARY	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 <i>Bemisia tabaci</i>	7
2.2 Moscas-brancas do grupo New World.....	10
2.3 Principais características do gênero <i>Begomovirus</i>	12
2.3.1 <i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>	14
2.3.2 <i>Bean golden mosaic virus</i>	15
2.3.3 <i>Tomato severe rugose virus</i>	15
2.3.4 <i>Sida micrantha mosaic virus</i>	15
2.4 Principais características do gênero <i>Crinivirus</i>	15
2.4.1 <i>Tomato chlorosis virus</i>	17
2.5 <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	18
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO 1	
<i>Tomato chlorosis virus</i> found on tomatoes in Rio Grande do Sul State, Brazil associated with <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	28
ABSTRACT	29
RESUMO	31
INTRODUCTION	32
ACKNOWLEDGEMENTS	35
REFERENCES	36
CAPÍTULO 2	
<i>Bemisia tabaci</i> from the New World group carries begomoviruses commonly found on weed species.....	38
ABSTRACT	39
RESUMO	41
INTRODUCTION	42
ACKNOWLEDGEMENTS	45
REFERENCES	46
CAPÍTULO 3	
Transmissão de begomovírus e crinivirus por <i>Bemisia tabaci</i> espécie New World 2.....	48
RESUMO	49
1. INTRODUÇÃO	51
2. METODOLOGIA	53
3. Estabelecimento de um colônia pura de New World 2	53

SUMÁRIO

	Página
2.1 Extração do DNA total dos insetos.....	54
2.2 Análise do gene mtCOI.....	55
2.3 Detecção de begomovírus.....	55
2.4 Detecção de crinivírus.....	56
2.5 Sequenciamento.....	56
2.6 Ensaio de transmissão.....	56
4. RESULTADOS.....	59
3.1 Estabelecimento da colônia pura de New World 2.....	59
3.2 Obtenção e Manutenção dos Isolados Virais.....	59
3.3 Ensaio de Transmissão.....	60
3.3.1 <i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>	61
3.3.2 <i>Bean golden mosaic virus</i>	62
3.3.3 <i>Tomato severe rugose virus</i>	62
3.3.4 <i>Sida micrantha mosaic virus</i>	62
3.3.5 <i>Tomato chlorosis virus</i>	63
5. DISCUSSÃO.....	64
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	67
7. REFERÊNCIAS.....	68

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Figura 1 - Distribuição das espécies indígenas de <i>Bemisia tabaci</i> NW e NW2 nas Américas.....	11
Figura 2 - Características do gênero <i>Begomovirus</i>	13
Figura 3 - Características do gênero <i>Crinivirus</i>	17
 CAPÍTULO 1	
Figure 1: Tomato plants exhibiting symptoms of <i>Tomato chlorosis virus</i> in a greenhouse planting in Santa Maria county, Rio Grande do Sul State.....	33
Figure 2: Map of the southern region of Brazil bordering Argentina and Uruguay, countries which Tomato chlorosis virus has not been reported yet.....	34
 CAPÍTULO 2	
Table 1: Field samples of <i>Bemisia tabaci</i> from the New World group and the begomoviruses species present in the insect.....	44
 CAPÍTULO 3	
Figura 1: Gaiolas para a criação da população pura de <i>Bemisia tabaci</i> espécie NW2 em algodão.....	54
Figura 2: Tomate infectado com ToSRV no período de acesso à aquisição (PAA) e tomate sadio no período de acesso a inoculação (PAI).....	57
Figura 3: Isolados virais utilizados nos ensaios de transmissão.....	60
Figura 4: Eficiência de transmissão das espécies NW2 e MEAM1 em diferentes isolados virais.....	61
Figura 5: Ensaios de transmissão do <i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>	61

RESUMO

Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) é uma praga de grande importância, principalmente por ser vetora de fitovíruses. São insetos com alta variabilidade e formam um complexo de espécies divididas em 11 sub grupos, contendo pelo menos 36 espécies morfológicamente indistinguíveis. Destas espécies, apenas Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), Mediterranean (MED), New World (NW) e New World 2 (NW2) foram identificadas no Brasil até o momento. A espécie MEAM1 é reconhecida como a de maior distribuição mundial, enquanto que a espécie NW2 possui poucos estudos pelo fato de ter sido descrita recentemente. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar a importância da espécie NW2, encontrada em baixas populações, porém em diferentes regiões do Estado de São Paulo, como transmissora de begomovírus e crinivírus. Inicialmente foram realizadas coletas nos locais aonde já houve relatos anteriores da presença de NW2. As moscas-brancas coletadas em campo foram armazenadas em álcool 90% para identificação da espécie através da análise do gene mitocondrial (mtCOI) e identificação das possíveis espécies de begomovírus presentes nos insetos encontrados no campo. Outra parte dessas moscas foi conduzida à UNESP, Campus Botucatu para estabelecimento de uma colônia pura da espécie NW2, a fim de realizar os ensaios de transmissão que foram feitos paralelamente com as espécies MEAM1 e NW2 utilizando os begomovírus *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV); e o crinivírus *Tomato chlorosis virus* (ToCV). O BGMV e o ToSRV foram

transmitidos por MEAM1 e NW2 com alta eficiência. EuYMV foi transmitido com alta eficiência por NW2, enquanto que MEAM1 transmitiu este vírus com baixa eficiência. O crinivírus ToCV foi transmitido por NW2 com baixa eficiência e com alta eficiência por MEAM1. SimMV não foi transmitido por nenhuma das duas espécies. ToCV foi detectado pela primeira vez no Estado do Rio Grande do Sul, associado ao vetor *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae). ToCV é a única espécie de crinivírus relatada no Brasil, o qual havia sido relatado nas principais áreas de produção de tomate do Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Tomateiros com sintomas típicos de ToCV foram encontrados em cultivo protegido no município de Santa Maria – RS, associados com elevadas infestações de moscas-brancas, as quais foram posteriormente identificadas como *T. vaporariorum* através da análise do gene mtCOI. A presença do ToCV nos tomateiros foi confirmada por RT-PCR e por sequenciamento. Considerando que 100% das plantas apresentavam o sintoma da doença, conclui-se que *T. vaporariorum* é um vetor eficiente do ToCV e possui potencial para a dispersão desse vírus para outros países da América do Sul.

Palavras-chave: mosca-branca, nativa, indígena, fitoviroses, vetor

ASSOCIATION OF BEGOMOVIRUSES AND CRINIVIRUSES WITH *Bemisia tabaci* NEW WORLD 2 SPECIES AND *Trialeurodes vaporariorum*. Botucatu, 2014. 71p.

Dissertation (Master Degree in Agronomy/Plant Protection) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: BRUNO ROSSITTO DE MARCHI

Advisor: RENATE KRAUSE-SAKATE

Co-Advisor: JULIO MASSAHARU MARUBAYASHI

SUMMARY

Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) is a major agriculture pest, especially for being a vector of plant viruses. Whiteflies are insects with high variability forming a complex of species divided into 11 sub-groups containing at least 36 morphologically indistinguishable species. Among these species, only Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), Mediterranean (MED), New World (NW) and New World 2 (NW2) have been identified in Brazil up to date. MEAM1 species is recognized as the most spreaded in the world, while NW2 species has limited information because it has been recently described. Thus, this study aimed to evaluate the importance of NW2 species found in low populations, in different regions in Sao Paulo State, as a vector of begomoviruses and criniviruses. Samples were taken in places where NW2 species had been previously reported. The samples collected were stored in 90% alcohol for further species identification by analysis of the Mitochondrial Cytochrome

Oxidase (mtCOI) gene and analysis of the presence of begomoviruses in the insects. In addition, insects were collected and brought to UNESP, Botucatu for establishment of a pure NW2 colony in order to perform transmission assays using MEAM1 and NW2 species in parallel using the begomoviruses species *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) and *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV); and the crinivirus *Tomato chlorosis virus* (ToCV). BGMV and ToSRV were highly transmitted by both MEAM1 and NW2. EuYMV was highly transmitted by NW2, while MEAM1 transmitted EuYMV in low rates. The crinivirus ToCV was transmitted by NW2 in low rates while MEAM1 transmitted with high efficiency. Neither of the *B. tabaci* species transmitted SimMV. ToCV was detected for the first time in Rio Grande do Sul State, associated with *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae). ToCV is the only crinivirus species detected in Brazil and it has been reported in most important tomato producing areas from Southeastern and Central-Western Brazil. Tomato plants exhibiting the typical symptoms of ToCV were found in a greenhouse in Santa Maria, Rio Grande do Sul State associated with high infestation of whiteflies, which were later identified as *T. vaporariorum* by analysis of the mtCOI gene. The presence of ToCV on tomatoes leaves was confirmed by RT-PCR and nucleotide sequencing. This is the first report of ToCV in Rio Grande do Sul State. Since 100% of the plants exhibited characteristic ToCV symptoms we concluded that *T. vaporariorum* is an efficient vector of ToCV and can contribute for the dispersum of this virus for other countries in South America.

Key-words: whitefly, native, indigenous, plant viruses, vector

1. INTRODUÇÃO

As moscas-brancas são insetos que pertencem a ordem Hemiptera, família Aleyrodidae. Foram descritas aproximadamente 1300 espécies de moscas-brancas em mais de 120 gêneros distintos, dentre eles, apenas os gêneros *Bemisia* e *Trialeurodes* são vetores de vírus (JONES, 2003; MOUND; HALSEY, 1978). No gênero *Bemisia*, a única espécie capaz de transmitir vírus é *Bemisia tabaci* (Gennadius). *B. tabaci* é uma das principais pragas da agricultura mundial e foi listada dentre as 100 piores espécies invasoras em todo o mundo (LOWE *et al.*, 2000). É um inseto polífago que tem como hospedeira mais de 600 espécies diferentes de plantas. Em adição aos danos diretamente causados pela sucção do floema e excreção de “honeydew”, que serve como substrato para infecções de fungos (JONES *et al.*, 2008), *B. tabaci* também é vetora de mais de 200 espécies diferentes de fitovírus, sendo os begomovírus e crinivírus os de maior importância. No Brasil, o único crinivírus relatado até o momento é o *Tomato chlorosis virus* – ToCV (*Crinivirus*) (BARBOSA *et al.*, 2008). O ToCV foi primeiramente identificado em tomate, mas também infecta pimentão e batata (FREITAS *et al.*, 2012). É transmitido pelos gêneros *Bemisia* e *Trialeurodes* de forma semi-persistente (WISLER *et al.*, 1998). ToCV já foi relatado nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro (BARBOSA *et al.*, 2011). O primeiro relato de ToCV no Estado do Rio Grande do Sul e associado ao vetor *Trialeurodes vaporariorum* no Brasil está descrito no Capítulo 1.

B. tabaci foi recentemente classificada como um complexo de pelo menos 36 espécies distintas separadas em 11 grupos com base no gene mitocôndria citocromo oxidase (mtCOI) (DE BARRO *et al.*, 2011). Dentre essas espécies, quatro foram identificadas no Brasil, sendo duas espécies invasoras (MEAM1 e MED) e duas espécies nativas (NW e NW2). A espécie Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), comumente referida como biótipo B, é uma espécie exótica distribuída por todo o mundo e predominante no Brasil, sendo a de maior importância. A espécie Mediterranean (MED), também conhecida como biótipo Q, foi recentemente relatada no extremo sul do país (BARBOSA *et al.*, 2014a). As espécies nativas como a New World (NW), também referida como biótipo A e a New World 2 (NW2) não foram completamente deslocadas e continuam presentes, sendo encontradas principalmente em plantas daninhas (BARBOSA *et al.*, 2014b). A espécie NW2 foi recentemente descrita por ALEMANDRI *et al.*, 2012 na Argentina e Uruguai e relatada no Brasil por MARUBAYASHI *et al.*, 2012. O papel da NW2 como transmissora de begomovírus e crinivírus ainda é desconhecido. Deste modo, esse trabalho consistiu em identificar os begomovírus em amostras de NW2 encontradas no campo (descrito no Capítulo 2) e isolar uma população pura de NW2 para fazer ensaios de transmissão com alguns dos principais vírus transmitidos por *B. tabaci* com o objetivo de desvendar quais as espécies de vírus são transmitidas por NW2 (descritos no Capítulo 3).

Portanto, este trabalho foi dividido em três capítulos intitulados: 1) “*Tomato chlorosis virus* found on tomatoes in Rio Grande do Sul State, Brazil associated with *Trialeurodes vaporariorum*” redigido em inglês conforme as normas da revista *Tropical Plant Pathology*, 2) “*Bemisia tabaci* from the New World group carries begomoviruses commonly found on weed species” redigido em inglês conforme as normas da revista *Tropical Plant Pathology* e 3) “Transmissão de begomovírus e crinivírus pela *Bemisia tabaci* espécie New World 2”.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Bemisia tabaci*

Bemisia tabaci Genn. (Hemiptera: Aleyrodidae) foi primeiramente descrita em 1889 em tabaco na Grécia e denominada de *Aleyrodes tabaci* (PERRING, 2001, Apud GENNADIUS, 1889). Essa mosca-branca é uma das mais importantes pragas do século 20, sendo listada dentre as 100 piores espécies invasoras em todo o mundo (LOWE *et al.*, 2000).

Tem como característica ser cosmopolita e polífaga, tendo como hospedeiras mais de 600 espécies de plantas. Os danos causados podem ser diretos, através da sucção do floema e excreção de “honeydew”, que serve como substrato para desenvolvimento de fungos, geralmente do gênero *Capnodium* (JONES *et al.*, 2008), ou indiretos, através da transmissão de fitovírus. As moscas-brancas são vetoras de aproximadamente 200 espécies de vírus, compreendidas em cinco gêneros: *Begomovirus* (família Geminiviridae), *Crinivirus* (Closteroviridae), *Ipomovirus* (Potyviridae), *Carlavirus* (Betaflexiviridae) e *Torradovirus* (Secoviridae) (NAVAS-CASTILLO *et al.*, 2011; PERRING, 2001).

Quanto à morfologia, são insetos pequenos que medem de 1 a 2 mm, sendo as fêmeas ligeiramente maiores que os machos (NATESHAN *et al.*, 1996). Os adultos têm o dorso de coloração amarelo pálido e as asas brancas. Como suas asas cobrem quase todo o corpo, a cor predominante é o branco, sendo assim denominada de mosca-branca (TOSCANO *et al.*, 2002). O ciclo de vida é composto por três fases (ovo, estágio de ninfa e

adulto) e sofre influência das condições climáticas e ambientais, principalmente temperatura, umidade relativa do ar e planta hospedeira (GILL, 1990). As fêmeas chegam a ovipositar de 130 a 300 ovos durante o ciclo, dependendo de diversos fatores como a planta hospedeira e a temperatura (TOSCANO *et al.*, 2002). A reprodução é sexuada ou por partenogênese arrenótoca, na qual fêmeas não fecundadas resultam em ovos que darão origem à machos estéreis (GILL, 1990). A mosca-branca é encontrada principalmente nos trópicos e subtropicais, porém sua presença já foi descrita em todos continentes (BROWN, 2000). O aumento populacional está estritamente relacionado à expansão da monocultura da maioria das espécies cultivadas, às condições dos sistemas agrícolas modernos, ao aumento da utilização de agrotóxicos, selecionando populações resistentes e, principalmente, à fácil adaptação aos diversos hospedeiros (BROWN *et al.*, 1992).

O complexo *B. tabaci* é constituído de populações morfologicamente idênticas, mas que exibem variabilidade biológica quanto aos hospedeiros preferencialmente colonizados, polimorfismo genético, fecundidade, composição de procariotas endosimbiontes e capacidade de transmissão das diferentes espécies de vírus (BROWN *et al.*, 1995; FROHLICH *et al.*, 1999). Pelo sistema tradicional, foram caracterizadas cerca de 40 diferentes biótipos (UEDA; BROWN, 2006), dos quais apenas dois destes (biótipo A e B) haviam sido relatados no Brasil (RABELLO *et al.*, 2008).

Recentemente, estudos utilizando a análise do gene da mitocôndria cytochroma oxidase I (mtCOI) demonstraram que *B. tabaci* não é composta de biótipos e sim por um complexo de diferentes espécies (DINSDALE *et al.*, 2010; DE BARRO *et al.* 2011). Atualmente, são reconhecidas pelo menos 36 espécies distintas de *B. tabaci* separadas em 11 grupos. O limite definido para a separação dessas espécies foi estabelecido através da geração de uma distribuição de frequência baseada em todas as comparações de pares de distâncias genéticas que teve como resultado dois pontos na distribuição, um a 3.5%, que define os limites para as espécies e outro a 11%, que define o limite para os diferentes grupos. Uma sequência consenso para cada grupo foi então criada, permitindo que uma sequência desconhecida seja comparada com todas as sequências consensos. A partir da porcentagem de identidade entre a sequência desconhecida e as sequências consensos é possível designar a qual grupo e espécie pertence aquele indivíduo. Esses limites de espécies têm suporte em estudos de incompatibilidade de acasalamento ou inviabilidade da prole em cruzamentos entre

indivíduos de espécies diferentes (TAY *et al.*, 2012; ALEMANDRI *et al.*, 2012; DE BARRO *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2011).

No Brasil, até então já foram relatadas quatro espécies diferentes dentro complexo *B. tabaci*: Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), Mediterranean (MED), New World (NW) e New World 2 (NW2) (MARUBAYASHI *et al.*, 2012; BARBOSA *et al.*, 2014a).

A Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1) ou comumente referida na literatura como biótipo B é a de maior distribuição mundial. Foi detectada inicialmente em *Euphorbia pulcherrima* Willdenow (Euphorbiaceae) na Flórida, USA (COSTA; BROWN, 1990). MEAM1 foi detectada no Brasil no começo de 1990, provavelmente introduzida no país através do comércio internacional de plantas ornamentais (LOURENÇÃO; NAGAI, 1994) e está relacionada com o aumento vertiginoso da incidência de begomovírus principalmente em solanáceas a partir do início da década de 1990 (RIBEIRO *et al.*, 2003). Trata-se da espécie de *B. tabaci* predominante no Estado de São Paulo (MARUBAYASHI *et al.*, 2012). Mediterranean (MED), também referida como biótipo Q, tem ampla distribuição mundial e possui destaque por apresentar resistência a alguns grupos de inseticidas (HOROWITZ *et al.* 2005). MED foi relatada em países da América do Sul, como Uruguai e Argentina em 2010 (GRILLE *et al.* 2011). No Brasil, foi relatada em 2014, mas, aparentemente ainda está restrita ao Estado do Rio Grande do Sul (BARBOSA *et al.*, 2014a). No Brasil, também há a presença das moscas nativas do grupo New World, que foram deslocadas após a invasão da exótica MEAM1, porém, se encontram em alguns pontos isolados do país (BARBOSA *et al.*, 2014b).

Por muitos anos foi reconhecido que há diferenças nas taxas de transmissão de begomovírus quando se usa diferentes espécies de moscas-brancas como vetor (POLSTON *et al.*, 2013; BEDFORD *et al.*, 1994a; BIRD *et al.*, 1957; MCGRATH *et al.*, 1995). Entretanto, seria impossível identificar a espécie de mosca-branca utilizada nesses estudos pois grande parte deles foram publicados antes que fosse possível identificar os membros do complexo *B. tabaci*. Porém, a maioria deles demonstraram que quase não há especificidade na transmissão de espécies de begomovírus entre as diferentes espécies do complexo *B. tabaci*, e que a grande maioria, senão todos, os membros do complexo *B. tabaci* são capazes de transmitir a grande maioria, senão todas as espécies de begomovírus (BEDFORD *et al.*,

1994b). Entretanto, alguns estudos mostram diferenças de eficiência de transmissão entre os membros do complexo *B. tabaci* transmitindo o mesmo vírus. Por exemplo, sobre as mesmas condições, populações de MEAM1 e MED transmitem o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) com a mesma eficiência, enquanto que populações de Asia II-1 transmitem o mesmo vírus com a metade da eficiência de moscas de outros dois clados diferentes. Há outro exemplo onde NW foi capaz de transmitir o *Chino del tomate virus* com o dobro da eficiência de uma população de MEAM1 (IDRIS *et al.*, 2001). Foi mostrado que muitas dessas diferenças de eficiências estão relacionadas aos hábitos alimentares e preferências a plantas hospedeiras utilizadas na aquisição e transmissão (BEDFORD *et al.*, 1994b; JIANG *et al.*, 2004; JIANG *et al.*, 2000; MUNIZ *et al.*, 2000; SANCHEZ-CAMPOS *et al.*, 1999).

2.2 Moscas-brancas do grupo New World

O grupo de *Bemisia tabaci* classificado como New World compreende apenas duas espécies, New World (NW) e New World 2 (NW2) e ambas se encontram no Brasil. NW também referida como biótipo A, foi coletada pela primeira vez nos EUA em batata-doce. No Brasil o biótipo A teve seu primeiro relato possivelmente na Bahia em 1928, em *Euphorbia pulcherrima*, *Nicotiana glauca* Graham e *Nicotiana tabacum* L. (BONDAR, 1928). NW ainda está presente pelo menos na Argentina, Brasil, Martinica, México, EUA (Texas) e Venezuela. Enquanto que NW2 se encontra na Argentina, Bolívia e Brasil, como mostra a Figura 1.



Figura 1: Distribuição das espécies indígenas de *Bemisia tabaci* NewWorld e NewWorld2 nas Américas (Retirado de BARBOSA *et al.*, 2014b).

Plantas daninhas (*Euphorbia* sp. e *Ipomoea* sp.) são as principais hospedeiras das espécies nativas, porém elas também já foram relatadas em culturas de importância como tomate, soja, feijão e algodão (BARBOSA *et al.*, 2014b).

NW2 foi recentemente descrita por ALEMANDRI *et al.*, 2012 na Argentina e teve seu primeiro relato no Brasil em 2012, sendo até o momento identificada nos Estados de São Paulo e Alagoas (BARBOSA *et al.*, 2014b; MARUBAYASHI *et al.*, 2012). O papel da espécie NW2 como transmissora de vírus é desconhecido. No Brasil o primeiro relato de danos ocasionados pela mosca-branca ocorreu antes da chegada de espécies exóticas como MEAM1, sendo provavelmente causado por espécies nativas, que foram relatados na década de 1950 (FLORES *et al.*, 1960) e em 1975 quando foi descrito o primeiro begomovírus

caracterizado nas Américas, o *Tomato golden mosaic virus* (MATYS *et al.*, 1975). Após este período a incidência de begomovírus aumentou drasticamente em solanáceas na década de 90, coincidentemente com a entrada da espécie MEAM1, que é mais eficiente que a NW para colonizar solanáceas (FRANÇA *et al.*, 1996).

2.3 Principais características do gênero *Begomovirus* e da família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é constituída por espécies de vírus caracterizados estruturalmente pela morfologia geminada da partícula viral, com 18-30 nm e geneticamente por possuir uma (monopartidos) ou duas (bipartidos) moléculas de DNA circular de fita simples (ssDNA) encapsidado em partículas icosaédricas geminadas (STANLEY *et al.*, 2005). Cada uma das moléculas apresenta 2500-3000 nucleotídeos (nt) encapsidada por uma única proteína estrutural (proteína capsidial) que se arranja na forma de 22 capsômeros formando dois icosaedros incompletos que confere o aspecto geminado das partículas virais, característico desta família de vírus de plantas (BROWN *et al.*, 2011).

Segundo a classificação do Internacional Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2012) a família *Geminiviridae*, é composta por 7 gêneros: *Begomovirus*, *Becurtovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*. Estes gêneros são subdivididos com base no número de componentes do genoma, tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros e relacionamento filogenético.

O gênero *Begomovirus* é considerado o mais importante dentro da família, pelo alto número de espécies que causam infecção em plantas. Podem ser divididos em dois grandes grupos, os que possuem genoma monopartido (DNA-A) e os que possuem genoma bipartido (DNA-A e DNA-B) (Figura 2) (GUTIERREZ, *et al.*, 2004., STANLEY *et al.*, 2005).

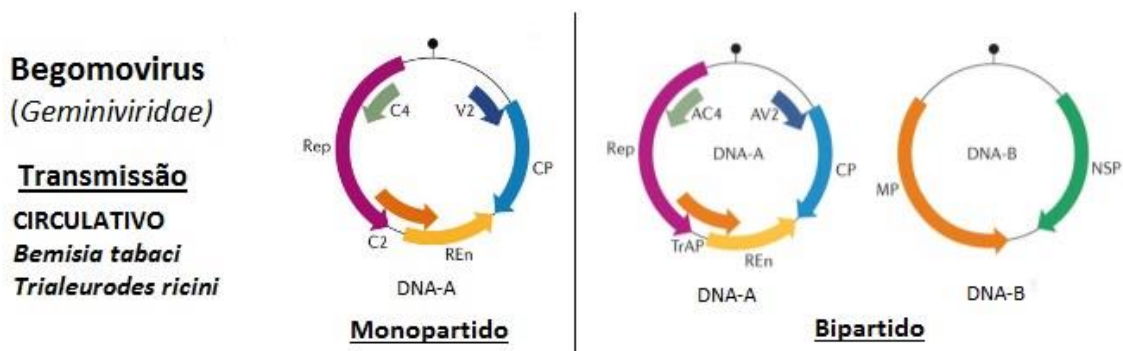


Figura 2: Gênero *Begomovirus*: modo de transmissão, espécies vetoras e mapa genômico de um begomovírus monopartido e um bipartido. Adaptado de Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013.

Neste gênero, encontram-se os vírus transmitidos por mosca-branca para dicotiledôneas. A transmissão desses vírus ocorre de maneira circulativa. A maioria das espécies de begomovírus apresentam dois componentes genômicos e ambos os componentes são essenciais para a infecção sistêmica eficiente do vírus na planta (STANLEY *et al.*, 2005). O DNA-A codifica todas as proteínas necessárias para a transcrição, replicação e encapsidação de ambos os DNAs, enquanto o DNA-B é responsável por funções de movimento do vírus na planta e desenvolvimento de sintomas (ROJAS *et al.*, 2005). Assim, o componente DNA-A codifica a CP (capa proteica ou AV1) no sentido viral e quatro proteínas no sentido complementar: Rep (“replication associated protein” ou AC1), responsável pela replicação de ambos os componentes (DNA A e DNA B); TrAP (“transcriptional activator protein” ou AC2), REn (“replication enhancer protein” ou AC3) e AC4, uma proteína a qual sua função ainda não foi identificada. O DNA-B codifica duas proteínas responsáveis pelo movimento e pela expressão de sintomas: a proteína NSP (“nuclear shuttle protein” ou BV1), no sentido viral, e outra no sentido complementar, a MP (proteína de movimento ou BC1). O tamanho dos dois componentes genômicos são parecidos e não compartilham identidade nas sequências, exceto por uma região altamente conservada (>90% de identidade nucleotídica) com aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada de região comum (RC) (FONTES *et al.*, 1994; GUTIERREZ, 2000). A transcrição dos genes virais em ambos os DNAs pode ocorrer tanto no sentido viral (5’ → 3’) quanto no sentido complementar (3’ → 5’).

A replicação ocorre através de uma forma replicativa de DNA fita dupla (dsDNA) utilizando o mecanismo ciclo rolante. A síntese de ssDNA viral é iniciada

quando a proteína Rep (“replication-associated protein”) cliva o DNA (A e B) na sequência TAATATT↓AC (nonanucleotídeo conservado entre os membros da família) localizada em uma estrutura em forma de “hairpin” dentro da região intergênica e auxilia na etapa de síntese de sequência. Os geminivírus não codificam uma DNA polimerase, fazendo com que sejam dependentes de fatores da hospedeira para sua replicação (ROJAS *et al.*, 2005).

Os *Begomovirus*, tradicionalmente eram divididos em dois grandes grupos, os originados do Novo Mundo (Américas - Hemisfério Ocidental) que correspondiam aos begomovírus bipartidos e os do Velho Mundo (Europa, Ásia e África – Hemisfério Oriental), monopartidos.

2.3.1 *Euphorbia yellow mosaic virus*

Euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV) é um begomovírus do Novo Mundo, que possui todas as características desse grupo, contendo um genoma bipartido, com dois componentes genômicos de DNA (DNA A e DNA B) de 2,6 kb. EuYMV é muito comumente encontrado na hospedeira *Euphorbia heterophylla*, uma planta daninha pertencente a família Euphorbiaceae que é vulgarmente conhecida por “leiteira” ou “amendoim-bravo”. *E. heterophylla* é considerada uma planta daninha de grande importância econômica no Brasil, causando problemas principalmente nas culturas da soja e do amendoim. (BRIDGES *et al.*, 1992; WILLARD *et al.*, 1993). Além do Brasil, ela também tem importância como planta daninha em outros 22 países tropicais e está presente em outros 37 países (WILSON 1981; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

EuYMV foi caracterizado por FERNANDES *et al.* 2011 no Brasil. Os sintomas característicos em *E. heterophylla* são de mosaico amarelado claro, o qual é capaz de infectar por biobalística plantas de *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana* e pimentão (*Capsicum annuum*).

Relatos de begomovírus infectando *Euphorbia* sp. na literatura são encontrados desde 1950 (COSTA *et al.*, 1950). O fato do relato ter ocorrido antes da entrada de MEAM1 no Brasil sugere que a transmissão era possivelmente realizada por espécies nativas de moscas-brancas.

2.3.2 *Bean golden mosaic virus*

Bean golden mosaic virus (BGMV) é o vírus causador do mosaico dourado do feijoeiro, principal doença viral do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) na América Latina (GÁLVEZ & MORALES, 1989). O BGMV pode causar perdas na produção que variam de 40 a 100%, sendo que a maior parte dessas perdas ocorre nas estações mais quentes do ano, quando a população do vetor aumenta e conseqüentemente ocorre uma maior transmissão do patógeno (MORALES & ANDERSON, 2001).

Os sintomas de BGMV em feijão podem variar de acordo com a região de origem dos isolados, mas de uma forma geral caracteriza-se por um notável mosaico verde-amarelo e pela atrofia e distorção no crescimento das plantas (MORALES & NIESSEN, 1988).

2.3.3 *Tomato severe rugose virus*

Tomato severe rugose virus (ToSRV) é um vírus do gênero *Begomovirus* que possui dois DNAs circulares de fita simples. O ToSRV é a espécie de begomovírus predominante no Estado de São Paulo nas culturas do pimentão, tomateiro e batata (*Solanum tuberosum* L.) (ROCHA *et al.*, 2010; SOUZA-DIAS *et al.*, 2008). Na região Centro-oeste, ele também foi relatado como a espécie de begomovírus prevalente em um levantamento realizado entre 2002 e 2004 (FERNANDES *et al.*, 2008). Atualmente, acredita-se que esse seja o vírus mais danoso para a cultura do tomateiro no Brasil.

2.3.4 *Sida micrantha mosaic virus*

Sida micrantha mosaic virus (SimMV) é um begomovírus bipartido, frequentemente relacionado com plantas invasoras como *Sida* spp., mas que também já foi relatado infectando naturalmente plantas cultivadas como o tomateiro (CASTILLO-URQUIZA *et al.*, 2008). Além disso, ele pode infectar ocasionalmente o maracujazeiro, porém, experimentalmente, o SimMV mostrou-se incapaz de ser transmitido de maracujá para maracujá por *B. tabaci* espécie MEAM1 (ALVES, 2012).

2.4 Principais características do gênero *Crinivirus*

O gênero *Crinivirus* pertence à família *Closteroviridae*, juntamente com o gênero *Closterovirus*, cujo membro mais conhecido é o *Cirus tristeza virus* (CTV) que

infecta o citros. Os membros do gênero *Crinivirus* têm seus genomas divididos em dois ou três RNAs separados (MARTINELLI *et al.*, 2002).

Os vírus da família *Closteroviridae* são tradicionalmente transmitidos por afídeos. Aqueles que são transmitidos por mosca branca pertencem ao gênero recentemente criado, *Crinivirus*. São membros desse gênero: *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV), *Beet pseudo yellow virus* (BPYV), *Curcubit yellow stunting disorder* (CYSDV), *Lettuce chlorosis virus* (LCV), *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) e *Tomato chlorosis virus* (ToCV).

Os crinivírus podem ser transmitidos por *Bemisia tabaci* NW e MEAM1 e duas espécies do gênero *Trialeurodes*, *T. abutilonea* e *T. vaporariorum*, havendo especificidade do vírus em relação a espécie do vetor.

Sabe-se que a maioria das espécies de crinivírus pode ser transmitida pelo gênero *Trialeurodes* ou pela espécie *Bemisia tabaci*, mas não por ambos. A exceção é o ToCV. Trata-se do único vírus transmitido pelos dois gêneros de mosca-branca vetora de viroses, o que leva a crer que o ToCV é um elo evolucionário entre os vírus que eram originalmente transmitidos por *Trialeurodes* e passaram a ser transmitidos por *Bemisia tabaci* (WISLER, 1998a).

Os vírions de ToCV consistem em longas partículas flexuosas variando de 800-850 nm de comprimento (LIU *et al.*, 2000). O genoma é composto por duas moléculas de RNA. O RNA 1 codifica proteínas associadas principalmente com replicação viral, enquanto o RNA 2 codifica uma ampla gama de proteínas envolvidas na proteção do genoma, movimento, e outras funções ainda não identificadas (Figura 3).

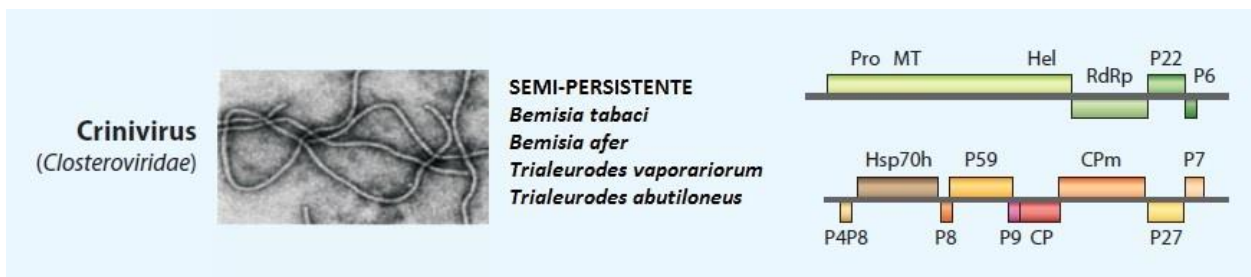


Figura 3: Gênero *Crinivirus*: Partícula viral visualizada no microscópio eletrônico, modo de transmissão, espécies vetoras e mapa genômico do *Tomato chlorosis virus*. Adaptado de (NAVAS-CASTILLO *et al.*, 2011).

2.4.1 *Tomato chlorosis virus*

Tomato chlorosis virus – ToCV foi identificado recentemente em tomateiro no Brasil (BARBOSA *et al.*, 2008). O vírus também infecta pimentão e batata (FREITAS *et al.*, 2012) e é transmitido pelos gêneros *Bemisia* e *Trialeurodes* de forma semi-persistente (WISLER *et al.*, 1998a), o que o diferencia de outros crinivírus como o *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) que é transmitido somente por *T. vaporariorum*. Os sintomas causados por TICV e ToCV são praticamente os mesmos e se caracterizam por um mosqueado clorótico irregular entre as nervuras que, a princípio, se desenvolve nas folhas do baixeiro e gradualmente avança por toda a extensão da planta. Esses sintomas fazem com que a doença seja confundida com deficiências nutricionais ou com senescência natural da planta. Além disso, uma significativa redução da produção ocorre devido à perda de área fotossinteticamente ativa, com conseqüente redução no número e tamanho dos frutos e senescência precoce. ToCV foi identificado pela primeira vez em 1995 na Florida, onde causava (desde pelo menos 1989) uma doença chamada de “yellow leaf disorder”. ToCV está presente em pelo menos 20 países ao redor do mundo, enquanto que TICV está presente somente em 11. As diferenças entre a incidência e distribuição geográfica entre ToCV e TICV é muito provavelmente relacionada aos seus vetores (uma vez que TICV é transmitido somente por *T. vaporariorum*, enquanto que ToCV é transmitido por *T. vaporariorum* e *B. tabaci*) (NAVAS-CASTILHO *et al.*, 2011).

Ensaio de transmissão com o ToCV foram realizados por WINTERMANTEL *et al.*, 2006, que relatou *Trialeurodes abutilonea* e MEAM1 como vetores altamente eficientes na transmissão. Os ensaios também foram realizados com *T.*

vaporariorum e *B. tabaci* espécie NW. Tanto *T. vaporariorum* como NW foram vetores do ToCV, porém menos eficientes quando comparadas a MEAM1. Segundo os autores, ToCV persistiu por até cinco dias em *T. abutilonea*, dois dias em MEAM1 e apenas um dia em NW e *T. vaporariorum*.

2.5 *Trialeurodes vaporariorum*

Trialeurodes vaporariorum (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) também é chamado de “greenhouse whitefly” ou mosca-branca de casa de vegetação. É uma praga que se alimenta de floema e assim como *B. tabaci* pode causar danos diretos e indiretos. *T. vaporariorum* transmite vírus de dois gêneros distintos, *Crinivirus* e *Closterovirus* (JONES, 2003), a saber: *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (DUFFUS *et al.*, 1996; WISLER *et al.*, 1998a, b), *Beet pseudo yellow virus* (BPYV) (Closterovirus) (DUFFUS, 1965; TZANETAKIS *et al.*, 2003) e *Potato yellow vein virus* (PYDV) (ALBA, 1950). *T. vaporariorum* é uma praga polífaga e suas plantas hospedeiras pertencem a 82 famílias botânicas (MOUND & HALSEY, 1978). *T. vaporariorum* em muitos casos pode compartilhar o habitat com *B. tabaci* (SKALJAC *et al.*, 2010), porém, essas duas moscas-brancas possuem uma dinâmica populacional diferente. Enquanto *B. tabaci* alcança o pico populacional durante o verão, populações de *T. vaporariorum* alcançam a máxima população sob condições climáticas mais amenas (LUO *et al.*, 2004). Os ovos de *T. vaporariorum* são mais resistentes ao frio comparados aos de *B. tabaci*, o que possibilita maior estabilidade populacional de *T. vaporariorum* ao longo do ano (CACIAGLI, 2007). O grande potencial reprodutivo dessas duas espécies de moscas-brancas, aliado aos diminutos ovos e estádios ninfais que se estabelecem na parte inferior das folhas são fatores que facilitam no transporte involuntário internacional desses insetos através do comércio de plantas. Não se sabe ao certo a origem de *T. vaporariorum*, mas assume-se que seja a América do Norte ou a América do Sul (CABI, 2013). A primeira descrição dessa espécie foi feita por volta de 1856 na Inglaterra, quando já havia se estabelecido em casas de vegetação (CABI, 2013). Mais recentemente, a presença de *T. vaporariorum* tem sido relatada em muitos países de regiões temperadas (MANZANO & VAN LENTEREN, 2009). No Brasil é considerada uma espécie

secundária. Porém, já foi relatada em 162 espécies de plantas, pertencentes a 40 famílias (OLIVEIRA 1995).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBA, V.R. Viropatogenos. pp. 52–58 in **Conferencia Latinoamericana de Especialistas en Papa**. Colombia, Bogota, 1950.

ALEMANDRI, V. et al. Species Within the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Complex in Soybean and Bean Crops in Argentina. **Journal of Economic Entomology** Lanham, US, v. 105, n. 1, p. 48-53, 2012.

ALVES, A. C. C. DE NEGREIROS. Identificação de isolados de *Sida mottle virus* e *Sida micrantha mosaic virus* não transmissíveis por *Bemisia tabaci* biótipo B que infectam maracuzajeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicapa*). **Tese Doutorado (Fitopatologia)** – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 71p., 2012.

BARBOSA, J.C. et al. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, US, v. 92, p.1709, 2008.

BARBOSA, J.C. et al. Occurrence of Tomato chlorosis virus in tomato crops in five Brazilian states. **Tropical Plant Pathology**, Brasilia, DF, v. 36, p. 256-258, 2011.

BARBOSA, L.F. et al. Mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo Q identificado no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil In: **XXXVII Congresso Paulista de Fitopatologia**, Botucatu. 2014a.

BARBOSA, L.F. et al. Indigenous American species of the *Bemisia tabaci* complex are still widespread in the Americas. **Pest Management Science**, Sussex, Inglaterra, DOI 10.1002/ps.3731, 2014b.

BEDFORD, I.D. et al. Differentiation of threewhitefly-transmitted geminiviruses from the Republic of Yemen. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, Holanda, v. 100, p. 243–257, 1994a.

- BEDFORD, I.D. et al. Geminivirus transmission and biological characterization of whitefly *Bemisia tabaci* biotypes from different geographic regions. **Annals of Applied Biology**, Warwick, Inglaterra, v. 125. p. 311–325, 1994b.
- BIRD, J. A whitefly-transmitted mosaic of *Jatropha gossypifolia*. **Agric Exp Sta Univ Puerto Rico** v. 22, p. 1–35, 1957.
- BONDAR, G. Aleyrodídeos do Brasil. **Boletim do Laboratório de Patologia Vegetal do Estado da Bahia**, v.5, p.1-37, 1928.
- BOSCO, D. et al. PCR-RFLP Identification of *Bemisia tabaci* Biotypes in the Mediterranean Basin. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, Israel, v.34, n.3, p. 243-251, 2006.
- BRIDGES, D.C.; BRECKE, B.J.; BARBOUR, J.C. Wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) interference with peanut (*Arachis hypogaea*). **Weed Science Society of America**, Champaign, Ill., US, v. 40, p. 37–42, 1992.
- BROWN, J. K.; BIRD, J. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. **Plant Disease**, Saint Paul, US, v. 76, n. 3, p. 220-225, 1992.
- BROWN, J. K.; FROHLICH, D. R.; ROSELL, R. C. The sweetpotato or silverleaf white flies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 40, p. 511-534, 1995.
- BROWN, J. K. Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-begomovirus complexes. **Virus Research**, Amsterdam, v. 71, n.1-2, p. 233-260, 2000.
- BROWN, J. K. et al. Family *Geminiviridae*. In: ANDREW, M. Q. K. et al (Ed.). **Virus Taxonomy**: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego, p. 351-373, 2011.
- CABI. *Trialeurodes vaporariorum*. in **Invasive Species Compendium**. Wallingford, UK, CAB International, 2013. Available online at <http://www.cabi.org/isc>
- CACIAGLI, P. Survival of whiteflies during long-distance transportation of agricultural products and plants. pp. 57–63 in Czosnek, H. (Ed.) **Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease (Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance)**. Netherlands, Springer, 2007.
- CASTILLO-URQUIZA, G.P. et al. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, New York, US, v.153, n.10, p.1985-1989, 2008.

- COSTA, A.S.; BENNETT, C.W. Whitefly transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v.40, p 266–283, 1950.
- COSTA, H.S.; BROWN, J.K. Variability in biological characteristic isozyme patterns and virus transmission among populations of *Bemisia tabaci* Genn. in Arizona. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v.80, p.888, 1990.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, GR, v. 1, p. 19-21, 1983.
- DE BARRO, P. J. et al. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. **Annual Review of Entomology**, Stanford, US, v. 56, p. 1-19, 2011.
- DINSDALE, A. et al. Refined Global Analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) Mitochondrial Cytochrome Oxidase 1 to Identify Species Level Genetic Boundaries. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, US, v. 103, cap.2, p. 196 – 208, 2010.
- DOVAS, C.I.; KATIAS, N.I.; AVGELIS, A.D.; Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of yellowing disease of tomato in Greece. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 1345-1349, 2002.
- DUFFUS, J.E. *Beet pseudo-yellowing virus*, transmitted by the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). **Phytopathology**, Saint Paul, v. 5, p. 450–453, 1965.
- DUFFUS, J.E.; LIU, H.-Y.; WISLER, G.C. *Tomato infectious chlorosis virus* – a new clostero-like virus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, Holanda, v. 102, p. 219–226, 1996.
- FERNANDES, F.R. et al. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, Norwell, US, v. 36, p.251-258, 2008.
- FERNANDES, F.R. et al. Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting *Euphorbia heterophylla* plants. **Archives of Virology**, New York, US, DOI 10.1007/s00705-011-1070-4, 2011.
- FONTES, E.P.B. et al. Geminivirus replication origins have a modular organization. **Plant Cell**, Heidelberg, v. 6, n.3 , p. 405-416, 1994.
- FRANÇA, F.H.; VILLAS-BOAS, G.L.; CASTELO-BRANCO, M. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no distrito federal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, SP, v. 25, p. 369–72, 1996.
- FREITAS, D.M.S. et al. First report of *Tomato chlorosis virus* in potato in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 4; p 593.3, 2012.

- FROHLICH, D. et al. A phylogeographic analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. **Molecular Ecology**, Oxford, GB, v. 8, p.1593-1602, 1999.
- FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K.; KRAMER, M. Observações da clorose infecciosa das malváceas em tomateiros do campo. **Biológico**, São Paulo, SP, v. 26, p. 65–69, 1960.
- GÁLVEZ, G.E.; MORALES, FJ. Whitefly-transmitted viruses. In: H.F., SCHWARTZ & M.A. PASTOR, Corrales (Eds), **Bean production problems in the tropics**. CIAT, Cali, Colombia, p. 379–408.1989.
- GILL, R. J. The morphology of whiteflies. In: GERLING. D. (Ed.). **Whiteflies: their bionomics pest status and management**. Andaver: Intercept, p. 13-46, 1990.
- GRILLE, G. et al. O. First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* in Argentina and Uruguay. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, Israel, v. 39, p. 235-238, 2011.
- GUTIERREZ, C. et al. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n.2 , p. 111-119, 2004.
- GUTIERREZ, C. Geminiviruses and the plant cell cycle. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, p. 763-772, 2000.
- HANLEY-BOWDOIN, L. et al. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. **Nature Reviews Microbiology**, London, GB, v. 11, p. 777–788, 2013.
- HOROWITZ, A. et al. Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, US, v. 58, p. 216-225, 2005.
- HU, J. et al. An extensive field survey combined with a phylogenetic analysis reveals rapid and widespread invasion of two alien whiteflies in China. **PLoS ONE** **6**, San Francisco, US: e16061, (doi: 10.1371/journal.pone.0016061). 2011.
- IDRIS, A.M.; SMITH, S.E.; BROWN, J.K. Ingestion, transmission, and persistence of *Chinodel tomate virus* (CdTV), a New World begomovirus, by Old and New World biotypes of the whitefly vector *Bemisia tabaci*. **Annals of Applied Biology**, Warwick, GB, v. 139, p. 45–154, 2001.
- INOUE-NAGATA, A. K. et al. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage π 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, NL, v. 116, p. 209–211, 2004.
- JIANG, Y.X. et al. Effect of *Bemisia tabaci* biotype in the transmission of *Tomato yellowleaf curl Sardinia virus* (TYLCSV-ES) between tomato and common weeds. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, ES, v. 2, p.115–119, 2004.

- JIANG, Y.X. et al. Correlation between whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) feeding behavior and transmission of tomato yellow leaf curl virus. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, US, v. 93, n. 3, p. 573–579, 2000.
- JONES, D.R. Plant viruses transmitted by whiteflies. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, Holanda, v. 109, p. 195–219, 2003.
- JONES, C.M. et al. Highthroughput allelic discrimination of B and Q biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci*, using *TaqMan* allele-selective PCR. **Pest Management Science**, Sussex, Inglaterra, v. 64, p. 12-15, 2008.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, London, GB, v.5, p.150-163, 2004.
- LIU, H-Y.; WISLER, G.C.; DUFFUS, J.E. Particles lengths of whitefly-transmitted Criniviruses. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, p.803-805, 2000.
- LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, SP, v.53, n.1, p.53-59, 1994.
- LOWE, S. et al. 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the Global Invasive Species Database. **The Invasive Species Specialist Group (ISSG)**, World Conservation Union (IUCN): 6-7, 2000.
- LUO, C. et al. The population dynamics of whiteflies and their natural enemy in Beijing suburb. Modern Entomology Research, **Agricultural Science Press** Beijing, China p. 465–468, 2004.
- MANZANO, M.R.; VAN LENTEREN, J.C. Life history parameters of *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) at different environmental conditions on two bean cultivars. **Neotropical Entomology**, Dordrecht, v. 38, p. 452–458, 2009.
- MARUBAYASHI, J. M. et al. At least two indigenous species of the *Bemisia tabaci* complex are present in Brazil. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, DE, v. 137: 113-121, 2013.
- MATYS, J.C. et al. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, SP, v. 1, p. 267–74, 1975.
- MCGRATH, P.F.; HARRISON, B.D. Transmission of tomato leaf curl geminiviruses by *Bemisia tabaci*: effects of virus isolate and vector biotype. **Annals of Applied Biology**, Warwick, GB, v. 126, p. 307–316, 1995.

- MORALES, F.J.; ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. **Archives of Virology**, New York, US, v. 146, n. 3, p. 415-41, 2011.
- MORALES, F.J.; NIESSEN, A.I. Comparative responses of selected *Phaseolus vulgaris* germplasm inoculated artificially and naturally with bean golden mosaic virus. **Plant Disease**, Saint Paul, US, v. 72, p. 1020-1023, 1988.
- MOUND, L.A.; HALSEY, S.H. Whitefly of the world: a systematic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with host plant and natural enemy data. **Chichester, British Museum (Natural History)**, p. 340, 1978.
- MUNIZ, M. Host suitability of two biotypes of *Bemisia tabaci* on some common weeds. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, NL, v. 95, n. 1, p. 63–70, 2000.
- NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E.; SÁNCHEZ-CAMPOS, E. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, US, v. 49, p. 219-248, 2011.
- NATESHAN, H. M. et al. Host range, vector and serological relationships of cotton leaf curl virus from southern India. **Annual Applied Biology**, Chichester, v. 128, p. 233-244, 1996.
- OLIVEIRA, M.F. et al. Atividade do acetolactato sintase de plantas de milho e de amendoim-bravo. **Planta daninha**, Rio de Janeiro, RJ, v. 20, p. 77-82, 2002.
- OLIVEIRA, M.R.V. Controle biológico de pragas em casas de vegetação com especial referência a *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Homoptera, Aleyrodidae). **Tese de doutorado**, São Carlos, UFSCar, 273p, 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**, Maryland Heights, v. 224, p. 390-404, 1996.
- PERRING, T.M. The *Bemisia tabaci* species complex. **Crop Protection**, Guildford, GB, v. 20, p. 725–737, 2001.
- POLSTON, J.E.; DE BARRO, P.; BOYKIN, L.M. Transmission specificities of plant viruses with the newly identified species of the *Bemisia tabaci* species complex. **Pest Management Science**, Sussex, Inglaterra, DOI 10.1002/ps.3738, 2014.
- RABELLO, A.R. et al. Diversity analysis of *Bemisia tabaci* biotypes: RAPD, PCR-RFLP and sequencing of the ITS1 rDNA region. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, SP, v. 31, n. 2, p. 585-590, 2008.
- RIBEIRO, S.G. et al. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, New York, US, v. 148, p.281–295, 2003.

- ROCHA, K.C.G. et al. Ocorrência e variabilidade genética do *Tomato severe rugose virus* em tomateiro e pimentão no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, SP, v.36, n.3, p.222-227, 2010.
- ROJAS, M.R. et al. Use of degenerate primers in the polimerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminivirus. **Plant Disease**, Saint Paul, v.77, p.340-347, 1993.
- ROJAS, M. R. et al. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 361-394, 2005.
- SANCHEZ-CAMPOS, S. et al. Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 89, p. 1038–1043, 1999.
- SOUZA-DIAS, J.A.C. et al. *Tomato severe rugose virus*: another begomo-virus causing leaf deformation and mosaic symptoms on potato in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, US, v. 92, p. 487, 2008.
- SKALJAC, M. et al. Co-infection and localization of Genetic diversity among *T. vaporariorum* populations in Serbia and neighbouring countries secondary symbionts in two whitefly species. **BMC Microbiology** 10, 142, 2010.
- STANLEY, J. et al. *Geminiviridae*. In: FAUQUET, C. M. **Virus taxonomy**: eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Elsevier, p. 301-326, 2005.
- TAY, W.T.; et al. Will the Real *Bemisia tabaci* Please Stand Up? **PLoS ONE** 7, San Francisco, US, doi:10.1371/journal.pone.0050550, 2012.
- THOMPSON, J.D. et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, GB, v.22, p.4673-4680, 1994.
- TOSCANO, L. C.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; MARUYAMA, W. I. Fatores que afetam a oviposição de *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em tomateiro. **Neotropical Entomology**, Dordrecht, v. 31, p. 631-634, 2002.
- TZANETAKIS, I.E.; WINTERMANTEL, W.M.; MARTIN, R.R. First report of *Beet pseudo yellow virus* in strawberry in the United States: a second crinivirus able to cause pallidosis disease. **Plant Disease**, Saint Paul, US, v. 87, p. 1398, 2003.
- UEDA, S.; BROWN, J.K. First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* in Japan by mitochondrial cytochrome oxidase I sequence analysis. **Entomology**, v. 34, p. 405-411, 2006.

- WILLARD, T.S.; GRIFFIN, J.L. Soybean (*Glycine max*) yield and quality responses associated with wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) control programs. **Weed Technology**, Champaign, US, v. 7, p. 118–122, 1993.
- WILSON, A.K. *Euphorbia heterophylla*: a review of distribution, importance and control. **Tropical Pest Management**, Basingstoke, GB, v. 27, p. 32–38, 1981.
- WINTERMANTEL, W.M.; WISLER, G.C. Vector Specificity, Host Range, And Genetic Diversity of *Tomato chlorosis virus*. **Plant Disease**, Saint Paul, US, v. 90, p. 0814, 2006.
- WISLER, G.C. et al. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. **Plant Disease**, Saint Paul, US, v. 82, p. 270–280, 1998a.
- WISLER, G. C. et al. *Tomato chlorosis virus*: A new whitefly-transmitted, phloem-limited bipartite closterovirus of tomato. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 88, p. 402-409. 1998b.
- ZANG, L.S.; CHEN, W.Q.; LIU, S.S. Comparison of performance on different host plants between the B biotype and a non-B biotype of *Bemisia tabaci* from Zhejiang, China. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, NL, v. 121, p. 221–227, 2006.

CAPÍTULO 01

*Redigido conforme as normas da revista Tropical Plant Pathology
no formato Short Communication*

Tomato chlorosis virus found on tomatoes in Rio Grande do Sul State, Brazil associated with *Trialeurodes vaporariorum*.

Bruno R. De Marchi¹, Leonardo da F. Barbosa¹, Valdir A. Yuki², Julio M. Marubayashi¹, Fernando L. Perini³, Marcelo A. Pavan¹, Maria I. M. Hoffmann¹, Luis F. M. Watanabe¹ & Renate Krause-Sakate¹

e-mail: reatekrause@fca.unesp.br

1UNESP – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, Brazil.

2Instituto Agrônômico de Campinas, Centro de Fitossanidade, Campinas, Brazil

3Iharabras S/A Indústrias Químicas, Sorocaba, Brazil

ABSTRACT *Tomato chlorosis virus* (ToCV) is the only crinivirus species detected in Brazil. The virus causes the typical inter-veinal yellow chlorosis, firstly on lower tomato leaves and it is transmitted by whiteflies. The virus has been reported on most important tomato producing areas from Southeastern and Central-Western Brazil. Tomato plants exhibiting the typical symptoms of ToCV were found in a greenhouse in Santa Maria, Rio Grande do Sul State associated with high infestation of whiteflies. Mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) revealed *Trialeurodes vaporariorum* as the only species of whitefly present in the sampled

field. ToCV was confirmed by RT-PCR and nucleotide sequencing of the amplicon. Up to date, this is the first report of ToCV in Rio Grande do Sul State. Since 100% of the plants exhibited characteristic ToCV symptoms we conclude that *T. vaporariorum* is an efficient vector of ToCV and can contribute for the spread of this virus in South America.

Key words: whitefly, mtCOI, crinivirus, closteroviridae

RESUMO *Tomato chlorosis virus* (ToCV) é a única espécie de crinivírus relatada no Brasil. O vírus causa sintomas que incluem mosqueado clorótico irregular entre as nervuras que se desenvolve primeiramente nas folhas do baixeiro e é transmitido por moscas-brancas. ToCV já foi relatado nas principais áreas de produção de tomate do Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Tomateiros com sintomas típicos de ToCV foram encontrados em cultivo protegido no município de Santa Maria – RS associados com uma alta infestação de moscas-brancas. Através de análise do gene mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) foi possível identificar *Trialeurodes vaporariorum* como a única espécie de mosca-branca presente no campo amostrado. A presença do ToCV nos tomateiros foi confirmada por RT-PCR e pelo sequenciamento de nucleotídeos do fragmento amplificado. Este é o primeiro relato de ToCV no Estado do Rio Grande do Sul. Considerando que 100% das plantas apresentavam o sintoma da doença, concluiu-se que *T. vaporariorum* é um vetor eficiente do ToCV e pode estar contribuindo para a dispersão desse vírus para outros países da América do Sul.

Palavras chaves: mosca-branca, mtCOI, crinivírus, closteroviridae

INTRODUCTION

Tomato cultivation in Brazil is threatened by a number of tomato-infecting viruses belonging mainly to the genus *Begomovirus* and *Crinivirus*. *Tomato chlorosis virus* (ToCV, genus *Crinivirus*, family *Closteroviridae*) causes the yellowing disease (“yellow leaf disorder”) on tomatoes. It is a typical member of the genus, with a bipartite genome of single-stranded RNA of positive polarity. Both RNA molecules are separately encapsidated in long, flexuous virions that are phloem-limited and transmitted in nature by three different species of whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae), *Bemisia tabaci* (Gennadius), *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) and *Trialeurodes abutilonea* (Haldeman), in a semi-persistent way (Wisler et al., 1998; Navas-Castillo et al. 2011).

From the early 1990s, epidemics of ToCV emerged worldwide, causing severe damage to tomato production. ToCV has been present in Florida since 1989 (Wisler et al. 1998), and that virus has been reported at least in 20 countries from the Americas, Europe, Africa and Asia (Navas-Castillo et al., 2011). In the U.S. and Spain, ToCV has been identified as a serious problem for tomato production (Wintermantel & Wisler, 2006). Symptoms of ToCV infections in tomatoes include inter-veinal yellow chlorotic areas that initially develop on lower leaves and then reach the upper part of the plant.

In Brazil, ToCV was first detected in the Sumaré County, São Paulo State in 2006. After that, the presence of ToCV was confirmed at least in five other tomato growing states

(Barbosa et al., 2011). In November 2013, tomato plants showing yellow chlorotic areas on lower leaves were found in a greenhouse tomato crop (Figure 1) in Santa Maria, Rio Grande do Sul state (southern Brazil), heavily infested with whiteflies. Leaves of symptomatic plants were sampled and the whiteflies present on those plants were collected using a hand-held aspirator, preserved immediately in 95% ethanol and stored at -20°C for further identification. For detection of ToCV, total RNA was extracted with Trizol® (Invitrogen) from five symptomatic leaf tissue samples and RT-PCR was performed with primers HS-11/HS-12 (Dovas et al., 2002), which amplifies a 587-bp fragment in the highly conserved region of the heat shock protein (HSP-70). The RT-PCR product was used for a nested-PCR specific for ToCV using primer pairs ToC-5/ToC-6 (Dovas et al., 2002) that amplified a single fragment of approximately 463-bp. RT-PCR products were directly sequenced using the primers ToC-5/ToC-6. Nucleotide sequences were compared to the corresponding sequence of the first reported Brazilian isolates of ToCV (GenBank Accession EU868927) and showed 99% nucleotide identity, confirming the presence of ToCV in those samples.



FIGURE 1 - Tomato plants exhibiting inter-veinal yellow chlorosis associated to *Tomato chlorosis virus* infection, in a greenhouse planting in Santa Maria county, Rio Grande do Sul state.

For molecular identification of the collected adults of whiteflies, total DNA of each insect were extracted using Chelex protocol as described by Walsh et al., 1991. The DNA was used as a template for a PCR with the specific primers TvapF and WFrev for *Trialeurodes vaporariorum* (Scott et al., 2007) and with the generic insect primers C1-J-2195 and TL2-N-3014 to identify *Bemisia tabaci* (Simon et al. 1994). All the samples were identified as *T. vaporariorum*. The mtCOI fragment was purified (QIAquick Gel Extraction Kit Qiagen) and quantified for sequencing in both directions using TvapF/WFrev primers (Macrogen, South Korea). The nucleotide sequence from 640 nt was deposited on GenBank (KF991609) and showed 99% nucleotide identity with the corresponding nucleotide sequences for the mtCOI gene of other *T. vaporariorum*.

ToCV has been reported in tomatoes from the States of Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, São Paulo and Rio de Janeiro (Barbosa et al., 2011). This is the first report of ToCV infecting tomatoes in the State of Rio Grande do Sul. The presence of ToCV on Rio Grande do Sul State can impose a concern for border countries like Argentina and Uruguay (Figure 2). These two countries are tomatoes producers and have the vector. However, ToCV has not been reported yet in both (Navas-Castillo et al. 2011).



FIGURE 2 – Map of the southern region of Brazil bordering Argentina and Uruguay, countries where *Tomato chlorosis virus* has not been reported yet. *Area where *Tomato chlorosis virus* has been reported.

Despite *T. vaporariorum* has been considered less efficient in transmission of ToCV when compared to *B. tabaci* (Wintermantel et al. 2006) the vector must be taken into consideration, once almost 100% of the plants in greenhouse showed ToCV symptoms and ToCV has already been experimentally transmitted by *T. vaporariorum* in Brazil (Freitas et. al 2011). This vector can contribute for spreading ToCV to other Latin America countries.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants received from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processes Numbers: 2013/12377-1 and 2012/51771-4). BRM is the recipient of a FAPESP fellowship (Proc 2012/17373-1). RKS, JAMR and MAP hold CNPq fellowships.

REFERENCES

Barbosa JC, Teixeira APM, Moreira AG, Camargo LEA, Bergamin Filho A, Kitajima EW, Rezende JAM (2008) First Report of *Tomato chlorosis virus* Infecting Tomato Crops in Brazil. *Plant Disease* 92(12):1709.

Barbosa JC, Costa H, Gioria R, Rezende JAM (2011) Occurrence of Tomato chlorosis virus in tomato crops in five Brazilian states. *Tropical Plant Pathology* 36:256-258.

Dovas CI, Katis NI, Avgelis AD (2002) Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece *Plant Disease* 86(12):1345-1349.

Freitas DMS, Lourenção AL, Rezende JAM, Matos ES (2011) Transmissão do *Tomato chlorosis virus* (ToCV) por *Trialeurodes vaporariorum* no Brasil. In XXXIV Congresso Paulista de Fitopatologia (CD ROM), Campinas.

Navas-Castillo J, Fiallo-Olivé E, Sánchez-Campos E (2011) Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology* 49:219-248.

Scott IAW, Workman PJ, Drayton GM, Burnip GM (2007) First record of *Bemisia tabaci* biotype q in New Zealand. *New Zealand Plant Protection* 60:264-270.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87:651-701.

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4):506-513.

Wintermantel WM, Wisler GC (2006) Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Disease* 90:814-819.

Wisler GC, Li RH, Liu HY, Lowry DS, Duffus JE (1998) *Tomato chlorosis virus*: A new whitefly-transmitted, phloem limited, bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology* 88:402-409.

CAPÍTULO 02

*Redigido conforme as normas da revista Tropical Plant Pathology
no formato Short Communication*

***Bemisia tabaci* from the New World group carries begomoviruses commonly found on weed species.**

Bruno R. De Marchi¹, Leonardo da F. Barbosa¹, Valdir A. Yuki², Julio M. Marubayashi¹, Marcelo A. Pavan¹, Maria I. M. Hoffmann¹, Luis F. M. Watanabe¹ & Renate Krause-Sakate¹
e-mail: reatekrause@fca.unesp.br

1UNESP – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, Brazil.

2Instituto Agrônomo de Campinas, Centro de Fitossanidade, Campinas, Brazil

ABSTRACT *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is one of the most serious pests of vegetable, fibre and ornamental crops worldwide and causes severe damage mainly by transmitting begomoviruses. *B. tabaci* is currently known as a complex composed of at least 36 cryptic species with genetic diversity. Within the complex, the invasive Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1) is the most prevalent species in Brazil and the main responsible for crop damage. However, there are also two indigenous species, New World (NW) and New World 2 (NW2) that have not been completely displaced by the invasive species. Here we investigate the presence of begomoviruses in field populations of indigenous species of *B. tabaci*. Total DNA was extracted from one single insect and the species was identified by sequencing the mtCOI gene. For detection of begomoviruses present in the insect, a rolling-circle amplification – RCA followed by PCR with begomoviruses universal primers was used. The fragments were purified and directly sequenced. It was possible to identify sequences related

to four begomoviruses species. *Sida micrantha mosaic virus* was found in NW2 and in a NW specimen. *Sida mottle virus* was found in NW, *Abutilon mosaic virus* was found in NW2 and *Sida yellow net virus* found in NW2. These results indicate that indigenous species of *B. tabaci* carry begomoviruses commonly found on weeds in Brazil and they may be important to maintain the transmission of these viruses in nature.

Key words: whitefly, mtCOI, begomovirus

RESUMO *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) é uma das principais pragas em diversas culturas em todo o mundo e causa danos severos principalmente através da transmissão de begomovírus. Estudos recentes mostraram que *B. tabaci* é um complexo de pelo menos 36 espécies crípticas com grande diversidade genética. Dentre esse complexo, a espécie exótica Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1) é a predominante e maior responsável pelos danos no Brasil. Porém, também estão presentes duas espécies indígenas, New World (NW) e New World 2 (NW2) que não foram completamente deslocadas pela invasora. Esse trabalho averiguou a presença de begomovírus em populações de espécies indígenas de *B. tabaci* coletadas em campo. O DNA total de um único inseto foi extraído e a identificação da espécie feita através do sequenciamento do gene mtCOI. Para detecção de begomovírus foi realizado um “rolling-circle amplification” – RCA seguido de PCR com primers universais para begomovírus. Os fragmentos foram purificados e sequenciados diretamente. Foi possível identificar sequências relacionadas a quatro diferentes espécies de begomovírus. *Sida micrantha mosaic virus* foi encontrado tanto em NW2 quanto em NW. *Sida mottle virus* somente em NW, *Abutilon mosaic virus* somente em NW2 e *Sida yellow net virus* em NW2. Esses resultados indicam que as espécies indígenas de *B. tabaci* estão possivelmente transmitindo begomovírus frequentemente encontrados em plantas daninhas e podem ser importantes para a manutenção destas espécies de vírus na natureza.

Palavras chaves: mosca-branca, mtCOI, begomovirus

INTRODUCTION

The whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Aleyrodidae: Hemiptera) is a complex consisting of at least 36 morphologically indistinguishable cryptic species, on the basis of mtCOI, that diverges each other's genetically and behavioral having differences in many factors as range of host plants, resistance to insecticides, tolerance to environmental stresses and efficiency in virus transmission. Some members of this species complex are important pests of agricultural, horticultural and ornamental crops, causing extensive damage directly through phloem-feeding and indirectly through transmission of plant pathogenic viruses, mainly begomoviruses and criniviruses (De Barro et al, 2011; Polston et al, 2013).

In Brazil, the invasive species Middle East–Asia Minor 1 (MEAM1), also known as B biotype, is spread throughout the country, being the main responsible in transmission of begomoviruses. The rapid spread of MEAM1 worldwide has occurred with the concurrent disappearance of indigenous *B. tabaci* species in many countries as Brazil, Australia and China (Hu et al, 2011; Liu et al, 2007). However, recent studies showed that indigenous species of *B. tabaci* from the New World group, as New World (NW) and New World 2 (NW2) are still present in many countries in the Americas, commonly found in weeds and wild plants (Barbosa et al. 2014). These weeds frequently serve as virus source for important agriculture crops, but the role of native species of *B. tabaci* as virus vectors remains unknown. Thus, the goal of this study is to obtain more information about what species of

begomoviruses are related to the native species from the New World group that might be transmitting these viruses from weed to weed or to cultivated hosts.

A sample was conducted in places where Marubayashi et al, 2011 have already found NW and NW2 previously. Whiteflies were collected in different hosts, mainly weed plants using a hand-held aspirator, preserved immediately in 95% ethanol and stored at -20°C for further identification. Total DNA of each insect were extracted using Chelex protocol as described by Walsh et al., 1991. The DNA was used as a template for a PCR with the generic insect primers C1-J-2195 and TL2-N-3014 (Simon et al. 1994) and analyzed by RFLP using the restriction enzyme TaqI to obtain different patterns for each species (NW, NW2 and MEAM1) (Bosco et al. 2006 ; Marubayashi et al. 2011). Samples identified as NW and NW2 were purified (QIAquick Gel Extraction Kit Qiagen) and quantified for sequencing (Macrogen, South Korea) and the species were confirmed by comparison to sequences deposited in GenBank, using BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Fifteen samples of *B. tabaci* from the New World group were found in the counties of Sao José do Rio Preto, Monte Alegre do Sul, Jacupiranga, Pariquera-Açú, Ilha Solteira, Bastos from São Paulo State, in the county of Selviria, Mato Grosso do Sul State and also in the counties Murici and Arapiraca, from Alagoas State (Table 1).

TABLE 1 – Field samples of *Bemisia tabaci* from the New World group.

Sample	County	Host	<i>B. tabaci</i> Species	Begomovirus Species	DNA-A Fragment length	Identity
1	S. J. Rio Preto/SP	<i>X.cavanillesii</i>	NW2	ND	-	-
2	Votuporanga/SP	Squash	NW2	ND	-	-
3	Pariquera Açu/ SP	<i>Ipomoea</i> sp.	NW	SimMV	434 bp	97%
4	Jacupiranga/SP	<i>Solanum gilo</i>	NW	ND	-	-
5	Jacupiranga/SP	<i>Solanum gilo</i>	NW	SiMoV	434 bp	96%
6	Bastos/SP	<i>E. heterophylla</i>	NW2	SimMV	434 bp	97%
7	Bastos/SP	<i>E. heterophylla</i>	NW2	SimMV	434 bp	97%
8	Selviria/MS	Soybean	NW2	ND	-	-
9	Monte Alegre/SP	<i>X. cavanillesii</i>	NW2	ND	-	-
10	Bastos/SP	<i>E. heterophylla</i>	NW2	AbMV	434 bp	92%
11	Arapiraca/AL	<i>E. heterophylla</i>	NW2	ND	-	-
12	Murici/AL	<i>Ipomoea</i> sp.	NW2	ND	-	-
13	Pariquera Açu/SP	<i>Sida</i> sp.	NW2	SiYNV	694 bp	84%
14	Pariquera Açu/SP	<i>Sida</i> sp.	NW	ND	-	-
15	Pariquera Açu/SP	<i>Sida</i> sp.	NW	ND	-	-

*Counties where the samples were collected, host, *Bemisia tabaci* species identified, begomoviruses species detected in the insect (ND: Not Detected), length of the viruses fragment sequenced and percentage of identity of the sequence with GeneBank sequences by Blast-n.

* SimMV: *Sida micrantha mosaic virus*; SiMoV: *Sida mottle virus*; AbMV: *Abutilon mosaic virus*; SiYNV: *Sida yellow net virus*.

For identification of the begomoviruses presents in the indigenous *B. tabaci* adults, total DNA of these samples were used as template for a rolling-circle amplification (RCA) that amplifies the circular ssDNA, followed by PCR with universal primers PAL1v1978 and PAR1c496 (Rojas et al., 1993) for begomoviruses detection. The fragments were purified (QIAquick Gel Extraction Kit Qiagen) and directly sequenced (Macrogen, South Korea) for further comparison in GenBank using BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Six from the fifteen insects found belonging to the New World group were infected with begomoviruses, being two belonging to NW species and four from NW2 species. The sequences of begomoviruses had high identity with four different begomoviruses species. *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) was found in NW2 collected in *Euphorbia heterophylla* and in a NW specimen collected from *Ipomea* sp. *Sida mottle virus* (SiMoV) was found in NW collected from *Solanum gilo*, *Abutilon mosaic virus* (AbMV) was found in NW2 from *Euphorbia heterophylla* and *Sida yellow net virus* (SiYNV) found in NW2 from *Sida* sp.

SimMV and SiMoV are viruses commonly found in *Sida* spp. that sporadically infect passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) and haven't succeeded to be transmitted by MEAM1 *B. tabaci* (Alves, 2012). AbMV is a begomoviruses that has been reported infecting cotton (*Gossypium hirsutum*) in 1937 (Costa et al., 1937) and beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in 1962 (Costa, 1962) before MEAM1 invasion in Brazil, which indicates that they were probably transmitted by indigenous species of *B. tabaci* in that occasion. SiYNV and SimMV have already been reported infecting tomatoes in a natural way in Brazil (Castillo-Urquiza et al., 2008; Acioli et al., 2013).

These results indicate that indigenous species of the *B. tabaci* complex are carrying begomoviruses commonly found in weeds in Brazil. However, further studies might be done in order to prove if NW and NW2 species are able to transmit these begomoviruses from weeds to cultivated hosts.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thanks the Fapesp for the financial support (Process Number: 2013/12377-1).

REFERENCES

Acioli NANF, Costa AF, Reis A, Boiteux MEDNF, Boiteux LS (2013) Report of Sida yellow net virus isolates associated with tomato plants in Rio de Janeiro State, Brazil. 46° Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Resumo: 847-1.

Alves ACCDN (2012) Identificação de isolados de *Sida mottle virus* e *Sida micrantha mosaic virus* não transmissíveis por *Bemisia tabaci* biótipo B que infectam maracuzajeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicapa*). Phd Thesis – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 71p.

Barbosa LF, Marubayashi JM, De Marchi BR, Yuki VA, Pavan MA, Moriones E, Navas-Castillo J, Krause-Sakate R (2014) Indigenous American species of the *Bemisia tabaci* complex are still widespread in the Americas. Pest Management Science: DOI 10.1002/ps.3731

Castillo-Urquiza GP, Beserra JE Jr, Bruckner FP, Lima ATM, Varsani A, Alfenas-Zerbini P, Zerbini FM (2008) Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. Archives of Virology 153 (10): 1985-1989.

Costa AS, Carvalho AMB (1962) Moléstias de vírus do algodoeiro. Bragantia 21: 46-62.

Costa AS (1937) Nota sobre o mosaico do algodoeiro.. Boletim Técnico Instituto Agrônômico, Campinas. : -20.

De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, Dinsdale AB (2011) *Bemisia tabaci*: a statement of species status. Annual Review of Entomology 56: 1–19.

Hu J, De Barro P, Zhao H, Wang J, Nardi F, et al. (2011) An extensive field survey combined with a phylogenetic analysis reveals rapid and widespread invasion of two alien whiteflies in China. PLoS ONE 6: e16061.

Liu SS, De Barro P, Xu J, Luan JB, Zang LS, et al. (2007) Asymmetric mating interactions drive widespread invasion and displacement in a whitefly. Science 318: 1769–1772.

Marubayashi JM, Yuki VA, Rocha KCG, Mituti T, Pelegrinotti FM, Ferreira FZ, Moura MF, Navas-Castillo J, Moriones E, Pavan MA, Krause-Sakate R (2013) At least two indigenous species of the *Bemisia tabaci* complex are present in Brazil. Journal of Applied Entomology 137: 113-121.

Navas-Castillo J, Fiallo-Olivé E, Sánchez-Campos E (2011) Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. Annual Review of Phytopathology 49:219-248.

Polston JE, De Barro P, Boykin LM (2014) Transmission specificities of plant viruses with the newly identified species of the *Bemisia tabaci* species complex. Pest Management Science: DOI 10.1002/ps.3738

Rojas MR, Gilbertson RL, Russell DR, Maxwell DP (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminivirus. Plant Disease 77:340-347.

CAPÍTULO 03

TRANSMISSÃO DE BEGOMOVÍRUS E CRINIVÍRUS POR *Bemisia tabaci* ESPÉCIE NEW WORLD 2

RESUMO As moscas-brancas, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) são pragas de grande importância, principalmente por serem vetoras de fitoviroses, como os begomovírus e crinivírus. São insetos com alta variabilidade e formam um complexo de espécies divididas em 11 sub grupos, contendo pelo menos 36 espécies morfológicamente indistinguíveis. Destas espécies, apenas Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), Mediterranean (MED), New World (NW) e New World 2 (NW2) foram identificadas no Brasil até o momento. A espécie MEAM1 é reconhecida como a de maior distribuição mundial, enquanto que a espécie NW2, encontrada até o momento no Brasil, Bolívia e na Argentina, possui poucos estudos pelo fato de ter sido descrita recentemente. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar a importância da espécie NW2, encontrada em baixas populações, em diferentes regiões do Estado de São Paulo, como transmissora de begomovírus e crinivírus. Foi realizada uma coletada no município de Bastos/SP, local onde NW2 havia sido relatada anteriormente. As moscas-brancas coletadas em campo foram transferidas com auxílio de um sugador manual para plantas de soja (*Glycine max*) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) cobertas com gaiolas e posteriormente trazidas para a UNESP, Campus Botucatu para estabelecimento de uma colônia pura da espécie NW2 a fim de realizar ensaios de transmissão. Após o estabelecimento, amostras representativas da colônia foram identificadas através da análise do

gene mtCOI como pertencentes a espécie NW2. Os ensaios de transmissão foram feitos paralelamente com as espécies MEAM1 e NW2 utilizando os begomovírus *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV); e o crinivírus *Tomato chlorosis virus* (ToCV). BGMV e o ToSRV foram transmitidos por MEAM1 e NW2 com alta eficiência. EuYMV foi transmitido por NW2 com alta eficiência, enquanto que MEAM1 transmitiu em baixa eficiência. O crinivírus ToCV foi transmitido por NW2 com baixa eficiência e com alta eficiência por MEAM1. SimMV não foi transmitido por nenhuma das duas espécies de *B. tabaci* avaliadas.

1. INTRODUÇÃO

Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) é uma das principais pragas da agricultura mundial e foi listada dentre as 100 piores espécies invasoras em todo o mundo (LOWE *et al.*, 2000). *B. tabaci* é um inseto polífago e pode causar danos severos em mais de 600 espécies diferentes de plantas, em adição aos danos diretamente causados pela sucção do floema e excreção de “honeydew”, que serve como substrato para o desenvolvimento de colônias de fungos (JONES *et al.*, 2008). As moscas-brancas também são conhecidas como vetoras de vírus, transmitindo mais de 200 espécies diferentes de fitoviroses, sendo os begomovírus e crinivírus os de maior importância. *B. tabaci* foi recentemente classificada como um complexo de pelo menos 36 espécies distintas separadas em 11 grupos com base no gene mitocôndria citocromo oxidase (mtCOI) (DE BARRO *et al.*, 2011). Dentre essas espécies, quatro foram identificadas no Brasil até então, sendo duas espécies invasoras (MEAM1 e MED) e duas espécies nativas (NW e NW2). A espécie Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), comumente referida como biótipo B, é uma espécie exótica distribuída por todo o mundo e predominante no Brasil, sendo a de maior importância. A espécie Mediterranean (MED), também conhecida como biótipo Q, foi recentemente relatada no extremo sul do país (BARBOSA *et al.*, 2014a). As espécies nativas como a New World (NW), também referida como biótipo A e a New World 2 (NW2) não foram completamente deslocadas e continuam presentes, sendo encontradas principalmente em plantas daninhas (BARBOSA *et al.*, 2014b). A espécie NW2 foi recentemente descrita por ALEMANDRI *et al.*, 2012 na Argentina e

relatada no Brasil por MARUBAYASHI *et al.*, 2012. O papel da NW2 como transmissora de begomovírus e crinivírus ainda é desconhecido. Portanto, o objetivo deste trabalho foi de isolar uma população pura de NW2 para fazer ensaios de transmissão utilizando os begomovírus *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV); e o crinivírus *Tomato chlorosis virus* (ToCV).

2. METODOLOGIA

2.1 Estabelecimento de uma colônia pura de New World 2

Para estabelecimento da colônia pura da espécie NW2 foi realizada uma coleta na cidade de Bastos/SP, aonde MARUBAYASHI *et al.*, 2012 já haviam relatado a presença da espécie NW2 anteriormente. Os insetos foram coletados em plantas de soja perene (*Neonotonia wightii*) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla*), no campo, e transferidos para gaiolas com plantas de soja (*Glycine max*) protegidas com telas anti-afídicas, sendo transferidos aproximadamente 20 insetos por gaiola. As plantas foram trazidas para o campus da FCA/UNESP – Botucatu e mantidas em gaiolas de madeira com dimensões de 70x70x80 cm (Figura 1) para o estabelecimento da população. Após algumas semanas, foi realizada a identificação da espécie após a realização de uma amostragem representativa da colônia seguida de identificação através da análise do gene mtCOI, sequenciamento e comparação por Blast-n.



Figuras 1A e 1B: Gaiolas protegidas com tela anti-afídica aonde a criação da população pura de *Bemisia tabaci* espécie New World 2 é mantida em algodão.

Bimestralmente durante todo o período em que se realizaram os ensaios de transmissão, foram realizados testes para verificar se não houve contaminação da colônia com outra espécie de *B. tabaci*, pois, morfologicamente não é possível distinguir espécies de *B. tabaci*.

2.2 Extração do DNA total dos insetos

Como não há possibilidade de realizar a identificação morfológica das espécies de *B. tabaci*, a identificação foi realizada através da análise do gene mtCOI. Primeiramente extraiu-se o DNA total das moscas-brancas, onde um indivíduo adulto de mosca-branca foi coletado e macerado em 30 μ l de tampão de extração (50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS). Cento e setenta microlitros do tampão foram adicionados ao macerado, adicionados de 100 μ l de fenol saturado em TE e 100 μ l de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e levados ao vortex por três minutos. Após centrifugação a 12.000 rpm por três minutos, o sobrenadante (180 μ l) foi misturado a 18 μ l (0.1 volume) de acetato de sódio 3M (pH 5.2) e 540 μ l (3 volumes) de etanol. O ácido nucléico foi precipitado por centrifugação (14.000 rpm, 10 minutos) a 4°C, após incubação por 20 minutos a -80°C. Os pellets foram lavados em etanol 80% e ressuspensos em 30 μ l de água destilada.

2.3 Análise do gene mtCOI

A porção do gene para a citocromo oxidase (mtCOI) foi amplificada com os oligonucleotídeos C1-J-2195 (5'-TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT-3') e L2-N-3014 (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3') descritos por FROHLICH *et al.*, 1999. A reação de PCR foi realizada em volume final de 50µl (concentração final MgCl₂ 50mM, dNTP 2,5mM, oligonucleotídeos C1-J-2195 e L2-N-3014 a 1µM) utilizando-se 0.5 unidades de *Taq* polymerase. A reação consistiu em 5' a 94°C (um ciclo), 30" a 94°C, 45" a 45°C e 1' a 72°C (35 ciclos) com uma extensão final de 10' a 72°C. A presença de amplicons será visualizada em gel de eletroforese a 1% corado com brometo de etídeo. O fragmento amplificado possui em torno de 800 bases. Cinco µl de cada produto de PCR amplificado foi clivado com a enzima *TaqI* a 65°C por 2 h utilizando-se o tampão indicado e uma unidade de enzima em volume final de 15 µl. Os padrões foram comparados aos biótipos descritos por BOSCO *et al.*, 2006.

Amostras representativas das localidades, bem como as que apresentarem padrões divergentes dos descritos por BOSCO *et al.*, 2006 tiveram o fragmento do mtCOI purificado e enviadas para sequenciamento para serem comparadas entre si e com outras sequências de moscas-brancas depositadas no GenBank, utilizando-se os programas Blast n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1994). A análise filogenética foi realizada com o programa MEGA versão 4.0 (KUMAR *et al.*, 2004), utilizando o método de "Neighbor-Joining", com valor de "bootstrap" 2000.

2.4 Detecção de begomovírus

O DNA total das folhas foi extraído pelo protocolo desenvolvido por DELLAPORTA *et al.*, 1983. A detecção de begomovirus foi feita a partir do DNA total utilizando-se inicialmente uma amplificação pela técnica de RCA ("rolling-circle amplification") com a enzima phi29 DNA polymerase utilizando-se o TempliPhi DNA Amplification Kit (GE Healthcare, USA) da maneira descrita por INOUE-NAGATA *et al.* 2004 com um aquecimento inicial do DNA total por 3 minutos a 95°C para aprimorar a amplificação. O produto de RCA foi utilizado para um PCR inicialmente com os oligonucleotídeos de detecção PAL1v1978 (5'- GCA TCT GCA GGC CCA CAT YGT CTT

YCC NGT -3) e PAR1c496 (5'- AAT ACT GCA GGG CTT YCT RTA CAT RGG -3') desenvolvidos por (ROJAS *et al.*, 1993).

2.5 Detecção de crinivírus

O RNA total foi extraído do tecido foliar de cada amostra com o reagente Trizol. A amplificação seguiu a metodologia de DOVAS *et al.*, 2002. Onde em uma primeira amplificação o RNA total de cada amostra foi submetido a uma reação de RT-PCR com o par de primers degenerados HS-11 (5'-GG(G/T)TT (A/G)GA(G/T) TT(C/T) GGTA CTAC-3') e HS-12 (5'CC(G/T) CCACC AAA(A/G) TCGTA-3') os quais amplificam um fragmento de aproximadamente 587 bp de uma região altamente conservada. O produto da RT-PCR foi submetido em seguida a uma reação de Nested-PCR usando o par de primers ToC5 (5'-GGTT TGGA TTTT GGTA CTACA TTC AGT-3') e ToC6 (5'-AAAC TGCC TGCA TGAA AAGT CTC-3') que são específicos para o ToCV e amplificam um fragmento de aproximadamente 463 bp.

2.6 Sequenciamento

O produto de PCR foi purificado utilizando-se o Kit QIAquick Gel Extraction da QIAGEN conforme recomenda o protocolo. O produto do purificado foi quantificado por gel e enviado à Macrogen (Koreia Seoul) para sequenciamento.

2.7 Ensaio de transmissão

Para a transmissão foram utilizados insetos adultos tanto da espécie NW2 quanto MEAM1 em ensaios paralelos. Os insetos foram transferidos com auxílio de aspirador bucal para pequenas gaiolas contendo ramos da plantas infectadas com um dos isolados virais. Estes foram mantidos em sala climatizada a 30°C por um período de acesso à aquisição (PAA) de 24 horas. Após esse PAA, as moscas-brancas foram transferidas para outras gaiolas contendo as plântulas saudas, permanecendo por 24 horas, sobre as mesmas condições para o período de acesso de inoculação (PAI). Para inoculação foram utilizados 15 insetos por planta, que foram transferidos para “clip-cages” colocados nas folhas (Figura 2).



Figuras 2A e 2B: A) Folhas de tomate infectadas com *Tomato severe rugose virus* com moscas submetidas ao período de acesso à aquisição (PAA); B) Planta de tomate com a “clip-cage” contendo 15 insetos no momento do período de acesso de inoculação (PAI).

Após o PAI, as plantas foram pulverizadas com os inseticidas Tiger 100 EC (Piriproxifem) e Actara 250 WG (Tiametoxam) para eliminação de todas as moscas-brancas, ninfas e ovos depositados. As plantas foram mantidas em gaiolas com telas anti-afídicas na casa de vegetação sob temperatura de 25 a 30°C por um período de 30 dias, para análise visual através da presença de sintomas e análises moleculares para a detecção do vírus. O controle negativo da transmissão foi realizado transferindo moscas-brancas provenientes da criação (livres de vírus) diretamente para uma planta sadia, onde permaneceram pelo mesmo período de 24 horas.

O número de plantas inoculadas variou para cada isolado. Os isolados utilizados foram de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), mantido em tomate cv. Santa Clara *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), mantido em *Euphorbia heterophylla*, *Tomato chlorosis virus* (ToCV), mantido em tomate cv. Santa Clara, *Bean golden mosaic virus* (BGMV), mantido em feijão comum e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV – Araguari/MG), mantido em maracujá, *Passiflora incarnata*. Os isolados de ToSRV, ToCV e SimMV - Araguari/MG foram gentilmente cedidos pelo Professor Doutor Jorge Alberto Marques Rezende da Esalq/USP – Piracicaba/SP, o isolado de EuYMV foi coletado na Fazenda Lageado no município de Botucatu/SP e o isolado de BGMV coletado no município de Piedade/SP.

Para o EuYMV, foi realizado um ensaio para verificar a capacidade desse vírus em infectar pimentão (*Capsicum annuum*) tendo como fonte uma planta daninha (*E. Heterophylla*) com *B. tabaci* espécie NW2, que adquiriu o EuYMV em *E. heterophylla* e foi posteriormente inoculado em plantas de pimentão.

3. RESULTADOS

3.1 Estabelecimento da colônia pura de New World 2

A colônia pura da espécie NW2 de *B. tabaci* foi estabelecida com sucesso, sendo todos os indivíduos amostrados identificados como membros da espécie NW2. A sequência parcial do gene mtCOI de um inseto da colônia pura quando comparada por BLASTn no GenBank, obteve uma identidade de 98% com uma sequência de *B. tabaci* da Argentina (AF340212) a qual é considerada pertencente a espécie NW2 (ALEMANDRI *et al.*, 2012). Portanto, seguindo o novo conceito de espécie dentro do complexo *B. tabaci* proposto cujo limite é 3.5% de identidade, constatamos que a colônia pura em questão é da espécie NW2, em todos os testes.

3.2 Obtenção e Manutenção dos Isolados Virais

Foram obtidos isolados de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV), *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV- Araguari/MG) para realização dos ensaios de transmissão (Figura 3).

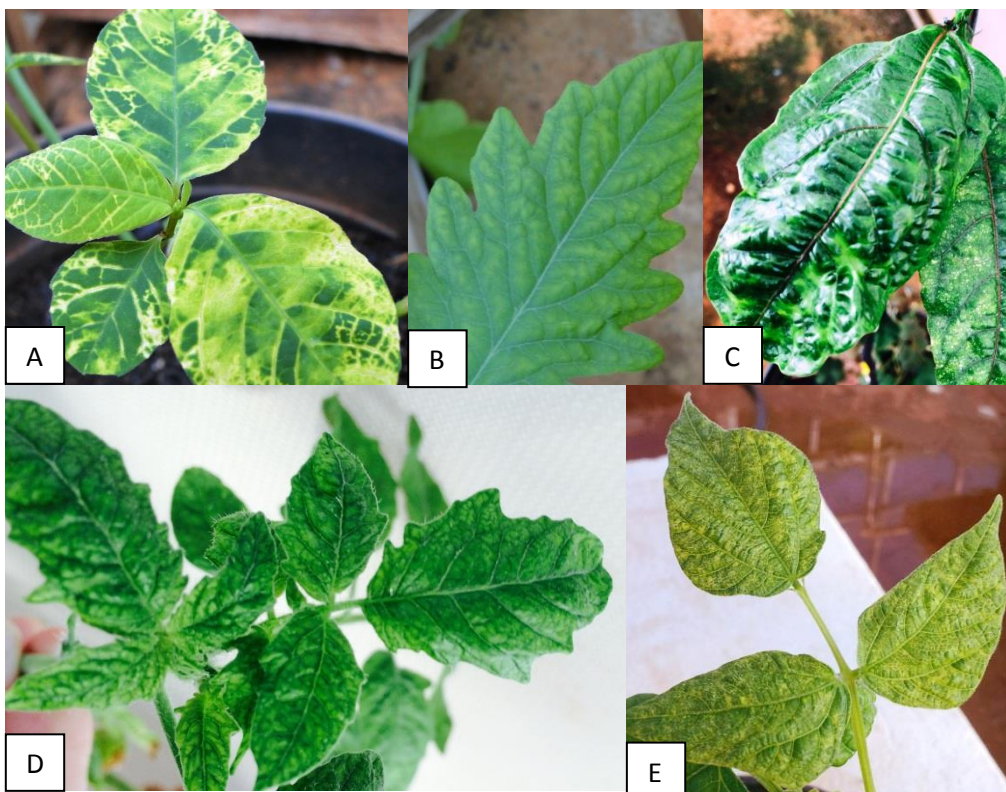


Figura 3: Isolados virais utilizados nos ensaios de transmissão. A) *Euphorbia yellow mosaic virus*; B) *Tomato chlorosis virus*; C) *Sida micrantha mosaic virus*; D) *Tomato severe rugose virus*; E) *Bean golden mosaic virus*.

O isolado de EuYMV teve 56% do DNA-A sequenciado. A sequência foi comparada através da ferramenta BLAST-n e verificou-se uma identidade de 98% com um isolado brasileiro de EuYMV (JX415192.1).

O isolado de BGMV teve 42% do DNA-A sequenciado. A sequência foi comparada por BLAST-n onde obteve-se 98% de identidade com um isolado de BGMV (FJ665283) do GeneBank.

O isolados de ToSRV, SimMV e ToCV foram confirmados por PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos. Para os isolados de ToSRV e ToCV, que estavam em tomate, foi feito PCR para verificar a não ocorrência de infecção mista (ToSRV + ToCV), confirmando a pureza do isolado.

3.3 Ensaios de Transmissão

Dentre os cinco isolados virais utilizados nos ensaios de transmissão para comparar a eficiência de transmissão entre NW2 e MEAM1, houve diferença evidente na transmissão apenas em dois, EuYMV e ToCV, como ilustrado na Figura 4.

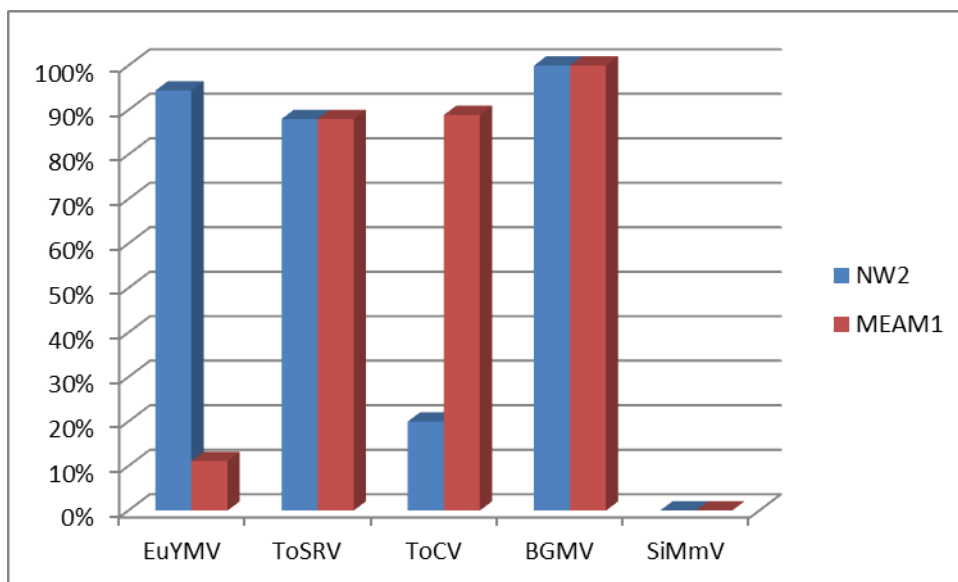


Figura 4: Eficiência de transmissão das espécies New World 2 (NW2) e Middle-East Asia Minor1 (MEAM1) em diferentes isolados virais.

3.3.1 *Euphorbia yellow mosaic virus*

Foram utilizadas 18 plantas para o ensaio com cada uma das espécies, NW2 e MEAM1. A espécie NW2 foi capaz de transmitir o EuYMV para 94,4% das plantas testadas enquanto que MEAM1 para apenas 11,11% das plantas (Figura 5).

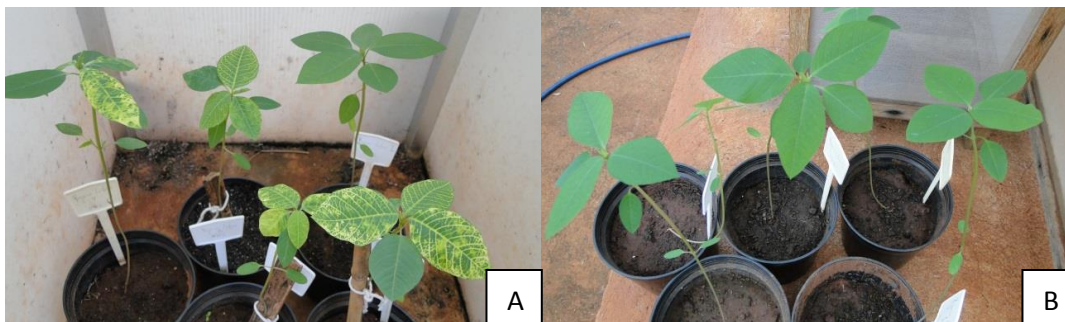


Figura 5: Ensaio de transmissão do *Euphorbia yellow mosaic virus* em plantas de *Euphorbia heterophylla* utilizando duas espécies diferentes de *Bemisia tabaci*: A) New World 2; B) Middle East-Asia Minor1.

Para esse vírus, foi realizado um ensaio de transmissão paralelamente, utilizando apenas a espécie NW2, na tentativa de transmitir EuYMV de *Euphorbia heterophylla* para sete plantas de pimentão (*Capsicum annuum*). Dentre as sete plantas, apenas uma foi infectada (14%), mas manteve-se assintomática.

3.3.2 *Bean golden mosaic virus*

Foram utilizadas para o ensaio 12 plantas para cada uma das espécies, NW2 e MEAM1. Tanto a espécie NW2 quanto MEAM1 transmitiram o BGMV para 100% das plantas e os sintomas já eram visíveis 15 dias após a transmissão.

3.3.3 *Tomato severe rugose virus*

Foram utilizadas para o ensaio 9 plantas para cada uma das espécies, NW2 e MEAM1. Tanto a espécie NW2 quanto MEAM1 transmitiram o ToSRV para 8/9 plantas (88%), demonstrando que ambas espécies de *B. tabaci* apresentaram a mesma eficiência de transmissão para o ToSRV.

3.3.4 *Sida micrantha mosaic virus*

O SimMV foi detectado em amostras de NW2 coletadas em campo, conforme os resultados obtidos no capítulo 2 desta dissertação, indicando a capacidade dessa espécie de mosca em adquirir esse vírus. Para verificar se a NW2 seria capaz de transmitir o SimMV, foi realizado um teste de transmissão comparando as duas espécies de *B. tabaci*, NW2 e MEAM1. A aquisição foi feita a partir de um isolado de *Sida micrantha mosaic virus* em maracujá e a inoculação feita em plantas de maracujá sadias. No ensaio com NW2 foram utilizadas 9 plantas, enquanto que para o ensaio de MEAM1 foram utilizadas 8 plantas. Em ambos os ensaios a *Bemisia tabaci* não foi capaz de transmitir o vírus. Houve grande dificuldade para a realização dos ensaios devido a grande mortalidade dos adultos durante a aquisição na planta de maracujá, isso ocorreu devido a baixa afinidade de *B. tabaci* pela hospedeira *Passiflora incarnata*.

Foi realizado também, um ensaio de biologia para comparar a afinidade das duas espécies de *B. tabaci* com a hospedeira *Passiflora incarnata*. O ciclo de

ovo até adulto variou de 21,5 dias para NW2 e 22,25 dias para MEAM1. A viabilidade de ovos, ou seja, a porcentagem de ovos que atingiram a fase de ninfa foi de 79,59% para NW2 e 69,16% para MEAM1. A porcentagem dos ovos que chegaram a fase adulta foi de apenas 12,24% para NW2 e 11,66% para MEAM1.

As duas espécies de *B. tabaci* foram capazes de completar o ciclo em *Passiflora incarnata*, indicando que elas são capazes de se alimentar na hospedeira, porém, a porcentagem dos ovos que alcançaram a fase adulta foi muito baixa para ambas as espécies de *B. tabaci*, se comparadas com culturas consideradas boas hospedeiras, isso reforça que nenhuma das espécies (NW2 e MEAM1) são vetoras do SimMV em maracujá, provavelmente devido a baixa afinidade com a hospedeira.

3.3.5 *Tomato chlorosis virus*

No ensaio de transmissão de ToCV foram utilizadas 10 plantas para NW2 e 9 plantas para MEAM1. Na transmissão realizada com NW2 apenas 2 das 10 plantas (20%) estavam infectadas 30 dias após a inoculação, enquanto que para MEAM1, oito das nove plantas (89%) estavam infectadas.

4. DISCUSSÃO

Houve diferença evidente na eficiência de transmissão entre NW2 e MEAM1 apenas em dois isolados, EuYMV e ToCV. NW2 transmitiu o EuYMV com uma eficiência muito maior comparada a MEAM1. A melhor eficiência pode estar relacionada à diversos fatores como melhor afinidade de NW2 à hospedeira *Euphorbia heterophylla*, que é uma planta onde NW2 é frequentemente encontrada em campo (MARUBAYASHI *et al.* 2012). Antes da entrada de MEAM1 no Brasil, já havia relatos de begomovírus infectando *Euphorbia* sp. (COSTA *et al.*, 1950), mostrando que as espécies indígenas de *Bemisia tabaci* estão de fato ligadas à hospedeiras da família Euphorbiaceae.

EuYMV é um vírus frequentemente encontrado na planta daninha *E. heterophylla*, porém, FERNANDES *et al.*, 2011 já haviam demonstrado a capacidade de EuYMV infectar uma planta cultivável, o pimentão (*Capsicum annuum*) através de biobalística. No ensaio realizado para verificar a capacidade do EuYMV em ser transmitido de *E. heterophylla* para pimentão com *B. tabaci* espécie NW2 foi demonstrado que essa espécie é capaz de transmitir o EuYMV com uma baixa eficiência (1 planta em 7 inoculadas). Esse resultado mostra que NW2 é capaz de transmitir um vírus de uma planta daninha para uma planta cultivada de importância econômica, porém, com baixa eficiência.

No ensaio utilizando o ToCV, MEAM1 foi muito mais eficiente (89%) na transmissão em relação a NW2 (20%). WINTERMANTEL *et al.*, 2006 constataram uma maior eficiência da espécie MEAM1 comparada à espécie nativa NW na transmissão do

ToCV. Os autores concluíram também que o vírus, que é transmitido de forma semi-persistente, fica retido no inseto por mais tempo em MEAM1, quando comparado a NW. Essa diferença poderia estar relacionada à afinidade das diferentes espécies com a planta hospedeira do ToCV, *Solanum lycopersicum*, uma vez que FRANÇA *et al.*, 1996 mostraram que o MEAM1 coloniza mais eficientemente solanáceas quando comparada com NW, que pertence ao mesmo grupo de NW2.

Por outro lado, no ensaio de ToSRV, verificou-se que as espécies MEAM1 e NW2 transmitiram o ToSRV com a mesma eficiência (88%), utilizando-se tomateiro como fonte de inóculo, indicando que talvez a hospedeira não seja o fator que esteja limitando a baixa eficiência de NW2 em transmitir o ToCV.

Estudos recentes com crinivírus revelaram algumas das interações existentes entre as proteínas virais e as proteínas do vetor *B. tabaci*. MILAN-LEIVA *et al.*, 2014 identificaram duas proteínas presentes no vetor que estariam interagindo com o ToCV. O estudo demonstrou que as duas proteínas capsidiais do ToCV (CP e CPm) interagem com duas proteínas do vetor, a “hexamerin” e a “sec6”, concluindo que essas proteínas estariam diretamente relacionadas com a transmissão deste vírus pela mosca-branca. Portanto, se a afinidade pela hospedeira não for o fator responsável pela diferença na eficiência de transmissão entre as espécies, há a possibilidade da eficiência de transmissão ser reduzida devido a alguma diferença na interação entre as proteínas do ToCV e as proteínas da *B. tabaci* espécie NW2, porém, estudos posteriores seriam necessários para comprovar essa hipótese.

Para o BGMV, ambas as espécies proporcionaram uma eficiência de transmissão muito alta. Isso mostra que a espécie nativa NW2 de *B. tabaci* é igualmente capaz à espécie invasora MEAM1 de transmitir um vírus de grande importância econômica como o BGMV, que é a principal doença do feijoeiro na América Latina.

SimMV não foi transmitido por nenhuma das duas espécies de *B. tabaci* testadas. Esse resultado já era esperado para MEAM1, uma vez que ALVES, 2012 realizou ensaios de transmissão com esse vírus e não obteve sucesso. SimMV é um begomovírus comumente encontrado em *Sida* spp., e infecta maracujá com baixa frequência (ALVES, 2012). Porém, até agora não foi possível transmitir SimMV experimentalmente utilizando *B. tabaci*. Esse vírus foi utilizado nos ensaios pelo fato de ter sido detectado em moscas da espécie NW2 encontradas em campo. Isso mostra que NW2 é capaz de adquirir

esse vírus, porém, aparentemente não é capaz de transmiti-lo para maracujá, pelo menos utilizando-se as colônias de moscas-brancas testadas.

De uma forma geral, os resultados mostraram que a espécie NW2, que foi recentemente descrita e até o momento não havia sido relatada como vetora de vírus, pode ter um papel importante na transmissão de begomovírus e crinivírus. O fato de NW2 estar mais restrita a plantas daninhas, faz com que MEAM1 seja sem dúvida a grande responsável pelas grandes epidemias causadas por estas espécies de vírus em culturas economicamente importantes no Brasil. Porém, NW2 estaria contribuindo para a dispersão de diversos vírus de plantas daninhas, que comumente servem como fontes de inóculo de vírus para as plantas cultiváveis.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- NW2 foi capaz de transmitir o BGMV, ToSRV e EuYMV com alta eficiência, o ToCV com baixa eficiência e não foi capaz de transmitir o SimMV;
- Houve diferença evidente na eficiência de transmissão entre MEAM1 e NW2 apenas para o EuYMV e para o ToCV;
- Foram encontradas sequências relacionadas aos vírus SimMV, SiMoV, AbMV e SiYNV nos espécimes de *B. tabaci* pertencentes à espécie New World e New World 2 no campo;
- ToCV foi verificado no Estado do Rio Grande do Sul associado a uma grande infestação do vetor *Trialeurodes vaporariorum* na estufa.

6. REFERÊNCIAS

ALEMANDRI, V.; DE BARRO, P.; BEJERMAN, N.; ARGÜELLO CARO, E. B.; DUMÓN, A. D.; MATTIO, M. F.; RODRIGUEZ, S. M.; TRUOL, G. Species Within the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Complex in Soybean and Bean Crops in Argentina. **Journal of Economic Entomology** Lanham, US, v. 105, n. 1, p. 48-53, 2012.

ALVES, A. C. C. DE NEGREIROS. **Identificação de isolados de *Sida mottle virus* e *Sida micrantha mosaic virus* não transmissíveis por *Bemisia tabaci* biótipo B que infectam maracuzajeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicapa*).** 2012. 71p. Tese Doutorado (Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BARBOSA, L.F.; YUKI, V.A.; MARUBAYASHI, J.M.; DE MARCHI, B.R.; PAVAN, M.A.; BARROS, D.R.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; KRAUSE-SAKATE, R. Mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo Q identificado no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil In: **XXXVII Congresso Paulista de Fitopatologia**, Botucatu. 2014a.

BARBOSA, L.F.; MARUBAYASHI, J.M.; DE MARCHI, B.R.; YUKI, V.A.; PAVAN, M.A.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; KRAUSE-SAKATE, R. Indigenous American

species of the *Bemisia tabaci* complex are still widespread in the Americas. **Pest Management Science**, Sussex, Inglaterra, DOI 10.1002/ps.3731, 2014b.

BOSCO, D., LORIA, A., SARTOR, C.; CENIS, J.L. PCR-RFLP Identification of *Bemisia tabaci* Biotypes in the Mediterranean Basin. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, Israel, v.34, n.3, p. 243-251, 2006.

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

DE BARRO, P. J., S. S. LIU, L. M. BOYKIN, AND A. B. DINSDALE. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 56, p. 1-19. 2011.

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

DOVAS, C.I.; KATIAS, N.I.; AVGELIS, A.D.; Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of yellowing disease of tomato in Greece. **Plant Disease**, Saint Paul, US, v. 86, p. 1345-1349, 2002.

FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUE, L.C.; DE OLIVEIRA, C.L.; CRUZ, A.R.R.; DA ROCHA, W.B.; PEREIRA, T.G.; NAITO, F.Y.B.; DIAS, N.M.; NAGATA, T.; FARIA, J.C.; ZERBINI, F.M.; ARAGAO, F.J.L; INOUE-NAGATA, A.K. Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting *Euphorbia heterophylla* plants. **Archives of Virology**, New York, US, DOI 10.1007/s00705-011-1070-4, 2011.

FRANÇA FH, VILLAS-B OAS GL, CASTELO-BRANCO M. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no distrito federal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, SP, v. 25, p. 369–72, 1996.

FROHLICH D, TORRES-JEREZ I, BEDFORD ID, MARKHAM PG, BROWN JK: A phylogeographic analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. **Molecular Ecology**, Oxford, GB, v. 8, p.1593-1602, 1999.

INOUE-NAGATA, A. K.; ALBUQUERQUE, L. C.; ROCHA, W. B.; NAGATA, T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage π 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, ND, v. 116, p. 209–211, 2004.

JONES, C.M.; GORMAN, K.; DENHOLM, I.; WILLIAMSON, M.S. Highthroughput allelic discrimination of B and Q biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci*, using *TaqMan* allele-selective PCR. **Pest Management Science**, Sussex, GB, v. 64, p. 12-15, 2008.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, London, GB, v.5, p.150-163, 2004.

LOWE, S.; BROWNE, M.; BOUDJELAS, S.; DE POORTER, M. 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the Global Invasive Species Database. The Invasive Species Specialist Group (ISSG), World Conservation Union (IUCN): 6-7, 2000.

MARUBAYASHI, J. M.; YUKI, V. A.; ROCHA, K. C. G.; MITUTI, T.; PELEGRINOTTI, F. M.; FERREIRA, F. Z.; MOURA, M. F.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R. At least two indigenous species of the *Bemisia tabaci* complex are present in Brazil. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, DE, v. 137: 113-121, 2012.

MILAN-LEIVA, A.; MARTIN-RODRIGUEZ, P.; FIALLO-OLIVE, E.; CASTILLO, A.G.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. The minor capsid protein of the Crinivirus *Tomato chlorosis virus* interacts with two *Bemisia tabaci* proteins in the yeast two-hybrid system. In: **II International Hemipteran Plant Interactions Symposium**, Riverside, 2014.

ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L.; RUSSELL, D.R.; MAXWELL, D.P. Use of degenerate primers in the polimerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminivirus. **Plant Disease**, Saint Paul, v.77, p.340-347, 1993.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, GB, v.22, p.4673-4680, 1994.

WINTERMANTEL, W.M.; WISLER, G.C. Vector Specificity, Host Range, And Genetic Diversity of *Tomato chlorosis virus*. **Plant Disease**, Saint Paul, US, v. 90, p. 814, 2006.