

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

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO VIRAL EM
PIMENTÃO INFECTADO POR TOSPOVÍRUS COM O USO DE
PIRACLOSTROBINA + METIRAM**

DAVID MARQUES DE ALMEIDA SPADOTTI

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Proteção de
Plantas).

BOTUCATU – SP

Abril – 2016

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

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO VIRAL EM
PIMENTÃO INFECTADO POR TOSPOVÍRUS COM O USO DE
PIRACLOSTROBINA + METIRAM**

DAVID MARQUES DE ALMEIDA SPADOTTI

Orientadora: Prof. Dra. Renate Krause-Sakate
Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Proteção de
Plantas).

BOTUCATU – SP
Abril – 2016

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

S732a Spadotti, David Marques de Almeida, 1988-
Avaliação da produção e concentração viral em pimentão infectado por tospovírus com o uso de piraclostrobina + metiram / David Marques de Almeida Spadotti. - Botucatu : [s.n.], 2016
ix, 47 f. : fots. color., grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016
Orientador: Renate Krause-Sakate
Coorientador: Jorge Alberto Marques Rezende
Inclui bibliografia

1. Pimentão - Resistência a doenças e pragas. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. Vírus de plantas - Controle. I. Krause-Sakate, Renate. II. Rezende, Jorge Alberto Marques. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO VIRAL EM PIMENTÃO INFECTADO POR TOSPOVÍRUS COM O USO DE PIRACLOSTROBINA - METIRAM

AUTOR: DAVID MARQUES DE ALMEIDA SPADOTTI

ORIENTADORA: RENATE KRAUSE SAKATE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. RENATE KRAUSE SAKATE
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu

Prof. Dr. VALDIR ATSUSHI YUKI
Departamento De / Instituto Agrônômico de Campinas

Prof. Dr. JULIO MASSAHARU MARUBAYASHI
Depto. Proteção Vegetal - FCA

Prof. Dr. MARCELO AGENOR PAVAN
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu

Prof. Dr. EDSON LUIZ LOPES BALDIN
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu

Botucatu, 01 de abril de 2016

“Você tem que encontrar o que você gosta. E isso é verdade tanto para o seu trabalho quanto para seus companheiros. Seu trabalho vai ocupar uma grande parte da sua vida, e a única maneira de estar verdadeiramente satisfeito é fazendo aquilo que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um ótimo trabalho é fazendo o que você ama fazer. Se você ainda não encontrou, continue procurando. Não se contente. Assim como com as coisas do coração, você saberá quando encontrar. E, como qualquer ótimo relacionamento, fica melhor e melhor com o passar dos anos.

Então continue procurando e você vai encontrar. Não se contente”

Steve Jobs

À minha família,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Marcelo Agenor Pavan, Renate Krause-Sakate, Jorge Alberto Marques Rezende, pela orientação, confiança, amizade e inspiração para o desenvolvimento de todos os meus trabalhos;

Aos professores e funcionários do Departamento de Proteção Vegetal FCA/UNESP, pelos conhecimentos transmitidos, amizade e contribuição na obtenção deste título, em especial aos professores Edson Luiz Lopes Baldin, Regiane Cristina Oliveira de Freitas Bueno, Carlos Gilberto Raetano, Antônio Carlos Maringoni e Chukichi Kurozawa e ao pesquisador do IAC Dr. Valdir Yuki pela troca de conhecimentos;

Aos funcionários da fazenda de São Manuel, pela contribuição na execução do experimento, em especial à Dona Maria e Senhores Luiz, Nilton e Geraldo;

Aos técnicos de campo “Paulinho” e “Pereira”, pelo auxílio na manutenção dos trabalhos desenvolvidos em estufa no Departamento de Proteção Vegetal e pela amizade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsas de estudos modalidades doutorado e Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) na Washington State University, sob orientação do Dr. Hanu R. Pappu;

Aos colegas do curso de Pós-graduação, por todo apoio, amizade e momentos de descontração durante a realização dos estudos, em especial aos amigos: Bruno, Cris, Daiana, Gabriel, Guilherme, Júlio, Kelly, Késsia, Leonardo, Letícia, Leysimar, Luis, Milena, Mônica, Tatiana, Vinicius, João e Marcelo;

Em especial à minha amiga Evelynne Urzedo Leão, pela confiança e dedicação aos desafios do tospovírus;

Finalmente, agradeço à minha família em especial aos meus pais, irmão e primo Mário Rafael Spadotti Soares, pela paciência e amizade nos últimos anos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
1 RESUMO	1
2 SUMMARY	3
3 INTRODUÇÃO.....	5
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
4.1 A cultura do pimentão.....	7
4.2 Viroses do pimentão	8
4.2.1 Gênero <i>Tospovirus</i>	8
4.2.2 Transmissão de tospovírus	9
4.2.3 Manejo de tospovírus	11
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
5.1 Experimentos a campo.....	14
5.2 Experimento em estufa	15
5.3 Determinação da resistência de planta adulta (Age-related resistance – ARR).....	16
5.4 Confirmação da infecção viral	16
5.5 PTA-ELISA	17
5.6 Extração do RNA e preparo do cDNA	17
5.7 PCR quantitativo (Real time PCR)	18
5.8 Aspectos de produção	18
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
6.1 Experimentos a campo.....	19
6.2 Experimento em estufa	21
6.3 Determinação da resistência de planta adulta (Age-related resistance – ARR).....	27

6.3 PCR quantitativo (Real time PCR)	29
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
APÊNDICES	40
APÊNDICE A.....	41
APÊNDICE B	42
APÊNDICE C	43
APÊNDICE D.....	44
APÊNDICE E	45
APÊNDICE F	46
ANEXO 1	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Croqui dos experimentos realizados na Fazenda Experimental de São Manuel..	20
Figura 2. Plantas testemunhas dos 4 tratamentos (sem Cabrio® Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; sem Cabrio® Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura; com Cabrio® Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; com Cabrio® Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura), respectivamente.	25
Figura 3. Plantas inoculadas aos 0 DAT dos 4 tratamentos (sem Cabrio® Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; sem Cabrio® Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura; com Cabrio® Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; com Cabrio® Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura), respectivamente.	25
Figura 4. Plantas inoculadas aos 15 DAT dos 4 tratamentos (sem Cabrio® Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; sem Cabrio® Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura; com Cabrio® Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; com Cabrio® Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura), respectivamente.	26
Figura 5. Plantas inoculadas aos 30 DAT dos 4 tratamentos (sem Cabrio® Top no Transplante e com durante o ciclo da cultura; sem Cabrio® Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura; com Cabrio® Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; com Cabrio® Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura), respectivamente.	26
Figura 6. Plantas inoculadas aos 45 DAT dos 4 tratamentos (sem Cabrio® Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; sem Cabrio® Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura; com Cabrio® Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; com Cabrio® Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura), respectivamente.	27
Figura 7. Porcentagem de plantas infectadas por GRSV e TCSV, conforme a idade de inoculação via extrato-vegetal tamponado.	29

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Efeito de P + M na produção e qualidade dos frutos, aplicado ou não no transplante e durante o ciclo da cultura em estufa.	24
Tabela 2. Detecção do <i>Groundnut ringspot virus</i> por qPCR.....	30

1 RESUMO

As cultivares de pimentão (*Capsicum annuum* L.) são geralmente suscetíveis à infecção por vírus, destacando-se no Brasil espécies dos gêneros *Potyvirus*, *Begomovirus*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus* e *Tospovirus*, sendo que deste último gênero predominam as espécies GRSV (*Groundnut ring spot virus*) e TCSV (*Tomato chlorotic spot virus*) no Estado de São Paulo. Devido ao amplo número de hospedeiros infectados pelos tospovírus e a ineficiência do controle químico na transmissão do vírus pelo vetor (tripes), é imprescindível o manejo integrado da doença. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso do defensivo químico piraclostrobina + metiram (P + M) como forma alternativa de controle dos tospovírus GRSV e TCSV no híbrido de pimentão Dahra RX, avaliando-se a produção quantitativa e qualitativa da planta e a influência do produto sobre a quantidade relativa de partículas virais do GRSV. Três experimentos foram realizados paralelamente, sendo dois em campo, dos quais um recebeu pré-tratamento pela aplicação de P + M (4 g. l⁻¹) na bandeja. No experimento em estufa, o pré-tratamento consistiu pela aplicação de P + M (4 g. l⁻¹) no transplante em 50% das plantas (total de 120 plantas). Os tratamentos foram constituídos da inoculação do vírus de forma natural no campo e via extrato vegetal em estufa aos 0, 15, 30, 45 dias após o transplantio (DAT) com ou sem aplicação de P + M (4.0 g. l⁻¹) durante o cultivo. A infecção pelos vírus GRSV/TCSV foi confirmada por PTA-

ELISA e a concentração viral via qPCR foi avaliada para as plantas cultivadas em estufa. No experimento realizado em estufa obteve-se 98% das plantas infectadas quando inoculadas via extrato vegetal, enquanto 25% das plantas no campo foram infectadas naturalmente por GRSV ou TCSV, porém com predominância do GRSV. A infecção de plantas deste híbrido pelas espécies GRSV e TCSV até os 45 dias após o transplante causaram prejuízos significativos na qualidade e quantidade de frutos produzidos. O uso do produto durante o cultivo deste híbrido não alterou os parâmetros de produção das plantas. Em condições de estufa, as mudas tratadas no transplantio com P + M apresentaram menor produção total, indicando que o modelo adotado de aplicação do produto não foi eficiente. A concentração viral do GRSV, aos 70 DAT não foi alterada com a utilização do produto, indicando pouco efeito deste na supressão do vírus e da doença.

Palavras-chave: *Capsicum annuum*, qPCR, GRSV, TCSV, controle, indução de resistência.

EVALUATION OF PRODUCTION AND VIRAL CONCENTRATION IN PEPPER INFECTED BY TOSPOVIRUS USING PYRACLOSTROBIN + METIRAM.

Botucatu, 2016. 47 p. Thesis (Doctorate Degree in Agronomy/Plant Protection) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Author: DAVID MARQUES DE ALMEIDA SPADOTTI

Adviser: Prof. Dra. RENATE KRAUSE-SAKATE

Co-Adviser: Prof. Dr. JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE

2 SUMMARY

The cultivars of pepper (*Capsicum annuum* L.) are usually susceptible to virus infection, especially by the species of the genus *Potyvirus*, *Begomovirus*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus* and *Tospovirus* in Brazil. GRSV (*Groundnut ring spot virus*) and TCSV (*Tomato chlorotic spot virus*) are the main tospovirus species in São Paulo state. Due to the large host circle of tospovirus and inefficient chemical vector control (thrips) in the virus transmission, the integrated management of the disease is essential. Thus, the aim of this study was to evaluate the use of chemical defensive Pyraclostrobin + Metiram (P + M) as an alternative form of control of tospoviruses GRSV and TCSV in the pepper hybrid Dahra RX, assessing the quantitative and qualitative production of the plant and the product's influence on the concentration of viral particles of GRSV. Three experiments were carried out in parallel, two in the field, one which received pre-treatment by applying P + M (4 g. L⁻¹) on the tray. In the greenhouse experiment, the pre-treatment consisted by application of P + M (4 g. L⁻¹) in the transplanting of 50% of the plants (total 120 plants). The treatments consisted of inoculation of the virus naturally in the field and sap transmission in greenhouse at 0, 15, 30, 45 days after transplanting (DAT) with application or not of P + M (4.0 g. L⁻¹) during cultivation. Infection by GRSV / TCSV virus was confirmed by PTA-ELISA and virus concentration was evaluated by qPCR for plants in greenhouse. In the greenhouse experiment was obtained 98% of infected plants sap transmitted, while 25% of the plants in the field were naturally infected by GRSV or TCSV, but with predominance of GRSV. Infection of plants of this hybrid by GRSV and TCSV until 45 days after transplantation caused considerable damage in the quality and quantity of fruits produced. The use of the product during the cultivation of the hybrid did not affect the production parameters. Under greenhouse conditions, the seedlings treated at transplanting with P + M had lower total

production, indicating that the model adopted for the application of the product was not efficient. The viral concentration of GRSV at 70 DAT was not altered by the use of the product, indicating little effect of suppression of the virus and disease.

Keywords: *Capsicum annuum*, qPCR, GRSV, TCSV, control, resistance induction.

3 INTRODUÇÃO

A família Solanaceae constitui uma das principais famílias botânicas da agricultura brasileira e mundial, destacando-se o tomate (*Solanum lycopersicum*), a batata (*Solanum tuberosum*) e o pimentão (*Capsicum annuum*) (OLMSTEAD et al., 2008). Em 2014 o Instituto de Economia Agrícola (IEA) estimou a produção do pimentão no Estado de São Paulo em aproximadamente 94 mil toneladas em uma área de 2,3 mil hectares (IEA, 2014).

As doenças e pragas limitam severamente o cultivo do pimentão em todo o mundo, e em algumas áreas as medidas de controle utilizadas acarretam um aumento no custo e produção. Embora existam apenas 5 espécies de pimentão domesticadas (IBIZA et al., 2012), essas cultivares são geralmente suscetíveis à infecção por vírus (LAWRENCE et al., 2014). No mundo foram listadas 65 espécies de vírus capazes de infectar o gênero *Capsicum* e no Brasil destacam-se as espécies dos gêneros *Potyvirus*, *Begomovirus*, *Tospovirus*, *Cucumovirus* e *Tobamovirus*, pela predominância em diversas regiões produtoras do país, e pelos prejuízos econômicos que podem causar (DE ÁVILA et al. 2004; LIMA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012). Os tospovírus são encontrados em todos os continentes e infectam cultivares de hortaliças, leguminosas e plantas ornamentais economicamente importantes (PAPPU et al., 2009; ZHOU et al., 2011;

OLIVEIRA et al., 2012).

O GRSV (*Groundnut ring spot virus*) é a espécie prevalente no Brasil (LOPES; ÁVILA, 2005). Os tospovírus são transmitidos de maneira circulativa propagativa por insetos da ordem Thysanoptera, conhecidos como tripes (WIJKAMP et al., 1993; HOGENHOUT et al., 2008). São insetos muito pequenos e encontram-se disseminados em todo o mundo. Pelo menos 14 espécies de tripes pertencentes aos gêneros *Frankliniella*, *Thrips*, *Scirtothrips*, *Ceratothripoides* e *Dictyothrips* já foram descritas como vetores de tospovírus (CIUFFO et al., 2010; KING et al., 2011).

Na prática, o manejo de tospovírus é complexo em razão de envolver um enorme número de espécies hospedeiras tanto do vírus como do vetor e dificuldades no controle químico do inseto (PAPPU et al., 2009). Problemas envolvendo resistência a inseticidas em *Frankliniella occidentalis* (BIELZA, 2008) e *Thrips tabaci* (TODA; MORISHITA, 2009) já foram relatados. O controle biológico como o uso do percevejo predador *Orius* sp. (KAWAI, 1995; SILVEIRA, 2003; VAN DEN MEIRACKER, 1999), do ácaro predador *Stratiolaelaps scimitus* disponível comercialmente no Brasil (FREIRE; MORAES, 2007), e do fungo *Metarhizium anisopliae* (NIASSY et al., 2012) também foram estudados pelos efeitos biopesticidas que causam ao vetor.

O manejo integrado da doença é a prática mais sustentável para o controle de vírus, destacando-se o emprego de variedades tolerantes ou resistentes. No gênero *Capsicum* foi relatado o gene dominante de resistência *Tsw*, efetivo apenas contra isolados da espécie TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) (BOITEUX; DE AVILA, 1994). Entretanto, este gene de resistência não é efetivo ao tospovírus GRSV e TCSV (*Tomato chlorotic spot virus*) e já existem relatos de quebra de resistência para o gene *Tsw* na Itália e Espanha (GARCIA-ARENAL; MCDONALD, 2003) e Argentina (FERRAND et al., 2015).

A aplicação de piraclostrobina + metiram (4g/L) induziu peso e volume maiores de frutos de tomate (GUIMARÃES et al, 2014), demonstrando potencial para aumento na produção da cultura em áreas com a ocorrência dos vírus GRSV e TCSV.

Diante desses fatos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de piraclostrobina + metiram como forma alternativa de controle dos tospovírus GRSV e TCSV na cultura do pimentão, utilizando-se a infecção natural no campo e a inoculação via extrato vegetal em condições controladas em estufa. A produção quantitativa e qualitativa da planta e a influência do produto sobre a concentração relativa de partículas virais do GRSV nos diferentes tratamentos foram também investigadas neste trabalho.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 A cultura do pimentão

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) pertence à família Solanaceae, e é cultivado praticamente em todo o território nacional (ECHER et al., 2002). O gênero *Capsicum* possui seu centro de origem em regiões tropicais da América Latina, e é representado por 27 espécies, das quais apenas cinco são domesticadas (IBIZA et al., 2012). Segundo o IBGE (2006), a produção nacional do pimentão concentra-se nas regiões Sudeste (44%), Nordeste (31%), Sul (15%) e Norte (1%), apresentando produtividade média em estufa de 200 toneladas por hectare, em uma área total de 12 mil hectares. O Estado de São Paulo cultiva 23,7% dessa área e produz em média 50 mil toneladas por ano (AGRIANUAL, 2016). Apenas 4,7% da área total está sob cultivo protegido no Estado de São Paulo e Distrito Federal (KOBORI et al., 2008).

4.2 Viroses do pimentão

As doenças e pragas podem limitar severamente o cultivo do pimentão em todo o mundo, bem como a ocorrência das desordens nutricionais. Em algumas áreas, as medidas de controle utilizadas oneram significativamente no custo de produção. As cultivares de pimentão são geralmente suscetíveis à infecção por vírus (LAWRENCE et al., 2014). Pernezny et al. (2003) listaram 65 espécies de vírus capazes de infectar o gênero *Capsicum* em todo o mundo. No Brasil, destacam-se as espécies *Potato virus Y* (PVY) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) do gênero *Potyvirus*, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) do gênero *Begomovirus*, GRSV, TCSV e TSWV do gênero *Tospovirus* e *Cucumber mosaic virus* (CMV) do gênero *Cucumovirus* (DE ÁVILA et al. 2004; LIMA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012).

Destes vírus, ressalta-se a importância dos tospovírus, pela severidade dos sintomas ocasionados na planta que geralmente apresenta necrose dos ramos, mosaico e deformação do limbo foliar, com a presença de anéis concêntricos nos ramos, folhas e frutos (PAPPU, et al. 2009).

4.2.1 Gênero *Tospovirus*

O primeiro relato de tospovírus na literatura ocorreu na Austrália em 1915 (BRITTLEBANK, 1919) e em 1930 o agente etiológico foi identificado como TSWV (SAMUEL et al., 1930). Trabalhos posteriores validaram a criação e a posição do gênero *Tospovirus*, o único infectando plantas da família *Bunyaviridae*, sendo TSWV a espécie tipo (FAUQUET et al., 2005). Atualmente, a família *Bunyaviridae* é composta por cinco gêneros: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus* (KING et al., 2011).

Os tospovírus são constituídos de partículas pleiomórficas de 80-120 nm de diâmetro, genoma de RNA fita simples tripartido com polaridade negativa ou ambisenso e possuem envelope formado por glicoproteínas que envolve o vírus (KORMELINK et al., 1992; STORMS et al., 1998). Os segmentos genômicos são denominados RNA S (Small), RNA M (Medium) e RNA L (Large). Possuem sequências terminais com uma complementaridade parcial, que permite o surgimento de uma conformação pseudocircular (DE HAAN et al., 1989). O RNA S codifica uma proteína não

estrutural, supressora de silenciamento gênico no sentido viral denominada NSs, e a nucleoproteína (N) no sentido complementar viral (DE HAAN et al., 1990; TAKEDA et al., 2002). O RNA M codifica uma proteína não estrutural de movimento no sentido viral denominada NSm e o precursor das glicoproteínas do envelope (Gn e Gc) no sentido complementar viral (KORMELINK et al., 1992; STORMS et al., 1998). Já o RNA L, diferentemente dos segmentos anteriores que apresentam sequências ambisenso, possui somente polaridade negativa e codifica uma grande proteína (proteína L) com aminoácidos conservados e encontrados em RNA polimerases dependentes de RNA (DE HAAN et al., 1991). Assim, o vírion é composto por ribonucleoproteínas (RNP), que são os segmentos de RNA encapsidados por nucleoproteínas (N) e por algumas cópias da RNA polimerase viral dependente de RNA (proteína L) (VAN POELWIJK et al., 1993). O envelope que circunda estes complexos ribonucleoprotéicos é oriundo de membranas celulares dos hospedeiros e possui projeções na sua superfície compostas pelas glicoproteínas virais Gn e Gc (KIKKERT et al., 1999).

No Brasil, os tospovírus infectam várias culturas de interesse econômico. A espécie tipo TSWV foi relatada em meados da década de 40 infectando fumo (SILBERSCHMIDT, 1937). Essa doença é conhecida como vira-cabeça, em razão dos sintomas que as plantas infectadas apresentam (COSTA; FORSTER, 1941). Estudos posteriores identificaram a presença de outras espécies como TCSV, GRSV, *Iris yellow spot virus* (IYSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) e *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) (DE ÁVILA et al., 1990; RESENDE et al., 1996, BEZERRA et al., 1999, POZZER et al., 1999), e recentemente foi identificada a espécie tentativa Bean necrotic mosaic virus (BeNMV) (OLIVEIRA et al., 2012). Em um estudo de levantamento realizado por Colariccio et al. (2001) constatou-se o TCSV como vírus predominante em São Paulo e Rio Grande do Sul, o GRSV em Minas Gerais, o TSWV no Distrito Federal e o CNSV de ocorrência esporádica.

4.2.2 Transmissão de tospovírus

Os tospovírus são transmitidos de maneira persistente e propagativa por insetos da ordem Thysanoptera, conhecidos como tripses (WIJKAMP et al., 1995). No processo de transmissão, o inseto adquire o vírus principalmente no primeiro e segundo

estágio larval (WIJKAMP et al., 1993). Para que o vírus seja transmitido com sucesso, ele precisa passar por diversas barreiras dentro do corpo do inseto. Os primeiros sinais de infecção em tripes por tospovírus foram visualizados em células epiteliais do intestino médio, principalmente na região anterior, posteriormente, o vírus se espalha pelos tecidos musculares do intestino médio. Na fase adulta, o vírus foi detectado nos tecidos musculares viscerais e no epitélio do intestino médio e, após 72 horas de aquisição, o vírus foi detectado nas glândulas salivares e nos ligamentos que conectam o intestino médio às glândulas salivares (NAGATA et al., 1999; MONTEIRO-ASTÚA et al., 2016).

Apesar da provável existência de barreiras à circulação do vírus no corpo do tripe, presume-se que a entrada do vírus pelas células do intestino do inseto é mediada por uma interação entre receptores de membrana do intestino médio e proteínas do RNA M do TSWV, semelhante ao que ocorre com outros membros da família *Bunyaviridae* (BANDLA et al., 1998, WHITFIELD et al., 2005). As glicoproteínas são as prováveis proteínas virais com função de adesão às células dos vetores; elas exercem importante papel na infecção do inseto vetor e são, provavelmente, os primeiros componentes virais que interagem com um receptor celular presente no intestino médio do tripe (ULLMAN et al., 1992; WIJKAMP et al., 1993; WHITFIELD et al., 2005).

Em condições de campo, a transmissão só se inicia quando o inseto atinge o estágio adulto (VAN DE WETERING et al., 1996). Na fase adulta, o inseto não adquire o vírus devido a uma barreira histológica localizada no intestino, que aparentemente impede a fixação dos vírions (ULLMAN, et al., 1992). Foi encontrada uma proteína de 50 KDa no intestino médio de *F. occidentalis* como uma candidata à receptora para o TSWV, indicando que a concentração do receptor celular varia de acordo com a idade do inseto, corroborando estudos que mostram que a aquisição do vírus é reduzida conforme o estágio de desenvolvimento do vetor (BANDLA et al. 1998; WHITFIELD et al., 2005). Não há transmissão vertical do vírus de insetos adultos para sua prole, ou seja, cada geração de tripes só adquire o vírus no estágio larval alimentando-se em uma planta doente (WIJKAMP et al., 1996; WHITFIELD et al., 2005).

Quatorze espécies de tripes pertencentes aos gêneros *Frankliniella* (nove espécies), *Thrips* (duas), *Scirtothrips* (uma), *Ceratothripoides* (uma) e *Dictyothrips* (uma) já foram descritas como vetores de tospovírus no mundo (CIUFFO et al., 2010; KING et al. 2011). No Brasil, foram relatadas cinco espécies vetorais: *F. Schultzzei* (Trybom), *F. Occidentalis* (Pergande), *F. Zucchini* Nakahara Monteiro, *T. Tabaci* Lindeman e *T. Palmi*

Karny (MONTEIRO et al., 2001). Até a década de 1980, *T. tabaci* era considerada a principal espécie vetora, devido principalmente à sua ampla distribuição geográfica. A partir da década de 90, *F. occidentalis* tornou-se o principal vetor em decorrência de sua rápida disseminação no Hemisfério Norte. As principais espécies vetores de GRSV, com relação à eficiência de transmissão, são *F. schultzei* (93,1%) e *F. occidentalis* (17,5%) (NAGATA et al., 2004).

4.2.3 Manejo de tospovírus

O manejo de tospovírus é difícil devido ao amplo círculo de hospedeiros e ao ineficiente controle químico do tripses que atua como vetor (PAPPU et al., 2009). O uso de inseticidas para controlar o tripses tem se mostrado um método de baixa eficiência, não reduzindo, de maneira significativa, a incidência de TSWV em diferentes cultivos (CHO et al., 1989; PAPPU et al., 2009). A resistência a inseticidas em *F. occidentalis* já foi documentada em uma série de categorias de produtos químicos, incluindo os organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides e spinosins (BIELZA, 2008).

Para *T. tabaci* também já foi relatada a ineficiência de inseticidas do grupo dos piretroides (TODA; MORISHITA, 2009). O uso de agentes de controle biológico são relatados na literatura, como o emprego do percevejo predador *Orius* sp. (KAWAI, 1995; VAN DEN MEIRACKER, 1999; SILVEIRA, 2003), do ácaro predador *Stratiolaelaps scimitus* já utilizado comercialmente no Brasil (FREIRE; MORAES, 2007), e também do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, como biopesticida (NIASSY et al., 2012).

O emprego de variedades tolerantes ou resistentes para o controle de tospovírus seriam ideais em um sistema de manejo integrado. No gênero *Capsicum*, foi relatado o gene dominante de resistência *Tsw*, efetivo apenas contra isolados da espécie TSWV (BOITEUX; DE AVILA, 1994). No entanto, apenas um ano após o seu uso, em 1999, na Itália e na Espanha, houve relato da quebra de resistência para o gene *Tsw* (GARCIA-ARENAL; MCDONALD, 2003).

Algumas espécies do gênero *Solanum* possuem resistência natural aos tospovírus. A primeira fonte de resistência natural foi identificada em *Solanum peruvianum* L., que apresentou elevado nível de resistência a isolados do TSWV (STEVENS et al., 1991). No Brasil, foram estudadas populações derivadas da cultivar “Stevens”,

originadas de cruzamentos entre *S. peruvianum* e *S. esculentum* Mill., obtidas na África do Sul (STEVENS et al., 1991). Essa resistência introduzida na cultivar Stevens é mediada pelo gene *Sw-5*, que confere resistência ampla aos tospovírus: TSWV, GRSV e TCSV (SPASSOVA et al., 2001). Plantas que expressam o gene *Sw-5* restringem a infecção sistêmica do vírus e as folhas inoculadas produzem uma reação do tipo hipersensibilidade (STEVENS et al., 1991).

O gene de resistência *Sw-5* é usado comercialmente em cultivares de tomate na África do Sul, Austrália, Estados Unidos, Espanha e Itália (SIVPARSAD; GUBBA, 2011). A Embrapa Hortaliças desenvolveu a cultivar de tomate para processamento industrial “Viradoro”, resistente aos tospovírus TSWV, TCSV e GRSV (GIORDANO et al., 2000). Essa cultivar teve origem no cruzamento entre os cultivares “IPA-5” (resistente a altas temperaturas, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 1, *Verticillium dahliae* raça 1, *Stemphyllium solani* e ao gênero *Meloidogyne*) e “TSW-10” que contém o gene *Sw-5*, que confere resistência a tospovírus (GIORDANO et al., 2000).

Diversos isolados de TSWV capazes de superar a resistência do gene *Sw-5* foram descritos no mundo como o isolado JF1 na África do Sul (THOMPSON; VAN ZIJL, 1996), o isolado GRAU na Espanha (ARAMBURU; MARTÍ, 2003), no Havaí (CANADY et al., 2001) e na Itália (ROGGERO et al., 2002). Na Itália, o isolado identificado TSWV-RB-TI foi capaz de infectar cinco híbridos de tomate que possuíam o gene de resistência *Sw-5*, entretanto este isolado não foi capaz de infectar 5 híbridos de pimentão que apresentavam o gene de resistência *Tsw* (CRESCENZI; FANIGLIULO, 2015).

Na Espanha, em 2015, foram relatados dois isolados de TSWV capazes de superar resistência em solanáceas, o isolado Pujol1TL3 em tomate (*Sw-5*) e PVR capaz de superar a resistência do gene *Tsw* em pimentão (DEBRECZENI et al., 2015). Recentemente, foi descrito na Argentina um isolado denominado TSWV-A2, capaz de superar essa resistência em um híbrido de pimentão a campo na região de La Plata (FERRAND et al., 2015), demonstrando a presença desse tipo de isolado na América do Sul.

O gene *Tsw*, proveniente de *Capsicum chinense* Jacq., incorporado em variedades tolerantes de pimentão (PI-159236) possui particularidades importantes como possibilitar a infecção da planta em estágios precoces e em condições de altas temperaturas prolongadas. Recentemente, foi descoberto que a avirulência do TSWV ao gene *Tsw* está ligada a várias mutações no gene NSs (DE RONDE et al., 2013). Um novo acesso de *Capsicum baccatum* L., denominada PIM26-1, foi recentemente verificado como tolerante

aos isolados de TSWV virulentos em plantas com o gene *Tsw*, mostrando-se promissor para programas de melhoramento genético de cultivares do pimentão (DEBRECZENI et al., 2015). Entretanto, não existem informações disponíveis sobre cultivares de pimentão resistentes ou tolerantes às espécies de tospovírus GRSV e TCSV, pois o gene dominante de resistência *Tsw* é efetivo apenas contra isolados da espécie TSWV.

Uma opção dentro do controle químico das doenças, é o uso de produtos com efeitos fisiológicos, com princípios ativos que podem modificar o mecanismo de defesa das plantas. Esses produtos contêm indutores que ativam genes de defesa da planta, de maneira não específica (ROMEIRO, 2008). Estudos demonstraram efeitos positivos com aplicação de acibenzolar-S-metil (ASM) em fumo no controle de *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Cercospora nicotianae*, *Phytophthora tabacina*, *P. parasitica*, *Erwinia carotovora* e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (FRIEDRICH et al. 1996), em *Arabidopsis thaliana* contra o fungo *P. parasitica*, a bactéria *P. syringae* pv. *tomato* e ao vírus *Turnip crinkle virus* (TCV) (LAWTON et al, 1996).

A aplicação de um fungicida da classe das estrobilurinas e da família F500 (piraclostrobina) foi capaz de induzir resistência ao TMV e a *P. syringae* pv. *tabaci* em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) (HERMES et al, 2002). Plantas sadias tratadas com piraclostrobina + metiram apresentam maiores picos de atividade de peroxidase quando comparadas às não tratadas e ativação de mecanismos de defesa em patossistemas diversos como *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) (VIGO et al. , 2012) e *Xanthomonas perforans* em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) (ITAKO et al, 2012). Guimarães et al. (2014) relataram que o uso de piraclostrobina + metiram (4 g/L) induziu volume e peso maiores de frutos de tomate cv. “Saladinha Plus”.

O produto Cabrio Top® (BASF) é constituído de piraclostrobina + metiram, pertence à classe dos ditiocarbamatos e estrobilurinas e apresenta duplo modo de ação, atuando através do ingrediente ativo piraclostrobina como inibidor do transporte de elétrons nas mitocôndrias das células dos fungos, inibindo a formação de ATP que é essencial nos processos metabólicos e através do ingrediente ativo metiram que ao se decompor, forma compostos tóxicos que reagem inespecificamente com enzimas sulfidrílicas, as quais estão largamente distribuídas na célula do fungo, atuando assim sobre um grande número de processos vitais da célula do fungo inibindo a germinação dos esporos, bem como o desenvolvimento do tubo germinativo (BASF, 2016).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Experimentos a campo

Os experimentos 1 e 2 foram realizados a campo na Fazenda Experimental da FCA/UNESP, em São Manuel, SP. As plantas foram cultivadas em canteiro com quatro linhas de 15 m e espaçamento de 1,0 x 0,4 m. Na área foram realizadas calagem e adubação de plantio (04-14-08), além de adubações semanais com sulfato de amônia (60 g/m) e cloreto de potássio (30 g/m). Realizou-se a desbrota de ramos e flores abaixo da bifurcação principal da planta, tutoramento e condução da cultura até a colheita dos frutos. Nesses experimentos foram realizadas três colheitas. Além disso, foi feito o controle mecânico das plantas daninhas nas áreas. O híbrido utilizado do segmento verde de pimentão foi o Dahra RX (Sakata[®]), sendo 60 plantas no experimento 1 e 60 plantas no experimento 2.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento de blocos casualizados, e os tratamentos seguindo um arranjo fatorial 5x2, com seis repetições. O primeiro fator constituiu-se da retirada das estruturas metálicas revestidas em voil à campo em cinco fases de crescimento: 0, 15, 30 e aos 45 dias após o transplântio (DAT). Plantas não inoculadas foram consideradas como testemunhas dos tratamentos. O segundo fator foi

constituído da aplicação ou não de piraclostrobina+metiram (Cabrio® Top) (P + M) (4 g/L) durante o cultivo. Ao todo foram realizadas quatro aplicações, espaçadas em 15 dias ao longo do ciclo da cultura, conforme recomendação do fabricante. O experimento 1 recebeu um pré tratamento que consistiu na aplicação de piraclostrobina + metiram (4 g/L) na bandeja.

A inoculação ocorreu naturalmente, através de espécies de tripes vetoras de tospovírus. As idades de inoculação das plantas foram controladas por meio de isolamento das plantas por estruturas metálicas revestidas em voil, as quais foram retiradas nas datas programadas, já descritas, permitindo o acesso dos tripes.

Os dados foram verificados quanto a normalidade e homogeneidade e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram feitas pelo software estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC).

5.2 Experimento em estufa

O experimento 3 sob condições de estufa, realizado no Departamento de Proteção Vegetal da FCA/UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil, utilizou-se de uma proteção com tecido voil para evitar a entrada de tripes e outras pragas no experimento. As plantas em estufa foram cultivadas em vasos plásticos de 10 L com substrato constituído de terra de barranco, areia grossa lavada e esterco de curral curtido na proporção 1:1:1, o qual foi autoclavado e suplementado com adubo mineral. As adubações de cobertura foram realizadas semanalmente com o uso de Yogen 5 (5 g/L) e nitrato de cálcio (0,4 g/L). Realizou-se a desbrota de ramos e flores abaixo da bifurcação principal da planta, tutoramento e condução da cultura até a colheita dos frutos. Neste experimento foi realizada seis colheitas. O híbrido utilizado do segmento verde de pimentão foi o Dahra RX (Sakata®), totalizando 120 plantas.

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, e os tratamentos seguindo um arranjo fatorial 5x2, com seis repetições. O primeiro fator dos tratamentos constituiu da inoculação por extrato vegetal do vírus em cinco fases de crescimento: 0, 15, 30 e aos 45 dias após o transplântio (DAT). Plantas não inoculadas foram consideradas como testemunhas dos tratamentos. O segundo fator foi constituído da aplicação ou não de piraclostrobina+metiram (Cabrio® Top) (P + M) (4 g/L) durante o cultivo. Ao todo foram realizadas quatro aplicações, espaçadas em 15 dias ao longo

do ciclo da cultura, conforme recomendação do fabricante. No experimento um total de 60 plantas receberam o pré tratamento com a aplicação de piraclostrobina + metiram (4 g/L) no transplante, de forma aleatória, enquanto outras 60 plantas não foram tratadas.

No experimento, a inoculação dos vírus foi feita via extrato vegetal tamponado, utilizando-se plantas de tomate naturalmente infectadas por GRSV e TCSV e previamente identificadas pelo teste de PTA-ELISA. Folhas sintomáticas foram maceradas em tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio 0,02 M na proporção de 1:10 (p/v).

Os dados foram verificados quanto a normalidade e homogeneidade e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram feitas pelo software estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC).

5.3 Determinação da resistência de planta adulta (Age-related resistance – ARR)

Quatro plantas de pimentão do híbrido Dahra RX foram inoculadas via extrato vegetal tamponado (conforme experimento em estufa) em condições de estufa aos 60 DAT e aos 70 DAT, mantendo-se uma planta testemunha para avaliar o efeito da inoculação dos vírus nestas idades, e poder definir quando a ARR é adquirida neste híbrido, obtendo assim, informação adicional para a o manejo integrado da doença neste patossistema.

5.4 Confirmação da infecção viral

A confirmação da infecção nas plantas-teste foi feita por meio de análises de sintomas aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação, além de testes sorológico (PTA-ELISA) e molecular (quantitative PCR, qPCR).

5.5 PTA-ELISA

Foi utilizado o teste sorológico ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), do tipo PTA (“Plate Trapped Antigen”) (MOWAT; DAWSON, 1987), com algumas modificações. Para este teste foi utilizado o antissoro policlonal contra os tospovírus GRSV, TCSV, TSWV e ZLCV, os quais foram cedidos pelo Dr. Jorge Alberto Marques Rezende (Laboratório de Virologia Vegetal ESALQ/USP). As amostras foram maceradas individualmente, em almofariz, em presença de tampão de carbonato, pH 9,6 na diluição 1:50. Foram colocados 100 µL de cada extrato por cavidade na placa de ELISA, os quais foram em seguida incubados por 15 minutos a 37 °C. A placa foi então lavada três vezes consecutivas com tampão PBS-Tween. Adicionou-se 100 µL de antissoro diluído em tampão PBS-TPB (diluição 1:1000) por cavidade e incubou-se por 2 horas a 37°C. Lavou-se novamente a placa com PBS-Tween. Em seguida, foram colocados 100 µL de imunoglobulina G conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA Anti Rabbit IgG A-8025), diluída em tampão PBS-TPB, em cada cavidade e incubou-se por 2 horas a 37°C. Novamente a placa foi lavada com PBS-Tween. Em seguida, foram colocados 100 µL de p-fosfato de nitrofenil (SIGMA 104-105), diluído em dietanolamina (0,6 mg/mL), em cada cavidade. Incubou-se à temperatura ambiente e esperou-se a reação ocorrer. A reação foi avaliada medindo a absorbância a 405 nm no leitor de ELISA Metertech Σ 960. Uma amostra foi considerada positiva quando o valor médio de absorbância foi pelo menos três vezes superior ao da absorbância do controle sadio.

5.6 Extração do RNA e preparo do cDNA

O RNA total foi extraído através do kit de purificação de RNA da Norgen Biotek Corporation, Thorold, ON, Canada, utilizando-se 300 mg do penúltimo folíolo do ápice de cada planta, conforme o protocolo do fabricante. O total RNA extraído foi utilizado para amplificação do cDNA alvo, utilizando o primer BR 60 (5'CCCGGATCCTGCAG AGCAATTGTGTCA 3') (EIRAS et al. 2002), de acordo com o protocolo da enzima de transcrição reversa AMV para posterior detecção e quantificação do fragmento desejado em qPCR.

5.7 PCR quantitativo (Real time PCR)

O qPCR foi otimizado através da diluição seriada em cinco vezes de uma amostra positiva, determinando o limite de detecção e linearidade do protocolo. O slope foi de -3,554 e o coeficiente de correlação de 91,1% da curva de diluição. A concentração final dos primers (10 Mm) foi determinada para a detecção do vírus em planta e no tripes vetor (LEÃO, 2015).

Os primers específicos utilizados foram (GSRV-F/GRSV-R) (LEÃO, 2015). Foram utilizadas 40 amostras na análise, representando todos os tratamentos em estufa. A reação de qPCR foi realizada em placas de reação com 96 poços “MicroAmp” (Life Technologies) em volume final de 10 µl com o Kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). A reação consistiu de 5 µL de Gotaq Qpcr Master mix, 0,3 µL de cada primer (10 Mm) e 1 µL de cDNA. Foi realizada triplicata de cada amostra. A reação ocorreu no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System, e o ciclo consistiu em: 1 ciclo de 95°C por três minutos (ativação da DNA polimerase) e 40 ciclos de 95°C por 10 segundos (desnaturação) e 60°C por 30 segundos (anelamento e extensão).

5.8 Aspectos de produção

Foram realizadas seis colheitas no experimento 3 em Botucatu e três colheitas nos experimentos 1 e 2 em São Manuel, as quais foram iniciadas no final de março de 2015. Os critérios adotados (CEAGESP) para a avaliação de produção de cada tratamento foram: número total de frutos, peso total de todas as colheitas (Kg), comprimento médio dos frutos (mm) e diâmetro médio dos frutos (mm).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Experimentos a campo

No experimento 1 onde foi realizado o tratamento com P + M na bandeja, cinco (14%) em 37 plantas foram infectadas por tospovírus, das quais três apresentavam infecção por GRSV e duas por GRSV+TCSV (Figura 1). No experimento 2 realizado simultaneamente, porém no qual as mudas não receberam o tratamento de P + M na bandeja, 17 (33%) no total de 51 plantas foram infectadas, das quais oito apresentavam infecção por GRSV e nove por GRSV+TCSV (Figura 1). Cinco plantas morreram devido à infecção ocasionada pelos tospovírus nos experimentos. A inoculação do vírus ocorreu de forma natural, através de tripes. Verificou-se tendência de maior número de plantas infectadas quando não houve aplicação do produto na bandeja, porém a maior incidência de vírus nestas plantas pode também ter sido ocasionada pela direção de chegada do vetor virulífero, uma vez que estas plantas infectadas se localizavam na bordadura do experimento e agrupadas (Figura 1).

O surgimento de sintomas nas plantas não coincidiu com a retirada do voil e sim com revoadas de tripes ao final do mês de janeiro de 2015, verificada pela captura de insetos em armadilhas adesivas amarelas posicionadas no experimento. O GRSV

é eficientemente transmitido por *F. schultzei* e *F. occidentalis* em condições de campo (NAGATA et al., 2004). No Estado de São Paulo a principal espécie que atua como vetor de tospovírus em diversas culturas é a *F. schultzei* (LEÃO, 2015).

15m	9/3	3/4			15/3*	18/4*
	7/3	5/4			12/3	20/4
	10/3*	2/4*			11/3	16/4
	6/3	1/4			13/3	19/4
	8/3	4/4			14/3*	17/4
	1/3	10/4			17/3*	14/4*
	3/3	6/4			19/3*	11/4
	4/3	8/4			16/3	12/4
	2/3	9/4			18/3	15/4*
	5/3	7/4*			20/3	13/4
	7/2	2/5			12/2	16/5
	9/2	1/5			13/2	20/5*
	6/2*	4/5			15/2	17/5*
	8/2	5/5			11/2	19/5*
	10/2	3/5			14/2	18/5*
	2/2	9/5			19/2	11/5
	4/2	6/5			18/2	14/5*
	3/2	8/5			17/2	13/5
	5/2	7/5			16/2	15/5
	1/2	10/5			20/2	12/5*
	5/1	1/6			11/1	16/6
	7/1	4/6			15/1	18/6
	10/1	3/6			13/1	19/6*
	8/1	5/6			14/1	17/6*
	6/1	2/6			12/1	20/6
	2/1	9/6			19/1*	13/6
	5/1	7/6			17/1	15/6
	3/1	6/6*			16/1	11/6*
	1/1	8/6			18/1	14/6
	4/1	10/6			20/1	12/6
Experimento 1			Experimento 2			

Figura 1. Croqui dos experimentos realizados na Fazenda Experimental de São Manuel. Experimento 1 (plantas que receberam o tratamento de P + M nas mudas) e experimento 2 (plantas que não receberam tratamento nas mudas). Em cinza, plantas que receberam 4 aplicações de P + M durante o cultivo da cultura e em branco plantas que não receberam as aplicações do produto durante o cultivo. *Plantas infectadas por tospovírus. Números indicam data de exposição das plantas ao vírus, onde as plantas de números 1, 6, 11, 16 foram expostas aos 0 dias após o transplantio (DAT); plantas 2, 7, 12, 17 aos 15 DAT; plantas 3, 8, 13, 18 aos 30 DAT; plantas 4, 9, 14, 19 aos 45 DAT e plantas 5, 10, 15, 20 representam plantas protegidas por voil até a colheita de frutos. O número seguinte à barra indica o número da repetição (1 a 6).

6.2 Experimento em estufa

A eficiência da inoculação de tospovírus no experimento em estufa foi em torno de 98% para todas as fases de inoculação (transmissão por extrato vegetal), confirmadas através da presença de sintomas típicos ocasionados por tospovírus e pelo teste sorológico PTA-ELISA. As plantas utilizadas como fonte de inóculo para as transmissões por extrato vegetal foram coletadas de tomateiro infectado por GRSV+TCSV, confirmadas por PTA-ELISA, entretanto obteve-se na transmissão 57 plantas infectadas pelo GRSV, 36 com infecção mista de GRSV e TCSV, e uma planta infectada somente pelo TCSV. Este resultado indica que o GRSV aparentemente possui mecanismos de replicação, proteínas de movimento ou mecanismos supressores do silenciamento gênico das plantas mais eficazes que o TCSV.

Independentemente da aplicação ou não do produto no transplante e durante o ciclo da cultura, a inoculação aos 0 DAT influenciou drasticamente na quantidade e peso dos frutos, além de menor comprimento e diâmetro dos frutos em relação aos outros tratamentos (Tabela 1, Figuras 2 e 3). Os sintomas mais comuns nas plantas foram: mosaico e anéis concêntricos nas folhas, necrose apical, anéis concêntricos no caule, tamanho reduzido e frutos com bolhosidade, mosaico, anéis concêntricos e deformados. As plantas que não receberam P + M no transplante produziram maior peso total de frutos (significância pela análise de variância), enquanto que os valores dos parâmetros número de frutos, comprimento e diâmetro não apresentaram significância entre as mudas tratadas ou não no transplantio (Tabela 1).

As plantas inoculadas aos 15 DAT tiveram maior porte e apresentaram números significativamente maiores de número de frutos, produção total, comprimento e diâmetro de frutos comparadas às plantas inoculadas aos 30 DAT (Tabela 1, Figuras 4 e 5), independentemente da aplicação de P + M durante o transplante e cultivo. Entretanto os frutos dos tratamentos 15 DAT e 30 DAT, bem como os frutos oriundos de plantas inoculadas aos 0 DAT não foram comerciais, apresentando deformações e bolhosidades. É notável que os danos causados pelos vírus nas mudas inoculadas aos 45 DAT foram menores em relação às inoculações anteriores, apresentando número, peso e dimensões de frutos significativamente mais elevados (Tabela 1, Figura 6).

Mediante o aumento da idade, ocorrem modificações nas plantas como o espessamento das paredes das células, formação de lignina, o que pode influenciar

no estabelecimento do vírus dentro da planta (BALAMURALIKRISHNAN et al., 2003). A influência da idade de inoculação das plantas por vírus e o aparecimento de sintomas foi observado em outros patossistemas como o *Maize dwarf mosaic virus* em diferentes híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), *Sugarcane mosaic virus* em cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. L.) e *Cotton leaf curl virus* em algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (RANGEL et al., 1996; BALAMURALIKRISHNAN et al., 2003; AKHTAR et al., 2004).

A maior produção total de plantas de pimentão Dahra RX que não receberam o tratamento com P + M no transplante, indica que o modelo adotado de aplicação do produto para este híbrido não funcionou como esperado, sendo portanto necessário refazer o modelo de aplicação. A aplicação de P + M durante o ciclo da cultura não alterou os parâmetros de produção (Tabela 1), entretanto levando-se em consideração que os três experimentos utilizaram apenas o híbrido de pimentão Dahra RX e os tospovírus são vírus que ocasionam sintomas extremamente severos, novos trabalhos devem ser realizados, especialmente através do uso de novos híbridos de pimentão e vírus pertencentes a espécies menos agressivas, bem como o uso de produtos diferentes.

No México utilizando-se o pimentão *C. annuum* cv. Sonora Anaheim inoculado com o begomovírus *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) ocorreu um menor índice de plantas infectadas, sintomas menos severos e concentração viral de cinco a seis vezes menores quando as plantas foram tratadas com o produto benzothiadiazole (BTH), conhecido por suas propriedades ativadoras do SAR (“Resistência sistêmica adquirida”) com maior produção de ácido salicílico (AS) (TREJO-SAAVEDRA et al., 2013). Em fumo inoculado com o TSWV com aplicação de acibenzolar-S-methyl (ASM), outro composto análogo do AS, foi relatado menor número de lesões locais com maiores doses do produto (MANDAL et al., 2008).

Diversas formulações do grupo de estrobirulinas foram testadas na semeadura de plantas de feijoeiro contra o potyvirus *Bean common mosaic virus* (BCMV), destacando a piraclostrobina, onde obteve-se 65% de proteção em condições de campo e 76% de proteção em casa-de-vegetação (UDAYASHANKAR et al., 2012). Guimarães (2016) obteve resultados promissores para o tomateiro cv. “Mariana” tratados com piraclostrobina + metiram na semeadura e durante o cultivo e infectados por vírus dos gêneros *Crinivirus* e *Begomovirus*. Plantas tratadas apresentaram maior produção e menor concentração de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV, *Begomovirus*). Tomateiros com a aplicação de piraclostrobina F-500 apresentaram atraso na infecção de patógenos sob

condições controladas contra o cucumovírus *Cucumber mosaic virus* (CMV), o potyvírus PVY e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, sugerindo o mecanismo de “priming”, ou seja, acúmulo de proteínas de defesa latentes da planta através de algum tipo de estresse biótico ou abiótico (SKANDALIS et al., 2016).

O produto piraclostrobina + metiram pertence ao grupo fungicida das estrobirulinas, e é indicado para a cultura do pimentão para o controle de oídio, cuja fase assexuada (*Oidiopsis taurica*) é responsável pelas infecções em pimentão, embora *Leveillula taurica*, fase teleomórfica, tenha sido encontrada em outras plantas hospedeiras (PAZ-LIMA et al., 2004). No experimento instalado em estufa houve incidência de oídio nas plantas não tratadas com o produto durante o final do cultivo, enquanto que as plantas tratadas pouco foram afetadas, mostrando o efeito do produto sobre o fungo.

A piraclostrobina auxilia a planta na melhor utilização do CO₂, reduzindo os gastos de energia e levando ao maior acúmulo de carboidratos, aumentando a fotossíntese líquida, causando incremento da atividade da enzima nitrato redutase que é fundamental para a incorporação de nitrogênio em moléculas vitais à planta, causando o efeito verde pelo maior teor de clorofila. Além disso, ocorre a diminuição do estresse associado à redução da produção de etileno, o que permite maior duração da vida útil das folhas e principalmente maior rendimento devido a maiores produtividades. Esses efeitos estão associados ao modo de ação do produto que atua na respiração celular na mitocôndria, especificamente no citocromo Bc1, interferindo no transporte de elétrons (VENÂNCIO et al., 2003; OLIVEIRA, 2005).

Tabela 1. Efeito de P + M na produção e qualidade dos frutos, aplicado ou não no transplante e durante o ciclo da cultura em estufa.

Variáveis	Número de Frutos					Produção Total (kg/planta)				
	Transplante		Cultivo		Média	Transplante		Cultivo		Média
Inoculação (dias)	Com P+M	Sem P+M	Com P+M	Sem P+M		Com P+M	Sem P+M	Com P+M	Sem P+M	
0	0.91	1.83	1.66	1.08	1.37 d	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01 d
15	17	15.08	19.16	12.91	16.04 bc	0.45	0.40	0.46	0.37	0.42 c
30	9.75	14	10.66	13.08	11.87 c	0.18	0.28	0.20	0.25	0.23cd
45	18.92	25.83	20.75	24.00	22.37 ab	0.67	0.78	0.80	0.65	0.72 b
TEST	26.08	27.25	28.00	25.33	26.66 a	1.22	1.82	1.64	1.40	1.52 a
Média	14.53 A	16.80 A	16.05 A	15.28 A		0.50 B	0.66 A	0.62 A	0.54 A	
P(Pré Trat)	0.1093					0.0450*				
P(Inoc)	0.0001*					0.0001*				
P(A)	0.6520					0.4396				
P (Pré Trat x Inoc)	0.8388					0.5643				
P (Pré Trat x A)	0.6795					0.5412				
P (Inoc x A)	0.1678					0.8489				
	Comprimento Frutos (mm)					Diâmetro Frutos (mm)				
	Transplante		Cultivo		Média	Transplante		Cultivo		Média
Inoculação (dias)	Com P+M	Sem P+M	Com P+M	Sem P+M		Com P+M	Sem P+M	Com P+M	Sem P+M	
0	14.08	25.41	18.77	20.72	19.74 d	9.58	18.91	14.36	14.13	14.24 c
15	48.48	52.09	49.18	51.38	50.28 c	28.47	32.79	31.50	29.76	30.63 b
30	47.95	40.58	44.61	43.92	44.27 c	26.59	25.86	27.36	25.09	26.22 b
45	74.50	66.04	79.75	60.77	70.26 b	32.56	30.05	33.99	28.61	31.30 b
TEST	89.64	98.24	99.07	88.80	93.94 a	39.17	42.83	42.82	39.18	41.00 a
Média	54.93 A	56.47 A	58.28 A	53.12 A		27.27 A	30.08 A	30.00 A	27.35 A	
P(Pré Trat)	0.1075					0.0635				
P(Inoc)	0.0001*					0.0001*				
P(A)	0.5060					0.0800				
P (Pré Trat x Inoc)	0.0685					0.1125				
P (Pré Trat x A)	0.6972					0.5342				

*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey $p < 0.05$. A (Aplicação de piraclostrobina + metiram (4 g. l⁻¹), Pré-Trat (Pré-tratamento), Inoc (Inoculações). * Indica interação entre os fatores.



Figura 2. Plantas testemunhas dos 4 tratamentos (sem Cabrio[®] Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; sem Cabrio[®] Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura; com Cabrio[®] Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; com Cabrio[®] Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura), respectivamente.



Figura 3. Plantas inoculadas aos 0 DAT dos 4 tratamentos (sem Cabrio[®] Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; sem Cabrio[®] Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura; com Cabrio[®] Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; com Cabrio[®] Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura), respectivamente.



Figura 4. Plantas inoculadas aos 15 DAT dos 4 tratamentos (sem Cabrio® Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; sem Cabrio® Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura; com Cabrio® Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; com Cabrio® Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura), respectivamente.



Figura 5. Plantas inoculadas aos 30 DAT dos 4 tratamentos (sem Cabrio® Top no Transplante e com durante o ciclo da cultura; sem Cabrio® Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura; com Cabrio® Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; com Cabrio® Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura), respectivamente.



Figura 6. Plantas inoculadas aos 45 DAT dos 4 tratamentos (sem Cabrio® Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; sem Cabrio® Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura; com Cabrio® Top no transplante e com durante o ciclo da cultura; com Cabrio® Top no transplante e sem durante o ciclo da cultura), respectivamente.

6.3 Determinação da resistência de planta adulta (Age-related resistance – ARR)

Em relação às quatro plantas inoculadas aos 60 DAT, apenas uma delas apresentou sintomas de tospovírus nas folhas mais novas, porém sem causar grandes prejuízos à sua produção, enquanto nenhuma das quatro plantas inoculadas aos 70 DAT apresentaram sintomas da doença (Figura 7). Portanto, o híbrido de pimentão Dahra RX passou a exibir a resistência de planta adulta a partir de inoculações realizadas após os 60 DAT (Figura 7). A resistência de planta adulta (Age-related resistance – ARR) foi observada em inúmeras espécies de plantas e patógenos.

Esse tipo de resistência é considerada como uma resposta de defesa distinta, diferentemente da SAR e da resistência sistêmica induzida (ISR); entretanto, parece estar relacionada com o acúmulo de AS (KUS et al., 2002). Oito cultivares de pimentão com diferentes níveis de resistência foram avaliados de acordo com a severidade de *Phytophthora capsici* considerando a ARR em ambiente controlado, verificando-se que com o aumento da

idade os níveis de intensidade da doença variaram conforme o método de inoculação e a concentração do inóculo. Os autores sugerem possíveis alterações fisiológicas das raízes das plantas (KIM et al., 1989). Em *Arabidopsis thaliana* infectada por *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), a ARR foi identificada na transição do estágio vegetativo para o de floração (LEISNER et al., 1993).

Uma definição precisa da defesa ou potencial de resistência de cada hospedeiro durante seu ciclo de vida é um fator primordial para o controle da infecção de patógenos, e é essencial para garantir altas produções nas diversas culturas (DEVELEY-RIVIÈRE; GALIANA, 2007). Dentro do contexto de manejo integrado das doenças, o desenvolvimento da resistência com o tempo é um fator importante a ser considerado na racionalização de práticas culturais em videiras e está sendo estudada para diversas outras espécies de plantas (COOLEY et al., 1996; FICKE et al., 2002).

O aumento ou aquisição de resistência a patógenos em função do desenvolvimento do hospedeiro recebeu várias denominações (“ontogenic resistance”; “developmental resistance”; “mature seedling resistance”; “adult seedling resistance”; “flowering-induced resistance” e “senescence-induced resistance”), e este pluralismo de denominações reflete o fato que diferentes laboratórios estudaram esta forma de resistência independentemente, indicando uma natureza polimórfica do fenômeno e vários estágios associados com resistência, dependendo da interação planta e patógeno estudados. Entretanto, uma vez induzida a ARR, esta persiste durante todo o ciclo de vida do hospedeiro, e pode funcionar contra um patógeno específico ou ter um amplo espectro de atividade (DEVELEY-RIVIÈRE; GALIANA, 2007).

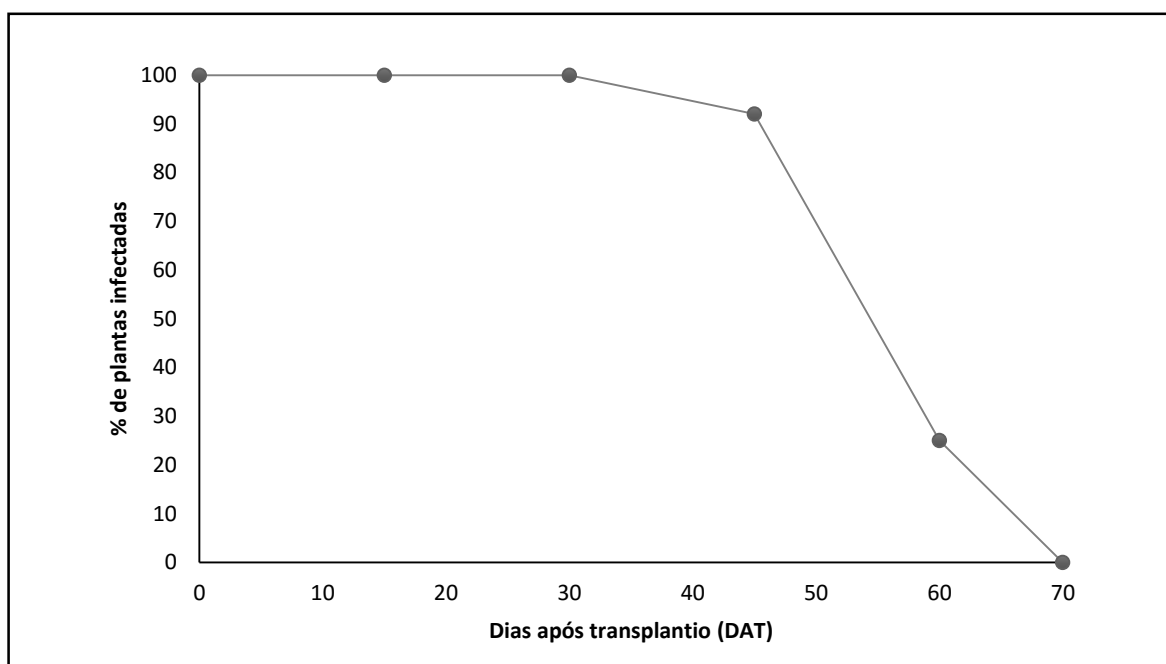


Figura 7. Porcentagem de plantas infectadas por GRSV e TCSV, conforme a idade de inoculação via extrato-vegetal tamponado.

6.3 PCR quantitativo (Real time PCR)

Na reação de PCR quantitativo, foram utilizadas 40 amostras do experimento 3 em estufa, representando todos os tratamentos, portanto considerando a aplicação ou não de P + M no transplante, e a aplicação ou não do produto durante o cultivo nas distintas fases de inoculação do vírus e testemunha. O valor médio de CT foi considerado à partir da triplicata de cada amostra na placa. A colheita do material foi realizada no dia 26 de fevereiro de 2015, 10 dias após a última aplicação de P + M e antes do início das colheitas. A concentração do vírus GRSV aparentemente não foi influenciada pela idade de inoculação das plantas, bem como pela aplicação ou não do produto (Tabela 2).

Apesar de produtos com efeito fisiológico terem sido demonstrados como promissores no manejo de alguns vírus de plantas (MANDAL et al., 2008; UDAYASHANKAR et al., 2012; TREJO-SAAVEDRA et al., 2013; GUIMARÃES, 2016; SKANDALIS et al., 2016), este efeito não é regra e depende do patossistema estudado, uma vez que pode-se concluir que para o pimentão Dahra RX o modelo de aplicação com piraclostrobina não trouxe incrementos de produção como esperado, bem como não teve efeito na replicação do GRSV.

Tabela 2. Detecção do *Groundnut ringspot virus* por qPCR.

SEM O USO DE CABRIO® TOP NO TRANSPLANTE									
Inoculação (DAT)	Tratamento	Ct1	Ct2	Ct3	CT MEAN Planta 1	Ct1	Ct2	Ct3	CT MEAN Planta 2
0	CP	23.77	26.63	24.32	24.91	26.95	24.87	24.83	25.55
0	SP	24.32	24.30	24.95	24.53	23.18	23.01	23.20	23.13
15	CP	23.54	23.91	22.83	23.43	21.79	21.94	21.72	21.82
15	SP	24.90	25.55	25.90	25.45	18.04	17.94	18.40	18.13
30	CP	24.00	30.57	28.56	27.71	26.53	26.53	27.02	26.70
30	SP	28.52	28.75	29.34	28.87	24.79	24.94	26.89	25.54
45	CP	24.97	24.96	24.86	24.93	18.88	18.57	18.57	18.68
45	SP	19.28	20.99	20.96	20.41	23.61	23.77	23.59	23.66
TEST	SP	32.03	32.34	32.78	32.39	32.02	32.34	32.38	32.25
COM O USO DE CABRIO® TOP NO TRANSPLANTE									
Inoculação (DAT)	Tratamento	Ct1	Ct2	Ct3	CT MEAN Planta 1	Ct1	Ct2	Ct3	CT MEAN Planta 2
0	CP	27.33	27.88	28.15	27.79	19.44	20.47	20.85	20.26
0	SP	26.97	27.84	28.00	27.61	18.47	18.67	18.13	18.43
15	CP	29.40	26.87	28.29	28.28	20.44	20.50	20.26	20.41
15	SP	24.80	23.21	20.39	22.81	17.23	18.25	18.35	17.95
30	CP	27.10	29.83	30.16	29.03	29.40	26.87	28.29	28.19
30	SP	26.11	25.92	26.20	26.08	26.95	26.94	27.16	27.02
45	CP	17.15	18.56	16.78	17.50	25.74	23.75	24.38	24.63
45	SP	28.47	28.56	29.45	28.83	22.15	22.51	22.71	22.46
TEST	SP	32.34	32.73	32.92	32.67	32.19	31.81	32.04	32.02

Ct ("threshold cycle") indica a média da leitura obtida da triplicata de duas plantas/tratamento oriundas do experimento 3 realizado em estufa no Departamento de Proteção Vegetal. Legenda: SP: Sem Cabrio®Top no cultivo; CP: Com Cabrio®Top no cultivo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A infecção de plantas do híbrido de pimentão Dahra RX pelas espécies GRSV e TCSV do gênero *Tospovirus* até os 45 DAT causa prejuízos na qualidade e quantidade de frutos produzidos;
- A resistência de planta adulta (ARR) é exibida para o híbrido de pimentão Dahra RX após os 60 DAT.
- O modelo de aplicação utilizado do produto piraclostrobina + metiram não funcionou para este híbrido, bem como sua aplicação durante o ciclo da cultura não alterou os parâmetros de produção, sintomas de infecção mista por GRSV e TCSV, bem como replicação do GRSV.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Instituto AgraFNP, 2016, 600 p.

AKHTAR, K. et al. Influence of plant age, whitefly population and cultivar resistance on infection of cotton plants by *cotton leaf curl virus* (CLCuV) in Pakistan. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 15-21, 2004.

ARAMBURU, J.; MARTÍ, M. The occurrence in north-east Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the Sw-5 gene. **Plant Pathology**, Chichester, v. 52, n. 3, p. 407-407, 2003.

BALAMURALIKRISHNAN, M. et al. Sugarcane mosaic virus infection progress in relation to age of sugarcane. **Sugar Tech**, New York, v. 5, n. 1-2, p. 21-24, 2003.

BANDLA, M. D. et al. Interaction of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) glycoproteins with a thrips midgut protein, a potential cellular receptor for TSWV. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, n. 2, p. 98-104, 1998.

BASF. **Fungicidas Cabrio Top**. Mannheim, 2016. Disponível em: <http://www.agro.basf.com.br/agr/ms/apbrazil/pt_BR/content/APBrazil/solutions/fungicidas/fungicidas_product/CABRIO_TOP>. Acesso em: 22 fev. 2016.

BEZERRA, I. C. et al. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, n. 9, p. 823-830, 1999.

- BIELZA, P. Perspective insecticide resistance management strategies against the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. **Pest Management Science**, Chichester, v. 64, n. 11, p. 1131-1138, 2008.
- BOITEUX, L. S.; DE ÁVILA, A. C. Inheritance of a resistance specific to *Tomato spotted wilt virus* in *Capsicum chinense* "PI 159236". **Euphytica**, Wageningen, v. 75, n. 1-2, p. 139-142, 1994.
- BRITTLEBANK, C.C. Tomato diseases. **Journal of the Department of Agriculture in Victoria**, Victoria, v.17, p. 1348-1352, 1919.
- CANADY, M. A. *et al.* *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) resistance in tomato derived from *Lycopersicon chilense* Dun. LA 1938. **Euphytica**, Wageningen, v. 117, n. 1, p. 19-25, 2001.
- CHO, J. J. *et al.* A multidisciplinary approach to management of *Tomato spotted wilt virus* in Hawaii. **Plant Disease**, Saint Paul, v.73, p.375-383, 1989.
- CIUFFO, M. *et al.* Identification of *Dictyothrips betae* as the vector of *Polygonum ringspot virus*. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 157, n. 2, p. 299-307, 2010.
- COLARICCIO, A. *et al.* Diversidade de tospovírus em diferentes regiões produtoras de olerícolas do Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n. 2, p. 177-182, 2001.
- COOLEY D. R. *et al.* Integrated pest management programs for strawberries in the Northeastern United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, n. 3, p. 228-237, 1996.
- COSTA, A. S.; FORSTER, R. Identidade do vírus de vira-cabeça e sua inclusão no grupo do vírus do "spotted wilt". **Bragantia**, Campinas, v. 1, n. 7, p. 491-516, 1941.
- CRESCENZI, A.; FANIGLIULO, A. Resistance breaking *Tomato Spotted Wilt Virus* isolates on resistant tomato cultivars in Italy. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1069, p.95-98, 2015.
- DE ÁVILA, A. C. *et al.* Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. **Journal of General Virology**, London, v. 71, p. 2801-2807, 1990.
- DE ÁVILA A.C *et al.* Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 22, p. 655-658, 2004.
- DE HAAN, P. *et al.* Molecular cloning and terminal sequence determination of the S and M RNAs of tomato spotted wilt virus. **Journal of General Virology**, London, v. 70, n. 12, p. 3469-3473, 1989.
- DE HAAN, P. *et al.* The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. **Journal of General Virology**, London, v. 71, n. 5, p. 1001-1007, 1990.
- DE HAAN, P. *et al.* Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA-polymerase. **Journal of General Virology**, London, v. 72, n. 9, p. 2207-2216, 1991.

- DE RONDE, D. et al. Tsw gene-based resistance is triggered by a functional RNA silencing suppressor protein of the *Tomato spotted wilt virus*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 14, n. 4, p. 405-415, 2013.
- DEBRECZENI, D. E. et al. Complete sequence of three different biotypes of tomato spotted wilt virus (wild type, tomato Sw-5 resistance-breaking and pepper Tsw resistance-breaking) from Spain. **Archives of Virology**, Viena, v. 160, n. 8, p. 2117-2123, 2015.
- DEVELEY-RIVIÈRE, M. P. AND GALIANA, E. Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. **New Phytologist**, Cambridge, v. 175, n. 3, p. 405-416, 2007.
- ECHER, M. M et al. Avaliação de genótipos de *Capsicum* para resistência ao ácaro branco. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, n. 2, p. 217-221, 2002.
- EIRAS, M et al. Caracterização do *Tomato chlorotic spot virus* isolado de jiló no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p.285–291, 2002.
- FAUQUET, C. M. et al. **Virus Taxonomy**: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 8 ed. London: Elsevier, 2005, 1162p.
- FICKE, A.; GADOURY, D. M.; SEEM, R. C. Ontogenic resistance and plant disease management: a case study of grape powdery mildew. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 6, p. 671-675, 2002.
- FERRAND, L. et al. First report of a resistance-breaking isolate of *Tomato spotted wilt virus* infecting sweet pepper harboring the Tsw gene in Argentina. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99, n.12, p. 1869, 2015.
- FREIRE, R A. P.; MORAES, G. J. Mass production of the predatory mite *Stratiolaelaps scimitus* (Womersley) (Acari: Laelapidae). **Systematic and Applied Acarology**, London, v. 12, n. 2, p. 117-119, 2007.
- FRIEDRICH, L. et al. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **The Plant Journal**, Oxford, v.10, n. 1, p. 61-70, 1996.
- GARCIA-ARENAL, F.; MCDONALD, B. A. An analysis of the durability of resistance to plant viruses. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 941-952, 2003.
- GIORDANO, L. B. et al. “Viradoro”: A Tospovirus-resistant processing tomato cultivar adapted to tropical environments. **HortScience**, Alexandria v. 35, n. 7, p. 1368-1370, 2000.
- GUIMARÃES, L. R. P. et al. Polyamines in tomato plants grown during an incidence of tospovirus exposure. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 140, n. 4, p. 701-709, 2014.

GUIMARÃES, L. R. P. Indução de resistência a *Tomato severe rugose virus* e *Tomato chlorosis virus* em tomateiro determinado. 65f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2016.

HERMES, S. et al. A Strobirulin fungicide enhances the resistance of tobacco against *Tobacco mosaic virus* and *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 130, n.1, p. 120-127, 2002.

HOGENHOUT, S.A. et al. Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto v. 46, p.327 -359, 2008.

IBGE/SIDRA. Levantamento sistemático da produção agrícola. 2006. Disponível em: www.sidra.ibge.gov.br. Acesso em 22 de Fevereiro de 2016.

IBIZA, V. et al. Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 59, n. 6, p. 1077-1088, 2012.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA - IEA. **Banco de dados IEA**, São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/banco/menu.php>>. Acesso em 20 maio de 2015.

ITAKO, A. T. et al. Efeito de produtos químicos sobre a mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*) e na ativação de proteínas relacionadas à patogênese em tomateiro. **Idesia**, Chile, v. 30, n. 2, p. 85-92, 2012.

JELLIS, G. Resistance of crop plants against fungi. **Plant Pathology**, Chichester, v. 47, n. 5, p. 681-681, 1998.

KAWAI, A. Control of *Thrips palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae) by *Orius* spp. (Heteroptera: Anthocoridae) on greenhouse eggplant. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 30, n. 1, p. 1-7, 1995.

KIKKERT, M. et al. *Tomato spotted wilt virus* particles morphogenesis in plant cells. **Journal of Virology**, Washington, v. 73, n. 3, p. 2288-2297, 1999.

KIM, Y.J.; HWANG, B. K.; PARK, K.W. Expression of age-related resistance in pepper plants infected with *Phytophthora capsici*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 73, p. 745-747, 1989.

KING, A. M. et al. **Virus taxonomy**: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier, 2011. 1338 p.

KOBORI R. F.; GIORIA, R.; BRUNELLI, K. R. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças do pimentão no Brasil. In: GHINI, R.; HAMADA, E. (Eds.). **Mudanças Climáticas: impactos sobre doenças de plantas no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008, cap. 5, p. 119-128.

KORMELINK, R. et al. The nucleotide sequence of the M RNA segment of *Tomato spotted wilt virus*, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. **Journal of General Virology**, London, v. 73, n. 11, p. 2795-2804, 1992.

KUS, J. V. et al. Age-related resistance in *Arabidopsis* is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 2, p. 479-490, 2002.

LAWRENCE, K. et al. Virus diseases of peppers (*Capsicum* spp.) and their control. In: LOEBENSTEIN, G.; NIKOLAOS, K. (Eds.). **Advances in Virus Research**. San Diego: Academic Press, 2014, cap. 6, p. 297-354.

LAWTON, K. et al. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of systemic acquired resistance signal transduction pathway. **The Plant Journal**, Oxford, v. 10, p. 71-82, 1996.

LEÃO, E. U. Caracterização do *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e seu vetor (*Frankliniella schultzei*) em melancia. 58 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, 2015.

LEISNER, S. M.; TURGEON, R.; HOWELL, S. H. Effects of host plant development and genetic determinants on the long-distance movement of *Cauliflower mosaic virus* in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 2, p. 191-202, 1993.

LIMA, M. F et al. Detecção e incidência de vírus em 89 acessos de pimenta (*Capsicum* spp.) no Município de Ceres, Goiás. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.28, n. 2, p.1187-S1194, 2010.

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. Doenças do tomateiro. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças. 2005, 152p.

MANDAL, B. et al. Biological and molecular analyses of the acibenzolar-S-methyl-induced systemic acquired resistance in flue-cured tobacco against *Tomato spotted wilt virus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 2, p. 196-204, 2008.

MONTERO-ASTÚA M.; ULLMAN D.E.; WHITFIELD A.E. Salivary gland morphology, tissue tropism and the progression of tospovirus infection in *Frankliniella occidentalis*. **Virology**, Waltham, v. 493, p. 39-51, 2016.

MONTEIRO R. C.; MOUND L. A; ZUCCHI R. Species of *Frankliniella* (Thysanoptera: Thripidae) as pests in Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 65-72, 2001.

MOWAT, W. P.; DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.15, p. 233-247, 1987.

- NAGATA, T. et al. Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for *Tomato spotted wilt virus*. **Journal of General Virology**, London, v. 80, n. 2, p. 507-515, 1999.
- NAGATA, T. et al. The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. **Plant Pathology**, Chichester, v. 53, n. 2, p. 136-140, 2004.
- NIASSY, S. et al. Selection of promising fungal biological control agent of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 54, n. 6, p. 487-93, 2012.
- OLIVEIRA, R. F. Efeito fisiológico do F500 na planta. **Atualidades Agrícolas**, São Bernardo do Campo, n. 4, p. 9-11, 2005.
- OLIVEIRA, A.S. et al. Characterization of Bean necrotic mosaic virus: a member of a novel evolutionary lineage within the Genus *Tospovirus*. **PLoS One**, San Francisco, v.7, n.6, 2012.
- OLMSTEAD, R. G. et al. A molecular phylogeny of the Solanaceae. **Taxon**, Utrecht, v. 57, n. 4, p.1159-1181, 2008.
- PAPPU, H. R.; JONES, R. A. C.; JAIN, R. K. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. **Virus Research**, New York, v. 141, n. 2, p. 219-236, 2009.
- PAZ-LIMA, M. L.; LOPES, C. A.; CAFÉ FILHO, A. C. Estabilidade da resistência de *Capsicum* spp. ao oídio em telado e casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 5, p. 519-525, 2004.
- PERNEZNY, K. L. et al. (Eds.). **Compendium of pepper diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 2003, 88p.
- POZZER, L. et al. Characterization of a tospovirus isolate of Iris yellow spot virus associated with a disease in onion fields in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p.345-350, 1999.
- RANGEL, Y.; GARRIDO, M. J.; MONTEVERDE, E. Effect of maize dwarf mosaic virus venezuelan strain on some biometrics characteristics associated to yield of three sorghum cultivars. **Fitopatologia Venezolana**, Maracay, v. 9, n. 2, p. 36-41, 1996.
- RESENDE, R. O. et al. New tospoviruses found in Brazil. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 431, p. 78-79, 1996.
- ROGGERO, P. et al. Field isolates of *Tomato spotted wilt virus* overcoming resistance in pepper and their spread to other hosts in Italy. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n. 9, p. 950-954, 2002.
- ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos. In: PASCHOLATI, S. F. et al. (Org.). **Interação planta-patógeno: fisiologia e biologia molecular**. Piracicaba: Fealq, 2008, p. 411-429,

SAMUEL, G.; BALD, J. G.; PITTMAN, H. A. Investigations on “spotted wilt” of tomatoes. **Council for Scientific and Industrial Research Bulletin**, Australia, v. 44, p. 64, 1930.

SILBERSCHMIDT, K. M. A doença vira-cabeça do tomateiro. **O Biológico**, São Paulo, v.3, p.183-184, 1937.

SILVEIRA, L.C.P. **Registro e associação de espécies de *Orius wolff* com tripes, influência do fotoperíodo na reprodução e avaliação de *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera: Anthocoridae) no controle biológico de tripes (Thysanoptera) em casa-de-vegetação**. 2003. 116 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Entomologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SKANDALIS, N. et al. Effect of 29 pyraclostrobin application on viral and bacterial diseases of tomato. **Plant Disease**, Saint Paul, v.30, 2016.

SPASSOVA, M. et al. The tomato gene Sw-5 is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 7, n. 2, p. 151-161, 2001.

SIVPARSAD, B.; GUBBA, A. *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) isolates occurring in the Republic of South Africa (RSA). **African Journal of Agricultural Research**, Nigéria, v. 6, n.3, p. 3013-3020, 2011.

STEVENS, M. R.; SCOTT, S. J.; GERGERICH, R. C. Inheritance of a gene for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. **Euphytica**, Wageningen, v. 59, n. 1, p. 9-17, 1991.

STORMS, M. M. H. et al. A comparison of two methods of microinjection for assessing altered plasmodesmal gating in tissues expressing viral movement proteins. **Plant Journal**, Oxford, v. 13, n.1, p.131- 140, 1998.

TAKEDA, A. et al. Identification of a novel RNA silencing supressor, NSs protein of tomato spotted wilt virus. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 532, n. 1, p. 75-79, 2002.

THOMPSON, G. J.; VAN ZIJL, J. J. B. Control of *Tomato spotted wilt virus* in tomatoes in South Africa. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 431, p. 379-384, 1996.

TODA, S.; MORISHITA, M. Identification of three point mutations on the sodium channel gene in pyrethroid-resistant *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 6, p. 2296-2300, 2009.

TREJO-SAAVEDRA, D. L.; GARCÍA-NERIA, M. A.; RIVERA-BUSTAMANTE, R. F. Benzothiadiazole (BTH) induces resistance to *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Biological Research**, Santiago de Chile, v. 46, n. 4, p. 333-340, 2013.

ULLMAN, D. E. et al. A midgut barrier to *Tomato spotted wilt virus* acquisition by adult western flower thrips. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 1333-1342, 1992.

UDAYASHANKAR, A. C. et al. Strobilurins seed treatment enhances resistance of common bean against bean common mosaic virus. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, n. 11-12, p. 710-716, 2012.

WHITFIELD, A. E.; ULLMAN, D. E.; GERMAN, T. L. Tospovirus-thrips interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 459-489, 2005.

WIJKAMP, I. et al. Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. **Journal of General Virology**, London, v. 74, n. 3, p. 341-349, 1993.

WIJKAMP, I. et al. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 10, p. 1069-1074, 1995.

WIJKAMP, I.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Propagation of tomato spotted wilt virus in *Frankliniella occidentalis* does neither result in pathological effects nor in transovarial passage of the virus. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 81, n. 3, p. 285-292, 1996.

VAN DEN MEIRACKER, R. A. **Biocontrol of western flower thrips by heteroptera bugs**. 1999. 147 p. PhD thesis. Faculty of Science, Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, Amsterdam, 1999.

VAN DE WETERING, F. et al. TSWV ingestion by first instar larvae *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 900-905, 1996.

VAN POELWIJK, F. et al. Detection of the L protein of tomato spotted wilt virus. **Virology**, Waltham, v. 197, n. 1, p. 468-470, 1993.

VENÂNCIO, W. S. et al. Physiological effects of strobilurin fungicides on plants, **Publicatio UEPG**, Ponta Grossa, v.9, n.3, p. 59-68. 2003.

VIGO, S. C. et al. Evaluation of pyraclostrobin and acibenzolar-S-methyl on common bacterial blight of snap bean. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, p. 167-174, 2012.

ZHOU, J. et al. Molecular characterization of a new Tospovirus infecting soybean. **Virus Genes**, New York, v. 43, n. 2, p. 289-295, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A

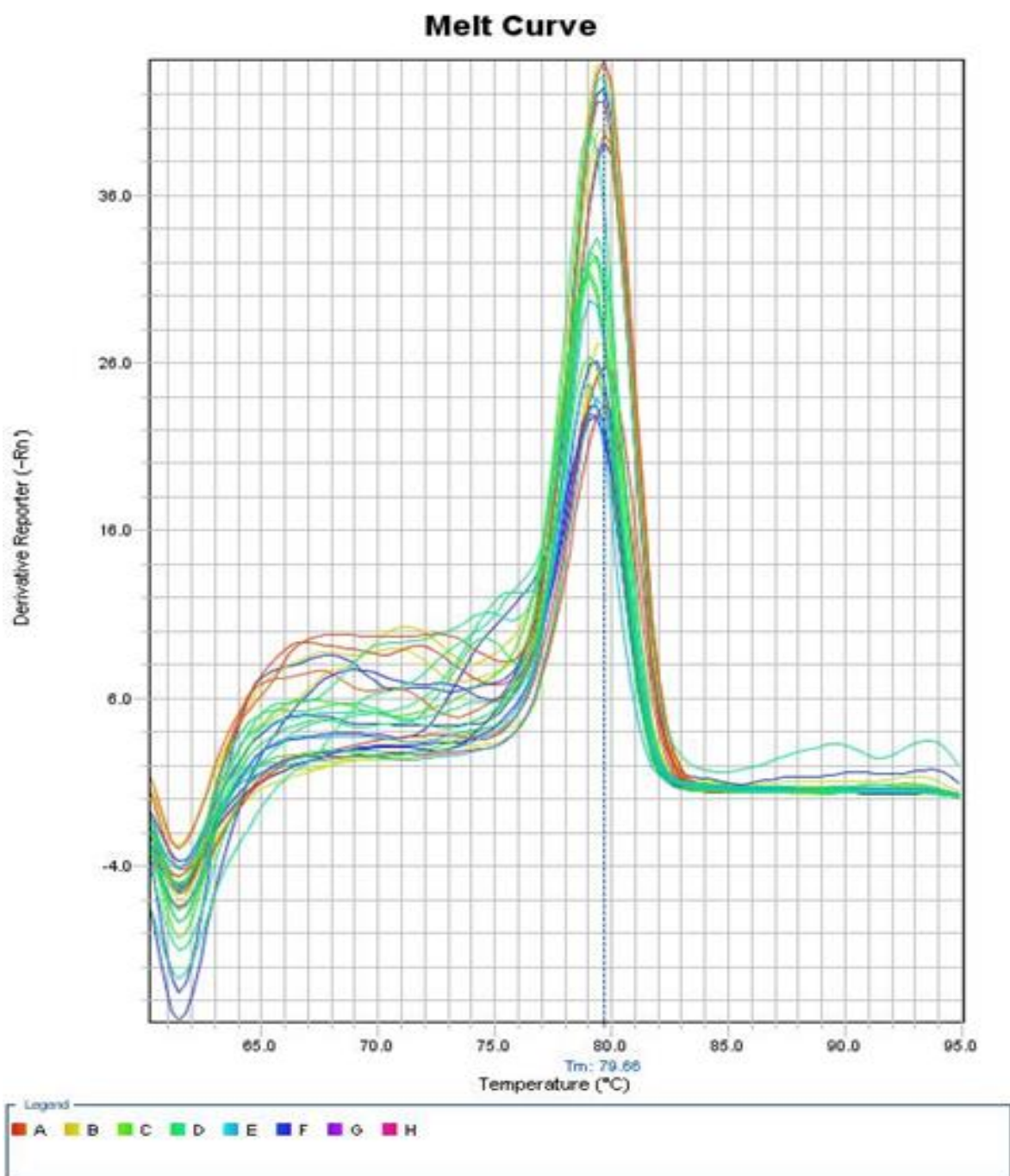


Figura 1. Curva de Melt da qPCR no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System do experimento 3 realizado em estufa no Departamento de Proteção Vegetal FCA/UNESP Botucatu.

APÊNDICE B



Figura 2. Instalação dos experimentos 1 e 2 à campo na Fazenda Experimental de São Manuel, UNESP e experimento 3 em estufa no Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu.

APÊNDICE C

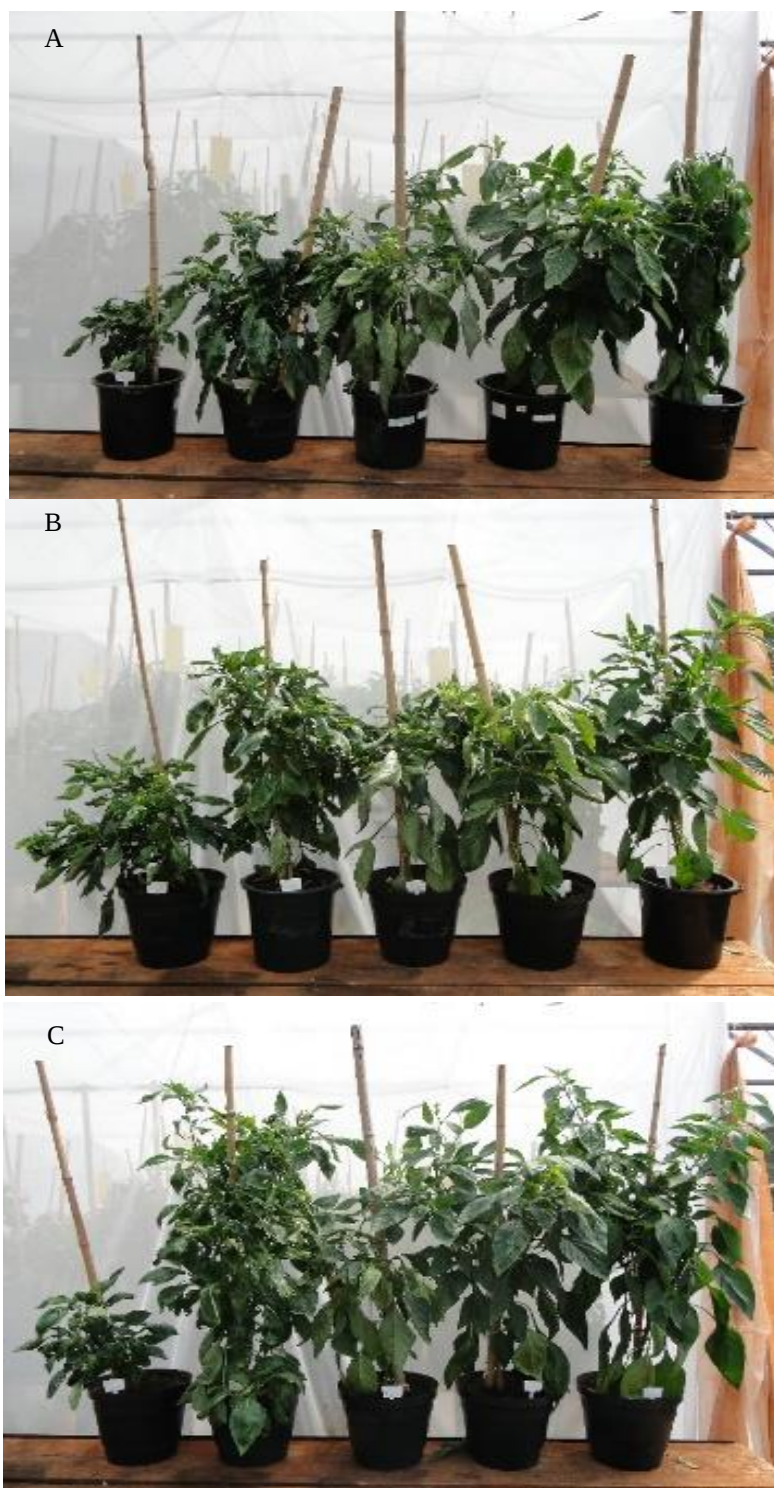


Figura 3. A) Plantas com tratamento no transplante e sem aplicação do produto nas 4 inoculações (0,15, 30,45) e testemunha respectivamente. B) Plantas com tratamento no transplante e com aplicação do produto nas 4 inoculações (0,15, 30,45) e testemunha respectivamente. C) Plantas sem tratamento no transplante e com aplicação do produto nas 4 inoculações (0,15, 30,45) e testemunha respectivamente.

APÊNDICE D



Figura 4. Sintomas de “Vira- Cabeça” nos experimentos 1 e 2 a campo na Fazenda São Manuel UNESP. A) Planta com gaiola retirada aos 45 DAT sem Cabrio[®] Top na bandeja e sem durante o ciclo da cultura. B) Planta testemunha sem Cabrio[®] Top na bandeja e com durante o ciclo da cultura. C) Planta com gaiola retirada aos 30 DAT sem Cabrio[®] Top na bandeja e sem durante o ciclo da cultura. D) Planta com gaiola retirada aos 15 DAT com Cabrio[®] Top na bandeja e com durante o ciclo da cultura.

APÊNDICE E



Figura 5. A) Frutos da planta testemunha sem Cabrio® Top após transplante e com durante o ciclo da cultura. B) Frutos da planta inoculada 30 DAT sem Cabrio® Top após transplante e sem durante o ciclo da cultura. C) Frutos da planta inoculada 45 DAT com Cabrio® Top após transplante e sem durante o ciclo da cultura. D) Frutos da planta inoculada 0 DAT com Cabrio® Top após transplante e com durante o ciclo da cultura.

APÊNDICE F



Figura 6. Sintomas de “Vira-Cabeça” no experimento 3 realizado em estufa FCA/UNESP Botucatu. A) Planta inoculada 30 DAT sem Cabrio® Top após transplante e sem durante o ciclo da cultura. B) Planta inoculada 30 DAT com Cabrio® Top após transplante e com durante o ciclo da cultura C) Planta inoculada 30 DAT com Cabrio® Top após transplante e com durante o ciclo da cultura. D) Planta inoculada 45 DAT sem Cabrio® Top após transplante e com durante o ciclo da cultura.

ANEXO 1

New Disease Reports (2014) 29, 25. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2014.029.025>



New Disease Reports

First report of *Groundnut ringspot virus* in cucumber fruits in Brazil

D.M.A. Spadotti*, E.U. Leão, K.C.G. Rocha, M.A. Pavan and R. Krause-Sakate

Department of Plant Protection, FCA/Unesp, B.P. 237, Botucatu, SP, Brazil

*E-mail: dsadotti@gmail.com

Received: 28 Mar 2014. Published: 08 Jun 2014. Keywords: *Cucumis sativus*, *Capnsium annuum*, virus plant disease

Cucumber (*Cucumis sativus*) fruits and pepper plants (*Capnsium annuum*) cultivated in the same commercial greenhouse in Vitoriana, São Paulo, Brazil, in December 2012 and March 2013, respectively, were found with necrotic concentric rings, typical of tospovirus infection (Fig. 1). In addition, thrips were observed in cucumber, pepper and weeds flowers. To confirm the presence of virus, cucumber fruits and pepper leaves with symptoms were collected and tested by plate-trapped antigen (PTA) enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Mowat & Dawson, 1987) using polyclonal antisera against *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) and *Zucchini lethal chlorotic virus* (ZLCV). The samples reacted only with the antisera against GRSV. Total RNA was extracted, using Norgen total RNA purification kit (Norgen Biotek Corporation, Canada), according to the manufacturer's instructions and tested by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Fragments of expected size (453 bp) were amplified using primers BR 60 (5' CCGGATCCTGCAGCAATTGTGTCA 3') and BR 65 (5' ATCAAGCCTTCTGAAAGTCAT 3') corresponding to the part of the nucleocapsid (N) gene as described by Elias *et al.* (2002). The RT-PCR amplicons were purified with the Qiagen PCR purification kit (Qiagen, Inc. Valencia, CA, USA), and then directly sequenced in both directions at Macrogen Inc., Seoul, Korea. BLAST analysis of the sequenced fragments from cucumber and pepper, deposited in GenBank (Accession Nos. KJ605652 and KJ782432, respectively), revealed 98% nucleotide sequence identity with an isolate of *Groundnut ringspot virus* (GRSV; GRU49702). Total genomic DNA was extracted from a single female thrips using the Chelex method (Boonham *et al.*, 2002). A portion of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) was amplified via standard PCR reaction using the primers mtD-7.2F and mtD-9.2R (Brunner *et al.*, 2002). The 450 pb fragment amplified showed 98% identity with *Frankliniella achadoi* (KF560548).

Cucumber fruits and pepper leaves were used for separate sap inoculations

onto different species of plants. GRSV from cucumber did not induce symptoms and was not detected in any of the species tested. Using pepper leaves chlorotic local lesions were observed on *Chenopodium quinoa*, *Cucumis sativus* cvs. Caipira (Fig. 2), Salada and Aodai; additionally necrotic local lesions on *Citrullus lanatus* cv. Crimson Sweet (Fig. 3) and initial concentric rings that evolved into systemic necrosis on *Datura stramonium*, *Nicotiana glauca* cv. TNN, *N. rustica*, *N. occidentalis* and *Capnsium annuum* cv. Magali. *Gomphrena globosa* showed chlorotic local lesions, leaf deformation and mottling. The presence or absence of GRSV in plants was confirmed by PTA-ELISA, RT-PCR and viral sequencing. To our knowledge, this is the first report of natural infection of GRSV in cucumber and causing symptoms on fruits.

References

- Boonham N, Smith P, Walsh K, Tume J, Morris J, Spence N, Bennison J, Barker I, 2002. The detection of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods* 101, 37-48. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00418-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00418-9)
- Brunner PC, Fleming C, Frey JE, 2002. A molecular identification key for economically important thrips species (Thysanoptera: Thripidae) using direct sequencing and a PCR-RFLP-based approach. *Agricultural and Forest Entomology* 4, 127-236. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1461-9563.2002.00132.x>
- Elias M, Chaves ALR, Colacicco A, Harikava R, Araujo J, Chagas CM, 2002. Caracterização do *Tomato chlorotic spot virus* isolado de Jêê no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 27, 285-291. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582002000300005>
- Mowat WP, Dawson S, 1987. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. *Journal of Virological Methods* 15, 233-247. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-0934\(87\)90101-7](http://dx.doi.org/10.1016/0166-0934(87)90101-7)



Figure 1



Figure 2



Figure 3

To cite this report: Spadotti DMA, Leão EU, Rocha KCG, Pavan MA, Krause-Sakate R, 2014. First report of *Groundnut ringspot virus* in cucumber fruits in Brazil. *New Disease Reports* 29, 25. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2014.029.025>

©2014 The Authors

This report was published on-line at www.ndrs.org.uk where high quality versions of the figures can be found.

New Disease Reports is a peer-reviewed on-line journal published by the British Society for Plant Pathology, for more information visit <http://www.ndrs.org.uk/>

Page 25

Figure 7. Nota Científica publicada durante o Doutorado.