

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Dissertação

Conhecendo a população de *Bemisia tabaci* do Rio Grande do Sul e o primeiro relato da ocorrência de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em pepino

Carolina Garcia Neves

Pelotas, 2017

CAROLINA GARCIA NEVES

Conhecendo a população de *Bemisia tabaci* do Rio Grande do Sul e o primeiro relato da ocorrência de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em pepino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fitossanidade (área de conhecimento: Fitopatologia)

Orientador (a): Profa. Dra Danielle Ribeiro de Barros

Co-Orientador: Dr. Ismail Teodoro de Souza Júnior

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

N511c Neves, Carolina Garcia

Conhecendo a população de Bemisia tabaci do Rio Grande do Sul e o primeiro relato da ocorrência de Tomato severe rugose virus (ToSRV) em pepino / Carolina Garcia Neves ; Danielle Ribeiro de Barros, orientadora ; Ismail Teodoro de Souza Junior, coorientador. — Pelotas, 2017.

65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Mosca branca. 2. Med. 3. Begomovirus. 4. Caracterização. 5. Cucumis sativus. I. Barros, Danielle Ribeiro de, orient. II. Souza Junior, Ismail Teodoro de, coorient. III. Título.

CDD : 632.9

Carolina Garcia Neves

Conhecendo a população de *Bemisia tabaci* do Rio Grande do Sul e o primeiro relato da ocorrência de *Tomato severe rugose virus (ToSRV)* em pepino

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Fitossanidade Programa de Pós-graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

23 de Março de 2017

Banca examinadora:

Profa Dra. Danielle Ribeiro de Barros (Orientadora)
Doutora em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa

Dr. Ismail Teodoro de Souza Júnior (Co-orientador)
Doutor em Fitotecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Fábio Nascimento da Silva
Doutor em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa

Profa. Dra. Andréa Bittencourt Moura
Doutora em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa

Agradecimentos

Aos meus pais, Victorugo e Rosaura, por todo o amor, apoio e incentivo em todos esses anos. Por nunca me deixarem desistir dos meus objetivos. “Só os fortes sobrevivem!” Obrigada por tudo!

Aos meus irmãos, Rosália e Victor, pelo nosso convívio, pela nossa cumplicidade e por estarem sempre presentes quando eu preciso. Amo vocês!

Ao meu namorado, Anderson Brunetto, por todo carinho, amor, dedicação, compreensão e companheirismo nesses dois anos. Me ajudando e participando de todos os momentos da execução desse trabalho. Te amo muito!

A minha orientadora, Danielle Barros, por ter me dado uma oportunidade há 4 anos atrás e sempre ter confiado em mim. Por todos os ensinamentos, orientações e acima de tudo pela amizade. Obrigada Dani!

Ao meu co-orientador, Ismail Teodoro de Souza Júnior, por toda ajuda durante a escrita, pelo incentivo e pelo bom humor, sempre alegrando o Laboratório. Obrigada Isma!

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal, Monique, Silvia e Johan. Por estarem sempre presentes, seja para jogar conversa fora, seja para ajudar, seja para estudar. Obrigada por tudo!

Aos colegas e amigos da Fitopatologia, pela amizade, pelo apoio e por todos os momentos compartilhados nesses dois anos.

Ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), pelo convite e ajuda na realização das coletas. Em especial ao Roque Danielli e ao Jairo Carbonari.

Ao professor Fábio Nascimento, pela ajuda na montagem da sequência do vírus. Muito obrigada!

À professora Renate Krause, por ter me recebido no Laboratório de Virologia Vegetal da Unesp – Botucatu. Obrigada por todo aprendizado adquirido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Onde todos pensam igual, ninguém pensa muito.”
(LIPPMANN, 1956)

Resumo

NEVES, Carolina Garcia. **Conhecendo a população de *Bemisia tabaci* do Rio Grande do Sul e o primeiro relato da ocorrência de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em pepino.** 2017. 65f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Nos últimos 20, a emergência de doenças causadas por begomovírus vem ocasionando sérios problemas em uma variedade de culturas hortícolas em várias partes do mundo. Além de fatores climáticos e mudanças nos modos de cultivo, a emergência desses vírus está relacionada com o aumento e a prevalência do inseto vetor, mosca branca (*Bemisia tabaci*). O objetivo desse trabalho foi conhecer a população de *B. tabaci* do Rio Grande do Sul e caracterizar molecularmente um isolado de begomovírus associado ao pepino. Para conhecer a população de *B. tabaci*, foram realizadas coletas em várias regiões do estado. A extração de DNA total foi feita individualmente para cada adulto coletado, após foi realizada a PCR para identificação da espécie de mosca branca. Para os 51 indivíduos que apresentaram resultado positivo para *B. tabaci* foi realizada a digestão com a enzima de restrição *TaqI*, a fim de identificar as espécies do complexo *B. tabaci*. Foram encontradas três espécies pertencentes a esse complexo: *Middle East-Asia Minor 1* (MEAM1), *New World* (NW) e *Mediterranean* (MED). A espécie predominante foi a MEAM1 encontrada nas cidades de Bom Princípio, Caxias do Sul e Feliz, seguida da espécie NW encontrada em Cruzeiro do Sul e Lajeado. A espécie MED ocorreu em menor percentagem que as outras e foi encontrada nas cidades de Barra do Quaraí, Bom Princípio e Feliz. Para a caracterização molecular do begomovírus associado ao pepino, foram coletadas plantas onde as moscas brancas eram encontradas. Foi realizada a extração de DNA total de 35 amostras de plantas e submetidas à amplificação por PCR. Das 35 amostras apenas 7 apresentaram resultado positivo para begomovírus. As amostras que apresentaram resultado positivo foram utilizadas na amplificação por RCA e digeridas com enzimas de restrição. Para a clonagem, apenas a amostra de pepino foi utilizada. Após o sequenciamento foi verificada a presença de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). Este é o primeiro relato de ToSRV infectando pepino.

Palavras-chave: mosca branca, MED, *Begomovirus*, caracterização, *Cucumis sativus*.

Abstract

NEVES, Carolina Garcia. **Knowing the population of *Bemisia tabaci* of Rio Grande do Sul and the first report of the occurrence of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) in cucumber.** 2017. 65f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Over the past 20 years, the emergence of diseases caused by begomoviruses has been causing serious problems in a variety of horticultural crops in various parts of the world. In addition to climatic factors and changes in cultivation modes, the emergence of these viruses is related to the increase and prevalence of insect vector, whitefly (*Bemisia tabaci*). The aim of this work was to know the population of *B. tabaci* of Rio Grande do Sul and molecularly characterize a begomovirus isolate associated with cucumber. In order to know the population of *B. tabaci*, collections were realized in several regions of the state. The total DNA extraction was realized individually for each adult collected, after the PCR was performed to identify the whitefly species. For the 51 individuals who had positive results for *B. tabaci* was realized digestion with the restriction enzyme *TaqI*, in order to identify the species of the complex *B. tabaci*. Three species belonging to this complex were found: Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), New World (NW) and Mediterranean (MED). The predominant species was MEAM1 found in the cities of Bom Princípio, Caxias do Sul and Feliz, followed by NW species found in Cruzeiro do Sul and Lajeado. For the molecular characterization of begomovirus associated with cucumber, plants were collected where the white flies were found. Total DNA extraction from 35 plant samples was performed and submitted to PCR. Of 35 samples, only 7 presented showed positive results for begomovirus. Samples that showed a positive result were used in amplification by RCA and digested with restriction enzymes. For cloning, only the cucumber sample was used. After the sequence analysis the presence of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) was verified. This is the first report of ToSRV infecting cucumber.

Key words: whitefly, MED, *Begomovirus*, characterization, *Cucumis sativus*.

Lista de figuras

| | | |
|-----------------|--|----|
| Figura 1 | Folha de feijão (A) e tomate (B) infestada por adultos de mosca branca..... | 14 |
| Figura 2 | Organização genômica dos begomovírus monopartidos e bipartidos..... | 20 |
| Figura 3 | Sintoma causado por infecção de Begomovírus em <i>Sida rhombifolia</i> , infectada por <i>Sida micrantha mosaic virus</i> (SiMMV). Cruzeiro do Sul, Rio Grande do Sul, 2016..... | 20 |
| Figura 4 | Municípios onde foram realizadas as coletas..... | 24 |
| Figura 5 | Percentagem de amostras positivas para <i>Bemisia tabaci</i> e suas respectivas cidades..... | 32 |
| Figura 6 | Eletroforese em gel de agarose apresentando diferentes padrões de restrição. (A) Padrão de restrição das espécies: 1 – <i>Middle East-Asia Minor 1</i> ; 2 - <i>Mediterranean</i> e 3 – <i>New World</i> . (B) Padrão de restrição das espécies: 1 – <i>Middle East-Asia Minor 1</i> e 2 – <i>Mediterranean</i> . (C): Padrão de restrição da espécie <i>New World</i> | 32 |
| Figura 7 | Percentagem de ocorrência das espécies do complexo <i>Bemisia tabaci</i> nos locais de coleta..... | 33 |
| Figura 8 | Percentagem de ocorrência das espécies <i>New World</i> (NW) (A) e <i>Middle East-Asia Minor 1</i> MEAM1 (B) e as respectivas cidades..... | 33 |
| Figura 9 | Percentagem de ocorrência da espécie <i>Mediterranean</i> (MED) e as cidades onde foi encontrada..... | 33 |

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 10 | Percentagem de ocorrência das espécies <i>Middle East-Asia Minor 1</i> (MEAM1) e <i>Mediterranean</i> (MED). (A) Cidade de Feliz; (B) Cidade de Bom Príncipe..... | 35 |
| Figura 11 | Análise filogenética do gene mtCOI parcial utilizando o método <i>neighbour-joining</i> em análise <i>bootstrap</i> com 1000 repetições com o programa MEGA 6.06..... | 36 |
| Figura 12 | Análise filogenética com as sequências dos DNA-A de espécies de begomovírus. Utilizando o método <i>neighbour-joining</i> em análise <i>bootstrap</i> com 1000 repetições com o programa MEGA 6.06..... | 47 |

Lista de tabelas

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabela 1 | Características de transmissão e tempo de transmissão de vírus de plantas pela mosca branca..... | 16 |
| Tabela 2 | Localidades, coordenadas, tipo de ambiente e hospedeiro onde as amostras de mosca branca foram coletadas..... | 28 |
| Tabela 3 | Sequências parciais do gene mitocondrial citocromo oxidase I de moscas brancas da espécie MED utilizadas na análise filogenética..... | 30 |
| Tabela 4 | Local, coordenadas, identificação e quantidade das amostras que apresentaram resultado positivo para <i>Bemisia tabaci</i> | 31 |
| Tabela 5 | Localidades, coordenadas, tipo de ambiente e espécies de plantas coletadas..... | 42 |
| Tabela 6 | Primers utilizados para sequenciamento do clone de begomovírus..... | 44 |
| Tabela 7 | Begomovírus utilizados na análise filogenética. Espécie, número de acesso no GenBank, hospedeiro e local..... | 45 |
| Tabela 8 | Local de coleta, coordenadas e espécies de plantas que apresentaram resultado positivo para begomovírus..... | 49 |

Sumário

| | |
|--|-----------|
| 1 Introdução Geral..... | 12 |
| 2 Revisão Bibliográfica..... | 13 |
| 2.1 <i>Bemisia tabaci</i> | 13 |
| 2.2 Gênero <i>Begomovirus</i> | 18 |
| 2.2.1 <i>Tomato severe rugose virus</i> | 22 |
| 2.3 Outros vírus transmitidos por <i>B. tabaci</i> | 23 |
| 3 CAPÍTULO 1: Distribuição de espécies do complexo <i>Bemisia</i> <i>tabaci</i> no Rio Grande do Sul..... | 26 |
| 3.1 Introdução..... | 26 |
| 3.2 Material e métodos..... | 27 |
| 3.2.1 Coleta das moscas brancas..... | 27 |
| 3.2.2 Extração de DNA e amplificação do gene mtCOI..... | 29 |
| 3.2.3 Análise de restrição para diferenciação entre as espécies MED, MEAM1 e NW..... | 29 |
| 3.3 Resultados e Discussão..... | 31 |
| 3.4 Conclusões..... | 39 |
| 4 CAPÍTULO II: Primeiro relato de um begomovírus associado ao pepino no Rio Grande do Sul..... | 40 |
| 4.1 Introdução..... | 40 |
| 4.2 Material e métodos..... | 41 |
| 4.2.1 Coleta das amostras e extração de DNA total..... | 41 |
| 4.2.2 Detecção por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)..... | 41 |
| 4.2.3 Amplificação por RCA (<i>Rolling Circle Amplification</i>) e análise de restrição..... | 42 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.4 Clonagem e minipreparação de DNA plasmidial..... | 43 |
| 4.2.5 Sequenciamento e análise de sequências..... | 44 |
| 4.2.6 Análise filogenética..... | 44 |
| 4.3 Resultados e discussão..... | 45 |
| 4.4 Conclusões..... | 49 |
| 5 Considerações finais..... | 50 |
| 6 Referências | 51 |
| Anexos..... | 60 |

1 Introdução Geral

Os vírus que causam doenças em plantas, são economicamente importantes e em sua maioria necessitam de um vetor para que ocorra a transmissão de hospedeiro para hospedeiro (ANDRET-LINK & FUCHS, 2005). Esses vetores pertencem a diferentes grupos de organismos, podendo ser: artrópodes (pulgões, tripes, cigarrinhas, ácaros, moscas brancas, gafanhotos), nematoides e organismos zoospóricos. A disseminação global desses patógenos foi facilitada por esses vetores, especialmente a mosca branca, que é considerada um supervetor, devido ao seu comportamento altamente polífago e pela capacidade de transmitir diferentes espécies de vírus para diferentes espécies de plantas a curtas e longas distâncias (GILBERTSON et al., 2015).

A mosca branca, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), atualmente é uma das pragas mais importantes da agricultura e foi considerada pela União Internacional para Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN, <http://www.issg.org>), como uma das 100 espécies mais invasoras no mundo. Seus danos podem ser diretos através da sua alimentação, causando o enfraquecimento da planta, e a secreção de uma substância açucarada, que serve como substrato para o desenvolvimento de fungos, acarretando a diminuição da fotossíntese, além de indiretos com sua capacidade de transmitir vírus que causam doenças em plantas (HOGENHOUT et al., 2008). Entre os vírus que a mosca branca é capaz de transmitir estão os gêneros: *Begomovirus*, *Carlavirus*, *Crinivirus*, *Ipomovirus* e *Torradovirus* (POLSTON et al., 2014).

Nos últimos 20 anos um grupo de vírus conhecido como begomovírus emergiu causando sérios problemas em uma variedade de culturas hortícolas em várias partes do mundo (ROJAS & GILBERTSON, 2008). A emergência

desses vírus está associada a diversos fatores, tais como: mudanças nas práticas de cultivo, o crescimento da movimentação global das plantas e o uso intensivo de inseticidas. Além desses fatores, o aumento e a prevalência do inseto vetor, mosca branca (*Bemisia tabaci*), está intimamente associado com o aparecimento dos begomovírus como patógenos importantes nas últimas décadas (NAVAS-CASTILLO et al., 2011; WISLER et al., 1998). Um exemplo interessante dessa relação pode ser citado, quando em meados da década de 1980, com a introdução do biótipo B nas Américas e o consequente deslocamento do biótipo A, local e menos polífago, resultou na superação dos begomovírus em relação aos potivírus como o grupo de vírus de plantas com maior número de espécies reconhecidas (MORALES, 2010).

Diante do exposto, considerando a importância que a mosca branca apresenta no cenário nacional e internacional como praga agrícola e vetor de vírus, estudar e conhecer o comportamento e a distribuição geográfica desse inseto na nossa região é de extrema importância, sendo assim com esse trabalho objetivou-se conhecer a população de *Bemisia tabaci* do Rio Grande do Sul e caracterizar molecularmente um isolado de begomovírus associado ao pepino.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 *Bemisia tabaci*

A nomenclatura utilizada para designar as espécies de *B. tabaci* ainda não chegou em um consenso dentro da comunidade científica. Devido a isso, Boykin (2014) escreve um trabalho, no qual a história da nomenclatura é explicada. Segundo a autora, em 1889, na Grécia, Gennadius descreveu uma nova espécie de mosca branca, infestando tabaco, a qual foi denominada como sendo *Aleurodes tabaci* Gennadius. Porém, é em 1914 que a história do gênero *Bemisia* inicia-se. Assim, em 1936, o nome inicialmente dado a mosca branca de *A. tabaci* é mudado, tornando-se *Bemisia tabaci*. Já a nomenclatura biótipos, foi introduzida apenas em 1991, sendo baseada na análise de padrões de esterase (COSTA & BROWN, 1991). Mesmo com os avanços nas técnicas moleculares, a nomenclatura biótipo ainda é utilizada. Porém, com base em vários estudos de compatibilidade de acasalamento, análises filogenéticas do gene mitocondrial citocromo oxidase I (mtCOI), e genomas, os integrantes do complexo *B. tabaci*, comportam-se como espécies diferentes (BOYKIN, 2014). De tal modo, após todos os estudos realizados o mais correto é dizer que o complexo *B. tabaci* não é formado por biótipos e sim por um complexo de diferentes espécies (DE BARRO et al. 2011).

Em relação aos aspectos biológicos de *B. tabaci*, são insetos pequenos apresentando um tamanho de 1 a 2 mm, sendo as fêmeas um pouco maiores que os machos (NATESHAN et al., 1996). Sua denominação comum de mosca branca, se deve pois quando chegam a fase adulta, a coloração do dorso é amarelo pálido e as asas brancas cobrem praticamente todo o corpo (TOSCANO

et al., 2002). São insetos sugadores de seiva e possuem o aparelho digestivo diferenciado em “câmara filtro”, permitindo que o excesso de alimento sugado seja excretado como *honeydew* (GALLO et al., 2002). A postura dos ovos é realizada na face abaxial das folhas para que esses fiquem protegidos do vento e da dessecação (SIMMONS, 1994). O ciclo de vida da mosca branca é composto por três fases: ovo, ninfa e adulto e sofre influência das condições climáticas e ambientais, principalmente temperatura e umidade relativa do ar, além da planta hospedeira (GILL, 1990). Após a eclosão, as ninfas se locomovem pela folha até um local adequado para sua fixação. Depois de inserirem o aparelho bucal e atingirem o floema da planta, permanecem sésseis até emergência dos adultos (BYRNE & BELLOWS JUNIOR, 1991).

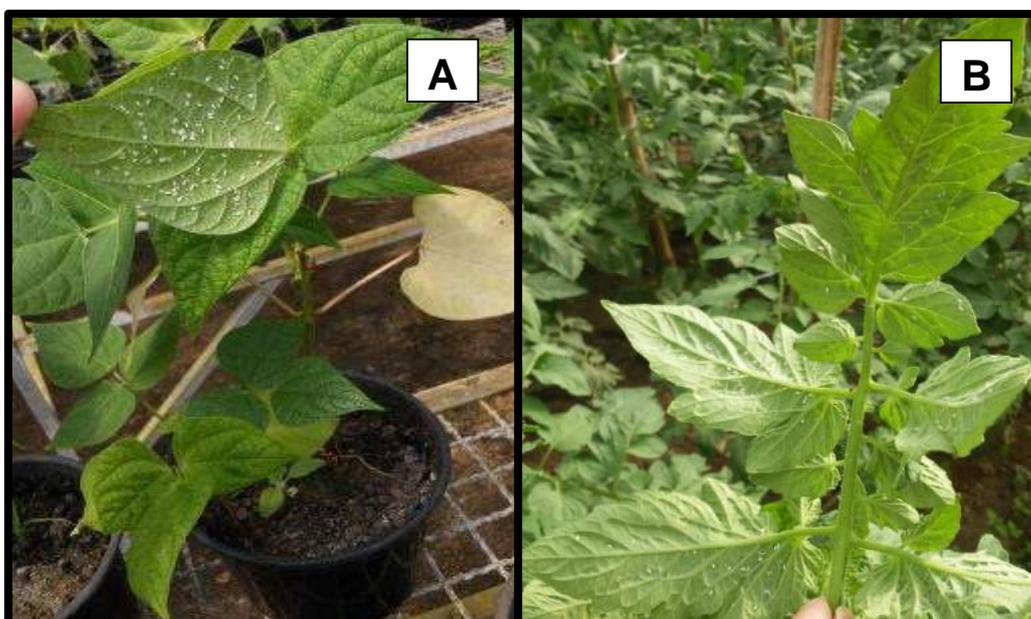


Figura 1 - Folha de feijão (A) e tomate (B) infestada por adultos de mosca branca.

Sabe-se que esse complexo de espécies crípticas, é composto de no mínimo 36 espécies morfologicamente iguais divididas em 11 grupos, variando quanto a preferência ao hospedeiro, resistência a inseticidas e capacidade de transmissão de diferentes espécies de vírus, além de aspectos moleculares (FIRDAUS et al., 2013).

A mosca branca, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), é considerada uma praga importante de culturas agrícolas, hortícolas e ornamentais, se encontra amplamente distribuída no mundo e apresenta uma grande diversidade genética (DE BARRO et al. 2011). Se alimenta do floema das

plantas, predominantemente espécies herbáceas. Seus danos podem ser diretos, através da sua alimentação e secreção de uma substância açucarada chamada *honeydew*, que serve como substrato para desenvolvimento de fungos, principalmente do gênero *Capnodium*, ou indiretos, através da transmissão de vírus, patógenos de plantas (JONES, 2003).

No Brasil, seu primeiro relato ocorreu em 1928, na Bahia (BONDAR, 1928), no entanto passou a ter importância no início da década de 90 com a introdução do biótipo B (espécie MEAM1 - *Middle East-Asia Minor 1*) provavelmente através de plantas ornamentais (LOURENÇÃO & NAGAI, 1994; ZERBINI et al., 2002). Atualmente se tem o relato da presença de quatro espécies do complexo *B. tabaci* no país: *Middle East-Asia Minor 1* (MEAM1), *Mediterranean* (MED), *New World* (NW) e *New World 2* (NW2) (MARUBAYASHI et al., 2013; BARBOSA et al., 2014a).

As espécies que merecem maior destaque são a MEAM1 e a MED. A primeira por ser a mais distribuída no mundo e ser responsável pela incidência de doenças causadas por vírus do gênero *Begomovirus* (GILBERTSON et al., 2015). E a segunda, por ter sido relatada pela primeira vez no Brasil em 2014, na cidade de Barra do Quaraí no Rio Grande do Sul, além de apresentar um difícil controle, devido à resistência a alguns inseticidas (BARBOSA et al., 2014a). A espécie NW, também chamada de biótipo A, foi a primeira espécie de mosca branca relatada no Brasil (BONDAR, 1928) e essa apresenta como preferência hospedeira plantas daninhas (BARBOSA et al., 2014b). A NW2 já foi relatada no estado de São Paulo e é encontrada com frequência em soja e *Euphorbia heterophylla* (MARUBAYASHI et al., 2013).

B. tabaci pode transmitir mais de 200 espécies de vírus, dos gêneros: *Begomovirus*, *Crinivirus*, *Carlavirus*, *Ipomovirus* e *Torradovirus* (POLSTON et al., 2014). Esses gêneros apresentam características diferentes que vão desde vírus que possuem estrutura linear ou icosaédrica e RNA linear de cadeia simples (*Carlavirus*, *Crinivirus*, *Ipomovirus*, *Torradovirus*) ou DNA circular de cadeia simples (*Begomovirus*) (KING et al., 2011). A transmissão de um hospedeiro para outro, é crucial para o ciclo de vida dos vírus, pois garante a sobrevivência do patógeno em um determinado ambiente, o número de espécies hospedeiras colonizadas e a incidência viral (BLANC et al., 2014). Estes cinco gêneros possuem uma relação específica de transmissão com a mosca branca, podendo

ser: não persistente, semi-persistente ou persistente circulativa (tabela 1) (POLSTON et al., 2014).

Tabela 1 - Características de transmissão e tempo de transmissão de vírus de plantas pela mosca branca.

| Características biológicas | Não Persistente | Semi-persistente | Persistente circulativa | Persistente propagativa |
|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| PAA e PAI ^a | Segundos, minutos ^b | Minutos, horas ^c | Horas, dias ^c | Horas, dias ^c |
| Período Latente | Nenhum | Nenhum | Horas, dias | Dias, semanas |
| Tempo de retenção no vetor | Minutos | Horas | Dias, semanas | Vida útil do inseto |
| Presença na hemolinfa do vetor | Não | Não | Sim | Sim |
| Multiplicação no vetor | Não | Não | Não | Sim |
| Transmissão transovariana | Não | Não | Não | Frequentemente |

^a PAA, período de acesso aquisição; PAI, período de acesso inoculação.

^b Período de tempo durante o qual o vírus pode ser adquirido e inoculado em células epidérmicas da planta.

^c Os tempos de PAA e PAI dependem da localização do vírus na planta, ou seja, a aquisição do vírus a partir do floema leva mais tempo do que a aquisição a partir das células da epiderme ou do mesófilo.

Fonte: HOGENHOUT et al., 2008

2.2 Gênero *Begomovirus*

Dentre os vírus que infectam plantas, o gênero *Begomovirus* é o que possui o maior número de espécies, com 322 espécies reconhecidas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) (ICTV, 2017). Esse gênero pertence à família *Geminiviridae*, são transmitidos por insetos e nos últimos 20 anos emergiram se tornando o maior grupo de vírus de plantas (em número de espécies) e um dos mais importantes economicamente (INOUE-NAGATA et al., 2016). O seu genoma de DNA circular, fita simples, pode ser bipartido ou monopartido, sendo os seus componentes conhecidos como DNA-A e DNA-B. Nos bipartidos, os dois componentes possuem uma região comum de aproximadamente 200 nucleotídeos, onde se encontra a origem de replicação (BROWN et al., 2012) (Figura 2).

Os begomovírus são divididos em dois grupos: os vírus bipartidos, prevalentes no Novo Mundo (Sul dos Estados Unidos, México, Caribe, América Central e América do Sul), que possuem dois componentes, o DNA-A e o DNA-B, cada um com aproximadamente 2,6 Kb. E os vírus monopartidos, composto por apenas um componente de DNA de aproximadamente 2,9 Kb, prevalente no Velho Mundo (Europa, África, Ásia e Austrália) (INOUE-NAGATA et al., 2016). Comumente são encontrados associados aos vírus monopartidos DNAs satélites (alphasatélites e betasatélites) que podem aumentar a virulência desses vírus (ZHOU, 2013). A introdução de begomovírus monopartidos no Novo Mundo já foi relatada, como exemplo, o estabelecimento do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) em algumas regiões, porém ainda não relatado no Brasil (LEFEUVRE et al., 2010). Além de um vírus que causa deformação na folha de tomate, o *Tomato leaf deformation virus* (ToLDeV) encontrado no Peru e no Equador (MELGAREJO et al., 2013). E um complexo de begomovírus que infectam batata doce relatados no Brasil e em outras regiões do Novo mundo (ALBUQUERQUE et al., 2012).

O DNA-A dos begomovírus bipartidos contém cinco genes. Na fita de sentido viral encontra-se o gene que codifica a proteína capsidial (*cp*) e na fita de sentido complementar são encontrados os genes: *rep*, *trap*, *ren* e *ac4*. Já o componente DNA-B codifica dois genes, sendo eles *NSP* e *mp* encontrados na fita viral e complementar, respectivamente (ROJAS et al., 2005). No DNA-A dos begomovírus monopartidos a organização genômica é semelhante ao dos bipartidos, possuindo apenas um sexto gene no sentido da fita viral, denominado de *av2* (BRIDDON et al., 2006).

O gene *cp* codifica a proteína capsidial, que além de estar envolvida na montagem da partícula viral, é essencial na transmissão do vírus e determina a especificidade do inseto vetor (HOFER et al., 1997). O gene *av2*, presente apenas nos begomovírus monopartidos, codifica uma proteína associada ao movimento do vírus na planta (PADIDAM et al., 1996). O gene *rep* (*replication-associated protein*) codifica a única proteína essencial na replicação viral (OROZCO et al., 1997). O gene *ren* (*replication enhancer protein*) codifica um fator acessório, não essencial na replicação do vírus, porém quando essa está presente o acúmulo de DNA viral é muito maior (HANLEY-BOWDOIN, 1999; ROJAS et al., 2005). O gene *trap* (*transactivating protein*) codifica um fator de

transcrição dos genes *cp* e *NSP* (WANG et al., 2005), além disso, esse gene também pode atuar na supressão de silenciamento de RNA através da ativação de genes do hospedeiro que codificam reguladores negativos do silenciamento do RNA (TRINKS et al., 2005). No DNA-B dos begomovírus bipartidos, o gene *NSP* codifica uma proteína responsável pelo transporte de DNA através do envelope nuclear (SANDERFOOT & LAZAROWITZ, 1996). E o gene *mp*, responsável por codificar a proteína envolvida no movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (NOUEIRY et al., 1994).

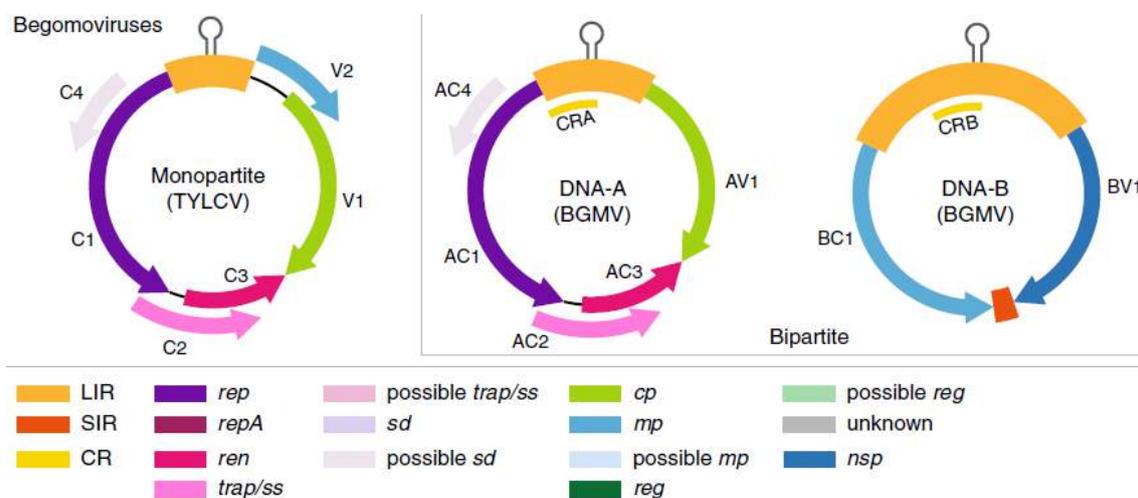


Figura 2 - Organização genômica dos begomovírus monopartidos e bipartidos. Onde: LIR, região intergênica longa; SIR, região intergênica curta; CR, região comum; *rep*, proteína associada à replicação; *ren*, intensificador de replicação; *trap*, proteína transativadora; *ss*, supressor de silenciamento; *tgs*, silenciamento gênico transcricional; *sd*, determinante de sintomas; *cp*, proteína capsial; *mp*, proteína de movimento; *reg*, gene regulador; *NSP*, proteína nuclear transportadora.

Fonte: VARSANI, NAVAS-CASTILLO et al., 2014

Os sintomas causados por begomovírus em plantas são: enfezamento e distorção da folha, mosaico amarelo ou mosaico verde-amarelo, bolhosidade, distorção, amarelecimento das nervuras ou entre as nervuras, manchas amarelas nas folhas, como pode ser observado na figura 3 (INOUE-NAGATA et al., 2016).



Figura 3 - Sintoma causado por infecção de Begomovírus em *Sida rhombifolia*, infectada por *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV). Cruzeiro do Sul, Rio Grande do Sul, 2016.

A transmissão desses vírus na natureza, ocorre através de membros do complexo de espécies crípticas, *Bemisia tabaci*, os quais são amplamente distribuídos no mundo e colonizam um grande número de espécies de plantas (GILL & BROWN, 2010). *B. tabaci* passou a ter destaque como praga agrícola em várias regiões do mundo nos anos de 1980, dando um maior destaque para as begomoviroses, pois relatórios de infestações por mosca branca caracteristicamente tem resultado em focos de infecção por begomovírus (BROWN, 2007). Devido ao seu inseto vetor ser altamente polífago, os begomovírus, podem ser encontrados tanto em plantas cultivadas como em não cultivadas, além disso as chances de transmissão de vírus antes restritos às plantas invasoras para plantas cultivadas e vice-versa é ampliada (RIBEIRO et al., 2003).

A relação de transmissão desse grupo ocorre de forma persistente e para a maioria das espécies é persistente não propagativa. Porém, no caso do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) existe um debate em relação a sua replicação no interior do vetor. Onde alguns autores relatam que existe uma evidência da replicação do DNA viral na mosca branca (ACOTTO & SARDO, 2010; PAKKIANATHAN et al., 2015). Porém, estudos mais recentes, discordam e sugerem que não há evidências da replicação do TYLCV no interior do seu vetor (SÁNCHEZ-CAMPOS et al., 2016). No entanto para poder afirmar ou descartar essa hipótese, mais estudos devem ser realizados. Os begomovírus

circulam no interior do vetor, passando pela maioria dos órgãos internos e saem pelas glândulas salivares principais (CICERO & BROWN, 2011). A proteína do capsídeo dos geminivírus é o que determina a especificidade do inseto vetor (BRIDDON et al., 1990).

No Brasil, as doenças com maior destaque são o mosaico dourado do feijoeiro, causado pelo vírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e um número de doenças de tomate, causadas por um complexo de vírus (INOUE-NAGATA et al., 2016). Quando se tem a presença de uma alta população de mosca branca e as culturas do feijão ou do tomate, são infectadas pelo vírus logo no início do seu ciclo, as perdas podem chegar até 100% (INOUE-NAGATA et al., 2016). Além do tomate e do feijão, outras culturas, por exemplo, soja, batata, pimenta, batata doce, também são infectadas por begomovírus, e as plantas daninhas, que merecem um destaque, pois funcionam como um reservatório natural de vírus (ROCHA et al., 2013).

2.2.1 *Tomato severe rugose virus*

O *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) pertence à família *Geminiviridae* e ao gênero *Begomovirus*. É a espécie de begomovírus prevalente nas regiões de cultivo de tomate do centro-sul do país (Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo e Goiás) (INOUE-NAGATA et al., 2016). As razões para a prevalência da espécie são desconhecidas, porém acredita-se estar relacionada com a eficiência do vetor *Bemisia tabaci* (espécie MEAM1), devido a ocorrência de reservatório natural desse vírus no campo (BARBOSA et al., 2011). Além do tomate, essa espécie é capaz de infectar naturalmente outras culturas, por exemplo: pimentão, batata, tabaco e recentemente foi encontrada infectando feijão e em condições experimentais pode infectar até nove espécies de plantas daninhas (SOUZA-DIAS et al., 2008; BARBOSA et al., 2009; NOZAKI et al., 2010; BARBOSA et al., 2011; MACEDO et al., 2016).

Os principais sintomas observados em plantas infectadas por ToSRV são: amarelecimento das nervuras, mosaico amarelo, mosqueado, deformação, redução do crescimento e enrolamento do limbo foliar (ROCHA et al., 2012). Em relação aos danos causados pela infecção por ToSRV, em pimentão foi

observada a redução no número de frutos produzidos por planta, afetando assim o rendimento da cultura (ROCHA et al., 2012).

2.3 Outros vírus transmitidos por *B. tabaci*

Gênero *Carlavirus* (Família *Betaflexiviridae*): Apenas duas espécies desse gênero são transmitidas por mosca branca, o *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) e o *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) (KING et al., 2011; NAIDU et al., 1998). O modo de transmissão do MYaV ainda não foi esclarecido, porém a transmissão do CPMMV tem sido descrita de duas formas: não persistente e semi-persistente (ROSARIO et al., 2014). Em relação as proteínas envolvidas na transmissão, apenas a proteína do capsídeo foi responsável pela interação com a mosca branca (MATOUSEK et al., 2009).

Gênero *Crinivirus* (Família *Closteroviridae*): É um dos gêneros mais estudados em relação a transmissão pela mosca branca. A transmissão ocorre de forma semi-persistente (DUFFUS et al., 1986). A aquisição e a inoculação do vírus pela mosca branca, ocorre nos tecidos do floema das plantas hospedeiras (JOHNSON et al., 2002). Nesse grupo a proteína que está envolvida na transmissão pela mosca branca, é a proteína do capsídeo menor (CPm), além de estar envolvida na transmissão, após análises de várias sequências da CPm de vários crinivírus, evidenciou-se que essa também pode estar relacionada com a especificidade do vetor (WINTERMANTEL et al., 2005; WINTERMANTEL, 2010).

Gênero *Ipomovirus* (Família *Potyviridae*): A transmissão ocorre de forma semi-persistente, porém a eficiência na transmissão pela mosca branca, mostrou-se baixa (abaixo de 50%). E em relação as proteínas envolvidas na transmissão, sabe-se apenas do envolvimento da proteína do capsídeo para que esse processo ocorra (MARUTHI et al., 2005).

Gênero *Torradovirus* (Família: *Secoviridae*): Por ser um gênero novo, a maioria dos estudos em relação aos seus membros são sobre a caracterização do genoma viral. Sendo assim, ainda não se tem informação a respeito do modo de transmissão (AMARI et al., 2008; POLSTON et al., 2014).

As relações entre os vírus, os vetores e as plantas hospedeiras, podem variar em benéficas, neutras ou antagônicas, dependendo das espécies

envolvidas. E estas relações podem afetar o processo de invasão e o deslocamento de espécies indígenas por invasoras, quando essas ocorrem no mesmo nicho, porém diferem nas interações (JIU et al., 2007). É comum observar trabalhos que mencionem a relação entre a mosca branca e a emergência de determinado vírus, em determinado local, devido ao vetor ser facilmente dispersado e apresentar um grande número de plantas hospedeiras. Porém, não se tem muitos estudos onde são mostrados os efeitos que os vírus causam no ciclo de vida da mosca branca e nem os efeitos que as plantas hospedeiras causam nesse inseto. Por isso, em trabalho realizado por Jiu (2007), foi comparada a performance das moscas brancas: biótipo B invasivo e da espécie indígena (ZHJ1) em plantas de tabaco saudáveis e infectadas pelos begomovírus *Tobacco curly shoot virus* (TbSCV) e *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV). Nesse estudo, observou-se que o biótipo B atingiu uma taxa de reprodução muito maior em plantas infectadas por ambos os vírus, do que a espécie indígena. No entanto a mosca branca só teve seu comportamento melhorado quando se alimentou de plantas infectadas com os vírus, uma vez que quando observado o desempenho do vetor e a presença do vírus em seu corpo, esse foi limitado. Assim, nesse trabalho o autor sugere que o mutualismo existente entre o biótipo B e os vírus e a falta desse relacionamento entre a espécie indígena e os patógenos, pode ter contribuído para a invasão do biótipo B na China e também para a emergência desses vírus.

3 CAPÍTULO 1: Distribuição de espécies do complexo *Bemisia tabaci* no Rio Grande do Sul

3.1 Introdução

A mosca branca, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), é um inseto que se alimenta do floema das plantas, principalmente espécies herbáceas. Os danos causados por *B. tabaci* podem ser de dois tipos: diretamente através da alimentação de estágios imaturos e adultos e da excreção do *honeydew* sobre as folhas e frutos ou indiretamente pela transmissão de vírus de plantas (JONES, 2003). Além de ser responsável pelo aumento considerável de doenças causadas pelos begomovírus nos últimos 20 anos, a mosca branca também é capaz de transmitir outros gêneros de vírus, como por exemplo, *Ipomovirus*, *Crinivirus*, *Carlavirus* e *Torradovirus* (NAVAS-CASTILLO et al., 2011).

Atualmente *B. tabaci* é considerada um complexo de espécies crípticas, contendo no mínimo 36 espécies, distribuídas em 11 grupos (FIRDAUS et al., 2013). As espécies desse complexo são morfologicamente iguais porém diferem em características bioquímicas, fisiológicas, moleculares que podem afetar sua fenologia, especificidade de planta hospedeira e capacidade de transmissão de diferentes espécies de vírus (DE BARRO et al., 2011). Para delimitar os diferentes membros desse complexo, tem sido amplamente utilizada uma ferramenta molecular baseada na amplificação do gene mitocondrial citocromo oxidase I (mtCOI) (DINSDALE et al., 2010).

Dentro desse complexo duas espécies merecem destaque: *Middle East-Asia Minor 1* (MEAM1, biótipo B) e *Mediterranean* (MED, biótipo Q) pois são as mais invasivas e distribuídas mundialmente. A introdução da espécie MEAM1 na América se deu no final da década de 1980 (BELLOWS et al., 1994). Atualmente é a espécie predominante no Brasil encontrando-se distribuída por todo o país (BARBOSA et al., 2014b). Já a espécie MED que foi originalmente descrita na

Grécia como *Aleyrodes tabaci* em 1889 por Gennadius, foi recentemente confirmada através do uso de marcadores moleculares como sendo a espécie *Mediterranean* (TAY et al., 2012). Esta foi relatada recentemente no Brasil, precisamente na cidade de Barra do Quaraí no Rio Grande do Sul (BARBOSA et al., 2014a). A introdução da espécie MED no Brasil merece atenção, pois essa é mais agressiva e apresenta maior resistência a inseticidas, como neonicotinoides e piriproxifen do que a espécie MEAM1, onde os danos causados por ela são considerados maiores do que os causados pela MEAM1 (CROWDER et al., 2007; MCKENZIE et al., 2012; CUTHBERTSON & VÄNNINEN, 2015). Vale ainda mencionar duas espécies indígenas que estão presentes em vários locais do Brasil e da América Latina, a espécie *New World* (NW) e *New World 2* (NW2) (MARUBAYASHI et al., 2013).

Os prejuízos causados pela mosca branca englobam desde a diminuição no rendimento de cultivos até o aumento nos custos de produção, devido ao uso de inseticidas (VIEIRA et al. 2011). Na cultura da soja, por exemplo, ocorre o escurecimento da folha pela formação da fumagina, reduzindo as taxas de fotossíntese e causando murcha e queda das folhas, antecipando o ciclo da cultura e resultando na queda da produtividade. As perdas de produtividade podem chegar a 100% conforme os níveis populacionais da mosca branca (EMBRAPA SOJA, 2008).

Após a descoberta da presença da espécie MED no Rio Grande do Sul em 2014, tornou-se necessário acompanhar o comportamento da mosca branca (*B. tabaci*) em relação a sua distribuição geográfica. O objetivo desse trabalho foi avaliar a distribuição das espécies do complexo *B. tabaci* no estado do Rio Grande do Sul, bem como monitorar a distribuição da espécie MED.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Coleta das moscas brancas

Nos meses de Novembro de 2015 e Março de 2016, foram coletados em 11 municípios do Estado do Rio Grande do Sul, espécimes adultos de mosca branca (*B. tabaci*). A escolha dos municípios se deu em relação a sua localização

e importância na produção de culturas hortícolas no estado, as regiões abrangidas foram: Fronteira Oeste (Barra do Quaraí), Região Sul (Capão do Leão e Canguçu), Vale do Caí (Feliz e Bom Princípio), Vale do Taquari (Lajeado e Cruzeiro do Sul) e Serra (Flores da Cunha, São Marcos, Caxias do Sul, Boa Vista do Sul) (figura 4). Cada uma dessas cidades compôs uma amostra, sendo que cada amostra constituiu-se de 10 indivíduos adultos. O local de coleta, planta hospedeira e coordenadas geográficas estão listados na tabela 3.

As moscas brancas foram coletadas aleatoriamente, totalizando 240 indivíduos. Foram utilizados microtubos de 1,5 mL contendo álcool 70%. Para a captura das moscas brancas os microtubos foram colocados próximos as folhas onde essas estavam localizadas e com apenas algumas batidas realizou-se a coleta. Após, os microtubos foram armazenados e estocados a -20°C até as amostras serem analisadas.



Figura 4 – Municípios onde foram realizadas as coletas. Onde: CL: Capão do Leão; CAN: Canguçu; BQ: Barra do Quaraí; CRS: Cruzeiro do Sul; BP: Bom Princípio; FE: Feliz; LAJ: Lajeado; BVS: Boa Vista do Sul; CXS: Caxias do Sul; SM: São Marcos; FC: Flores da Cunha.

Tabela 2 - Localidades, coordenadas, tipo de ambiente e hospedeiro onde as amostras de mosca branca foram coletadas.

| Local | Coordenadas | Tipo de Ambiente | Hospedeiro | Código da amostra |
|------------------|------------------------------|------------------|---|-------------------|
| Barra do Quaraí | S 30°12'18.6''W 57°32'14.7'' | A.F.* | <i>Capsicum annuum</i> | 020 |
| Barra do Quaraí | S 30°07'13.1''W 57°20'40.0'' | A.F. | <i>C. annuum</i> | 030 |
| Barra do Quaraí | S 30°06'47.4''W 57°20'23.2'' | A.F. | <i>Solanum lycopersicum</i> | 035 |
| Capão do Leão | - | A.F. | <i>Phaseolus vulgaris</i> | 032 |
| Feliz | S 29°29'03.0''W 51°18'23.0'' | A.F. | <i>S. lycopersicum</i> | 038 |
| Feliz | S 29°29'03.0''W 51°18'23.0'' | A.F. | <i>Cucumis sativus</i> | 039 |
| Feliz | S 29°29'38.5''W 51°19'02.0'' | A.F. | <i>C. sativus</i> , <i>S. lycopersicum</i> | 040 |
| Lajeado | S 29°27'29.6''W 52°00'59.3'' | A.F. | <i>Bidens</i> sp., <i>Sonchus oleraceus</i> | 041 |
| Cruzeiro do Sul | S 29°30'53.6''W 52°01'08.8'' | A.A. | <i>Glycine max</i> | 043 |
| Cruzeiro do Sul | S 29°32'57.4''W 52°03'34.3'' | A.A. | <i>P. vulgaris</i> , <i>S. oleraceus</i> | 044 |
| Cruzeiro do Sul | S 29°32'23.7''W 52°00'22.3'' | A.A. | <i>Bidens</i> sp., <i>Sida rhombifolia</i> | 045 |
| Flores da Cunha | S 28°57'46.2''W 51°10'56.8'' | A.F. | <i>S. lycopersicum</i> , <i>Ipomoea</i> sp. | 046 |
| Flores da Cunha | S 28°57'46.2''W 51°10'56.8'' | A.F. | <i>Bidens</i> sp. | 047 |
| São Marcos | S 28°56'10.3''W 51°08'00.2'' | A.F. | <i>S. lycopersicum</i> , <i>Ipomoea</i> sp. | 048 |
| Caxias do Sul | S 29°02'30.8''W 51°02'20.0'' | A.F. | <i>Bidens</i> sp., <i>Euphorbia heterophylla</i> | 049 |
| Caxias do Sul | S 29°19'53.1''W 51°11'14.4'' | A.F. | <i>S. lycopersicum</i> | 050 |
| Boa Vista do Sul | S 29°20'04.4''W 51°40'42.4'' | A.F. | <i>S. lycopersicum</i> | 051 |
| Boa Vista do Sul | S 29°18'35.5''W 51°38'15.8'' | A.F. | <i>S. lycopersicum</i> | 052 |
| Bom Princípio | S 29°30'49.5''W 51°20'38.3'' | A.F. | <i>Cucumis sativus</i> | 053 |
| Canguçu | - | A.A.* | <i>Ipomoea</i> sp. | 031 |
| Canguçu | - | A.A. | <i>Solanum americanum</i> , <i>S. lycopersicum</i> | 054 |
| Canguçu | S 31°29'17.0''W 52°32'31.3'' | A.A. | <i>S. oleraceus</i> , <i>S. lycopersicum</i> | 055 |
| Canguçu | S 31°28'53.7''W 52°33'45.8'' | A.A. | <i>Bidens</i> sp., <i>S. lycopersicum</i> | 056 |
| Canguçu | S 31°28'01.0''W 52°33'24.2'' | A.A. | <i>S. rhombifolia</i> , <i>S. lycopersicum</i> | 057 |

*A.F.: Ambiente Fechado

*A.A.: Ambiente Aberto

3.2.2 Extração de DNA e amplificação do gene mtCOI

A extração de DNA total foi feita individualmente para cada adulto coletado, a partir de uma amostra de 10 indivíduos de cada local de coleta, utilizando o método chelex modificado (WALSH et al., 1991). Chelex 100 é uma resina quelante que possui uma elevada afinidade por íons metálicos polivalentes. Essa resina é composta de copolímeros de estireno divinilbenzeno contendo íons iminodiacetato emparelhados, que atuam como grupos quelantes (WALSH et al., 1991). Cada adulto foi macerado em 50 µl da solução de Chelex a 5% em um microtubo de 1,5 mL. Foi submetido a agitação por alguns segundos e incubado a 56°C por 15 minutos, novamente foi submetido a agitação por alguns segundos e novamente incubado a 99°C por 8 min. Após, foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 min. O DNA foi utilizado como molde para amplificação por PCR.

A fim de verificar a espécie de mosca branca, primeiramente foi feito um *screening* para identificação da espécie *B. tabaci*. Para isso todas as amostras de DNA foram submetidas à amplificação por PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores C1-J-2195-FW (5' TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT 3') e TL2-N-3014-RV (5' TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA 3') (SIMON et al., 1994), os quais amplificam um fragmento de aproximadamente 800 pb do gene mitocondrial citocromo oxidase I (mtCOI). Foram incubadas em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial 94°C por 5 min; 34 ciclos: desnaturação 94°C por 30 s, anelamento 45°C por 45 s, extensão 72°C por 1 min; e uma extensão final de 72°C por 10 min. Em seguida, a reação de PCR foi corrida em gel de agarose a 1% e realizada a observação dos fragmentos em transluminador UV.

3.2.3 Análise de restrição para diferenciação entre as espécies MED, MEAM1 e NW

As amostras positivas na PCR, as quais amplificaram o fragmento do gene mtCOI (800 pb), foram submetidas a análise de restrição para identificação das espécies pertencentes ao complexo de espécies *B. tabaci* (MED, MEAM1, NW) utilizando a enzima de restrição *TaqI*. Para a reação foram utilizados: 7,7 µl de água; 2,0 µl do tampão da enzima; 0,3 µl da enzima *TaqI*; 6,5 µl de PCR e foram

incubadas por 2 h a 65°C. Para essa digestão, também foram utilizados controles positivos para as espécies MEAM1 e NW. Após a digestão, os fragmentos foram observados em gel de agarose 1,5% e transluminador UV. A fim de obter uma prévia diferenciação dos padrões para posterior comparação, uma análise de restrição online (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) foi realizada, utilizando sequências das três espécies já identificadas. As amostras que apresentaram um padrão de restrição compatível com a espécie MED, tiveram o PCR purificado com o Kit illustra GFX PCR DNA; GE Healthcare Life Sciences, de acordo com as instruções do fabricante e enviado para sequenciamento na empresa Helixxa, (Paulínia, São Paulo). As sequências utilizadas para construção da árvore filogenética estão listadas na tabela 4. Essas foram alinhadas utilizando o programa ClustalW (v. 1.6) em MEGA 6.06. A árvore filogenética foi construída pelo método *Neighbour-Joining* usando o software MEGA 6.06 com 1000 repetições de *bootstrap*.

Tabela 3 - Sequências parciais do gene mitocondrial citocromo oxidase I de moscas brancas da espécie MED utilizadas na análise filogenética.

| Espécie | Nº de acesso GenBank | Hospedeiro | Local |
|------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------|
| MED | JF304725 | <i>Cucumis melo</i> | Argentina |
| MED | JF304724 | <i>Capsicum annuum</i> | Uruguai |
| MED | HQ231408 | <i>Solanum lycopersicum</i> | Costa Rica |
| MED | KF991612 | <i>C. annuum</i> | Brasil |
| MED | KF991614 | <i>Ipomoea batatas</i> | Brasil |
| MED | KF991613 | <i>I. batatas</i> | Brasil |
| MED | KF991611 | <i>C. annuum</i> | Brasil |
| MED | KF991610 | <i>C. annuum</i> | Brasil |
| MED | EU192061 | <i>S. lycopersicum</i> | China |
| MED | AB297898 | <i>Solanum tuberosum</i> | Síria |
| MED | DQ302946 | - | Espanha |
| MED | HQ198750 | <i>Euphorbia pulcherrima</i> | EUA |
| MED | FN557470 | <i>S. lycopersicum</i> | Israel |
| MED* | KY485205 | <i>Cucumis sativus</i> | Brasil |
| MED* | KY485206 | <i>C. sativus</i> | Brasil |
| MED* | KY485207 | <i>C. annuum</i> | Brasil |
| MED* | KY485208 | <i>C. annuum</i> | Brasil |
| MED* | KY485209 | <i>C. annuum</i> | Brasil |
| MED* | KY485210 | <i>C. annuum</i> | Brasil |
| MED* | KY485211 | <i>C. annuum</i> | Brasil |
| MED* | KY485212 | <i>C. annuum</i> | Brasil |
| <i>Aleurocanthus camelliae</i> | AB536794 | <i>Camellia sinensis</i> | Japão |

*Sequências obtidas nesse trabalho.

3.3 Resultados e Discussão

A partir do *screening* dos 240 indivíduos adultos analisados, 51 (21%) indivíduos apresentaram resultado positivo para *B. tabaci*, pela amplificação de um fragmento de aproximadamente 800 pb. Na tabela 5 estão apresentadas todas as amostras positivas e suas respectivas localidades. Ao levar em consideração o número de amostras positivas, 37% delas foram encontradas nos municípios de Feliz, 2% em Lajeado, 33% em Cruzeiro do Sul, 6% em Caxias do Sul, 10% em Bom Princípio e 12% em Barra do Quaraí (figura 5). Dentro da família Aleyrodidae são conhecidas mais de 1556 espécies, subdivididas em três

subfamílias Aleurodicinae, Aleyrodinae e Udamoselinae (FORERO, 2008). Portanto, é possível que os outros 79% dos indivíduos que não apresentaram resultado positivo para *B. tabaci*, pertençam a outra espécie da família Aleyrodidae, como por exemplo, a espécie *Trialeurodes vaporariorum*, pois em trabalho recente realizado no Rio Grande do Sul, foi a espécie de mosca branca predominante nas cidades de Caxias do Sul, Santa Maria e Pelotas (BARBOSA et al., 2014b).

Tabela 4 - Local, coordenadas, identificação e quantidade das amostras que apresentaram resultado positivo para *Bemisia tabaci*.

| Local | Coordenadas | % de indivíduos |
|-----------------|----------------------------|-----------------|
| Feliz | S 29°29'03.0"W 51°18'23.0" | 90% |
| Feliz | S 29°29'03.0"W 51°18'23.0" | 30% |
| Feliz | S 29°29'38.5"W 51°19'02.0" | 70% |
| Lajeado | S 29°27'29.6"W 52°00'59.3" | 10% |
| Cruzeiro do Sul | S 29°30'53.6"W 52°01'08.8" | 60% |
| Cruzeiro do Sul | S 29°32'57.4"W 52°03'34.3" | 10% |
| Cruzeiro do Sul | S 29°32'23.7"W 52°00'22.3" | 100% |
| Caxias do Sul | S 29°19'53.1"W 51°11'14.4" | 30% |
| Bom Princípio | S 29°30'49.5"W 51°20'38.3" | 50% |
| Barra do Quaraí | S 30°12'18.6"W 57°32'14.7" | 10% |
| Barra do Quaraí | S 30°07'13.1"W 57°20'40.0" | 50% |

*% de indivíduos: Quantidade de indivíduos dentro de uma amostra de 10 adultos analisados que apresentaram resultado positivo.

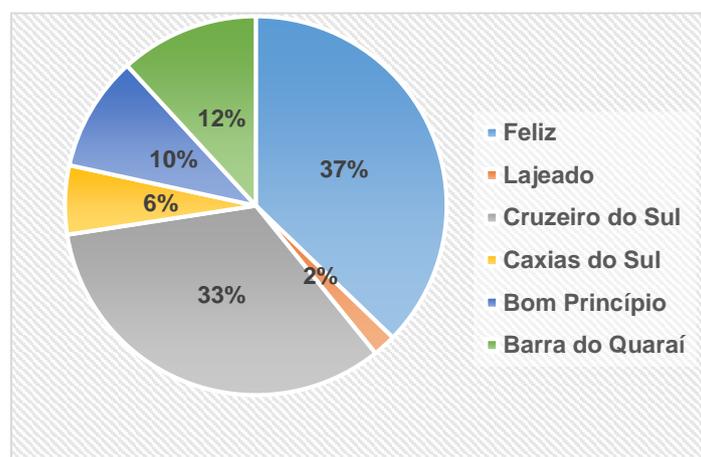


Figura 5 - Percentagem de amostras positivas para *Bemisia tabaci* e suas respectivas cidades.

Para identificação das espécies do complexo *B. tabaci* (MED, MEAM1, NW), foi feita análise de restrição para os 51 indivíduos que apresentaram resultado positivo. A análise de restrição online feita com sequências de cada uma das espécies: MED, MEAM1 e NW mostrou um padrão diferente para cada

uma (anexos A, B e C). Para a espécie MED as bandas apresentaram um tamanho aproximado de 650 pb e 150 pb. Já a espécie MEAM1 apresentou três bandas com tamanhos diferentes 150 pb, 200 pb e 450 pb e a espécie NW apresentou duas bandas com tamanhos de 450 e 430 pb. Quando comparado esses padrões com as digestões feitas em laboratório e com os controles positivos das espécies NW e MEAM1, é possível observar a semelhança entre o padrão e o tamanho das bandas (figura 6- A, B e C) sendo realizada então a identificação das espécies do complexo *B. tabaci*.

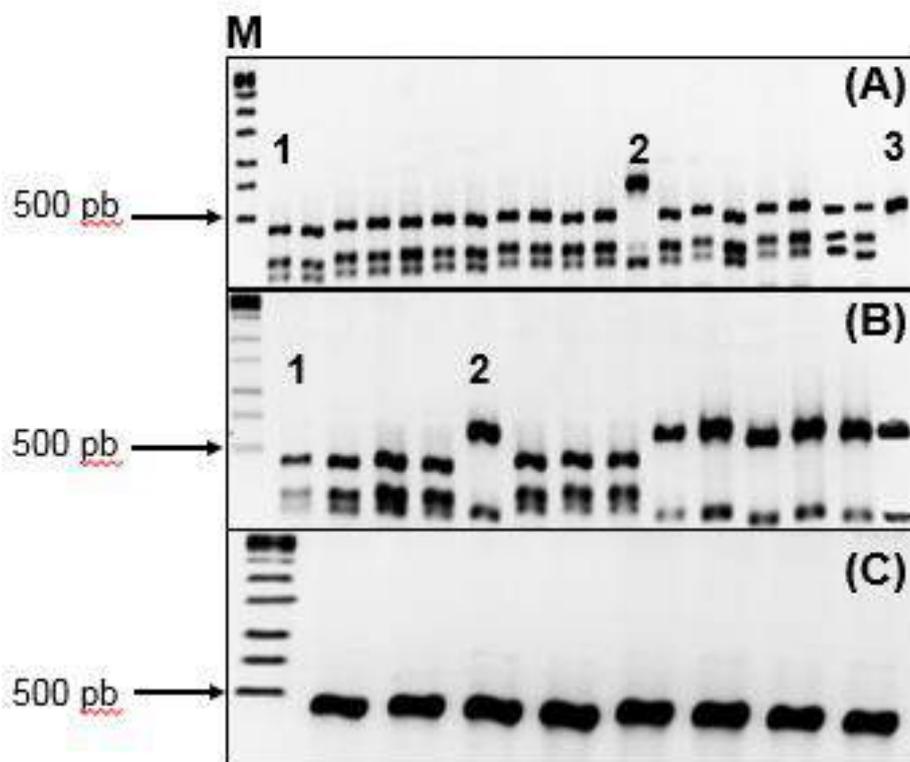


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose apresentando diferentes padrões de restrição. (A) Padrão de restrição das espécies: 1 – *Middle East-Asia Minor 1*; 2 - *Mediterranean* e 3 – *New World*. (B) Padrão de restrição das espécies: 1 – *Middle East-Asia Minor 1* e 2 – *Mediterranean*. (C): Padrão de restrição da espécie *New World*. M: Marcador 1Kb DNA ladder (Invitrogen).

Dos 51 indivíduos analisados através da digestão, 25 são pertencentes a espécie MEAM1, sendo essa a espécie mais distribuída entre os locais de coleta, seguida da espécie NW com 18 indivíduos identificados e por último 8 indivíduos identificados como a espécie MED (figura 7).

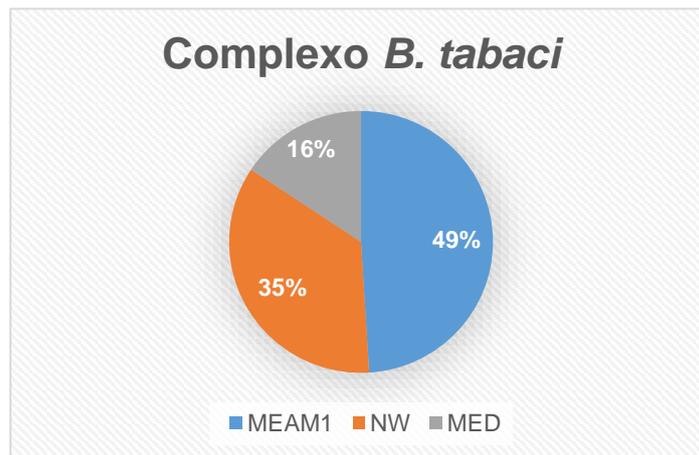


Figura 7 - Percentagem de ocorrência das espécies do complexo *Bemisia tabaci* nos locais de coleta.

A detecção da espécie NW ocorreu nas cidades de Lajeado em plantas dentro de casa de vegetação e em Cruzeiro do Sul em campo aberto (figura 8A). Nos dois locais ela foi encontrada colonizando principalmente plantas daninhas como: *Bidens* sp, *Sonchus oleraceus* e *Sida rhombifolia*. Esses dados são semelhantes aos obtidos por Marubayashi (2013), onde as espécies indígenas NW e NW2 também foram encontradas preferencialmente colonizando plantas daninhas. Vale destacar que na cidade de Cruzeiro do Sul, estas espécies também foram encontradas colonizando soja e feijão. No Rio Grande do Sul, não há trabalhos relatando a presença da espécie NW em ambas as culturas, porém em outros estados como Goiás, Mato Grosso e Ceará já foi relatada a presença em feijão e em Mato Grosso e no Distrito Federal a presença em soja (LIMA et al., 2000).

A espécie MEAM1 foi encontrada em casa de vegetação nas cidades de Bom Princípio, Caxias do Sul e Feliz (figura 8B). Foi coletada a partir de plantas como: tomate, pepino, *Bidens* sp e *Euphorbia heterophylla*. MEAM1 foi a que apresentou o maior número de indivíduos identificados, mostrando ser a espécie predominante. Em estudos feitos em outros estados, MEAM1 também apresentou ampla distribuição tanto em plantas daninhas como em plantas cultivadas (MARUBAYASHI et al., 2013). A predominância da espécie MEAM1 também é observada em outros países da América Latina, pois a sua invasão teria deslocado as populações indígenas da mosca branca (NW e NW2)

(BARBOSA et al., 2014b). No entanto, a existência das espécies indígenas de forma significativa em alguns locais se deve ao fato das adaptações que essas sofreram, a fim de não competir pelos hospedeiros preferidos de MEAM1 (BARBOSA et al., 2014b). Um exemplo pode ser citado, como o que ocorre na cultura do tomateiro, onde a colonização por populações da espécie MEAM1 é eficiente apresentando um grande número de ninfas e ovos, já as espécies indígenas não apresentam essa eficiência, não sendo o tomate um hospedeiro preferencial (HILJE & MORALES, 2008).

Neste trabalho, por exemplo, a espécie MEAM1 foi a predominante com 49% de ocorrência no estado do RS, distribuída em três cidades diferentes. No entanto a presença da espécie indígena foi dominante em duas cidades e sua porcentagem de ocorrência ficou 14% abaixo da MEAM1. Conforme mencionado anteriormente, esse fato pode ser devido as adaptações sofridas pela espécie indígena em relação aos seus hospedeiros a fim de evitar a competição com a MEAM1. Pois, exceto para *Bidens* sp. onde foram encontradas as duas espécies, porém em locais diferentes, os outros hospedeiros foram diferentes entre elas.

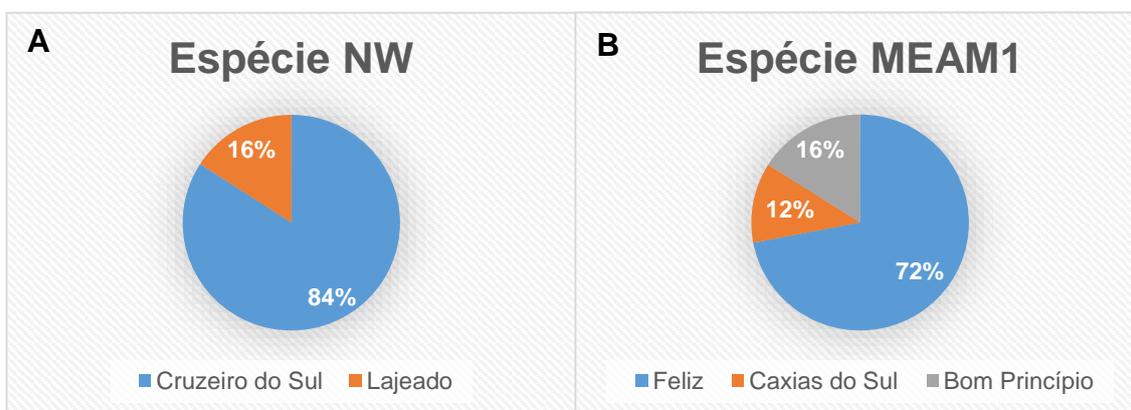


Figura 8 - Percentagem de ocorrência das espécies *New World* (NW) (A) e *Middle East-Asia Minor 1* (MEAM1) (B) e as respectivas cidades.

A presença da espécie MED foi observada em casa de vegetação nas cidades de Barra do Quaraí, Feliz e Bom Princípio (figura 9). Em Feliz e Bom Princípio, as coletas foram feitas em plantas de pepino e em Barra do Quaraí foram coletadas em plantas de pimentão. O primeiro relato da espécie MED no Brasil, ocorreu em 2014, onde ela foi encontrada na cidade de Barra do Quaraí (BARBOSA et al., 2014a). Atualmente, MED é a espécie mais agressiva do

complexo *B. tabaci*, pois além de apresentar resistência a maioria dos inseticidas utilizados no seu controle, tem mostrado uma maior capacidade de invasão, podendo deslocar populações da espécie MEAM1 (HOROWITZ et al., 2005; CHU et al., 2010).

Em relação a distribuição da espécie MED no estado, é possível observar que a concentração da população é maior na cidade de Barra do Quaraí, onde foi encontrada pela primeira vez. Isso pode ser devido a localização da cidade, a qual faz fronteira com países como Uruguai e Argentina onde a espécie encontra-se presente desde 2011 (GRILLE et al., 2011).

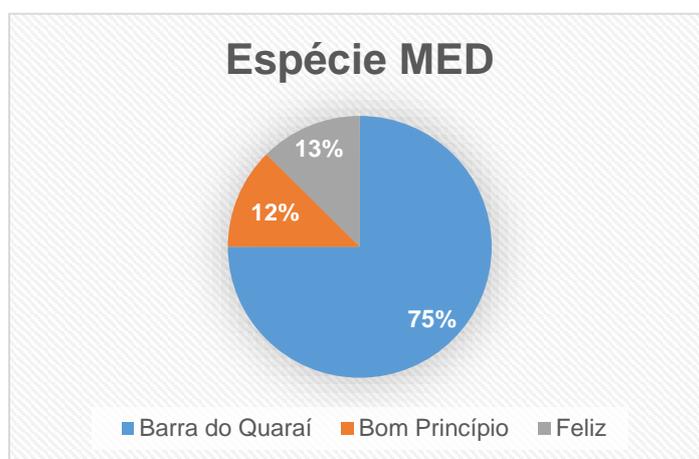


Figura 9 - Percentagem de ocorrência da espécie *Mediterranean* (MED) e as cidades onde foi encontrada.

A ocorrência da espécie MED até o momento não tinha sido relatada em outras regiões do Rio Grande do Sul, que não na cidade Barra do Quaraí. Porém o número de indivíduos encontrados foi baixo e a presença se deu em apenas duas cidades onde a espécie MEAM1 foi predominante (figura 10), diferente do encontrado na cidade de Barra do Quaraí, onde foi verificada apenas a presença da espécie MED. Sendo assim é possível que esses indivíduos tenham sido introduzidos nesses locais através de mudas oriundas de outras regiões do país ou até mesmo importadas.

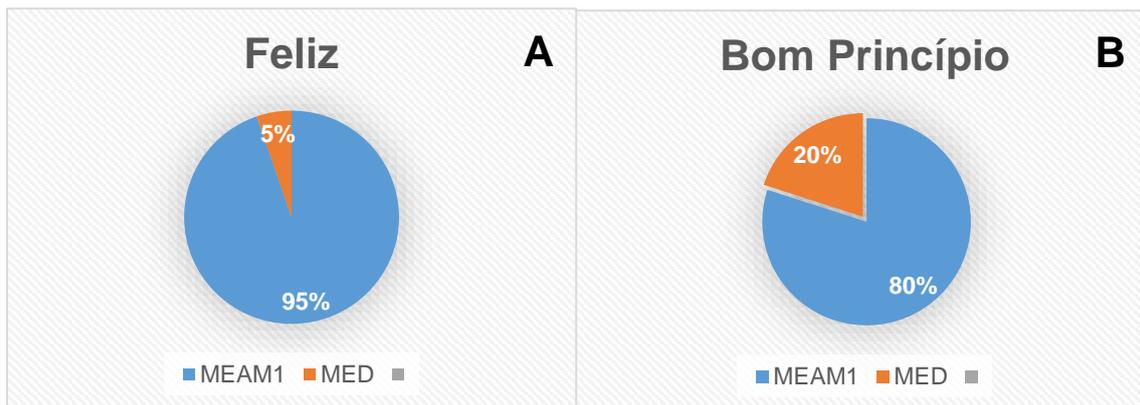


Figura 10 - Percentagem de ocorrência das espécies *Middle East-Asia Minor 1* (MEAM1) e *Mediterranean* (MED). (A) Cidade de Feliz; (B) Cidade de Bom Princípio.

Outro fato que pode contribuir para a população da espécie MED ainda ser baixa e não encontrar-se distribuída em todo o estado são as condições climáticas exigidas para o seu desenvolvimento. Pois regimes de temperatura e chuva são os principais fatores ambientais que afetam a dinâmica de *B. tabaci* (HILJE & MORALES, 2008). Em trabalho feito por Bonato (2007), a menor temperatura observada para o desenvolvimento de *B. tabaci* espécie MED foi de 17°C, sendo 10.2°C o menor limiar térmico para desenvolvimento. Sendo assim, a população de mosca branca diminui muito durante o inverno do Rio Grande do Sul e sua sobrevivência só é possível caso ela encontre locais abrigados com temperaturas amenas.

Para entender melhor a distribuição de MED no Estado, uma análise filogenética com as sequências obtidas neste trabalho e com sequências de outras regiões do mundo, demonstrou uma divisão da espécie MED (figura 11). No grupo 1 estão os indivíduos encontrados na cidade de Barra do Quaraí (KY485207, KY485208, KY485209, KY485210, KY485211, KY485212), esses estão intimamente relacionados com os indivíduos coletados no mesmo local, porém em 2014, além dos encontrados no Uruguai e Argentina. Esse agrupamento sugere que a entrada da espécie MED no Rio Grande do Sul, possa ter sido a partir destes países e isso pode estar relacionado com a localização da cidade de Barra do Quaraí, a qual faz fronteira com os dois países. No grupo 2, estão os indivíduos coletados nas cidades de Bom Princípio e Feliz (KY485205 e KY485206) que agruparam com espécimes de países como Síria

e Israel. Os dois grupos estão relacionados, porém, observando a distância entre os espécimes encontrados nas cidades de Barra do Quaraí e Bom Princípio e Feliz, pode-se dizer que é mais provável que não tenha havido uma dispersão para esses locais a partir de Barra do Quaraí e sim que esses indivíduos foram introduzidos a partir de outros países ou outros locais do país por meio de material vegetal já contendo a mosca branca.

Em relação a mosca branca no Rio Grande do Sul, mais estudos devem ser realizados levando em consideração o seu comportamento e a distribuição geográfica das espécies do complexo *B. tabaci*, principalmente a espécie MED. Em adição a isso, é de extrema importância saber qual a espécie está ocorrendo em determinado local, para que as estratégias de controle adotadas sejam eficientes e os prejuízos causados pela mosca branca sejam minimizados.

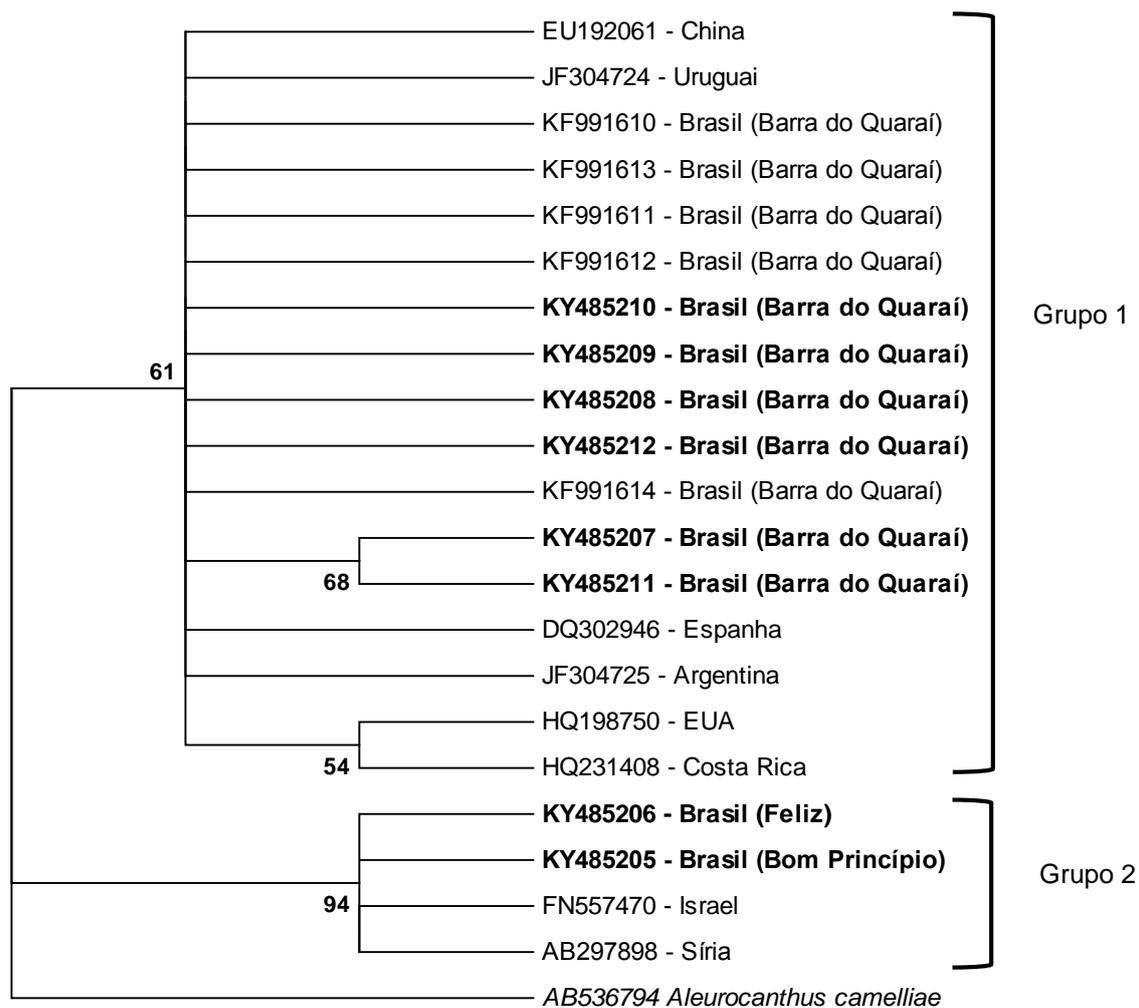


Figura 13 - Análise filogenética do gene mtCOI parcial utilizando o método *neighbour-joining* em análise *bootstrap* com 1000 repetições com o programa MEGA 6.06. Sequências representativas de MED foram incluídas e *Aleurocanthus camelliae* foi utilizada como grupo externo. O país de origem e o número de acesso no GenBank estão indicados para cada sequência e as sequências relatadas nesse trabalho estão em negrito.

3.4 Conclusões

No estado do Rio Grande do Sul foram encontradas três espécies do complexo *B. tabaci*: Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), Mediterranean (MED) e New World (NW).

A espécie MEAM1 foi predominante no estado, encontrada nas cidades de Bom Princípio, Caxias do Sul e Feliz.

Seguida da espécie NW, encontrada nas cidades de Cruzeiro do Sul e Lajeado. A espécie MED ocorre em menor percentagem que as outras e foi encontrada nas cidades de Barra do Quaraí, Bom Princípio e Feliz.

4 CAPÍTULO II: Primeiro relato de um begomovírus associado ao pepino

4.1 Introdução

O pepino (*Cucumis sativus* L.) é uma hortaliça pertencente à família *Cucurbitaceae*, uma planta de origem Asiática, com boa adaptação e produção tanto em ambiente protegido, como no campo (FONTES & PUIATTI 2005). No Brasil é um fruto bastante apreciado e consumido na forma de fruto imaturo, em saladas, dentre outras, fato pelo qual a sua importância tem crescido na comercialização de hortaliças (CARDOSO & SILVA 2003).

As viroses estão entre as principais doenças que afetam as cucurbitáceas e quando ocorrem no estágio inicial de desenvolvimento das plantas, acarretam perdas na produção e afetam a qualidade dos frutos (LIMA et al., 2011). A incidência e severidade dessas doenças variam segundo a interação patógeno, hospedeiro, vetor e meio ambiente (PROVVIDENTI, 1996).

Dentre os vírus que acometem as cucurbitáceas, no Brasil, os potivírus merecem destaque com três espécies importantes: *Papaya ringspot virus* – type watermelon (PRSV-W), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e *Watermelon mosaic virus* (WMV) (LIMA et al., 2011). Além dos potivírus, outros grupos de vírus podem ocorrer, por exemplo os begomovírus. Cinco begomovírus bipartidos que infectam cucurbitáceas já foram reconhecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV): *Squash leaf curl virus* (SLCV), *Squash mild leaf curl virus* (SMLCV), *Cucurbit leaf crumple virus* (CuLCrV), *Melon chlorotic leaf curl virus* (MCLCuV) e *Melon chlorotic mosaic virus* (MeCMV) (ROMAY et al., 2015). Porém, até o momento, no Brasil, não se tem relato da ocorrência de begomovírus na cultura do pepino.

O gênero *Begomovirus* possui o maior número de espécies dentro da família *Geminiviridae* (322 de 362 espécies totais) (ICTV, 2017). Apresenta o

genoma de DNA circular, fita simples, podendo ser monopartido ou bipartido, com dois componentes genômicos conhecidos como DNA-A e DNA-B (BROWN et al., 2012). Nos últimos anos houve um aumento considerável no número de doenças causadas por begomovírus, fato que pode ter sido impulsionado pelo seu vetor *Bemisia tabaci*, especialmente pela espécie MEAM1 (biótipo B), que é altamente polífaga e se encontra distribuída por todo o mundo (GILBERTSON et al., 2015).

No estudo realizado de coleta e identificação das espécies de *B. tabaci*, plantas cultivadas e daninhas, que estavam associadas a esta praga também foram coletadas. Um estudo de diagnóstico foi realizado buscando verificar a presença de begomovírus. Devido a alta incidência desse grupo de vírus em culturas hortícolas e a alta eficiência na sua transmissão pela mosca branca, o objetivo deste estudo foi diagnosticar e caracterizar molecularmente um isolado de begomovírus encontrado em pepino no estado do Rio Grande do Sul.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Coletas das amostras e extração de DNA total

Nos meses de Novembro de 2015 e Março de 2016, foram coletadas aleatoriamente em 11 municípios do Rio Grande do Sul, folhas de plantas cultivadas e daninhas, a fim de diagnosticar a presença de begomovírus, totalizando 35 amostras (tabela 5).

O DNA total dessas amostras foi extraído a partir de um disco foliar retirado de cada uma das folhas e realizado segundo protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987).

4.2.2 Detecção por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

O DNA total das amostras foi submetido à amplificação por PCR utilizando primers universais para detecção do DNA-A de begomovírus pAR1c496 (5'-AATACTGCAGGGCTTYCTRTRACATRGG-3') e pAL1v1978 (5'-GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT-3') (ROJAS et al., 1993). Um fragmento de aproximadamente 1,1 Kb do DNA-A, compreendendo a região

comum e as extremidades amino-terminal dos genes *Rep* e *Cp* foi obtido. O produto foi visualizado em gel de agarose 1% e transluminador UV.

Tabela 5 - Localidades, coordenadas, tipo de ambiente e espécies de plantas coletadas.

| Local | Coordenadas | Tipo de Ambiente | Hospedeiro |
|------------------|------------------------------|------------------|---|
| Barra do Quaraí | S 30°12'18.6''W 57°32'14.7'' | A.F.* | <i>Capsicum annuum</i> |
| Barra do Quaraí | S 30°07'13.1''W 57°20'40.0'' | A.F. | <i>C. annuum</i> |
| Barra do Quaraí | S 30°06'47.4''W 57°20'23.2'' | A.F. | <i>Solanum lycopersicum</i> |
| Canguçu | - | A.A.* | <i>Ipomoea</i> sp. |
| Capão do Leão | - | A.F. | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| Feliz | S 29°29'03.0''W 51°18'23.0'' | A.F. | <i>S. lycopersicum</i> |
| Feliz | S 29°29'03.0''W 51°18'23.0'' | A.F. | <i>Cucumis sativus</i> |
| Feliz | S 29°29'38.5''W 51°19'02.0'' | A.F. | <i>C. sativus</i> <i>S. lycopersicum</i> |
| Lajeado | S 29°27'29.6''W 52°00'59.3'' | A.F. | <i>Bidens</i> sp., <i>Sonchus oleraceus</i> |
| Cruzeiro do Sul | S 29°30'53.6''W 52°01'08.8'' | A.A. | <i>Glycine max</i> |
| Cruzeiro do Sul | S 29°32'57.4''W 52°03'34.3'' | A.A. | <i>P. vulgaris</i> , <i>S. oleraceus</i> |
| Cruzeiro do Sul | S 29°32'23.7''W 52°00'22.3'' | A.A. | <i>Bidens</i> sp., <i>Sida rhombifolia</i> |
| Flores da Cunha | S 28°57'46.2''W 51°10'56.8'' | A.F. | <i>S. lycopersicum</i> , <i>Ipomoea</i> sp. |
| Flores da Cunha | S 28°57'46.2''W 51°10'56.8'' | A.F. | <i>Bidens</i> sp. |
| São Marcos | S 28°56'10.3''W 51°08'00.2'' | A.F. | <i>S. lycopersicum</i> , <i>Ipomoea</i> sp. |
| Caxias do Sul | S 29°02'30.8''W 51°02'20.0'' | A.F. | <i>Bidens</i> sp, <i>Euphorbia heterophylla</i> |
| Caxias do Sul | S 29°19'53.1''W 51°11'14.4'' | A.F. | <i>S. lycopersicum</i> |
| Boa Vista do Sul | S 29°20'04.4''W 51°40'42.4'' | A.F. | <i>S. lycopersicum</i> |
| Boa Vista do Sul | S 29°18'35.5''W 51°38'15.8'' | A.F. | <i>S. lycopersicum</i> |
| Bom Princípio | S 29°30'49.5''W 51°20'38.3'' | A.F. | <i>Cucumis sativus</i> |
| Canguçu | - | A.A. | <i>Solanum americanum</i> , <i>S. lycopersicum</i> |
| Canguçu | S 31°29'17.0''W 52°32'31.3'' | A.A. | <i>S. oleraceus</i> , <i>S. lycopersicum</i> |
| Canguçu | S 31°28'53.7''W 52°33'45.8'' | A.A. | <i>Bidens</i> sp, <i>S. lycopersicum</i> |
| Canguçu | S 31°28'01.0''W 52°33'24.2'' | A.A. | <i>S. rhombifolia</i> , <i>S. lycopersicum</i> |

*A.F.: Ambiente fechado

A.A.: Ambiente aberto

4.2.3 Amplificação por RCA (*Rolling Circle Amplification*) e análise de restrição

Das 35 amostras de plantas coletadas, oito foram utilizadas para prosseguir com a amplificação por RCA. Onde na reação foi usado o DNA total

extraído, juntamente com primers tioprotetidos e com a enzima DNA polimerase do bacteriófago phi29 (NEB Labs), de acordo com as instruções do fabricante (INOUE-NAGATA et al., 2004). A amostra foi incubada em termociclador por 20 horas a 30°C e a 10 min a 65°C para a inativação da enzima ao final da reação. Os fragmentos amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição *Apal*, *BglII*, *Clal*, *EcoRV*, *HindIII*, *NotI*, *PstI*, *SacI*, *XbaI* e *XhoI*. As reações de digestão foram feitas utilizando 6,7 µl de água estéril, 1,0 µl do tampão da enzima, 0,3 µl de enzima e 2,0 µl de RCA e incubadas por 2 h a 37°C. Os produtos das digestões foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% e transluminador UV. Dentre as enzimas utilizadas, *SacI* liberou um fragmento correspondente a uma cópia do genoma de um begomovírus (2.6Kb), somente para a amostra de pepino. Este resultado possibilitou a continuação do trabalho com a clonagem deste fragmento de DNA.

4.2.4 Clonagem e minipreparação plasmidial

O vetor utilizado para clonagem foi o pBluescript KS+ (Stratagene) (pKS). Esse foi digerido com a mesma enzima de restrição utilizada no RCA (*SacI*) e desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina (CIP), conforme recomendação do fabricante. A ligação inserto-vetor ocorreu a 4°C — “overnight” com o uso da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen).

O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação em *Escherichia coli* estirpe DH5α pelo método do choque térmico (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). As células transformadas foram plaqueadas em meio de cultura Lúria Bertani (LB) com o antibiótico ampicilina e incubadas a 37°C — “overnight”. Após a incubação, possíveis colônias recombinantes, de coloração branca, foram transferidas individualmente para microtubos de 1,5 mL, contendo meio LB líquido com ampicilina. Os tubos foram mantidos sob agitação, a 37°C — “overnight”.

Posteriormente a incubação, as amostras foram submetidas à minipreparação de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A presença do inserto de ~2.6Kb, foi confirmada através da

digestão dos plasmídeos com a enzima utilizada na clonagem, para verificação do tamanho esperado do genoma.

4.2.5 Sequenciamento e análise de sequências

O clone selecionado para determinação da sequência nucleotídica foi enviado para sequenciamento na empresa Helixxa (Paulínia, São Paulo). Na primeira rodada do sequenciamento foram utilizados os oligonucleotídeos universais M13 Forward e M13 Reverse. Com o resultado desta primeira rodada de sequenciamento, a sequência obtida foi utilizada para a construção dos primers internos a fim de obter o sequenciamento completo do genoma (tabela 6).

Tabela 7 - Primers utilizados para sequenciamento do clone de begomovírus.

| Primer | Sequência (5' – 3') |
|-------------|-------------------------|
| M13 – FW* | GTAAAACGACGGCCAGT |
| M13 – RV* | GCGGATAACAATTTTCACACAGG |
| PIP2 – FW** | TGAACAGGCCCATGTACAG |
| PIP1- RV** | TGCATCGTGCTTTGCAATCC |

*Primers universais

**Primers desenvolvidos neste trabalho

A sequência obtida foi montada utilizando o programa DNA Baser v.3.5 e analisada pelo algoritmo *Blastn* disponível online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Para determinação das ORFs foi utilizado o algoritmo ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) disponível online.

4.2.6 Análise Filogenética

Após os resultados, com a identificação da sequência clonada, foi realizada uma análise filogenética com a sequência completa de nucleotídeos do DNA-A da amostra encontrada neste estudo e sequências de outros begomovírus relatados no Brasil e em outros países (tabela 7). As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o ClustalW (v. 1.6) em MEGA 6.06. Uma

árvore filogenética foi construída pelo método *Neighbour-Joining* com o software MEGA 6.06.

Tabela 7 - Begomovírus utilizados na análise filogenética. Espécie, número de acesso no GenBank, hospedeiro e local.

| Espécie | Nº GenBank | Hospedeiro | Local |
|---|-------------------|-----------------------------|-------------------|
| ToSRV | FJ824808 | <i>Capsicum annuum</i> | São Paulo |
| ToSRV | JX415197 | <i>Nicandra physaloides</i> | Goiás |
| ToSRV | JX415190 | <i>Crotalaria juncea</i> | Goiás |
| ToSRV | DQ207749 | <i>Capsicum annuum</i> | Goiás |
| ToSRV | JF803263 | <i>Solanum lycopersicum</i> | Distrito Federal |
| ToSRV | KX458238 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Brasil |
| ToSRV-BP * | - | <i>Cucumis sativus</i> | Rio Grande do Sul |
| <i>Squash leaf curl virus</i> (SLCV) | AF256203 | <i>Citrullus lanatus</i> | USA |
| <i>Squash mild leaf curl virus</i> (SMLCV) | DQ285014 | - | USA |
| <i>Melon chlorotic mosaic virus</i> (MeCMV) | HM163576 | <i>Citrullus lanatus</i> | Venezuela |
| <i>Melon chlorotic leaf curl virus</i> (MCLCuV) | AF325497 | <i>Cucumis melo</i> | Guatemala |
| <i>Tomato rugose mosaic virus</i> (ToRMV) | AF291705 | <i>Solanum lycopersicum</i> | Minas Gerais |
| <i>Bean golden mosaic virus</i> (BGMV) | NC_004042 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Brasil |
| <i>Sida micrantha mosaic virus</i> (SimMV) | AJ557451 | <i>Sida micrantha</i> | Brasil |
| <i>Cucurbit leaf crumple virus</i> (CuLCrV) | AF256200 | - | USA |
| <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV) | NC_004005 | <i>Capsicum annuum</i> | Espanha |

*ToSRV-BP – sequência obtida neste estudo.

4.3 Resultados e Discussão

O resultado obtido através da PCR, mostrou que das 35 amostras analisadas sete tiveram resultado positivo, amplificando um fragmento de aproximadamente 1,1 Kb (tabela 8).

Foram realizadas reações de amplificação (RCA), para todas as amostras positivas. No entanto, a amostra de pepino foi a única que, após a análise de restrição liberou um fragmento correspondente a uma cópia do genoma dos begomovírus. Além disso, e mais importante, essa escolha também se baseou no fato de que no Brasil não se tem relato da ocorrência de begomovírus em pepino.

Tabela 8 - Local de coleta, coordenadas e espécies de plantas que apresentaram resultado positivo para begomovírus.

| Local de coleta | Coordenadas | Espécie |
|-----------------|------------------------------|----------|
| Feliz | S 29°29'03.0''W 51°18'23.0'' | Tomate |
| Bom Princípio | S 29°30'49.5''W 51°20'38.3'' | Pepino |
| Feliz | S 29°29'38.5''W 51°19'02.0'' | Tomate |
| Cruzeiro do Sul | S 29°30'53.6''W 52°01'08.8'' | Soja |
| Cruzeiro do Sul | S 29°32'57.4''W 52°03'34.3'' | Feijão |
| Cruzeiro do Sul | S 29°32'23.7''W 52°00'22.3'' | Guanxuma |
| Flores da Cunha | S 28°57'46.2''W 51°10'56.8'' | Ipomea |

A comparação do primeiro resultado do sequenciamento com sequências depositadas no banco de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) revelou 98% de identidade com o DNA-A de um isolado de *Tomato severe rugose virus*, sendo essa uma identificação preliminar. Para confirmar a infecção da planta de pepino por um begomovírus, primers internos foram desenhados, para realização do sequenciamento do genoma completo do vírus. A sequência completa de nucleotídeos (nt) do DNA-A foi então comparada com as contidas no Genbank e apresentou 97% de identidade de nt com um isolado de ToSRV encontrado em tomate, no estado de Goiás (JX415196).

A sequência do DNA-A de ToSRV obtido no trabalho apresentou 2574 nucleotídeos, com uma organização genômica semelhante a outros begomovírus bipartidos. Foi encontrada a sequência de nove nucleotídeos TAATATT↓AC característica da maioria dos geminivírus, onde encontra-se a origem de replicação. Além dessa característica comum, o DNA-A do isolado também apresentou uma ORF no sentido viral, conhecida como AV1 (*Cp*) e quatro ORFs no sentido complementar denominadas AC1 (*Rep*), AC2 (*Trap*), AC3 (*Ren*) e AC4, organização típica dos begomovírus do Novo Mundo os quais apresentam cinco ORFs no DNA-A (ROJAS et al., 2005).

A análise filogenética mostra o agrupamento entre os diferentes isolados de ToSRV, porém é possível observar uma estreita relação entre o isolado encontrado em pepino, deste trabalho, e os isolados de ToSRV encontrados em tomate e feijão, além do vírus *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV). Em relação aos begomovírus encontrados em cucurbitáceas, pode-se observar que houve uma distância entre eles e o isolado encontrado no trabalho, ficando a sequência encontrada nesse estudo mais próxima de outros begomovírus encontrados no Brasil, como SimMV e BGMV (figura 12).

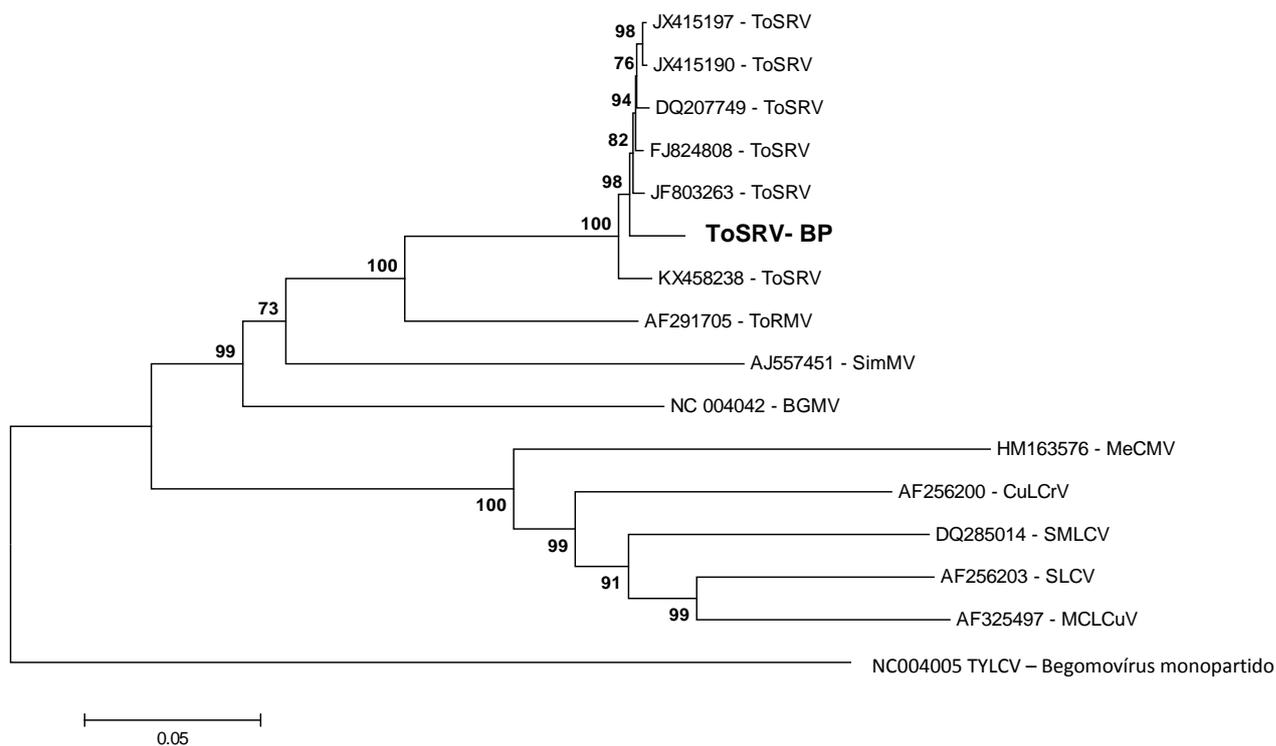


Figura 12 - Análise filogenética com as sequências dos DNA-A de espécies de begomovírus. Utilizando o método *neighbour-joining* em análise *bootstrap* com 1000 repetições com o programa MEGA 6.06. A espécie e o número de acesso no GenBank estão indicados para cada sequência e a sequência encontrada no trabalho encontra-se em negrito.

No Brasil, não há relatos da ocorrência de ToSRV em plantas de pepino. Embora, essa espécie de vírus seja predominante em cultivos de tomate, ela também é capaz de infectar pimentão, batata, tabaco, plantas daninhas e recentemente foi encontrada infectando plantas de feijão (SOUZA-DIAS et al., 2008; BARBOSA et al., 2009; NOZAKI et al., 2010; BARBOSA et al., 2011; Macedo et al., 2016). O fato da amostra coletada não apresentar sintomas de infecção pelo ToSRV, é o mesmo ocorrido em trabalho realizado por Macedo (2016), onde foi diagnosticada a presença desse vírus em plantas de feijão assintomáticas e mesmo 21 dias após a inoculação as plantas de feijão ainda assim não apresentaram sintomas típicos da infecção como: clorose, enrolamento e redução do tamanho das folhas. Sabendo-se da importância que essa espécie apresenta para o cultivo do tomate e que ela pode estar presente em hospedeiros alternativos, mesmo que esses não apresentem sintomas, é preciso ficar atento tanto para o caso do ToSRV vir a causar perdas na cultura

do pepino como também para que essa não se torne um reservatório natural do vírus, prejudicando lavouras de tomate que estejam próximas.

Além disso, sabe-se que para ocorrência de um determinado vírus no campo muitos fatores estão envolvidos, porém segundo trabalho realizado por Macedo (2015) a eficiência de transmissão do ToSRV por *Bemisia tabaci* em plantas de tomate seria o fator principal para a predominância da espécie no campo. Esse fato pode ser relacionado com o presente estudo, pois no local onde a amostra foi coletada foi observada uma alta infestação por mosca branca, além de lavouras de tomate nas proximidades. Portanto, ter encontrado um vírus que tipicamente infecta plantas de tomate em pepino, pode estar relacionado ao fato da mosca branca ser altamente polífaga, possuindo mais de 500 espécies de plantas hospedeiras (cucurbitáceas, solanáceas, brássicas, fabáceas, euforbiáceas, malváceas e plantas ornamentais) (HAJI et al., 2004). De tal modo, outros fatores como a suscetibilidade do hospedeiro, as condições climáticas, o uso exagerado de inseticidas nas lavouras de tomate, podem estar causando mudanças nas populações de mosca branca e conseqüentemente a procura por novos hospedeiros, ocasionando a transmissão de vírus que antes eram restritos a uma determinada cultura.

Devido a importância e os danos causados pelo ToSRV em cultivos de tomate é preciso ficar alerta para que o mesmo não ocorra na cultura do pepino. Tomando cuidado para que lavouras de pepino infectadas por ToSRV não tornem-se uma fonte de inóculo do vírus e possam se transformar em um problema potencial para a cultura do tomate.

4.4 Conclusões

Esse é o primeiro relato da ocorrência de *Tomato severe rugose virus* infectando pepino.

5 Considerações Finais

Conhecer a distribuição geográfica das espécies do complexo *B. tabaci* no Rio Grande do Sul é extremamente importante para garantir o seu manejo adequado, visto a importância que essa praga vem ganhando nos últimos anos.

A presença da espécie MED em outras regiões do estado, alertam para a introdução de uma espécie mais agressiva que com o tempo pode vir a deslocar espécies menos invasivas como MEAM1 e NW.

Altas infestações de mosca branca, contribuem para a ocorrência de doenças causadas por begomovírus. A espécie ToSRV é prevalente em cultivos de tomate, porém no Brasil, até o momento não havia sido relatada a ocorrência de begomovírus infectando pepino.

O comportamento da mosca branca pode estar associado com a ocorrência desse vírus em pepino, pois as mudanças no manejo de produção, por exemplo, o uso intensivo de inseticidas para o controle da praga, podem estar favorecendo a migração da mosca branca para novos hospedeiros e conseqüentemente a transmissão de vírus que até então não tinham sido encontrados na cultura.

O conhecimento sobre o vetor *B. tabaci*, ajuda não apenas o entendimento sobre o seu comportamento, mas também na distribuição e ocorrência de begomovírus.

6 Referências

ACOTTO, G. P.; SARDO, L. Transovarial transmission of begomoviruses in *Bemisia tabaci*, in *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*, ed. by Stansley PA and Naranjo SE. Springer, Dordrecht/ Heidelberg/London/New York. p. 339–348. 2010.

ALBUQUERQUE, L. C.; INOUE-NAGATA, A. K.; PINHEIRO, B.; RESENDE, R. O.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. Genetic diversity and recombination analysis of sweepviruses from Brazil. **Virology Journal**. v. 9, p. 241. 2012.

AMARI, K.; GONZALEZ-IBEAS, D.; GOMEZ, P.; SEMPERE, R. N.; SANCHEZ-PINA, M. A. *Tomato torrado virus* is transmitted by *Bemisia tabaci* and infects pepper and eggplant in addition to tomato. **Plant Disease**. v. 92, p. 1139. 2008.

ANDRET-LINK, P.; FUCHS, M. Transmission specificity of plant viruses by vectors. **Journal of Plant Pathology**. v. 87, n. 3, p. 153-165. 2005.

BARBOSA, J. C.; BARRETO, S. S.; INOUE-NAGATA, A. K.; REIS, M. S.; FIRMINO, A. C.; BERGAMIN FILHO, A.; REZENDE, J. A. M. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**. v. 75, p. 440-443. 2009.

BARBOSA, J. C.; BARRETO, S. D.; INOUE-NAGATA, A. K.; REZENDE, J. A. M. Characterization and experimental host range of a Brazilian tomato isolate of *Tomato severe rugose virus*. **Journal of Phytopathology**. v. 159, p. 644-646. 2011.

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. First report of *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. **Pest Management Science**, v. 71, n. 4, p. 501-504. 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**, v. 70, n. 10, p. 1440-1445. 2014b.

BELLOWS, T.; PERRING, T.; GILL, R.; HEADRICK, D. Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae) infesting North American agriculture. **Annals of the Entomological Society of America**. v. 87, p. 195–206. 1994.

BLANC, S.; DRUCKER, M.; UZEST, M. Localizing Viruses in their Insect Vectors. **Annual Review of Phytopathology**. v. 52, p. 18.1 – 18.23. 2014.

BONATO, O.; LURETTE, A.; VIDAL, C.; FARGUES, J. Modelling temperature-dependent bionomics of *Bemisia tabaci* (Q-biotype). **Physiological Entomology**. v. 32, n. 1, p. 50-55. 2007.

BONDAR, G. Aleyrodideos do Brasil. **Boletim do Laboratório de Patologia Vegetal do Estado da Bahia**, v.5, p.1-37. 1928.

BOYKIN, L. M. *Bemisia tabaci* nomenclature: lessons learned. **Pest Management Science**. v. 70, n. 10, p. 1454 – 1459. 2014.

BRIDDON, R.W.; PINNER, M.S.; STANLEY, J.; MARKHAM, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**. v. 177, p. 85–94. 1990.

BRIDDON, R. W.; STANLEY, J. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. **Virology**. v.344, n.1, p.198-210. 2006.

BROWN, J. K. The *Bemisia tabaci* complex: genetic and phenotypic variability drives begomovirus spread and virus diversification. **Online APSNet Featur**. 2007. doi: 10.1094/APSnetFeature-2007-0107

BROWN, J. K.; FAUQUET, C. M.; BRIDDON, R. W.; ZERBINI, F. M.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. Family *Geminiviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) *Virus taxonomy*. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. **Elsevier Academic Press**, London. p. 351–373. 2012.

BROWN, J. K.; ZERBINI, F. M.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; RAMOS-SOBRINHO, R.; SILVA, J. C. F.; FIALLO-OLIVÉ, E.; BRIDDON, R. W.; HERNÁNDEZ-ZAPEDA, C.; IDRIS, A.; MALATHI, V. G.; MARTIN, D. P.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; UEDA, S.; VARSANI, A. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. **Archives of Virology**. v. 160, n. 6, p. 1593-1619. 2015.

BYRNE, D.N.; BELLOWS JUNIOR, T.S. Whitefly biology. **Annual Review of Entomology**. v. 36, p. 431-457, 1991.

CARDOSO, A. L. L.; SILVA, N. Avaliação de híbridos de pepino tipo japonês sob ambiente protegido em duas épocas de cultivo. **Horticultura Brasileira**. v. 21, p. 170-175. 2003.

CHU, D.; WAN, F.; ZHANG, Y.; BROWN, J. Change in the biotype composition of *Bemisia tabaci* in Shandong Province of China from 2005 to 2008. **Environmental Entomology**. v. 39, n. 3, p. 1028-1036. 2010.

CICERO, J. M.; BROWN, J.K. Anatomy of accessory salivary glands of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and correlations to begomovirus transmission. **Annals of the Entomological Society of America**. v. 104, p. 280–286. 2011.

COSTA, H. S.; BROWN, J. K. Variation in biological characteristics and in esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci* (Genn.) and the association of one population with silverleaf symptom development. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 61, p. 211–219. 1991.

CROWDER, D. W.; DENNEHY, T. J.; ELLERS-KIRK, C.; YAFUSO, C. M.; ELLSWORTH, P. C.; TABASHNIK, B. E.; CARRIÉRE, Y. Field evaluation of resistance to pyriproxyfen in *Bemisia tabaci* (B biotype). **Journal of Economic Entomology**. v.100, p.1650-1656. 2007.

CUTHBERTSON, A.G.S.; VÄNNINEN, I. The importance of maintaining Protected Zone status against *Bemisia tabaci*. **Insects**. v.6, p.432-441. 2015.

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

DINSDALE, A.; COOK, L.; RIGINOS, C.; BUCKLEY, Y.; BARRO, P. D. 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**. v. 103, p. 196–208. 2010.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**. v.19, p.11-15, 1987.

DUFFUS, J.; LARSEN, R.; LIU, H. Lettuce infectious yellows virus—a new type of whitefly transmitted virus. **Phytopathology**. v. 76, p. 97–100. 1986.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologia de Produção de Soja - região central do Brasil – 2009 e 2010**. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste. p. 1 -262. 2008.

FIRDAUS, S.; VOSMAN, B.; HIDAYATI, N.; SUPENA, E. D. J.; VISSER, R.; HEUSDEN, A. W. The *Bemisia tabaci* species complex: Additions from different parts of the world. **Insect Science**, v. 20, n. 6, p. 723-733. 2013.

FONTES, P. C. R.; PUIATTI, M. Cultura do pepino. **Olericultura: teoria e prática**. Viçosa: UFV. p.439-456. 2005.

FORERO, D. The systematics of the Hemiptera. **Revista Colombiana de Entomologia**. v. 34, n. p. 1–21. 2008.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES J.R.S.; OMOTO, C. Entomologia Agrícola. Piracicaba: **FEALQ**. 920p. 2002.

GILL, R. J. The morphology of whiteflies. In: GERLING, D. (Ed.). **Whiteflies: their bionomics pest status and management**. Andover: Intercept, p. 13-46. 1990.

GILL, R.; BROWN, J. K. Systematics of Bemisia and Bemisia relatives: can molecular techniques solve the *Bemisia tabaci* complex conundrum - a taxonomist's viewpoint. **Bemisia: bionomics and management of a global pest**. Springer. p. 5-29. 2010.

GILBERTSON, R. L.; BATUMAN, O.; WEBSTER, C. G.; ADKINS, S. Role of the insect supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. **Annual Review of Virology**. v. 2, p. 67-93. 2015.

GRILLE, G.; GAUTHIER, N.; BUENAHORA, J.; BASSO, C.; BONATO, O. First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* in Argentina and Uruguay. **Phytoparasitica**. v. 39, p. 235-238. 2011.

HAIBLE, D.; KOBER, S.; JESKE, H. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. **Journal of Virological Methods**. v.135, p.9–16. 2006.

HAJI, F.N.P.; CARNEIRO, J. da S.; BLEICHER, E.; MOREIRA, A.N.; FERREIRA, R.C.F. Manejo da mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B na cultura do tomate. In: HAJI, F.N.P.; BLEICHER, E. (Ed.). **Avanços no manejo da mosca-branca Bemisia tabaci biótipo B (Hemiptera, Aleyrodidae)**. Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido, cap. 7, p.87-110. 2004.

HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S. B.; OROZCO, B. M.; NAGAR, S.; ROBERTSON, D. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 18, p. 71-106. 1999.

HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; ROBERTSON, D. Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. **Molecular Plant Pathology**. v.5, n. 2, p. 149–156. 2004.

HILJE, L. & MORALES, F. J.; Whitefly bioecology and management in Latin America. **Encyclopedia of Entomology**. ed. by Capinera JL. Springer, Gainesville, FL, p. 4250-4260. 2008.

HOFER, P.; BEDFORD, I. D.; MARKHAM, P. G.; JESKE, H.; FRISCHMUTH, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. **Virology**. v. 236, n. 2, p. 288-95. 1997.

HOGENHOUT, S.; AMMAR, D.; WHITFIELD, A. E.; REDINBAUGH, M. G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review of Phytopathology**. v. 46, p. 327-359. 2008.

HOROWITZ, A.; KONTSEDALOV, S.; KHASDAN, V.; ISHAAYA, I. Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 58, n. 4, p. 216-225. 2005.

ICTV. Family *Geminiviridae*. **International Committee on Taxonomy of Viruses**. Disponível em: < <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em 02 de Março de 2017.

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

INOUE-NAGATA, A.K.; LIMA, M.F.; GILBERTSON, R.L.; A review of geminivirus (begomovirus) diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. **Horticultura Brasileira**. v.34, n.1, p.008-018. 2016.

JIU, M.; ZHOU, X-P.; TONG, L.; XU, J.; YANG, X.; FANG-HAO, W.; LIU, S-S. Vector-Virus Mutualism Accelerates Population Increase of an Invasive Whitefly. **PLoS ONE**. v. 2, n.1, p. 1-8. 2007.

JOHNE, R.; MÜLLER, H.; RECTOR, A.; VAN RANST, M.; STEVENS, H. Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. **Trends in Microbiology**. v. 17, n. 5, p. 205-211. 2009.

JONES, D. R. Plant viruses transmitted by whiteflies. **European Journal of Plant Pathology**. v. 109, p. 195–219. 2003.

JOHNSON, D. D.; WALKER, G. P.; CREAMER, R. Stylet penetration behavior resulting in inoculation of a semipersistently transmitted closterovirus by the whitefly *Bemisia argentifolii*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 102, p. 115–123. 2002.

KING, A. M.; LEFKOWITZ, Q. E.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B. (eds), Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Academic Press**, San Diego, CA. 2011.

LEFEUVRE, P.; MARTIN, D. P.; HARKINS, G.; LEMEY, P.; GRAY, A. J. A.; MEREDITH, S.; LAKAY, F.; MONJANE, A.; LETT, J. M.; VARSANI, A.; Heydarnejad, J. The spread of *Tomato yellow leaf curl virus* from the Middle East to the world. **PLoS Pathogens**. v. 6, n.10, p. 1-12. 2010.

LIMA, L. H. C.; NÁVIA, D.; INGLIS, P. W.; OLIVEIRA, M. R. V. Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**. v. 23, n. 4, p. 781-785. 2000.

LIMA, M. F. Viroses de Cucurbitáceas. **Circular técnica. Embrapa Hortaliças**. v. 95, p. 1-7. 2011.

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.

MACEDO, M. A.; FILHO, M. M.; NAVAS-CASTILLO, J.; INOUE-NAGATA, A. K. Host range and whitefly transmission efficiency of *Tomato severe rugose virus* and *Tomato golden vein virus* in tomato plants. **Tropical Plant Pathology**. v. 40, n. 6, p. 405 – 409. 2015.

MACEDO, M. A.; BARRETO, S. S.; COSTA, T. M. First Report of Common Beans as a Non-Symptomatic Host of *Tomato severe rugose virus* in Brazil. **Plant Disease**. 2016. doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0330-PDN

MELGAREJO, T.A.; KON, T.; ROJAS, M.R.; PAZ-CARRASCO, L.; ZERBINI, F.M.; GILBERTSON, R. L. Characterization of a New World Monopartite Begomovirus Causing Leaf Curl Disease of Tomato in Ecuador and Peru Reveals a New Direction in Geminivirus Evolution. **Journal of Virology**. v. 87, n. 10, p. 5397-5413. 2013.

MCKENZIE, C. L.; BETHKE, J. A.; BYRNE, F. J.; CHAMBERLIN, J. R.; DENNEHY, T. J.; DICKEY, A. M.; GILREIN, D.; HALL, P. M.; LUDWIG, S.; OETTING, R. D.; OSBORNE, L. S.; SCHMALE, L.; SHATTERS JR, R. G. Distribution of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in North America after the Q invasion. **Journal of Economic Entomology**. v.105, p.753-766. 2012.

MATOUSEK, J.; SCHUBERT, J.; DEDIC, P. Complementation analysis of triple gene block of Potato virus S (PVS) revealed its capability to support systemic infection and aphid transmissibility of recombinant Potato virus X. **Virus Research**. v. 146, p. 81–88. 2009.

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**. v. 137, p. 113-121. 2013.

MARUTHI, M. N.; HILLOCKS, R. J.; MTUNDA, K.; RAYA, M. D.; MUHANNA, M.; KIOZIA, H.; REKHA, A. R.; COLVIN, J.; THRESH, J. M. Transmission of *Cassava brown streak virus* by *Bemisia tabaci* (Gennadius). **Journal of Phytopathology**. v.153, p. 307–312. 2005.

MOFFAT, A.S.; Plant pathology-geminiviruses emerge as serious crop threat. **Science**, v.286, n.1, p.1835. 1999.

MORALES, F. J. Distribution and dissemination of begomoviruses in Latin America and the Caribbean. In: Stansly PA, Naranjo SE, editors. **Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest**. p. 283–318. 2010.

NAIDU, R. A.; GOWDA, S.; SATYANARAYANA, T.; BOYKO, V.; REDDY, A.S.; DAWSON, W.O.; REDDY, D. V. Evidence that whitefly-transmitted cowpea mild mottle virus belongs to the genus Carlavirus. **Archives Virology**. v. 143, p. 769–780 1998.

NATESHAN, H. M.; MUNIYAPPA, V.; SWANSON, M. M.; HARRISON, B. D. Host range, vector and serological relationships of cotton leaf curl virus from southern India. **Annual Applied Biology**. v. 128, p. 233-244. 1996.

NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual Review Phytopathology** v.49, n.1, p.219-248. 2011.

NOUEIRY, A. O.; LUCAS, W. J.; GILBERTSON, R. L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**. v. 76, p. 925-932. 1994.

NOZAKI, D. N.; KRAUSE-SAKATE, R.; PAVAN, M. A. Begomovirus infectando a cultura de pimentão no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**. v. 36, p. 244-247. 2010.

OROZCO, B. M.; MILLER, A. B.; SETTLAGE, S. B.; HANLEY-BOWDOIN, L. Functional domains of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**. v. 272, n. 15, p. 9840-6. 1997.

PADIDAM, M.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. M. The role of AV2 ("precoat") and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. **Virology**. v. 224, p. 390-404. 1996.

PAKKIANATHAN, B. C.; KONTSEDALOV, S.; LEBEDEV, G.; MAHADAV, A.; ZEIDAN, M.; CZOSNEK, H.; GHANIM, M. Replication of *Tomato yellow leaf curl virus* in its whitefly vector *Bemisia tabaci*. **Journal of Virology**. v. 89, p. 9791–9803. 2015.

PROVVIDENTI, R. Cucumber mosaic. In: ZITTER, A.; HOPKINS, D. L.; THOMAS, C.E. **Compendium of cucurbit diseases**. APS PRESS: St. Paul. p. 438-39. 1996.

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**. v. 70, n. 10, p. 1547-1552. 2014.

RIBEIRO, S. G.; AMBROZEVIĆIUS, L. P.; DE AVILA, A. C.; BEZERRA, I. C.; CALEGARIO, R. F.; FERNANDES, J. J.; LIMA, M. F.; MELLO, R. N.; ROCHA, H.; ZERBINI, F. M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting geminiviruses in Brazil. **Archives of Virology**. v. 148, p. 281-295. 2003.

ROCHA, K. C.; KRAUSE-SAKATE, R.; PAVAN, M. A.; KOBORI, R. F.; GIORIA, R.; YUKI, V. A.; Avaliação de danos causados pelo *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em cultivares de pimentão. **Summa Phytopathologica**. v.38, p.87-89. 2012.

ROCHA, C. S.; CASTILLO-URQUIZA, G. P.; LIMA, A. T. M.; SILVA, F. N.; XAVIER, C. A. D.; HORA-JUNIOR, B. T.; BESERRA-JUNIOR, J. E. A.; MALTA, A. W. O.; MARTIN, D. P.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; MIZUBUTI, E. S. G.; ZERBINI, F. M. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. **Journal of Virology**. v. 87, p. 5784-5799. 2013.

ROJAS, M. R.; GILBERTSON, R. T.; RUSSEL, D. R.; MAXWELL, D. P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**. v.77, n.4, p.340-347. 1993.

ROJAS, M. R.; HAGEN, C.; LUCAS, W. J.; GILBERTSON, R. L. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**. v.43, p.361-394. 2005.

ROJAS, M. R.; GILBERTSON, R. L. Emerging plant viruses: a diversity of mechanisms and opportunities. In: Roossinck MJ, editor. **Plant virus evolution**. v. 1, p. 27–51. 2008.

ROMAY, G.; LECOQ, H.; DESBIEZ, C. *Melon chlorotic mosaic virus* and associated alphasatellite from Venezuela: genetic variation and sap transmission of a begomovirus–satellite complex. **Plant Pathology**. v. 64, n. 5, p. 1224 – 1234. 2015.

ROSARIO, K.; CAPOBIANCO, H. NG, T.F.F.; BREITBART MAND POLSTON JE, RNA Viral Metagenome of Whiteflies Leads to the Discovery and Characterization of a Whitefly-Transmitted Carlavirus in North America. **PloS One**. 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3 ed.). Cold Spring Harbor, NY. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.

SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; RODRÍGUEZ-NEGRETE, E. A.; CRUZADO, L.; GRANDE-PÉREZ, A.; BEJARANO, E. R.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. Tomato yellow leaf curl virus: No evidence for replication in the insect vector *Bemisia tabaci*. **Scientific Reports**. V. 6, P. 1 – 6. 2016.

SANDERFOOT, A. A.; LAZAROWITZ, S. G. Getting it together in plant virus movement: Cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. **Trends in Cell Biology**. v. 6, p. 353-358. 1996.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v.87, p.651-701. 1994.

SIMMONS, A.M. Oviposition on vegetables by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae): temporal and leaf surface factor. **Environmental Entomology**, v.23, n.2, p.381-389, 1994.

SOUZA-DIAS, J. A. C.; SAWAZAKI, H. E.; PERNAMBUCO, P. C. A.; ELIAS, L. M.; MALUF, H. *Tomato severe rugose virus*: Another begomovirus causing leaf deformation and mosaic symptoms on potato in Brazil. **Plant Disease**. v. 92, p. 487-488. 2008.

TAY, W.; EVANS, G.; BOYKIN, L.; DE BARRO, P. Will the Real *Bemisia tabaci* Please Stand Up? **PLoS ONE**. v. 7, n. 11, p. 1 – 5. 2012.

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**. v. 31, p. 631-634. 2002.

TRINKS, D.; RAJESWARAN, R.; SHIVAPRASAD, P.V.; AKBERGENOV, R.; OAKELEY, O.J.; VELUTHAMBI, K.; HOHN, T.; POOGGIN, M.M. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. **Journal of Virology**. v.79, p. 2517-2527. 2005.

VARSANI, A., NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; HERNÁNDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.; BROWN, J. K.; ZERBINI, F. M.; MARTIN, D. P. Establishment of three new genera in the family *Geminiviridae*: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. **Archives of Virology**. v.159, n.8, p. 2193-2203. 2014.

VIEIRA, S. S.; BUENO, A.F.; BOFF, M.I.C.; BUENO, R.; HOFFMAN-CAMPO, C.B. Resistance of soybean genotypes to *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**. v.40, p. 117–122. 2011.

WALSH, P.; METZGER, D.; HIGUCHI, R. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**. v.10, p.506-513. 1991.

WANG, H.; BUCKLEY, K. J.; YANG, X.; BUCHMANN, R. C.; BISARO, D. M. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. **Journal of Virology**. v. 79, n. 12, p. 7410-7418. 2005.

WINTERMANTEL, W. M.; WISLER, G. C.; ANCHIETA, A. G.; LIU, H-Y.; KARASEV, A. V.; TZANETAKIS, I. E. The complete nucleotide sequence and genome organization of *Tomato chlorosis virus*. **Archives Virology**. v. 150, p. 2287–2298. 2005.

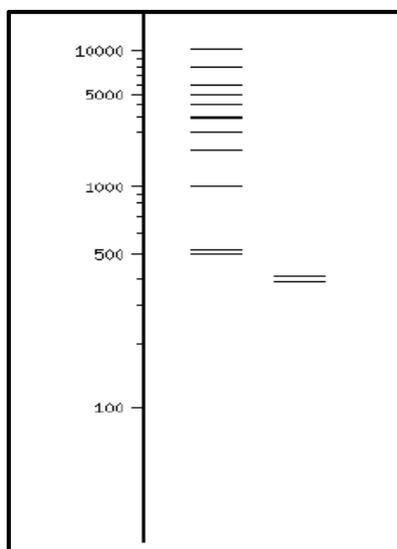
WINTERMANTEL, W. M. Transmission efficiency and epidemiology of criniviruses, in Bemisia: **Bionomics and Management of a Global Pest**, ed. by Stansley PA and Naranjo SE. Springer, Dordrecht/ Heidelberg/London/New York, p. 319–331. 2010.

WISLER, G. C.; DUFFUS, J. E.; LIU, H. Y.; LI, R. H. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. **Plant Disease**. v. 82, p. 270–280. 1998.

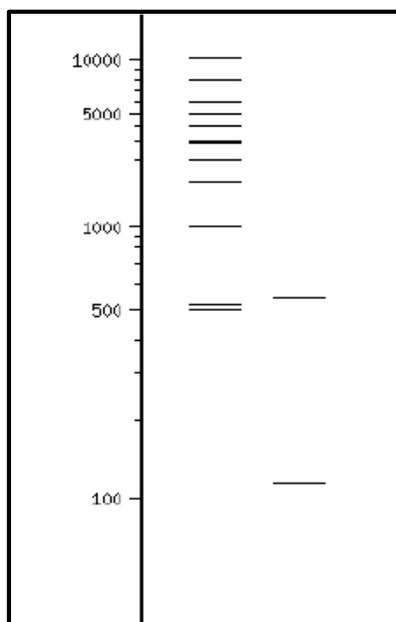
ZERBINI, F. M.; RIBEIRO, S. G.; ANDRADE, E. C.; LOPES E. F.; FERNANDES, J. J.; FONTES, E. P. B. Identificação e taxonomia de novas espécies de vírus transmitidos por mosca-branca no Brasil. **Biológico**. v. 64, n. 2, p. 151-152. 2002.

ZHOU, X. Advances in Understanding Begomovirus Satellites. **Annual Review of Phytopathology**. v. 51, n. 1, p. 357-381. 2013.

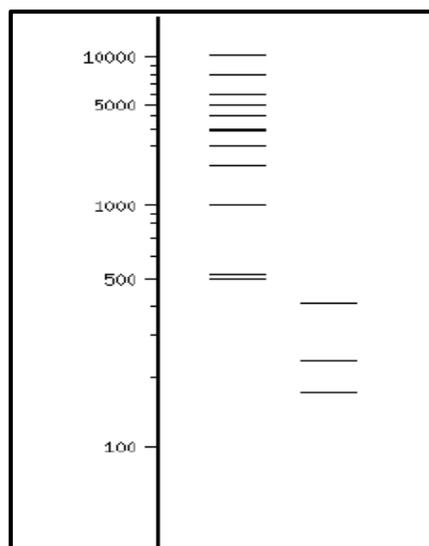
Anexos



Anexo A – Análise de restrição online com a enzima *TaqI*. Padrão de restrição referente a espécie NW (biótipo A).



Anexo B - Análise de restrição online com a enzima *TaqI*. Padrão de restrição referente a espécie MED (biótipo Q).



Anexo C - Análise de restrição online com a enzima *TaqI*. Padrão de restrição referente a espécie MEAM1 (biótipo B).