

Estudo da Interação de um Begomovírus Isolado de Tomateiro com a Mosca Branca

Carmem D. G. Santos¹, Antonio C. de Ávila² & Renato de O. Resende³

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, CEP 70910-970, Brasília, DF, e-mail: carmelo@ufc.br; ²EMBRAPA Hortaliças, Cx. Postal 218, CEP 70359-970, Brasília-DF, e-mail: avila@cnp.embrapa.br; ³Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, CEP 70910-970, Brasília-DF, e-mail: rresende@unb.br

(Aceito para publicação em 04/11/2003)

Autor para correspondência: Carmem Dolores Gonzaga Santos

SANTOS, C.D.G., ÁVILA, A.C. & RESENDE, R.O. Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca. Fitopatologia Brasileira 28:664-673. 2003.

RESUMO

No estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) em Anápolis-GO, denominado GO-ANPL (taxonomicamente relacionado ao *Tomato rugose mosaic virus*, ToRMV) com o vetor *Bemisia tabaci* biótipo B, determinaram-se o período de acesso de aquisição do vírus (PAA), o período de acesso de inoculação (PAI), o período de latência (PL), a sua retenção e transmissão à progênie. Nos experimentos empregaram-se plantas de tomateiro 'Santa Clara' e cinco insetos por planta. Constatou-se um PAA mínimo de 15 min com o qual 6% dos tomateiros foram infetados. Este percentual aumentou para 65% quando o PAA foi estendido para 24 h. O PAI mínimo foi de 30 min registrando-se 18% de infecção, o qual foi elevado para 67% com 24 h de PAI. Observou-se o término do PL 16 h após o vetor adquirir o vírus. Na detecção do GO-ANPL no vetor via PCR, testes com mais de 2.500

espécimens constataram o vírus em ninfas desenvolvidas em tomateiro infetado, em adultos com diferentes PAAs, mas não em ovos de fêmeas avirulíferas ovipositados em planta infetada. Observou-se a passagem transtadial em 100% dos adultos testados que transmitiram o vírus em 33% dos casos. Evidenciou-se a transmissão à progênie pela detecção do vírus em ovos, ninfas e adultos provenientes de fêmeas virulíferas, contudo, a transmissão do vírus pelos adultos não foi observada. Os resultados obtidos indicam que a interação vírus-vetor é estabelecida desde a fase inicial do desenvolvimento do inseto e podem ser considerados relevantes para os estudos epidemiológicos dos begomovírus associados ao biótipo B de *B. tabaci* no país.

Palavras-chave adicionais: interação vírus-vetor, *Geminiviridae*, *Lycopersicon esculentum*, PCR.

ABSTRACT

Studies of the interaction of a new begomovirus isolate from tomato with the whitefly

A begomovirus named GO-ANPL (taxonomically related to the *Tomato rugose mosaic virus*, ToRMV), obtained from tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants in Anápolis, state of Goiás, was used to study virus/vector (*Bemisia tabaci* biotype B) interaction. The acquisition access period (AAP), the inoculation access period (IAP), and the latent period (LP) were determined by transferring five whiteflies per tomato seedling cv. Santa Clara. The minimum AAP was 15 min resulting in 6% infected plants, which reached 65% as the length of AAP increased to 24 h. At a minimum IAP of 30 min, 18% of plants were infected; this increased to 67% after an IAP of 24 h. The end of the LP in the vector occurred 16 h after virus acquisition. To detect the GO-ANPL in the vector by PCR,

more than 2,500 specimens were tested. The virus was found in adults under different AAPs from the 1st to the 4th instar grown on infected plants. No virus was found in the eggs that were laid on infected plants by aviruliferous females. The GO-ANPL isolate was transmitted to the progeny of viruliferous females, since the virus was detected in eggs, all instars and adults. However, no virus transmission was observed from these adults. A high frequency of viral detection was observed in newly emerged adults from immature forms reared on virus-infected plants. These adults infected 33% of tomato plants in virus transmission assays. The results indicate that the interaction between begomovirus and *B. tabaci* biótipo B starts at early stages of insect development. This is important information for epidemiological studies of begomovirus in this country.

INTRODUÇÃO

Os begomovírus, vírus da família *Geminiviridae* transmitidos por mosca branca, constituem sérios patógenos de culturas agrônomicas e hortícolas em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo. A partir da década de 80, tornaram-

se freqüentes os relatos da disseminação da mosca branca, *Bemisia tabaci* Gennadius biótipo B (*B. argentifolii* Bellows & Perring), e de begomovírus provocando impacto devastador nas regiões em que ocorrem (Brown *et al.*, 1995). No Brasil, os begomovírus foram relatados nas culturas do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), feijão de corda (*Vigna unguiculata* Walp.), soja (*Glycine max* Merrill) e pimentão (*Capsicum annuum* L.). No Distrito Federal, a

*Parte de Tese de doutorado do primeiro autor. Universidade de Brasília (2001)

presença de begomovírus em tomateiro foi relatada a partir de 1994, causando, no ano seguinte, perdas que variaram de 40% a 100% (Bezerra *et al.*, 1996). Esse relato sucedeu à constatação da mosca branca no Distrito Federal em 1993 (França *et al.*, 1996). A partir de 1996, elevada incidência de begomovírus em tomateiro foi observada nos estados de Minas Gerais, Bahia, São Paulo, Pernambuco, Rio de Janeiro, Goiás e Ceará, sendo muitas vezes, relatado como limitante para a produção do tomate em várias áreas de cultivo (Faria *et al.*, 2000).

Os begomovírus não são transmitidos por semente ou por contato entre plantas infetadas e sadias. Sua dispersão ou introdução no campo dá-se pela ação da mosca branca a partir de fontes de vírus de áreas próximas, podendo ser de cultivos antigos como também de fontes alternativas no campo (Costa, 1976). Diversidade genética tem sido observada em espécies de begomovírus associadas ao tomateiro no Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (Ribeiro *et al.*, 2003), e o relacionamento genético observado entre as espécies de tomate e de plantas daninhas sugerem que os vírus sejam provenientes de plantas nativas e que estão sendo transferidos para o tomateiro pela mosca branca, *B. tabaci* biótipo B (Ambrozevicius *et al.*, 2002). Segundo Villas-Bôas *et al.* (1999) o biótipo B tem se dispersado nos campos rapidamente, sendo considerada a espécie de mosca branca que comumente devasta os cultivos agrícolas nas várias regiões geográficas do país.

A modalidade de transmissão de begomovírus por moscas brancas, *Bemisia* spp., é do tipo circulativa, não propagativa (Brown, 1997; Rubinstein & Czosnek, 1997; Ghanim *et al.*, 1998; Morin *et al.*, 1999). A relação entre os begomovírus e a mosca branca, incluindo diversas características de transmissão do vírus pelo vetor, tais como período de aquisição, de inoculação, de latência, de retenção, passagem transovariana, entre outros, foram estudadas em alguns países, envolvendo begomovírus de cucurbitáceas, como *Squash leaf curl virus* (SLCV) (Cohen *et al.*, 1989), de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) como o *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) (Nateshan *et al.*, 1996) e de tomate, principalmente o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Picó *et al.*, 1996; Ghanim *et al.*, 1998; Muniappa *et al.*, 2000) espécies não relatadas no Brasil. Nesses estudos, os resultados obtidos foram variáveis e relacionados à estirpe viral envolvida, à região geográfica e às condições de cada pesquisa.

Considerando a importância dos begomovírus para a cultura do tomate, sua associação com a mosca branca e a relativa escassez de informações sobre o relacionamento desses vírus com o vetor, *B. tabaci* biótipo B, no Brasil, realizou-se este trabalho, o qual teve por objetivo investigar a interação de um begomovírus isolado de tomate com a mosca branca nas diferentes fases de seu desenvolvimento, e determinar as características de transmissão pelo adulto, visando, contribuir para os estudos epidemiológicos de begomovírus de tomate nas condições brasileiras.

MATERIALE MÉTODOS

Origem do isolado de begomovírus e da população do vetor

O isolado viral empregado no estudo da interação vírus-

vetor foi obtido de tomate indústria 'Jumbo,' coletado em lavouras no município de Anápolis, Estado de Goiás, apresentando sintomas de mosaico, clorose internerval e enrolamento do limbo foliar. O vírus foi previamente identificado como pertencente ao gênero *Begomovirus* por meio de PCR com "primers" específicos (Santos *et al.*, 1998) e mediante análise de seqüência nucleotídica do componente A (Santos *et al.*, 2002b). Análises preliminares da seqüência de nucleotídeos de grande parte do genoma do componente A, envolvendo a região intergênica, a capa protéica, e parte da replicase sugerem que o isolado, denominado GO-ANPL, seja uma variante ou uma espécie próxima ao *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), espécie recentemente identificada em tomateiro no Brasil (Ribeiro *et al.*, 2003).

A população inicial do vetor *B. tabaci* biótipo B, foi cedida pela Dra. Geni Villas-Bôas (Embrapa Hortaliças). As colônias do inseto foram mantidas em plantas envasadas de repolho (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) e couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), espécies não hospedeiras do begomovírus, em insetários protegidos com malha de náilon à prova de insetos.

Condução dos ensaios de transmissão do isolado GO-ANPL pelo vetor

Os ensaios de detecção e de transmissão do isolado GO-ANPL pelo vetor foram conduzidos na Embrapa Hortaliças-DF, com temperatura variando de 14 a 20 °C, de maio a julho, e de 20 a 24 °C, de julho a setembro de 2000.

Para a realização dos ensaios de transmissão pelo vetor, empregaram-se adultos com no máximo três dias da emergência, coletados de plantas de couve e repolho com o auxílio de um aspirador adaptado para insetos. A passagem das moscas brancas das brássicas para tomate sadio precederam os tratamentos, para efeito da adaptação do vetor à solanácea. Para a inoculação, foram usadas mudas sadias de tomate 'Santa Clara' no estágio de duas folhas verdadeiras cultivadas em copos descartáveis de café contendo uma mistura de solo e esterco esterilizados. Os procedimentos adotados, e descritos a seguir, foram similares na determinação do período de acesso de aquisição do vírus (PAA), do período de acesso de inoculação (PAI) e do período de latência (PL).

Aquisição do vírus pelo vetor

Folhas novas (1ª a 3ª, do ápice para a base) de 'Santa Clara' com três a quatro semanas da inoculação, foram destacadas e dispostas em tubos "falcon". Grupos de pelo menos 100 moscas brancas avirulíferas foram transferidas para cada tubo, previamente identificados para cada PAA. Este procedimento foi adotado nos ensaios para determinação do PAA e do PL, nos quais o tempo máximo de permanência de folhas e insetos nos tubos foi de 24 h. Nos ensaios visando a determinação do PAI, em virtude da necessidade de um maior número de insetos com PAA mais longo (72 h), dispuseram-se as folhas destacadas com pecíolos imersos em vidros com água, para conservar a sua turgidez. Os vidros com as folhas foram então dispostos em recipientes plásticos e cobertos com

tecido escaline, para evitar a fuga dos insetos ali introduzidos.

Transmissão do vírus pelo vetor

Decorrido o PAA de cada ensaio, conduziram-se os tubos “falcon” ou recipientes plásticos com folhas e insetos para serem abertos em caixa de papelão revestida com duplex preto. As folhas foram retiradas dos tubos e, com leves movimentos das folhas, provocou-se a saída do vetor para o teto da caixa. As moscas brancas foram coletadas da caixa escura, com o auxílio de ponteiros plásticos com pontas vedadas do pipetador automático P-20 e transferidas, em grupos de cinco, para plântulas individuais de tomate. As plantas foram imediatamente cobertas com gaiolas confeccionadas com copos descartáveis de 300 ml, cujo fundo foi substituído por tecido escaline, para conter os insetos. Ao final do período da inoculação, as moscas brancas foram eliminadas, as plantas pulverizadas com inseticida sistêmico e transferidas em bandejas plásticas para casa de vegetação.

Determinação do período de acesso de aquisição do vírus, PAA

Avaliaram-se nove períodos de acesso de aquisição do vírus pelo vetor: 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 20 h e 24 h, visando-se identificar o período mínimo para a aquisição e os percentuais de transmissão do vírus em cada caso. Para tanto, após cada PAA, as moscas brancas foram transferidas para plantas sadias (cinco insetos por planta), onde permaneceram por 48 h. O experimento foi conduzido com cinco repetições de grupos de dez plantas submetidas a cada um dos nove tratamentos, num total de 450 plantas inoculadas. Após 15 dias em condições de casa de vegetação, as amostras das brotações de cada planta, com ou sem sintomas, foram coletadas e testadas individualmente por hibridização. O percentual médio de plantas infetadas foi definido e analisado estatisticamente empregando-se a regressão não-linear e o modelo logarítmico que melhor se adequou para a avaliação dos dados.

Determinação do período de acesso de inoculação do vírus, PAI

Foram definidos nove períodos de acesso de inoculação do vírus pelo vetor: 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 20 h e 24 h, visando-se determinar o período mínimo para a inoculação e os percentuais de transmissão para cada período. Foi adotado um único PAA de 72 h pelo vetor e após cada PAI nas plantas de tomate, as moscas brancas foram eliminadas. A confirmação de infecção nas plantas e a análise estatística foram conduzidas conforme o procedimento anterior.

Determinação do período de latência do vírus no vetor, PL

Empregaram-se cinco períodos de acesso de aquisição do vírus em folhas destacadas: 8 h, 12 h, 16 h, 20 h e 24 h. Após o PAA, os insetos foram transferidos para tomate onde permaneceram, continuamente, por 4 h, 8 h, 12 h, 16 h ou 20 h (PAI). Na avaliação desta variável, considerou-se o tempo total do vírus na mosca branca, dado pela soma do PAA e PAI, para se verificar o início da transmissão do vírus, ou seja, o término

do período de latência no vetor. O número de plantas inoculadas por combinação (PAA+PAI) variou de 20 a 30 e, decorrido o período de observação, foi calculado o percentual de plantas infectadas pelo vírus.

Detecção do GO-ANPL nas amostras foliares

Para a detecção do begomovírus nas amostras foliares dos ensaios de PAA, PAI e PL, foi empregada a técnica “dot-blot” (Rom *et al.*, 1993). Extratos de amostras foliares, trituradas na presença de NaOH 0,4 N, foram gotejados em membranas de náilon (Hybond N+ da Amersham/Pharmacia) que, após lavagens em Tris-HCl pH 7,5, em 2X SSC (NaCl 3 M, citrato de sódio 0,3 M), imersão em etanol 95% e fixação do DNA sob UV, foram hibridizadas em sondas preparadas com fragmento do DNA A do GO-ANPL marcado com o α -³²P e avaliadas por autoradiografia.

Detecção do GO-ANPL no vetor coletado de planta infetada

A presença do vírus foi investigada nas diversas fases de desenvolvimento da mosca branca: em ovos de fêmeas avirulíferas, cinco a sete dias após serem ovipositados em tomateiro infetado, nos quatro ínstares do vetor que se desenvolveram em planta infetada e em adultos com PAA de 15 min a 24 h. A passagem transestadial do vírus no vetor foi investigada a partir de adultos emergidos de ninfas cujo 4º instar foi transferido da planta infetada para folhas de couve, espécie não suscetível ao vírus. Em ensaios que visaram avaliar a retenção do vírus de ninfas do 1º instar para os estágios posteriores, transferiram-se exemplares dessas ninfas de plantas infetadas para planta couve e aguardando-se o seu desenvolvimento.

Detecção do GO-ANPL na progênie do vetor

Nos testes para detecção de transmissão do vírus à progênie transferiram-se fêmeas, individualmente, de tomateiro infetado para couve ou repolho, confinando-as às plantas por 24 h a 48 h. Após esse período, as fêmeas foram testadas quanto à presença de vírus, e somente as progênies de fêmeas confirmadamente virulíferas foram coletadas. Obtiveram-se amostras de ovos e, à medida que iam se desenvolvendo, amostras de ninfas de 1º ao 4º instar e de adultos emergentes.

As transferências de ninfas e as coletas de ovos, ninfas e adultos foram realizadas com o auxílio de pincel fino e microscópio estereoscópico. Em virtude do elevado número de amostras, os exemplares coletados e transferidos para microtubos contendo tampão de extração (Tris-EDTA 0,1 M pH 9,0, 1% SDS) foram acondicionados a -20 °C para posterior extração de DNA.

Extração do DNA a partir da mosca branca

O DNA foi extraído de ovos em grupos de até 20 exemplares, de cada um dos quatro ínstares em grupos de até dez, e de adultos em conjunto de até seis. A coleta individual ocorreu para fêmeas usadas nos ensaios de progênie e adultos na investigação da passagem transestadial. A extração do DNA baseou-se na metodologia empregada por Metha *et al.* (1994a).

Insetos congelados em TE foram triturados nos microtubos com auxílio de pistilos plásticos, com adição de 1 µl de proteinase K (50 µg/ml), incubação a 65 °C, adição de 3,5 µl de acetato de potássio 8 M, tratamento com clorofórmio/fenol, precipitação do DNA com etanol e ressuspensão em água milli-Q. As amostras de DNA total foram mantidas a -20 °C para posterior uso na PCR.

A extração de DNA a partir de folhas de tomateiro, a ser empregado como testemunha, foi realizada conforme o método desenvolvido por Dellaporta *et al.* (1983).

Realização da PCR das amostras

Para a PCR, empregaram-se 5,0 µl de DNA total do inseto (ovos, ninfas ou adultos) ou 2 µl de DNA de tomateiro, 2,5 µl tampão 10X da enzima *Taq* DNA polimerase (Pharmacia), 1 µl de dNTP (Pharmacia) a 2,5 mM, 10 pmoles (0,7 µl) de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 U (0,2 µl) de *Taq* DNA polimerase (Pharmacia), ajustando o volume da reação para 25 µl com água (filtro Milli-Q) estéril. Constituíram o controle positivo, o DNA extraído de adultos com PAA de 48 h, DNA de planta infetada com o GO-ANPL e DNA plasmidial do *Bean golden mosaic virus* (BGMV). O controle negativo incluiu DNA de ovos, ninfas e adultos de colônias avirulíferas e DNA de tomateiro sadio. Utilizou-se o par de oligonucleotídeos 5'-CCCCTCGACATGYCTAAGMGKGAAGCCCC-3' (CP1) e 5'-CCCCTGCAGAACTTCCAAGTCTGGACG-3' (CP2), que amplificam fragmentos de 0,9 kb do DNA A, referente a capa protéica do vírus. Foi utilizado o termociclador modelo PTC 100 MJ Research, adotando-se um programa com aquecimento inicial de 94 °C por 3 min e 33 ciclos compostos de: desnaturação (94 °C/1min), anelamento (52 °C/1 min), extensão (72 °C/1 min) e extensão final a 72 °C por 7 min. Após a eletroforese, os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio e observado sob luz UV. Ocasionalmente, "southern blot" (Metha *et al.*, 1994a) das amostras foi também realizado.

Transmissibilidade do vírus por adultos oriundos da progênie e da passagem transestadial

Para avaliar a transmissibilidade do vírus para tomateiros sadios, adultos da progênie de fêmeas virulíferas e adultos oriundos da passagem transestadial, e que não tiveram acesso à fonte de vírus, foram transferidos em grupos de dez a 15 para mudas de tomate, nas quais permaneceram por 48 h. Após esta etapa, os adultos foram coletados, individualmente, para detecção do vírus por PCR, conforme procedimento anteriormente descrito, permanecendo as plantas inoculadas sob observação em casa de vegetação.

RESULTADOS

Nos experimentos para definição de PAA, PAI e PL, as plantas de tomate infetadas com o GO-ANPL apresentaram sintomas iniciais de mosqueado e clareamento de nervuras aos oito dias após a inoculação, e ao décimo quinto dia, sintomas de mosaico internerval e deformação foliar estavam

bem definidos, independente do tempo de inoculação concedido.

Período de acesso de aquisição do vírus, PAA

Os resultados dos experimentos realizados para a determinação do PAA, confirmados com o "dot blot" (Figura 1A, Tabela 1). A análise estatística da média dos dados usando o modelo de regressão não linear está ilustrada na Figura 1B. Nos ensaios constatou-se que *B. tabaci* biótipo B, foi capaz de adquirir o begomovírus a partir de um PAA de apenas 15 min com o qual transmitiu o vírus para o tomateiro em um percentual médio de 6%. Este percentual aumentou à medida que o PAA dos insetos foi estendido alcançando os 65% quando esse período foi de 24 h (Tabela 1). O modelo logarítmico foi o que melhor se adequou à análise dos dados.

Período de acesso de inoculação do vírus, PAI

Os resultados dos experimentos realizados para a determinação do PAI (Tabela 2) foram confirmados com o "dot blot" (Figura 1C). Segundo a análise estatística das médias dos dados usando o modelo de regressão não-linear (Figura 1D). Observou-se que a mosca branca virulífera (PAA 72 h), nas condições desses experimentos, foi capaz de transmitir o vírus aos 30 min de PAI para 19% das plantas de tomate. O percentual médio de transmissão aumentou com a extensão do PAI, havendo infecção em 66,7% das plantas submetidas a 24 h de PAI.

Período de latência no vetor, PL

De acordo com os resultados dos experimentos para determinação do período de latência (Tabela 3), observou-se que o início da transmissão do vírus para tomateiro, término do PL, ocorreu a partir da combinação que somou 16 h no vetor (8 h+8 h), quando 3,4% das plantas de tomate foram infetadas. Percentual pouco acima deste (4,0%) foi obtido quando o tempo no vetor foi de 20 h (8 h+12 h ou 16 h+4 h). Nas combinações que resultaram nos tempos de 24 h, 28 h e 32 h, o percentual médio de plantas infetadas foi de 6,5%, 11,9%, 12,7%, respectivamente. Um total de 25% de infecção foi observado para os casos em que o inseto permaneceu na planta até que se completassem 40 h do vírus no vetor, tanto para a combinação 16 h+24 h como 24 h+16 h.

Deteção do begomovírus no vetor

Os resultados dos testes de detecção do begomovírus no vetor (Figura 2, Tabela 4) foram confirmados por "southern blot". O vírus foi detectado nos quatro estágios ninfais que se desenvolveram em planta infetada com valores crescentes de 15,4 a 70%, do 1º ao 4º ínstar. Dessa última fase do inseto, o fragmento do DNA viral amplificado foi sempre mais facilmente observado no gel (Figura 2). O GO-ANPL não foi detectado em nenhuma das 27 amostras de ovos testadas, provenientes de fêmeas avirulíferas, cinco a sete dias após a oviposição em tomate infetado. Estas amostras envolveram mais de 500 ovos coletados de diferentes plantas de tomate infetadas. A passagem transestadial do vírus, por outro lado, foi detectada

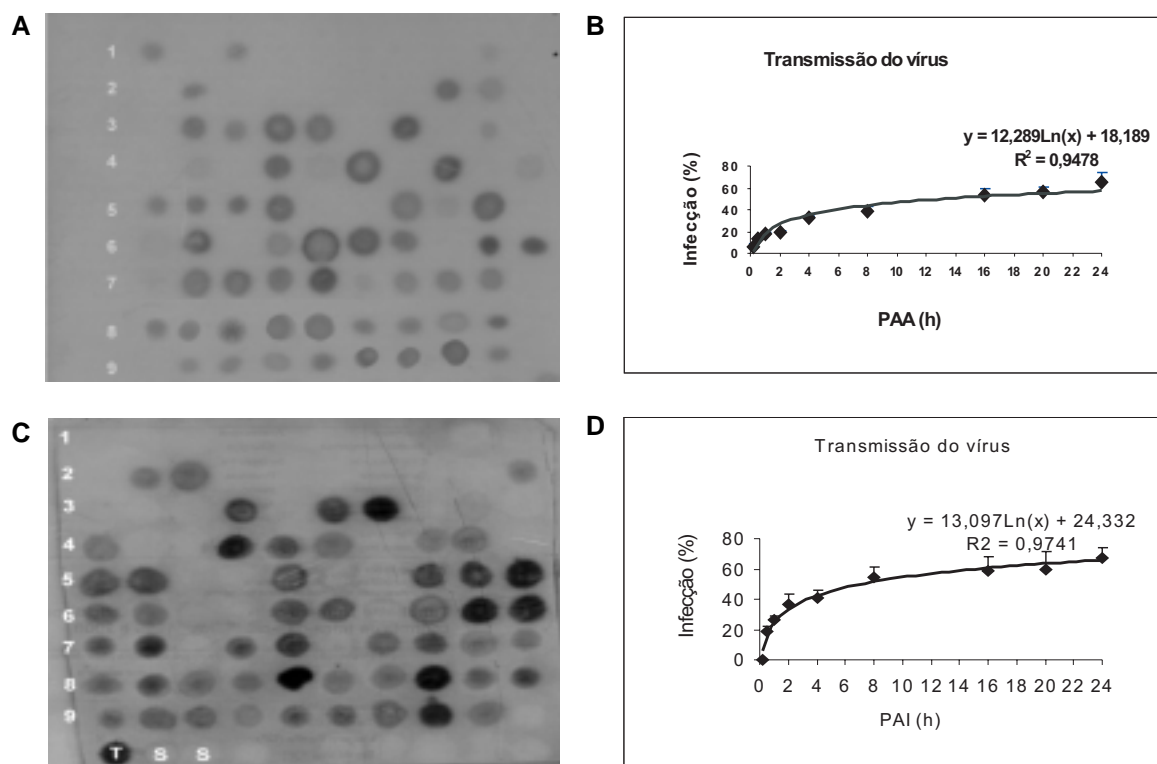


FIG. 1 - Análise da transmissão do begomovirus GO-ANPL pela mosca branca (*Bemisia tabaci* biótipo B): (A) "dot-blot" de amostras foliares de tomate (*Lycopersicon esculentum*) 'Santa Clara' após diferentes períodos de acesso de aquisição do vírus (PAA) e período de acesso de inoculação (PAI) fixo de 48 h. Linhas de 1 a 9 - amostras de plantas com PAA de 15 min a 24 h; (B) curva representando o percentual de transmissão com os períodos crescentes de PAA; (C) "dot blot" de amostras foliares coletadas após PAA fixo de 72 h e PAI variável. Linhas de 1 a 9 - amostras de plantas com PAI de 15 min a 24 h; S= extrato de planta sadia, T= extrato de tomate infetado; (D) curva representando o percentual de transmissão com os períodos crescentes de PAI.

em todas as amostras individuais testadas, sugerindo que a passagem do vírus da fase de ninfa para o adulto ocorre com elevada frequência em condições naturais. Não foi possível avaliar a retenção do vírus da fase de 1º instar para os estágios

posteriores, em virtude do insucesso da sobrevivência das ninfas transferidas (sete em 30 tentativas) para plantas saudas, ainda que sob cuidadosa manipulação. Nos exemplares testados quanto à retenção do vírus (cinco nas fases de 2º a 4º

TABELA 1 - Percentual de transmissão do isolado do begomovirus GO-ANPL pela *Bemisia tabaci* biótipo B para tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) 'Santa Clara', após diferentes períodos de acesso de aquisição do vírus pelo vetor (PAA) e um período de acesso de inoculação (PAI) fixo de 48 h. Brasília-DF, 2001

Período acesso de aquisição (horas)	Total de plantas infetadas / Plantas inoculadas ^A
0,25	3/50 (6,0) ^B
0,5	6/50 (12,0)
1	9/51 (17,6)
2	10/50 (20,0)
4	17/51 (33,3)
8	19/50 (38,0)
16	26/49 (53,0)
20	28/50 (56,0)
24	32/49 (65,0)

A= Para a transmissão foram empregadas cinco moscas brancas / planta de tomate;

B = Percentual de plantas infetadas em cada PAA.

TABELA 2 - Percentual de transmissão do isolado do begomovirus GO-ANPL por *Bemisia tabaci* biótipo B para tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) 'Santa Clara', após um período de acesso de aquisição fixo de 72 h e diferentes períodos de acesso de inoculação (PAI). Brasília-DF, 2001

Período acesso de inoculação (horas)	Total de plantas infetadas / Plantas inoculadas ^A
0,25	0/50 (0,0) ^B
0,5	10/51 (19,0)
1	13/48 (27,0)
2	18/49 (36,7)
4	20/49 (40,8)
8	28/51 (54,9)
16	29/49 (59,1)
20	29/48 (60,4)
24	34/51 (66,7)

A= Para a transmissão foram empregadas cinco moscas brancas / planta de tomate;

B = Percentual de plantas infetadas com cada PAI.

TABELA 3 - Percentual de transmissão do begomovirus GO-ANPL por *Bemisia tabaci* biótipo B, na detecção do período de latência do vírus no vetor. Brasília-DF, 2001

Período total do vírus no vetor (horas) ^A	Total de plantas infetadas / plantas inoculadas ^B
12	0/36 (0,0) ^C
16	1/29 (3,4)
20	2/50 (4,0)
24	4/61 (6,5)
28	5/42 (11,9)
32	22/173 (12,7)
40	22/88 (25,0)

A= Tempo do vírus no vetor resultante das diferentes combinações do período de acesso de aquisição + período de acesso de inoculação (12 h = 8 h+4 h; 16 h = 8 h+8 h; 20 h = 8 h+12 h e 16 h+4 h; 24 h = 8 h+16 h; 16 h+8 h e 20 h+4 h; 28 h = 20 h+8 h e 24 h+4 h; 32 h = 12 h+20 h, 16 h+16 h; 20 h+12 h e 24 h+8 h; 40 h = 16 h+24 h e 24 h+16 h; B= total de plantas infetadas sobre o total de plantas inoculadas para as combinações que somaram o mesmo tempo no vetor; C= percentual e plantas infetadas em cada combinação.

ínstar e dois na fase adulta) o resultado foi negativo.

O vírus foi constatado nos adultos com PAA de 30 min a 24 h, mas não em adultos com o PAA de 15 min (Tabela 4), sendo maior o percentual de detecção nos casos em que o PAA foi mais prolongado.

A transmissão do begomovírus à progênie da mosca branca foi constatada em todas as fases do vetor, ou seja em ovos, ninfas e adultos provenientes de fêmeas virulíferas ovipositados em planta não hospedeira do vírus. Em ovos, o percentual foi de 13,8%, sendo menor em ninfas de 1º ao 3º ínstar (4,3 a 8,3%). No 4º ínstar, o vírus foi constatado em 23,5% das amostras e na fase adulta em 16,0% dos casos testados. Ocasionalmente, foram realizadas PCRs com o DNA de amostras foliares de couve obtidas do local onde se alimentavam as fases ninfaís provenientes de fêmeas virulíferas. O resultado do teste, para todas as amostras vegetais empregadas, foi negativo.

Transmissibilidade do vírus

Nos testes de transmissibilidade do vírus pelos adultos da progênie de fêmeas virulíferas, não foi verificado nenhum caso de infecção dentre as 23 plantas de 'Santa Clara' submetidas a esses insetos. Por outro lado, nos casos em que os adultos foram emergentes de ninfas do 4º ínstar coletadas de tomateiro infetado, e para os quais se confirmou, posteriormente, a passagem transestadial do begomovírus, as inoculações resultaram num percentual de 33% de transmissão viral após 48 h de PAI.

DISCUSSÃO

O isolado do Begomovirus GO-ANPL empregado neste trabalho, por ocasião de sua caracterização molecular, foi parcialmente sequenciado e submetido à análises filogenéticas com begomovírus identificados no Brasil e em outros países. Os estudos comparativos realizados com a seqüência de

TABELA 4 - Percentual de detecção do begomovirus GO-ANPL em diferentes estádios de desenvolvimento de *Bemisia tabaci* biótipo B em planta infetada, em planta não hospedeira e em adultos com variados períodos de acesso de aquisição do vírus. Brasília-DF, 2001

Fase de desenvolvimento do vetor	Total de amostras positivas / Amostras Testadas ^G
Ovo ^A	0/27 (0,0) ^H
1º Ínstar	2/13 (15,4)
2º Ínstar	8/14 (57,1)
3º Ínstar	7/10 (70,0)
4º Ínstar	11/16 (68,8)
Adulto (transestadial) ^B	8/8 (100,0)
Ovo ^C	4/29 (13,8)
1º Ínstar	1/12 (8,3)
2º Ínstar	1/17 (5,9)
3º Ínstar	1/23 (4,3)
4º Ínstar	4/17 (23,5)
Adulto (emergente)	4/25 (16,0)
15 min ^D	0/3 (0,0)
30 min	3/8 (37,5)
1 h	2/6 (33,3)
2 h	4/6 (66,7)
4 h	5/8 (62,5)
8 h	4/7 (57,1)
16 h	5/7 (71,4)
20 h	3/4 (75,0)
24 h	6/6 (100,0)
Fêmea virulífera ^E	26/42 (61,9)
Ovo ^F	0/12 (0,0)
1º ao 4º Ínstar	0/15 (0,0)
Adulto	0/13 (0,0)

A = ovo a 4º ínstar - provenientes de fêmeas avirulíferas e desenvolvidos em tomate infetado; B = ninfa de 4º ínstar transferida de tomate infetado para couve para emergência do adulto; C = ovo a adulto provenientes de fêmeas virulíferas e desenvolvidos em couve; D = adultos com PAA de 15 min a 24 h; E = fêmeas com PAA de 24 h e testadas individualmente; F = ovo a adulto provenientes de insetos avirulíferos; G = detecção por PCR: ovos, até 20 por tubo; ninfas até dez por tubo; adultos, até seis por tubo.; H = Percentual de plantas infetadas.

nucleotídeos obtida de grande parte do genoma do componente A do GO-ANPL (Santos *et al.*, 2002b), sugerem que esse isolado seja uma variante ou uma possível espécie próxima ao ToRMV, begomovírus recentemente relatado entre as novas espécies ocorrentes em tomateiro no Brasil (Ribeiro *et al.* (2003).

Em ensaios preliminares para a determinação do PAA, PAI e PL, a adoção de três insetos por planta causou mais escapes do que quando se usaram cinco insetos, e com este número os resultados foram similares ao uso de dez insetos. Para alguns vírus, como o *Tomato leaf curl virus* (TLCV) isolado de Bangalore, ToLCV-Ban4, a transmissão com um único adulto alcançou 40 a 65%, no entanto, cinco insetos foram requeridos para os 100% de infecção (Muniyappa *et al.*, 2000). Para o TYLCV, o emprego de cinco insetos resultou em uma transmissão máxima de 81%, enquanto que 97% foram alcançados com a adoção de 20 insetos por planta (Metha *et al.*, 1994b).

Na transmissão do GO-ANPL, fêmeas foram mais

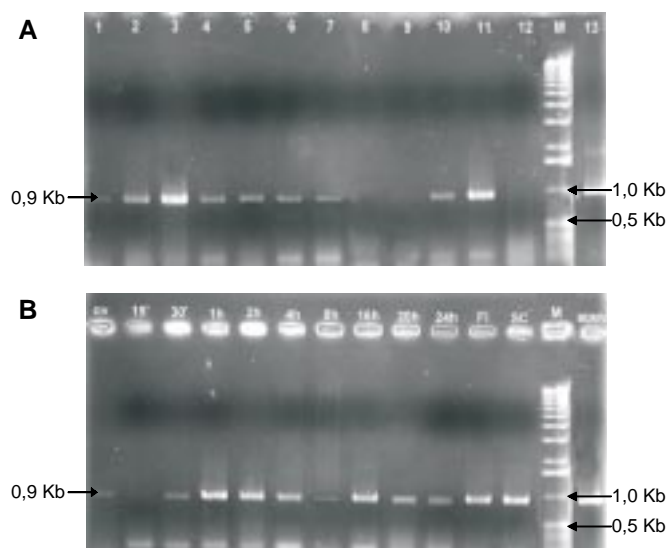


FIG. 2 - Análise eletroforética de amostras de mosca branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) submetidas a PCR. **A** - Colunas 1 a 4 - ninfas de 1°, 2°, 4° e 3° ínstar coletadas em planta infetada; 5 a 7 - 1°, 2° e 4° ínstar da progênie de fêmeas virulíferas; 8 - 4° ínstar do ensaio de retenção de vírus; 9 - adulto do ensaio de retenção de vírus; 10 - adultos da progênie de fêmea virulífera; 11 - adultos da passagem transestadial; 12 - adulto avirulífero; M= marcador DNA Ladder; 13- 'Santa Clara' infetada (controle). **B** - ovos de progênie de fêmea virulífera; 15 min a 24 h- adultos com período de acesso de aquisição do GO-ANPL de 15 min a 24 h; Fi= fêmea virulífera (individual); SC = tomate 'Santa Clara' infetado, M = marcador 1Kb DNA Ladder; BGMV- controle positivo.

freqüentemente empregadas que machos, em virtude de seu maior tamanho e de serem mais numerosas nas colônias. As fêmeas de mosca branca, em geral, são consideradas mais eficientes na transmissão de begomovírus que os machos (Nateshan *et al.*, 1996; Muniyappa *et al.*, 2000), porém, experimentos para comparar a eficiência entre machos e fêmeas na transmissão do GO-ANPL não foram conduzidos.

Nos ensaios de transmissão, verificou-se que ocorreu um percentual crescente da infecção viral em plantas de tomate com a extensão do PAA ou do PAI. Conforme observou-se na análise estatística, existe uma associação positiva entre as duas variáveis (percentual de infecção e PAA) expresso pela equação $Y = 12,289 \ln(x) + 18,189$. O elevado coeficiente de determinação (r^2) obtido para a curva (0,9478), o qual mede a excelência do ajustamento da equação encontrada, sugere que os percentuais de infecção são explicados pela variação do PAA. Comportamento similar foi observado entre as variáveis do percentual de infecção e o PAI, cuja relação expressa pela equação $Y = 13,097 \ln(x) + 24,332$, obteve o coeficiente de determinação (r^2) de 0,9741, um pouco superior àquele resultante da análise do PAA.

A constatação de períodos curtos (15 min ou 30 min) para aquisição ou transmissão de begomovírus em tomateiro reforçam a importância de *B. tabaci* biótipo B na rápida disseminação do vírus no campo. Resultados similares aos

obtidos com o GO-ANPL foram relatados para begomovírus que infetam algodão, tomate e cucurbitáceas em outros países (Cohen *et al.*, 1983; Metha *et al.*, 1994b; Nateshan *et al.*, 1996; Idris & Brown, 1998). Os percentuais de infecção correspondentes aos tempos mínimos para aquisição ou transmissão dos begomovírus, porém, variam bastante com a espécie ou mesmo com o isolado viral envolvido. Segundo Duffus (1996), os begomovírus diferem entre si, em suas relações de aquisição e persistência na mosca branca, e podem diferir em outras características de interações com o inseto vetor.

O período de latência do GO-ANPL em *B. tabaci* biótipo B de 16 h, aproxima-se ao de outros begomovírus como o TYLCV, isolado da Jordânia, que foi de 20 h (Mansour & Al-Musa, 1992) e do SCLV, que foi de 19 h (Coehn *et al.*, 1983) com 15 a 20 insetos (*B. tabaci* biótipo A) por planta. Período de latência inferior ao GO-ANPL, porém, foi relatado para o ToLCV-Ban 4 (6 h) com cinco insetos/planta (Muniyappa *et al.*, 2000).

Os dados obtidos com as variáveis estudadas na relação do GO-ANPL com a *B. tabaci* biótipo B, evidenciando a maior eficiência na transmissão do begomovírus com o aumento do PAA ou do PAI e um PL de 16 h, estão de acordo com a modalidade de transmissão do tipo circulativa (Costa, 1976; Rossell *et al.*, 1999).

A detecção do GO-ANPL foi registrada em todos os ínstars do vetor desenvolvidos em planta infetada, tendo sido maior o percentual de detecção do vírus nos últimos estágios ninfais. Estes dados diferem daqueles obtidos por Polston *et al.* (1990) para o SLCV, nos quais o DNA viral foi detectado em apenas uma ninfa de *B. tabaci* biótipo A dentre as 196 testadas individualmente e em nenhuma das 335 ninfas testadas em grupos de cinco a dez pelos autores. Segundo Lastra (1993), ainda que as ninfas de mosca branca possam adquirir o vírus alimentando-se em planta infetada, o seu hábito sésil as impedem de ter algum papel na transmissão do vírus do ponto de vista epidemiológico. Contudo, contrariando o que afirma esse autor, a participação das ninfas na aquisição do GO-ANPL e a conseqüente passagem transestadial do vírus para o adulto, revela a importância das ninfas na epidemiologia da virose, uma vez que adultos emergindo de "pupas" desenvolvidas em plantas infetadas, mesmo sob baixa população, podem disseminar vírus em uma plantação. Elevados níveis de transmissão de vírus em tomateiro associados a baixo número de moscas brancas no campo foram anteriormente relatados (Lima *et al.*, 2001).

O GO-ANPL não foi detectado em nenhuma das amostras constituídas de grupos de 20 ovos coletados após cinco a sete dias da oviposição realizada por fêmeas avirulíferas de *B. tabaci* biótipo B em planta infetada. Este resultado indica que não ocorre a passagem do vírus juntamente com a água veiculada para os ovos através de pedicelos ou hastes. Observação semelhante foi realizada por Ghanim *et al.* (1998) em ensaios realizados para o TYLCV. Segundo Weber, citado por Byrne & Bellows (1991), a água presente na folha passa osmoticamente através de uma massa coloidal e entra no ovo de *Trialeurodes vaporariorum* Westwood através do pedicelo.

autores citam ainda que Gameel, em 1974, relatou um processo similar ocorrendo com *B. tabaci* biótipo A e que outras pesquisas têm sugerido que aleirodídeos usam o pedicelo como forma de absorver a água.

Por meio da PCR foi possível detectar o GO-ANPL em adultos com PAA de 30 min a 24 h em planta infetada, observando-se um aumento no percentual de detecção com o aumento do tempo para a aquisição do vírus. A não detecção do vírus nos adultos com PAA de 15 min pode ter sido em razão do baixo número de amostras testadas, uma vez que com esse tempo de alimentação, a transmissão do vírus do inseto para mudas de tomateiro ocorreu em 6% dos casos. Resultados semelhantes a estes foram observados por Muniyappa *et al.* (2000) para o ToLCV, em que o DNA viral foi amplificado a partir de insetos com PAA de 30 min, mas não daqueles com PAA de 15 min. Em ensaios com fêmeas individuais que tiveram um PAA contínuo de 24 h em tomateiro infetado com o GO-ANPL, o vírus foi detectado em 63% dos casos, indicando que é possível que ocorra variação na capacidade de aquisição de DNA viral entre fêmeas de mosca branca. Oscilações similares no percentual de detecção viral em indivíduos com diferentes PAAs foram relatadas anteriormente por Rossell *et al.* (1999) e Polston *et al.* (1990).

Na relação GO-ANPL e *B. tabaci* biótipo B, a passagem transtadial foi detectada em todos os adultos emergentes testados sugerindo que, nessa relação, a retenção do vírus após a última ecdise ocorre com elevada frequência. Estes resultados diferem daqueles obtidos por Polston *et al.* (1990) para o SLCV, que não detectaram o begomovírus em 63 adultos de *B. tabaci* biótipo A testados, e para o CLCuV no mesmo vetor (Costa, 1976). Contudo, para alguns begomovírus de tomateiro, como o TYLCV, e de plantas daninhas a passagem transtadial em *B. tabaci* biótipo A foi também registrada (Costa, 1976). Na relação GO-ANPL com o vetor, observou-se ainda que o percentual de transmissão viral de 33% observado nos testes de transmissibilidade pelos adultos emergentes acima referidos, foi similar àquele obtido nos ensaios em que o PAA concedido às moscas brancas avirulíferas foi de 4 h em planta infetada (Tabela 1).

As informações aqui obtidas indicam que a PCR pode ser empregada em estudos epidemiológicos para a detecção da presença de begomovírus na área de plantio de tomateiro, ou em suas proximidades, a partir de moscas brancas coletadas no campo, em tomateiro ou em outras espécies vegetais.

O isolado GO-ANPL, ainda que em percentual relativamente baixo, foi constatado em todas as fases de desenvolvimento da progênie oriunda de fêmeas virulíferas, diferindo dos resultados negativos de transmissão à progênie obtidos nas investigações com o *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) (Harrison, 1985), com o *Sinaloa tomato leaf curl virus* (STLCV) (Idris & Brown, 1998) e para o SLCV (Cohen *et al.*, 1983). Neste último caso, os autores não detectaram o vírus em pelo menos 1.000 adultos de primeira geração oriundos de fêmeas virulíferas. Contudo, para o TYLCV, begomovírus de genoma monopartido, a transmissão transovariana foi registrada em percentuais bastante elevados (36-80%) em ovos, ninfas e

adultos da progênie (Ghanim *et al.*, 1998).

A não constatação da transmissão do GO-ANPL para tomateiro pelos adultos de mosca branca provenientes da progênie de fêmeas virulíferas foi baseada na ausência de infecção viral em 23 plantas de tomateiro, nas quais esses adultos permaneceram por 48 horas. Em ensaios conduzidos com o TYLCV, Ghanim *et al.* (1998) constataram uma transmissão viral de 10% obtida a partir de 50 plantas submetidas aos adultos da progênie de primeira geração de fêmeas virulíferas. Os autores observaram, no entanto, que em pelo menos um dos ensaios conduzidos com grupos de 20 plantas, nenhum tomateiro foi infetado pelo TYLCV. Diante disto, é possível imaginar que os resultados obtidos para o GO-ANPL diferissem de zero, caso o ensaio de transmissão do vírus pelos adultos da progênie tivesse sido realizado com um maior número de plantas.

A diversidade genética das espécies de begomovírus de tomateiro constatada no Brasil tem sido atribuída à presença de plantas daninhas e da mosca branca vetora no campo (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). Apesar dessa diversidade, o ToRMV, espécie com a qual o isolado GO-ANPL apresenta um relacionamento genético próximo, e o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMV) ambas recentemente descritas, têm sido as mais frequentemente encontradas na região de Minas Gerais (Zerbini *et al.*, 1996; Ambrozevicius *et al.*, 2002). De modo similar ao que se observa com os tospovírus no campo, a predominância de outros begomovírus nas demais áreas produtoras de tomate no Brasil poderá estar, provavelmente, associada às espécies de plantas daninhas (fontes de vírus) típicas ou predominantes em cada região, somada à variação na eficiência de transmissão desses begomovírus pela mosca branca. No caso dos tospovírus, o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) foi a principal espécie detectada no Distrito Federal e Paraná, o *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) a predominante em São Paulo e a *Groundnut ringspot virus* (GRSV) a mais disseminada em Pernambuco, uma distribuição que, segundo Nagata *et al.* (1995), pode ter sido resultante de uma transmissão preferencial e diferencial dos tospovírus pelo trips vetor.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a interação begomovírus-vetor é estabelecida desde a fase inicial do desenvolvimento do inseto e podem ser considerados relevantes para os estudos epidemiológicos dos begomovírus de tomateiro associados ao biótipo B de *B. tabaci* no país.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROZEVICIUS, L.P., CALEGÁRIO, R.F., FONTES, E.P.B., CARVALHO, M.G. & ZERBINI, F.M. Diversidade genética de begomovírus infetando o tomateiro e plantas daninhas no Sudeste do Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 27:372-377. 2002.
- BEZERRA, I.C., RIBEIRO, S.G., ÁVILA, A.C. & GIORDANO, L.B. Survey of geminivirus in tomato producing areas in Federal District. Resumos, 8º Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, MG. 1996. p.289.
- BROWN, J.K., FROHLICH, D.R. & ROSSEL, R.C. The

- sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annual Review of Entomology* 40:511-534. 1995.
- BROWN, J.K. The biology and molecular epidemiology of the Geminiviridae subgroup III. In: Stacey, G.E. & Keen, N.T. (Eds). *Plant-Microbe Interactions*. New York. ITP. 1997. pp.125-195.
- BYRNE, D.N. & BELLOWS JUNIOR, T.S. Whitefly biology. *Annual Review of Entomology* 36:431-457. 1991.
- COHEN, S., DUFFUS, J.E. & LIU, H. Acquisition, interference, and retention of cucurbit leaf curl viruses in whiteflies. *Phytopathology* 79:109-113. 1989.
- COHEN, S., DUFFUS, J.E., LARSEN, R.C., LIU, H. & FLOCK, R.A. Purification, serology and vector relationships of squash leaf curl virus, a whitefly-transmitted geminivirus. *Phytopathology* 73:1669-1673. 1983.
- COSTA, A.S. Whitefly-transmitted plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 14:429-449. 1976.
- DELLAPORTA, S. L., WOOD, J. & HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21. 1983.
- DUFFUS, J. E. Whitefly-borne viruses. In: Gerling, D. & Mayer, R.T. (Eds). *Bemisia 1995: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management*. Andover: Intercept 1996. pp.255-263.
- FRANÇA, F.H., VILLAS-BÔAS, G.L. & CASTELO BRANCO, M. Ocorrência de *B. argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 25:369-372. 1996.
- FARIA, J.C., BEZERRA, I.C., ZERBINI, F.M., RIBEIRO, S.G. & LIMA, M.F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 25:125-137. 2000.
- GHANIM, M., MORIN, S., ZEIDAN, M & CZOSNEK, H. Evidence for transovarial transmission of Tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology* 240:295-303. 1998.
- HARRISON, B.D. Advances in geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology* 23:55-82. 1985.
- HOROWITZ, A.R., PODOLER, H. & GERLING, D. Life table analysis of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) in cotton fields in Israel. *Acta ecologica/Oecologica Applicata* 5:221-233. 1984.
- IDRIS, A.M. & BROWN, J.K. *Sinaloa tomato leaf curl* geminivirus: biological and molecular evidence for a new subgroup III virus. *Phytopathology* 88:648-657. 1998.
- LASTRA, R. Los geminivirus: un grupo de fitovirus com características especiales. *Memorias Taller Centroamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas*. Turrialba, 1993. pp.16-19.
- LIMA, M.F., BEZERRA, I.C., RIBEIRO, S.G. & AVILA, A.C. Distribuição de geminivírus nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale do São Francisco. *Fitopatologia Brasileira* 26:81-85. 2001.
- MANSOUR, A. & AL-MUSA, A. Tomato yellow leaf curl virus: host range and virus-vector relationships. *Plant Pathology* 41:122-125. 1992.
- METHA, P., WYMAN, J.A., NAKHLA, M.K. & MAXWELL, D.P. Polymerase chain reaction detection of viruliferous *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) with two tomato-infecting geminiviruses. *Journal of Economic Entomology* 87:1285-1290. 1994a.
- METHA, P., WYMAN, J.A., NAKHLA, M. K. & MAXWELL, D.P. Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* 87:1291-1297. 1994b.
- MORIN, S., GHANIM, M; ZEIDAN, M; CZOSNEK, H; VERBEEK, M. & VAN DEN HEUVELT, F.J.M. A Groel homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl. *Virology* 256:75-84. 1999.
- MUNIYAPPA, V. VENKATESH, H. M., RAMAPPA, H. K., KULKARNI, R. S., ZEIDAN, M. TARBA, C.Y., GHANIM, M. & CZOSNEK, H. *Tomato leaf curl virus* from Bangalore (ToLCV-Band4): sequence comparison with Indian isolates, detection in plants and insects, and vector relationships. *Archives of Virology* 145:1583-1598. 2000.
- NAGATA, T., ÁVILA, A.C., TAVARES, P.C.T.M., BARBOSA, C.J., JULIATTI, F.C. & KITAJIMA, E.W. Occurrence of different tospovirus in six states of Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 20:90-95. 1995.
- 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* 128:233-244. 1996.
- PICÓ, B., DIEZ, M.J. & NUEZ, F. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II Tomato yellow leaf curl virus-a review. *Scientia Horticulturae* 67:151-196. 1996.
- POLSTON, J.E., AL-MUSA, A., PERRING, T.M. & DODDS, J.A. Association of the nucleic acid of Squash leaf curl geminivirus with the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology* 80:850-856. 1990.
- RIBEIRO, S.G., AMBROZEVÍCIUS, L.P., ÁVILA, A.C., BEZERRA, I.C., CALEGARIO, R.F., FERNANDES, J.J., LIMA, M.F., MELLO, R.N., ROCHA, H.C. & ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Archives of Virology* 148: 281-295. 2003.
- ROM, M., ANTIGNUS, Y., GIDONI, D., PILOWSKY, M. & COHEN, S. Accumulation of Tomato yellow leaf curl virus DNA in tolerant and susceptible tomato lines. *Plant Disease* 77:253-257. 1993.
- ROSSELL, R.C. TORRES-JEREZ, I. & BROWN, J.K. Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph, and honeydew. *Phytopathology* 89:239-246. 1999.
- RUBINSTEIN, G. & CZOSNEK, H. Long-term association of Tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. *Journal of General Virology* 78: 2683-2689. 1997.
- SANTOS, C.D.G., ÁVILA, A.C. & RESENDE, R.O. Determination of virus/vector interaction of a new begomovirus isolated from tomato in the State of Goiás, Brazil. *Resumos, 13º Encontro Nacional de Virologia, Águas de Lindóia, SP.2002a*. pp.151-152.
- SANTOS, C.D.G., BEZERRA, I.C., ÁVILA, A.C. & RESENDE, R.O. Occurrence of geminivirus in tomato crops in the state of Goiás. *Resumos, 10º Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, MG*. 1998. p.144.
- SANTOS, C.D.G., INOUE NAGATA, A., ÁVILA, A.C. & RESENDE, R.O. Molecular characterization of a new begomovirus isolated from tomato in the State of Goiás, Brazil. *Resumos, 13º*

Encontro Nacional de Virologia, Águas de Lindóia, SP. 2002b. p.153.
VILLAS-BÔAS, G.L., FRANÇA, F.H., NEWTON, M. & ELIAS, M.F. Predominância do biótipo B de mosca branca (*Bemisia argentifolii*) em diversos hospedeiros e regiões do Brasil. Anais, 8º Encontro Latino-americano e do Caribe Sobre Moscas Brancas e

Geminivirus, Recife, 1999. p.150.

ZERBINI, F.M., ZAMBOLIM, E.M., CARRIJO, I.V. & GILBERTSON, R.L. A new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Minas Gerais, Brazil. *Phytopathology* 86:S1. 1996 (Abstract).