

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Departamento de Fitopatologia e Nematologia**

**Teste do indutor de resistência ASM como alternativa de controle da
clorose do tomateiro causada pelo *Tomato chlorosis virus* (ToCV) e
possíveis efeitos sobre o vetor *Bemisia tabaci* biótipo B**

Michel Rudan Isaias Vargas

0111000 - Trabalho de Conclusão de Curso em
Engenharia Agronômica para a obtenção do título
de Engenheiro Agrônomo.

**Piracicaba
2016**

Michel Rudan Isaias Vargas

**Teste do indutor de resistência ASM como alternativa de controle da
clorose do tomateiro causada pelo *Tomato chlorosis virus* (ToCV) e
possíveis efeitos sobre o vetor *Bemisia tabaci* biótipo B**

Orientador:
Prof. Dr. **JORGE ALBERTO MARQUES
REZENDE**

0111000 - Trabalho de Conclusão de Curso em
Engenharia Agrônoma para a obtenção do título
de Engenheiro Agrônomo.

**Piracicaba
2016**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende, quem me apoiou e acreditou no meu potencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia e ao Laboratório de Virologia Vegetal pelo apoio e estrutura ao desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À FAPESP, processo 2014/05828-0, pela concessão de bolsa de Iniciação Científica.

Um agradecimento especial ao Dr. Pedro Javier Mansilla Córdova pelos ensinamentos aplicados durante a condução deste projeto.

Sumário

| | |
|--|-----------|
| RESUMO | 5 |
| 1. INTRODUÇÃO | 6 |
| 2. OBJETIVO | 10 |
| 3. MATERIAL & MÉTODOS | 10 |
| 3.1 Planta-teste..... | 10 |
| 3.2 Fonte de inóculo | 11 |
| 3.3 Colônia de <i>B. tabaci</i> biótipo B | 11 |
| 3.4 Transmissão do ToCV | 11 |
| 3.5 Detecção do ToCV | 11 |
| 3.5.1 Extração de RNA total..... | 11 |
| 3.5.2 RT-PCR | 12 |
| 3.6 Efeito do ASM na infecção do tomateiro pelo ToCV | 13 |
| 3.7 Efeito do ASM no comportamento de <i>B. tabaci</i> biótipo B | 14 |
| 3.7.1 Teste com livre chance de escolha | 14 |
| 3.7.2 Teste sem chance de escolha | 15 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 15 |
| 4.1 Eficácia do indutor de resistência ASM no controle do amarelão do tomateiro causada pelo ToCV. | 15 |
| 4.1.1 Severidade de sintomas..... | 15 |
| 4.1.2 Desenvolvimento dos tomateiros..... | 18 |
| 4.1.3 Peso fresco e seco das plantas | 22 |
| 4.1.4 Produtividade dos tomateiros | 23 |
| 4.2 Efeito do ASM no comportamento de <i>B. tabaci</i> biótipo B | 24 |
| 4.2.1 Teste com livre chance de escolha | 24 |
| 4.2.2 Teste sem livre chance de escolha..... | 25 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 25 |
| 6. REFERÊNCIAS | 27 |

RESUMO

Teste do indutor de resistência ASM como alternativa de controle da clorose do tomateiro causada pelo Tomato chlorosis virus (ToCV) e possíveis efeitos sobre o vetor *Bemisia tabaci* biótipo B

Em 2006 foi detectada uma nova virose na cultura do tomateiro no Brasil, causada pelo *Tomato chlorosis virus* (ToCV), que atualmente encontra-se presente em diversas regiões do país e do mundo que cultivam essa hortaliça. Pertencente ao gênero *Crinivirus*, o ToCV coloniza o floema da planta e induz uma clorose internerval das folhas basais, como principal sintoma em tomateiro. O vírus é transmitido por *Bemisia tabaci* biótipo B, com relação do tipo semi-persistente. Até o momento não são conhecidas alternativas de controle da doença, exceto a eliminação de fontes de inóculo e o uso de inseticidas para o controle do vetor. O princípio de controle baseado na imunização destina parte de seus esforços na indução de resistência de plantas à patógenos. Além de ser uma alternativa menos danosa ao ambiente, vem demonstrando importantes e positivos resultados de sua eficiência. Diante desses fatos o objetivo deste trabalho é avaliar a eficácia do indutor de resistência acibenzolar-S-methyl (ASM) no controle da clorose do tomateiro causada pelo ToCV, e verificar o efeito do ASM no comportamento do vetor *B. tabaci* biótipo B. Foram realizados três experimentos para avaliar o desenvolvimento de tomateiros sadios e infectados com o ToCV, sob a aplicação de água e ASM. Constatou-se em todos os ensaios que o ASM não protegeu os tomateiros contra a infecção com o ToCV inoculado com *B. tabaci* biótipo B. Nos dois primeiros experimentos constatou-se diferenças estatísticas significativas apenas entre tomateiros sadios e infectados com o ToCV, independente do ASM. As plantas infectadas produziram em média aproximadamente 50% menos massa fresca do que as plantas não infectadas. Já as plantas tratadas com ASM, nas concentrações de 50 e 100 mg/l, produziram massas frescas em média 38% e 43% superiores às das plantas tratadas com água e infectadas com o ToCV, respectivamente. No terceiro experimento não houve diferença significativa entre os tratamentos. A produção de frutos foi avaliada nos dois últimos experimentos. Apenas no terceiro ensaio constatou-se que as plantas infectadas produziram significativamente menor quantidade de frutos do que as plantas sadias. No entanto, as produções dos tomateiros infectados com o ToCV e tratados com concentrações diferentes de ASM não diferiram daquela dos tomateiros infectados sem o ASM. Quanto ao efeito do ASM na biologia da *B. tabaci* biótipo B, em três experimentos independentes, constatou-se que no teste com chance de escolha os insetos tiveram menor preferência por ovipositar nas plantas tratadas em relação à testemunha. Porém, o ASM não afetou o número de ninfas e a eclosão dos adultos. Nos três ensaios sem chance de escolha do vetor não houve diferença significativa entre os tratamentos para as três variáveis analisadas.

Palavras-chave: Amarelão do tomateiro; clorose internerval; mosca-branca; *Crinivirus*

1. INTRODUÇÃO

A relevância da cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) para o Brasil está bem concretizada, seja pela importância aos produtores ou pela geração de renda ao país (IBGE, 2010). Com uma área de 64.880 hectares e uma produção aproximada de 4,1 milhões de toneladas de frutos (IBGE, 2012), o Brasil atualmente encontra-se entre os 10 maiores produtores mundiais de tomate (FAO, 2013). Mas ao contrário do que possa parecer, esta cultura apresenta alguns fatores de manejo que a tornam árdua ao produtor. Entre estes, balanceamento nutricional e controle de pragas e doenças (FILGUEIRA, 2008). Sendo o último, ainda mais relevante, por conta do clima favorável e diversidade de patógenos e vetores intrínsecos às regiões produtoras desta hortícola, o que favorece o triângulo da doença (BERGAMIN FILHO et al., 1995; FILGUEIRA, 2008).

Apesar do amplo conhecimento sobre o desenvolvimento e disseminação das doenças, ainda existem fitomoléstias, dentre as quais destacam as viroses, que desproveem de técnicas efetivas e duradouras, ou são onerosas de serem aplicadas.

De modo geral, os agentes patogênicos de natureza viral utilizam-se do maquinário celular da planta para atender à replicação do vírus. Para isso, alguns aminoácidos e funções celulares (transcrição e tradução de proteínas) passam a servir aos objetivos do patógeno, impedindo a metabolização destes pelo seu hospedeiro. Logo, o vírus que infecta uma célula vegetal controla os processos de catabolismo e anabolismo da célula. Consequentemente parte dos metabólitos deixa de ser aproveitados pelas plantas gerando uma disfunção na fisiologia de “fonte e dreno” e acarretando em redução do rendimento (produtividade) e da qualidade dos frutos de tomate (BOS, 1983).

Até o ano de 2006, os vírus pertencentes aos gêneros *Tospovirus* e *Begomovirus* destacavam-se pela soma de doenças que atingiam a tomaticultura brasileira. Todavia, a partir da detecção do *Tomato chlorosis virus* (ToCV) em território nacional gerou uma nova preocupação aos tomaticultores brasileiros. A detecção do ToCV aconteceu na região de Sumaré, interior do estado de São Paulo (BARBOSA et al., 2008). O vírus coloniza o floema da planta e induz uma clorose internerval das folhas basais, como principal sintoma em tomateiro. Esta clorose é similar à deficiência de Mg, entretanto, esta é acentuada ao longo do tempo e se espalha às outras folhas da planta. Algumas folhas também exibem pontos necróticos e adquirem um aspecto quebradiço. Em razão disso há perda da área fotossintética ativa do tomateiro, decréscimo do crescimento das plantas e da produção (NAVAS-CASTILLO et al., 2000; BARBOSA et al., 2008).

O ToCV tem se tornado uma emergente fonte de preocupação para os tomaticultores de todo o mundo (LOURO et al., 2000; ACCOTO et al., 2001; SEGEV et al., 2004; TSAI et al., 2004; ALVAREZ-RUIZ et al., 2007; NAVAS-CASTILLO et al., 2011). Este vírus pertence à família *Closteroviridae* e ao gênero *Crinivirus*, consagrado por ser o gênero detentor das fitoviroses de maior ascendência na decorrente agricultura mundial (TZANETAKIS et al., 2013). O genoma do ToCV é composto por duas moléculas de RNA de fita simples, senso positivo, encapsuladas em partículas alongadas e flexuosas de 650-800 e 700-900 nm de comprimento (WINTERMANTEL et al., 2005). A sequência completa de nucleotídeos dos RNA-1 e RNA-2 do isolado brasileiro indicou alta porcentagem de identidade com isolados de ToCV do mediterrâneo (ALBUQUERQUE et al., 2013; BARBOSA et al., 2013). A magnitude desta patologia vegetal é vigorada por ser um vírus recém detectado em território nacional que rapidamente se espalhou pelas principais áreas de produção de tomate (BARBOSA et al., 2011). Então, há falta de informações detalhadas sobre a epidemiologia e maneiras eficazes de como controlar a doença causada pelo ToCV. Geralmente as principais ações contra doenças transmitidas por vetores consistem em usar cultivares resistentes, quando disponíveis, e realizar o controle dos vetores. Não há conhecimento sobre a resistência de tomateiros a esse vírus e sabe-se que os inseticidas nem sempre trazem o efeito desejado de eliminação do vetor antes da transmissão do vírus. Esses fatos acentuam a importância de se conhecer e buscar alternativas de controlar esta doença.

A transmissão do ToCV ocorre por meio de aleirodídeos, sendo *B. tabaci* biótipo A, B e Q, *Trialeurodes abutilonea* e *T. vaporariorum* os principais vetores (NAVAS-CASTILLO et al., 2000; WINTERMANTEL e WISLER, 2006; NAVAS-CASTILLO et al., 2011; FREITAS, 2012). Não há relatos de ocorrência de *T. abutilonea* no Brasil.

A relação do ToCV com *B. tabaci* biótipo B é do tipo semi-persistente. A aquisição do vírus pelo vetor ocorre após curto período de alimentação na planta infectada. Não há período de latência e a retenção do vírus no vetor é de 2-3 dias (WINTERMANTEL e WISLER, 2006).

De acordo com estudos realizados por Freitas (2012) no Brasil, após determinar os períodos de acesso a aquisição e de inoculação do ToCV por *B. tabaci* biótipo B, observou-se uma eficiência de transmissão do ToCV de 15% após 5 min de alimentação para a aquisição do vírus; 40% de transmissão após 1 h de aquisição; 100% após 24 h de aquisição. Freitas (2012) ainda demonstrou a eficiência de *T. vaporariorum*

na transmissão experimental do ToCV no Brasil. A proporção de 40 insetos infectivos por planta de tomate resultou em uma eficiência de transmissão de 57,7 %. Estes resultados convergiram a outros obtidos em estudos realizados na América do Norte (WINTERMANTEL e WISLER, 2006), demonstrando que *T. vaporariorum* é o vetor, dentre os vetores do ToCV, de menor eficiência.

Atualmente, o princípio de controle baseado na imunização destina parte de seus esforços na indução de resistência de plantas a patógenos. Ao contrário dos métodos clássicos de controle, como a aplicação de defensivos, a indução de resistência não resulta em problemas secundários, tais como a ressurgência de pragas alvos, seleção de pragas resistentes e contaminação do ambiente agrícola (GRAVENA et al., 1994). Os métodos de imunização passam, quase que, intangíveis a estes aspectos. Apesar da indução de resistência ser bem conceituada, descrita e provada desde longa data (CHESTER, 1933), apenas recentemente teve seu afincamento prático elevado a sua viabilidade no controle de doenças (GORLACH et al., 1996; INBAR et al., 1998; PARADELA et al., 2001; GUZZO et al., 2001).

Mesmo não possuindo um sistema imunológico propriamente dito, como os vertebrados superiores, as plantas possuem uma gama de mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos contra patógenos (PASCHOLATI e LEITE, 1995), que por sua vez podem ser desencadeados por eliciadores bióticos ou abióticos. (HUTCHESON, 1998; VALLAD e GOODMAN, 2004). A ativação destes mecanismos de defesa ocorre por meio de respostas metabólicas aos diferentes estresses sofridos pela planta (MARTE et al., 1993; MEERA et al., 1995; KOSAKA et al., 2001). Além das respostas naturais ao ambiente (estresses bióticos e abióticos), as plantas podem ser induzidas artificialmente por meio de produtos químicos que venham a agir como eliciadores de indução à resistência (OOSTENDORP et al., 2001; FAIZE et al., 2004). A indução não provoca o surgimento da resistência nos organismos isentos dessa, mas sim, os mecanismos latentes que passam a se expressar em resposta aos ativadores corretos (VAN LOON et al., 1994), de modo que esta resistência provoque um atraso ou evite a entrada e a subsequente atividade patogênica sobre o tecido vegetal (PASCHOLATI e LEITE, 1995).

O ácido jasmônico (AJ) é um hormônio vegetal que junto a seus derivados são naturalmente distribuídos nos tecidos vegetais, desempenhando importantes funções fisiológicas (BOSTOCK, 1999; VIEIRA et al., 2010). Juntamente com o papel anatômico-fisiológico, como alongamento de raízes, inibição ao crescimento vegetal, indução a

senescência, quebra de dormência em sementes, etc. (KODA, 1992; VIEIRA et al., 2010), o AJ é produzido nas plantas em reação às injúrias ou patógenos (STICHER et al., 1997; KOZLOWISKI et al., 1999; CORTÊS, 2000). Com isso, o AJ pode apresentar funções hormonais e de defesa contra fitopatógenos e insetos (STICHER et al., 1997, GUIMARÃES et al., 2008). Muitos estudos demonstraram a importância do AJ na resposta de defesa das plantas contra agentes patogênicos (BOSTOCK, 1999; MAUCHMANI et al., 1998; GUIMARÃES et al., 2008). Em tomateiros, aplicações exógenas de AJ ativam genes que transcrevem enzimas relacionadas à defesa, peroxidases, polifenoloxidasas e lipoxigenases (CIPOLLINI e REDMAN, 1999; STOUT et al., 1998; THALER, 1999).

Entre os mecanismos bioquímicos de defesa, o ácido salicílico (AS) é um dos mais relevantes e representa um dos mais primitivos, dentre os compostos vegetais. Como hormônio em plantas, o AS induz a produção de enzimas relacionadas à resistência e fitoalexinas (BONALDO et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2005). O uso exógeno de AS nas plantas acarreta aumento da concentração deste hormônio nos tecidos vegetais (REPKA et al., 2001), concomitantemente à produção de proteínas relacionadas aos processos bioquímicos de defesa. No entanto, o AS possui um grande potencial de fitotoxidez a grande parte das fanerógamas de importância agrônômica quando utilizado como um indutor de resistência exógeno (REGLINSKI et al., 1994; THALER et al., 2002). Logo, a utilidade comercial do AS como protetor fica comprometida.

O acibenzolar-S-methyl (ASM), do grupo Benzotiadiazol, demonstrou ser um composto químico com grande potencial de indução de resistência em plantas às moléstias vegetais (GORLACH et al., 1996). Este grupo químico revelou ter correlação entre sua atividade de induzir resistência e a sua estrutura molecular, de modo que a presença do grupo éster é inerente à eficácia dos compostos derivados do Benzotiadiazol. Além disso, a atividade da planta sob o tratamento do composto é inversamente proporcional ao peso molecular do derivado de carboxilato, presente no ASM por meio da estrutura 7-carboxilato (KUNZ et al., 1997)

Em contraste aos defensivos químicos corriqueiros, o ASM proporciona uma interessante vantagem, por não apresentar interação direta com os patógenos, não causa toxidez, atividade ou resíduos antimicrobianos. Em razão disso não há seleção de patógenos resistentes (RUESS et al., 1995). Somado a tal fato, os impactos ambientais que o ASM possa causar são praticamente nulos: (DL50 oral em ratos > 2.000 mg/kg) e ausência de efeitos carcinogênico, mutagênico ou teratogênico (RUESS et al., 1996).

No âmbito prático da experimentação, o ASM promoveu consideráveis resultados na indução de resistência em tomateiros a alguns de seus patógenos: murcha-bacteriana (ARAUJO et al., 2005), *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (BAYSAL et al., 2003), *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria (CAVALCANTI et al., 2006) e outros complexos bacterianos (PARADELA et al., 2001; ANDRADE et al., 2013).

Para a área de virologia vegetal, o uso do ASM é pouco expressivo, mesmo assim este apresentou respostas consideráveis, como a redução de sintomas em cultivares de tomate infectado por *Tomato spotted wilt virus* (TWSV) (PAPPU et al., 2000; SANTIN, 2012) e diminuição expressiva na concentração do *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV), pertencente ao mesmo gênero do ToCV (crinivirus), nos floemas de meloeiro (*Cucumis melo*). Neste último, a indução de genes ligados aos processos de defesa da planta também foi detectada (TAKESHITA et al., 2013).

Ao lado dos resultados obtidos pelo uso do ASM sobre as doenças, outro ponto deve ser destacado, a interação deste indutor com o vetor do ToCV. Plantas de pepineiro (*Cucumis sativus*) tratadas com ASM foram preteridas para oviposição de *B. tabaci* em contraponto às plantas controles. Houve ainda uma elevada taxa da inviabilidade de ovos depositados sobre as plantas tratadas, assim como uma significativa taxa de mortalidade de ninfas (CORREA et al., 2005). Estes dados apenas reforçam outro resultado obtido na Europa, onde o ASM também apresentou um efeito negativo sobre *B. tabaci* biótipo B em plantas de tomateiro (PASCUAL et al., 2003).

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é avaliar a eficácia do indutor de resistência ASM no controle da clorose do tomateiro causada pelo ToCV e no comportamento do vetor *B. tabaci* biótipo B.

3. MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Planta-teste

Para este experimento foram utilizadas plantas de tomate do Grupo Santa Cruz, variedade Kadá. A semeadura foi feita em bandejas de poliestireno preenchidas com substrato comercial Plantmax®. Após o surgimento das primeiras folhas verdadeiras, as plântulas foram transplantadas para vasos esterilizados, contendo

substrato composto por terra, areia e matéria orgânica. Para cada vaso foi transplantada uma planta-teste, que por sua vez foi conduzida em haste única estaqueada. As plantas foram irrigadas diariamente e adubadas semanalmente. A adubação foi diluída em água de irrigação, com a formulação 10-10-10 de NPK.

3.2 Fonte de inóculo

O isolado do ToCV utilizado neste experimento foi obtido de um tomateiro do grupo Santa Cruz proveniente do município de Sumaré – SP. Esta fonte de inóculo foi mantida em tomateiros, em gaiolas à prova de insetos, na área experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, ESALQ/USP.

3.3 Colônia de *B. tabaci* biótipo B

As colônias de *B. tabaci* biótipo B livres de vírus foram mantidas em plantas de couve (*Brassica oleraceae* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.) conduzidas em telado à prova de insetos, no Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP.

3.4 Transmissão do ToCV

O vírus foi transmitido por meio de adultos de *B. tabaci* biótipo B manipulados e coletados por aspirador entomológico. Para o processo de aquisição do vírus, insetos foram acondicionados em tubos Falcon de 50 ml contendo uma ou duas folhas sintomáticas de tomateiro, comprovadamente infectado com o ToCV. Após 24 h de acesso à fonte de inóculo, os vetores foram transferidos às plantas-testes a serem inoculadas e mantidos por um período de 24 h. Os insetos foram eliminados através de inseticidas de contato e ingestão do grupo cetoenol.

3.5 Detecção do ToCV

3.5.1 Extração de RNA total

Para a confirmação da infecção das plantas com o ToCV foi realizada análise de RT-PCR. O RNA total foi extraído usando-se o protocolo Trizol® LS (Invitrogen). Três discos foliares foram amostrados em micro tubos de 1,5 ml, macerados com o auxílio de nitrogênio líquido e pistilo, seguida da adição de 1 ml de Trizol®. Após agitação vigorosa os micro tubos foram incubados por 5 min à temperatura ambiente. A esta

mistura foi acrescido 0,2 ml de clorofórmio. Uma leve agitação manual foi feita e os micro tubos foram novamente incubados por 5 min à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.000 g (10.900 rpm) por 15 min a 4° C. O sobrenadante foi retirado com cuidado e acondicionado em um novo micro tubo contendo 0,5 ml de isopropanol gelado. Esta solução foi incubada à temperatura ambiente por 15 min e centrifugada em seguida por 10 min a 12.000 g (10.900 rpm) a 4° C, gerando a precipitação do RNA. A parte líquida foi descartada e ao precipitado foi adicionado 1 ml de etanol 75%, seguida de uma rápida agitação em vórtex e centrifugação a 7.500g (8.600 rpm) por 5 min a 4° C. Ao final, o precipitado de RNA, após seco à temperatura ambiente, foi diluído em 20 µl de água tratada com 0,1 % de Dietilpirocarbonato (DEPC).

3.5.2 RT-PCR

A detecção do ToCV foi feita por Nested RT-PCR a partir do RNA viral total extraído das amostras. Como etapa inicial da RT-PCR, adicionaram-se 7 µl de água tratada com 0,1% DEPC, 1 µl do primer (anti-senso) HS12 (5'-CC(G/T)CCACCAAA(A/G)TCGTA-3') [20 mMol] (DOVAS et al., 2002) e 3 µl do RNA extraído das folhas do tomateiro em um micro tubo de 1,5 ml. Essa mistura foi acondicionada em termociclador por 5 min a 65° C e posteriormente em gelo por 4 min. Após o resfriamento das amostras, foram adicionados 5 µl de solução tampão (M-MLV RT), 1 µl de dNTPs [10 mM] e 1 µl da enzima M-MLV. Esta mistura foi incubada em termociclador em uma sequência de 37° C por 50 min, 70° C por 15 min e a 4° C ao final, resultando em moléculas de cDNA.

Para a primeira reação de PCR foram utilizados para cada amostra a ser analisada 15,3 µl de água destilada tratada com DEPC, 2,5 µl de tampão 10x da enzima Taq DNA polimerase, 0,8 µl de MgCl₂ [50 mM], 1,5 µl de dNTPs [10 mM], 3 µl do cDNA, 0,8 µl do primer (senso) HS11 (5'-GG(G/T)TT(A/G)GA(G/T)TT(C/T)GGTACTAC-3') [20 mMol], 0,8 µl do primer HS12 (5'-CC(G/T)CCACCAAA(A/G)TCGTA-3') e 0,3 µl da enzima Taq DNA polimerase. Em termociclador essa solução foi aquecida a 94°C por 3 min e posteriormente submetida a 35 ciclos de 94°C por 30 s, 49°C por 40 s, 72°C por 50 s e uma temperatura final de 72°C por 10 min.

Para a segunda etapa de PCR foram utilizados os mesmos reagentes da primeira reação com a substituição dos primers HS11 e HS12 por Toc5 (senso) (5'-GGTTTGGATTTTGGTACTACAT TCAGT-3') [20 mM] e Toc6 (anti-senso) (5'-

AAACTGCCTGCATGAAAAGTCTC-3') [20 mM] (DOVAS et al., 2002). Estes primers, na proporção 0,8 µl, acrescidos de 3 µl do produto da primeira reação foram incubados em termociclador sob o regime de uma temperatura inicial de 95°C por 1 min mais 40 ciclos de 95°C por 20 s, 60°C por 15 s, 72°C por 10 s e uma temperatura final de 72°C por 2 min.

O DNA foi corado por SYBR® Safe e separado por eletroforese em gel de agarose 1% por 55 min a 60 A. Os fragmentos amplificados de aproximadamente 463 pb do genoma do ToCV foram visualizados em transiluminador de luz UV e as imagens foram arquivadas. A confirmação da identidade do vírus foi feita através do sequenciamento de nucleotídeos do gene amplificado, obtido na empresa Macrogen, Coréia do Sul.

3.6 Efeito do ASM na infecção do tomateiro pelo ToCV

Tomateiros com aproximadamente 15 cm de altura foram pulverizados com ASM diluído em água em duas concentrações diferentes: 50 mg/L p.c. (segundo o fabricante) e 100 mg/L p.c. (PASCUAL et al., 2003). O outro tratamento constituiu em pulverizações de água sobre as plantas (controle). As aplicações dos tratamentos foram feitas via pulverizadores portáteis até o ponto de escorrimento da solução nas plantas. Ao todo foram realizadas 2 aplicações, com um intervalo de 1 semana entre elas.

A transmissão do vírus foi realizada 3 dias após a primeira aplicação dos tratamentos. As plantas foram transferidas para uma gaiola, para a inoculação do ToCV com *B. tabaci* biótipo B. Foram usadas 5 plantas para cada tratamento (ASM e H₂O) distribuídas ao acaso. Insetos virulíferos foram liberados no interior da gaiola na proporção de 20-30 adultos por planta, totalizando 300-450 indivíduos. As plantas foram agitadas periodicamente para movimentação e melhor distribuição dos insetos sobre elas. Após 24 h as plantas foram pulverizadas com inseticida, do grupo cetoenol, para a eliminação dos insetos. Em outra gaiola, à prova de insetos, 15 plantas sadias foram mantidas. Essas plantas receberam os mesmos tratamentos (ASM e H₂O) e concentrações, entretanto não houve inoculação do vírus. Deste modo, estas plantas não infectadas serviram como controle para avaliação de desenvolvimento.

Durante a condução do experimento foi avaliado semanalmente o desenvolvimento das plantas quanto à expressão e a severidade dos sintomas. Como mediada de avaliação foi adotada a seguinte escala de notas: 0, sem sintomas; 1,

mosqueado amarelo; 2, < 20% da área foliar amarela; 3, 20–50% da área foliar amarela; 4, > 50% da área foliar amarela (Figura 1). A comprovação da infecção do ToCV foi realizada por RT-PCR, conforme descrito, 30 dias após a inoculação. Por fim, foi feita avaliação do desenvolvimento das plantas tomando-se a altura (ao longo do ciclo), peso fresco e peso seco da parte aérea (no final do ciclo). Em dois experimentos avaliou-se a produção.

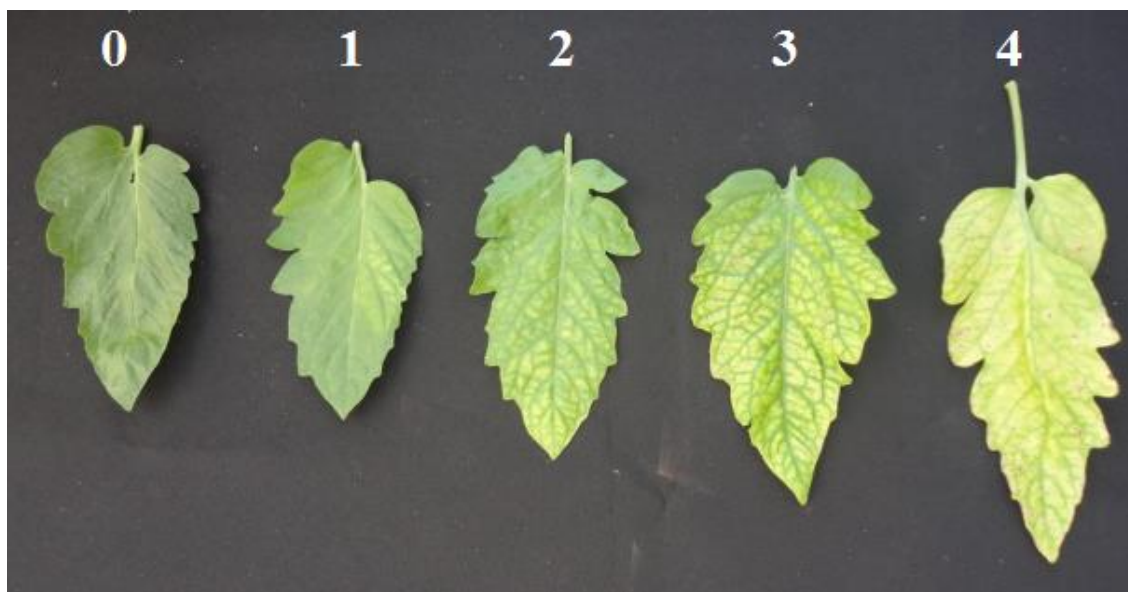


Figura 1. Escala de severidade utilizada na avaliação dos sintomas do ToCV em tomateiros: 0, sem sintomas; 1, mosqueado amarelo; 2, < 20% da área foliar amarela; 3, 20–50% da área foliar amarela; 4, > 50% da área foliar amarela.

3.7 Efeito do ASM no comportamento de *B. tabaci* biótipo B

3.7.1 Teste com livre chance de escolha

Para avaliar a possível influência do indutor de resistência sobre *B. tabaci* biótipo B foi utilizada a mesma metodologia, com algumas adaptações, utilizada por Pascual et al. (2003) e Correa et al., (2005). Foram utilizadas plantas de tomate pulverizadas com ASM, em duas concentrações diferentes (50 mg/L p.c. e 100 mg/L p.c.) e H₂O. Foram usados aleirodídeos livres de vírus. As plantas de ambos os tratamentos, em número de cinco cada, foram distribuídas ao acaso em uma gaiola a prova de insetos. Em seguida, adultos de *B. tabaci* biótipo B foram liberados na gaiola na proporção de 20-30 adultos por planta, totalizando 300-450 indivíduos. Os insetos ficaram confinados na gaiola por 48 h para a oviposição nas plantas-teste. Em seguida os insetos foram eliminados com inseticida de contato e ingestão do grupo cetoenol. Após um dia foi

efetuada a contagem dos ovos em todas as folhas do tomateiro com o auxílio de uma lente de aumento. Dentre as folhas ovipositadas, algumas foram amostradas para o acompanhamento de ninfas após 18 dias da eclosão dos ovos. Deste modo foi possível averiguar a preferência por oviposição de *B. tabaci* biótipo B entre plantas tratadas e não tratadas com ASM, além de observar a influência deste indutor sobre o desenvolvimento do inseto.

3.7.2 Teste sem chance de escolha

Apesar de muito similar ao teste proposto com livre escolha, neste experimento, as plantas dos dois tratamentos (ASM ou H₂O) foram mantidas em gaiolas separadas, com cinco plantas de cada tratamento. Adultos de *B. tabaci* biótipo B foram liberados em cada gaiola na proporção de 20-30 adultos por planta, totalizando 300-450 indivíduos por gaiola. A oviposição e o desenvolvimento de ninfas foram mensurados do mesmo modo que o teste com livre chance de escolha.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Eficácia do indutor de resistência ASM no controle do amarelão do tomateiro causada pelo ToCV.

4.1.1 Severidade de sintomas

Para os três experimentos avaliou-se inicialmente a infecção das plantas com o ToCV e a severidade da doença nas plantas de tomateiro com base na escala de notas de sintomas.

Em todos os experimentos não foi constatado o efeito do ASM na proteção das plantas de tomate contra a infecção pelo ToCV por meio da inoculação com o vetor, uma vez que todas as plantas tratadas e inoculadas, bem como as plantas controles inoculadas exibiram sintomas. A confirmação da infecção foi realizada por RT-PCR, conforme ilustrado na Figura 2. Todas as plantas não inoculadas testaram negativo na RT-PCR. Os amplicons sequenciados apresentaram identidade de 97% - 100% com isolados do ToCV depositados no GenBank (número de acesso EU868927), confirmando portanto a identidade da espécie usada nos experimentos.

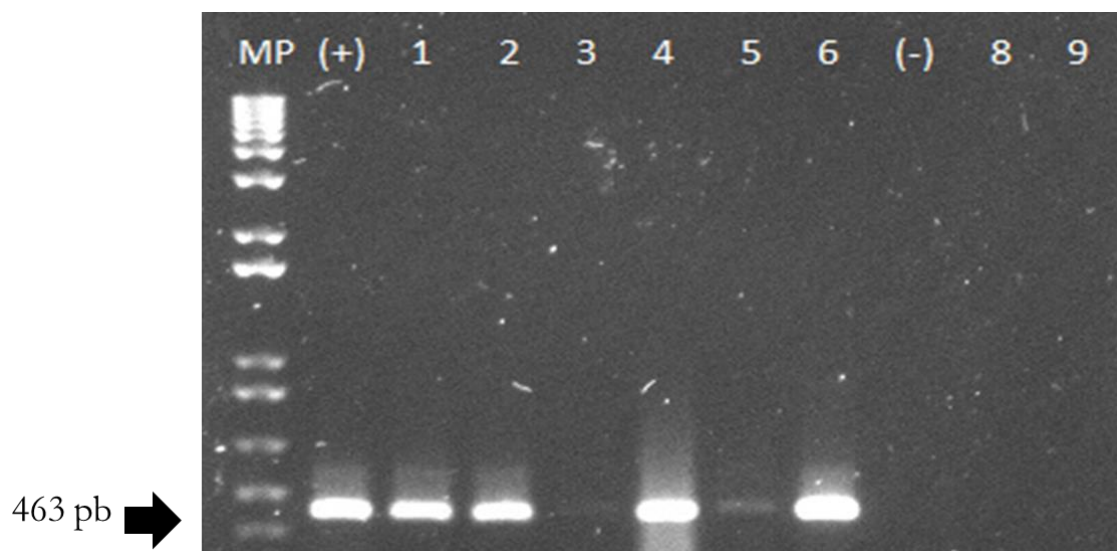


Figura 2. Detecção do ToCV em gel de agarose 1%. (MP) Marcador de peso 1 kb plus; (+) controle positivo para a presença do vírus; (-) controle negativo; (1 a 6) amostras dos tomateiros infectados; (8 a 9) amostras dos tomateiros sadios.

Nas figuras 3, 4 e 5 estão as notas médias de severidade dos sintomas no decorrer do tempo para os experimentos 1, 2 e 3 respectivamente. Os primeiros sintomas nas plantas infectadas foram identificados entre 22 e 44 dias após a inoculação.

Nos três experimentos foi observado um atraso de pelo menos uma semana na intensificação dos sintomas nas plantas tratadas com o ASM, quando comparados com aqueles das plantas não tratadas e inoculadas. Ao final das avaliações as plantas tratadas com ASM no geral exibiram sintomas menos intensos do que as plantas controles. Este atraso na intensificação da severidade dos sintomas, bem como a menor intensidade nas plantas tratadas com ASM, pode estar associado à produção de proteínas de resposta à infecção com o vírus, induzidas pelo ASM, conforme constatado por Takeshita et al. (2013) em meloeiros infectados com o crinivirus *Curcubit chlorotic yellows virus*. Pappu et al. (2000) e Santin (2012) também constataram redução dos sintomas induzidos pelo *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), do gênero *Tospovirus*, em tomateiros tratados com o ASM.

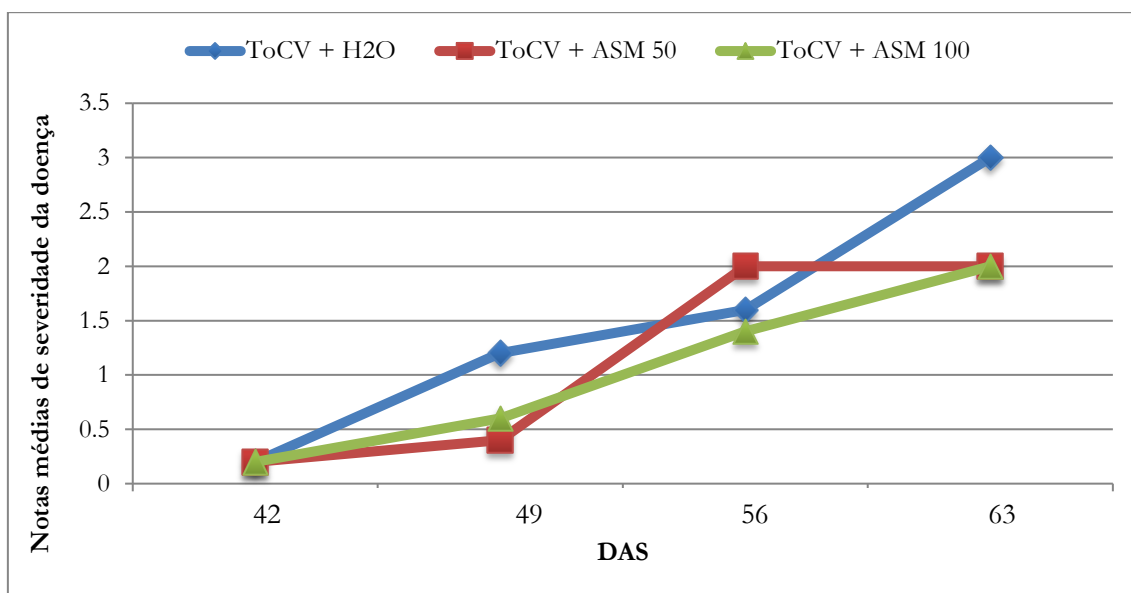


Figura 3. Evolução da severidade dos sintomas causados pelo ToCV em tomateiros em diferentes épocas após a inoculação, no primeiro experimento.

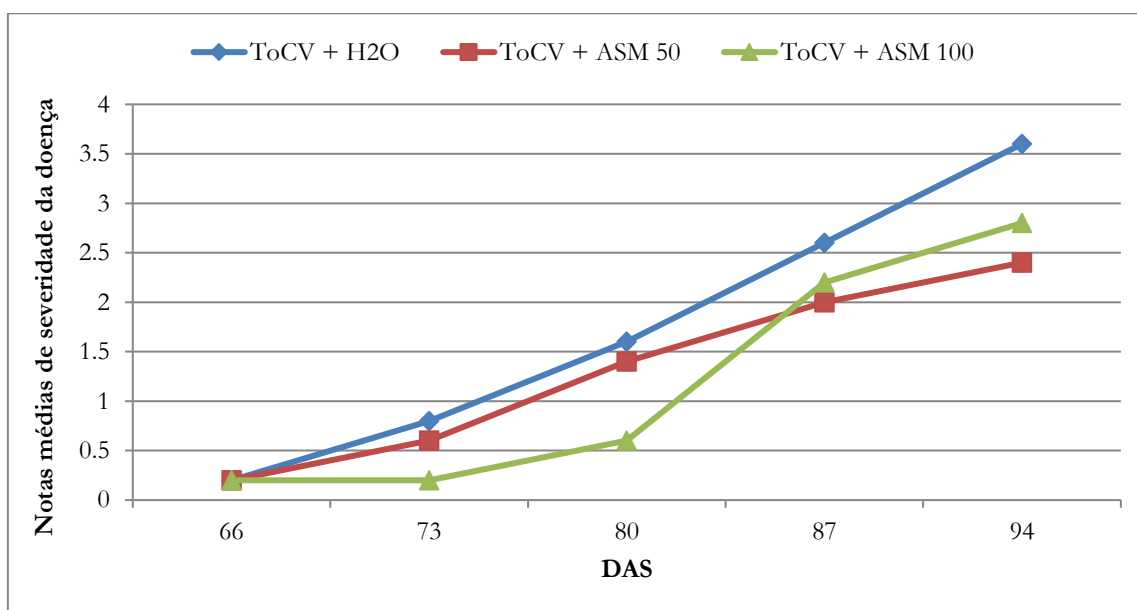


Figura 4. Evolução da severidade dos sintomas causados pelo ToCV em tomateiros em diferentes épocas após a inoculação, no segundo experimento.

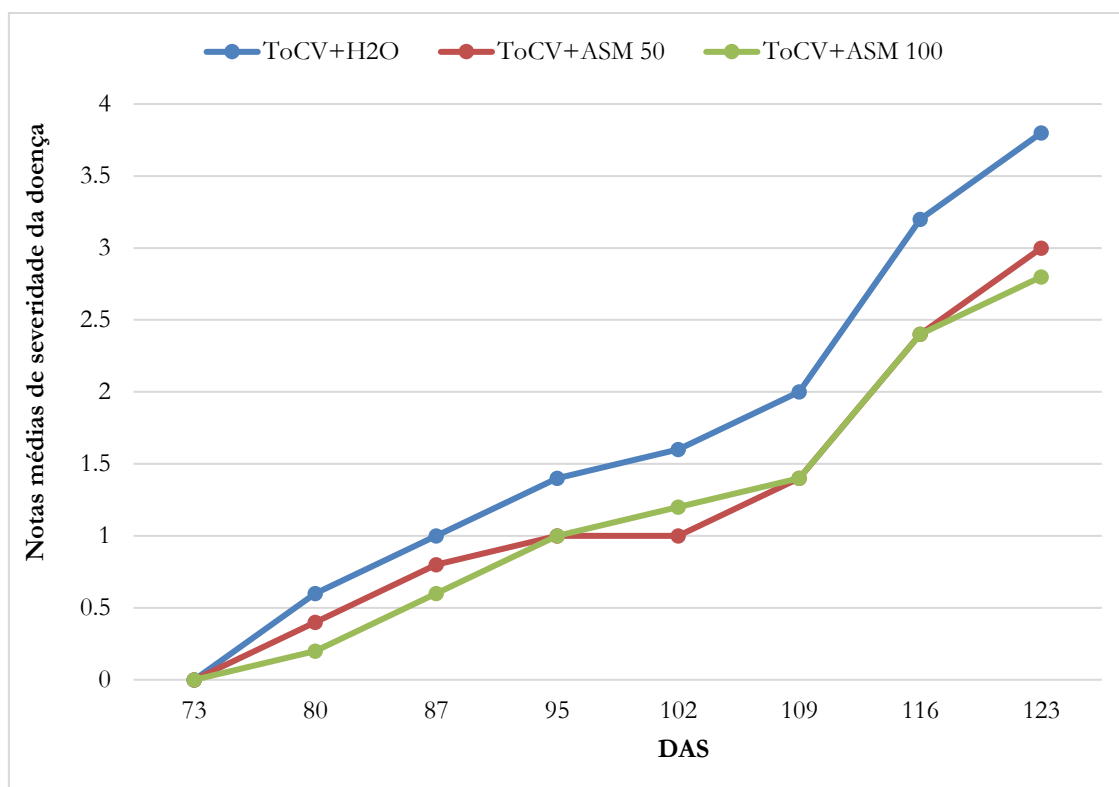


Figura 5. Evolução da severidade dos sintomas causados pelo ToCV em tomateiros em diferentes épocas após a inoculação, no terceiro experimento.

3.1.2 Desenvolvimento dos tomateiros

A figura 5 ilustra diferentes estádios de desenvolvimento de tomateiros durante um dos experimentos para a avaliação do efeito do ASM no controle do amarelão causado pelo ToCV.



Figura 6. Plantio e acompanhamento do crescimento das plantas de tomateiro em um dos experimentos.

O resultado da avaliação do desenvolvimento vegetativo das plantas de tomate tratadas com ASM em duas concentrações, quando comparado com o de plantas controles é apresentado na figura 7. Deve-se mencionar que durante o desenvolvimento desse experimento ocorreu uma incidência imprevisível e incontrolável do vírus do vira-cabeça do tomateiro (identificado por PTA-ELISA) que levou a eliminação de algumas plantas, porém sem prejuízo completo do experimento.

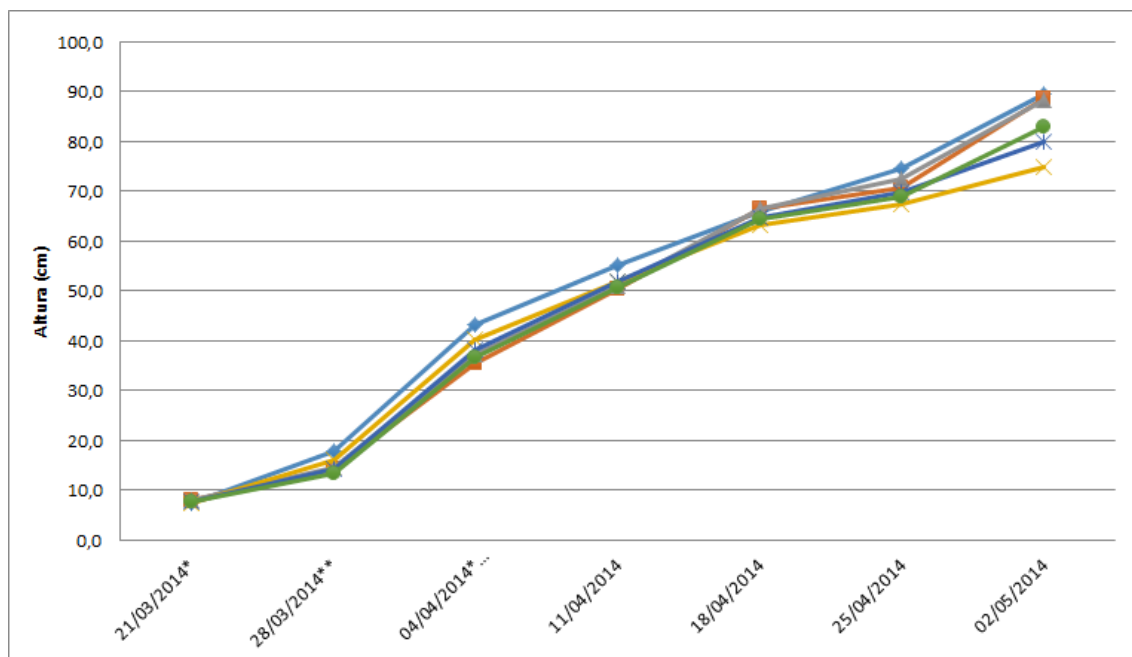


Figura 7. Crescimento vegetativo das plantas de tomate no primeiro experimento, —◆— (Sadio + H₂O); —■— (Sadio + ASM 50); —▲— (Sadio + ASM 100); —×— (ToCV + H₂O); —*— (ToCV + ASM 50); —●— (ToCV + ASM 100). *Primeira aplicação do ASM; **inoculação do vírus; ***segunda aplicação do ASM.

Com base na figura 7 é possível verificar como ocorreu o crescimento vegetativo das plantas do primeiro experimento, que abrangeu o período de 21/03/2014, quando as plantas foram transplantadas para os vasos, até 02/05/2014. A princípio, não houve grande variação entre as médias finais das alturas das plantas sob os diferentes tratamentos (desvio padrão 5,85 e coeficiente de variação 24%), não diferindo estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

O segundo experimento foi conduzido no período de 4 de abril a 15 de julho e os resultados das avaliações do desenvolvimento das plantas tratadas e não tratadas com o ASM, associado com a infecção ou não com o ToCV estão na figura 8. A distribuição dos dados referentes ao crescimento vegetativo das plantas desse experimento é semelhante ao do primeiro ensaio, no entanto o desvio padrão foi maior (14,87) e o

coeficiente de variação foi menor (22%). Consequentemente, nesse caso houve diferença estatística entre a altura das plantas infectadas e não infectadas com o ToCV, independente do tratamento com ASM, quando comparadas no dia 20/06/2014 (duas semanas antes da remoção do ápice das plantas) pelo teste de Scott-Knott a 5%. Em média as plantas não infectadas estavam 25 cm mais altas do que as plantas infectadas, o equivalente a uma redução média de 20% na altura das plantas.

Esse experimento foi conduzido por mais tempo do que o primeiro. Por conta disso fez-se necessário a remoção do ápice dos tomateiros no dia 20 de junho, a uma altura de 110 cm, sendo esta mantida até o dia 15 de julho. Isso foi feito com o intuito de controlar a altura das plantas para posterior avaliação da produção de frutos entre os diferentes tratamentos. Para tal, foram deixadas um total de cinco inflorescências por plantas, sendo os frutos colhidos e pesados quando pelo menos um fruto apresentasse sinais de coloração avermelhada (Figura 9).

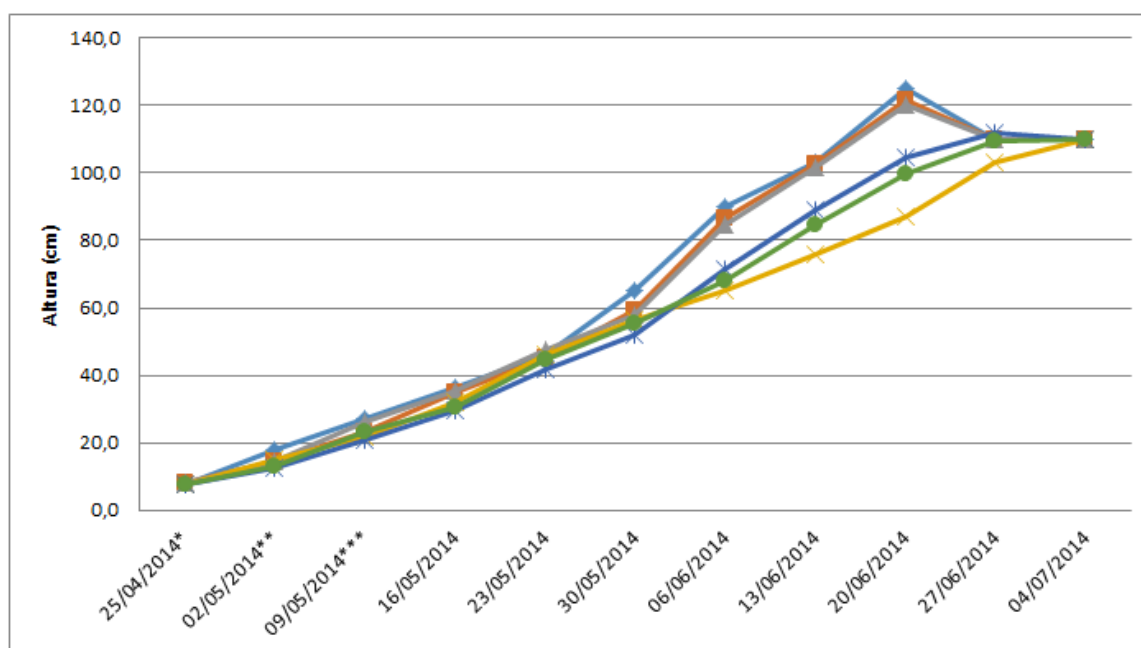


Figura 8. Crescimento vegetativo das plantas de tomate no segundo experimento, —◆— (Sadio + H₂O); —■— (Sadio + ASM 50); —▲— (Sadio + ASM 100); —×— (ToCV + H₂O); —*— (ToCV + ASM 50); —●— (ToCV + ASM 100). *Primeira aplicação do ASM; **inoculação do vírus; ***segunda aplicação do ASM.

A terceira repetição deste mesmo experimento (Figura 10) foi executada no intervalo de 25/07/2014 a 02/12/2014. Os resultados desse ensaio convergem com os dos ensaios anteriores, consolidando a observação de que a influência do ToCV foi baixa no crescimento das plantas de tomate. A nulidade de interferência do ASM sobre o ToCV,

quanto ao desenvolvimento das plantas pode estar mais associada a possível lentidão com que este crinivírus invade os tecidos vegetais, pois quando tomateiros infectados com o TSWV, um tospovírus mais agressivo, tratados com ASM apresentaram uma resposta positiva. Tomateiros infectados e tratados com ASM tiveram um maior crescimento em relação as plantas infectadas e não tratadas com ASM (SANTIN, 2012).

Assim como na segunda repetição deste experimento, também foi feita a colheita e pesagem dos frutos, seguindo os mesmos critérios pré-estabelecidos pela metodologia desse trabalho.

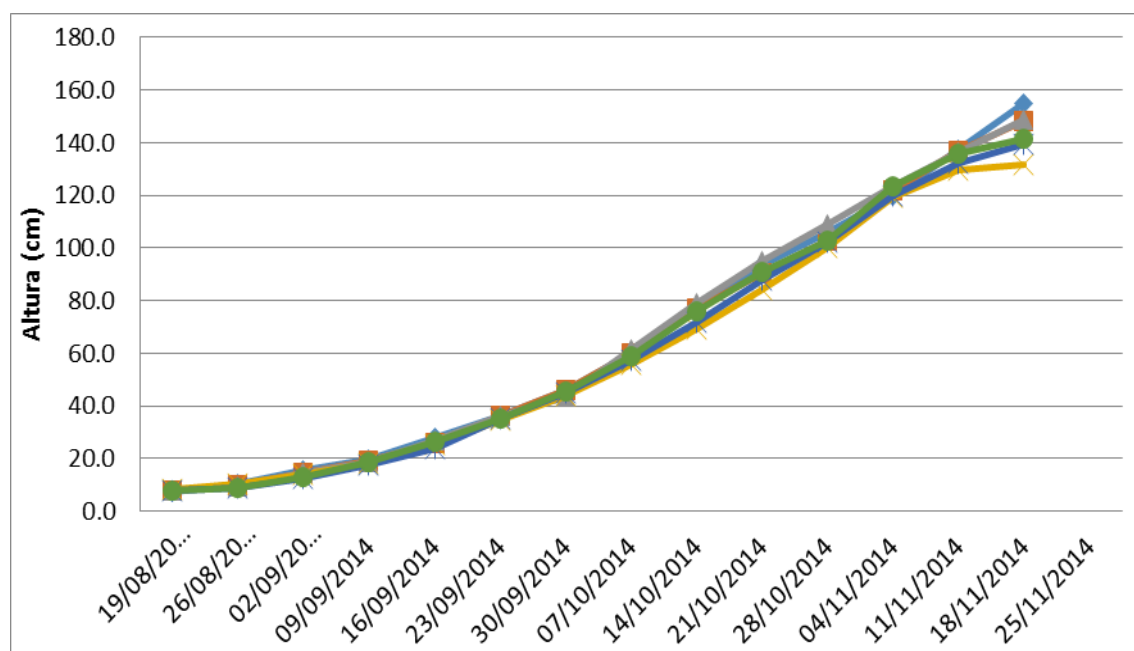


Figura 9. Crescimento vegetativo das plantas de tomate no segundo experimento, —♦— (Sadio + H₂O); —■— (Sadio + ASM 50); —▲— (Sadio + ASM 100); —x— (ToCV + H₂O); —*— (ToCV + ASM 50); —●— (ToCV + ASM 100). *Primeira aplicação do ASM; **inoculação do vírus; ***segunda aplicação do ASM.



Figura 10. Parâmetro utilizado para a colheita dos frutos.

3.1.3 Peso fresco e seco das plantas

Ao final dos experimentos todas as plantas foram individualmente cortadas ao nível do solo e pesadas. Em seguida foram acondicionadas individualmente em sacos de papel, dessecadas e pesadas novamente, para a obtenção dos pesos fresco e seco, respectivamente.

Na tabela 1 são apresentadas as médias dos pesos fresco e seco das plantas de tomate tratadas e não tratadas com ASM, com e sem infecção com o ToCV nos três experimentos. Os resultados do primeiro experimento indicam diferença estatística significativa apenas entre tomateiros sadios e infectados com o ToCV, independente do ASM. As plantas infectadas em média produziram aproximadamente 50% menos massa fresca do que as plantas não infectadas. Já as plantas tratadas com ASM, nas concentrações de 50 e 100 mg/l produziram massas frescas da ordem de 58% e 49% superiores às das plantas tratadas com água e infectadas com o ToCV, respectivamente.

Os resultados do segundo experimento seguiram os do primeiro. Tomateiros sadios, com ou sem o tratamento com ASM, no geral produziram massa fresca em média 52% superior à dos tomateiros infectados. Já as massas frescas das plantas tratadas com ASM, nas concentrações de 50 e 100 mg/l, foram 19% e 38% superiores às das plantas tratadas com água e infectadas com o ToCV, respectivamente.

No terceiro experimento não houve diferença significativa no peso fresco das plantas infectadas e tratadas com ASM em relação ao das plantas infectadas com o ToCV

sem aplicação de ASM. Em valores absolutos, no entanto, as plantas tratadas com ASM e infectadas com o ToCV apresentaram menor peso fresco.

Em conjunto esses resultados indicaram que a pulverização dos tomateiros com o ASM protegeu parcialmente o desenvolvimento das plantas contra os efeitos do ToCV.

Tabela 1. Médias dos pesos frescos e seco de tomateiros tratados e não tratados com ASM, com e sem infecção com o ToCV, em dois experimentos independentes

| Tratamentos | Peso fresco dos Tomateiros (g) | | | Peso seco dos Tomateiros (g) | | |
|-------------------------|--------------------------------|-------------|-------------|------------------------------|-------------|-------------|
| | Experimento | Experimento | Experimento | Experimento | Experimento | Experimento |
| | I | II* | III | I | II* | III* |
| Sadio +H ₂ O | 309,8 a | 1263,0 a | 3246,0 a | 56,2 a | 151,1 a | 503,8 a |
| Sadio + ASM 50 | 304,6 a | 1237,6 a | 3224,0 a | 49,8 a | 101,2 a | 524,2 a |
| Sadio + ASM 100 | 315,2 a | 1122,6 a | 3016,4 a | 51,8 a | 117,5 a | 474,6 a |
| ToCV + H ₂ O | 125,2 b | 532,2 c | 2643,2 a | 32,3 b | 109,2 a | 358,8 b |
| ToCV + ASM 50 | 198,0 b | 637,8 c | 3027,4 a | 34,4 b | 101,1 a | 352,6 b |
| ToCV + ASM 100 | 187,0 b | 735,0 b | 2898,4 a | 30,3 b | 101,7 a | 325,4 b |

As médias nas colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. * Foi aplicado o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade nas médias dos pesos frescos transformados (log(x)).

Pelo fato do ToCV causar uma doença ainda pouco conhecida e recente em território nacional (BARBOSA et al., 2008), são raros os relatos de sua interferência sobre o desenvolvimento das plantas. Entretanto, recentemente Mansilla Córdova (2015) constatou prejuízos de até 52% e 72% em frutos colhidos e peso fresco das plantas, respectivamente, dependendo do cultivar.

Outro importante resultado visto nestes experimentos foi a respeito da dosagem do ASM utilizada. O tratamento de 100 mg/l, considerado o dobro do recomendado pelo fabricante, não comprometeu o desenvolvimento das plantas tratadas, o que converge com os dados encontrados na literatura (PAPPU et al., 2000; SANTIN et al., 2012).

4.1.4 Produtividade dos tomateiros

A produtividade dos tomateiros contabilizada nos experimentos II e III (Tabela 2) não demonstrou a influência do ASM sobre as plantas infectadas com ToCV. No experimento III foi possível observar uma diferença significativa na produtividade das plantas sadias em relação as infectadas, com um valor médio de 30% superior à dos tomateiros infectados e tratados com o ASM. No entanto, quando se comparou a produção dos tomateiros tratados com ASM e infectados com o ToCV, com a daqueles infectados

sem tratamento com ASM não se observam diferenças significativas. Isto é, o ASM não parece auxiliar no incremento da produção das plantas infectadas com o vírus.

Tabela 2. Médias dos pesos dos frutos colhidos de tomateiros tratados e não tratados com ASM, com e sem infecção com o ToCV, em dois experimentos independentes

| | Peso dos tomates colhidos (g) | |
|--------------------------|-------------------------------|-----------------|
| | Experimento II | Experimento III |
| Sadio + H ₂ O | 259,1 a | 317,9 b |
| Sadio + ASM 50 | 214,6 a | 378,5 a |
| Sadio + ASM 100 | 220,9 a | 346,6 b |
| ToCV + H ₂ O | 219,2 a | 247,2 c |
| ToCV + ASM 50 | 201,1 a | 217,2 c |
| ToCV + ASM 100 | 216,9 a | 267,8 c |

As médias nas colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

4.2 Efeito do ASM no comportamento de *B. tabaci* biótipo B

4.2.1 Teste com livre chance de escolha

Nos experimentos I e III (Tabela 3) a aplicação de ASM resultou na diminuição significativa de ovos depositados nas plantas tratadas, assim como uma maior mortalidade de ninfas e adultos no experimento III e II, respectivamente. Em números absolutos, a porcentagem de ninfas eclodidas foi menor nas plantas tratadas com o ASM, independente da concentração. Esses resultados corroboram outros relatados na literatura, onde o ASM provocou uma menor oviposição de *B. tabaci* em tomateiros tratados com ASM (PASCUAL et al., 2003). A influência do ASM sobre a oviposição e desenvolvimento da mosca-branca já foi relatada antes em pepineiro e tomateiro (PASCUAL et al., 2003; CORREA et al., 2005).

Na segunda repetição deste experimento não houve influência significativa do ASM sobre o desenvolvimento da mosca-branca, apesar dos números absolutos indicarem menor oviposição, menor número de ninfas e adultos nas plantas tratadas em relação ao controle.

Tabela 3. Número médio de ovos e porcentagem de ninfas e adultos de *Bemisia tabaci* biótipo B eclodidas em tomateiros tratados e não tratados com ASM em três experimentos independentes.

| | Experimento I | | | Experimento II | | | Experimento III | | |
|---------|---------------|---------|---------|----------------|---------|---------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | H2O | ASM 50 | ASM 100 | H2O | ASM 50 | ASM 100 | H2O | ASM 50 | ASM 100 |
| Ovos | 29,8 a | 12,4 b | 13,6 b | 29,6 a | 18,0 a | 18,6 a | 33,0 a | 16,2 b | 16,8 b |
| Ninfas | 85,2% a | 60,7% a | 62,0% a | 65,7% a | 39,7% a | 43,0% a | 79,6% a ¹ | 51,0% b ¹ | 61,1% b ¹ |
| Adultos | 21,2% a | 23,7% a | 30,8% a | 49,8% a | 28,5% b | 27,1% b | 22,0% a ¹ | 23,4% a ¹ | 33,4% a ¹ |

As médias nas linhas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. * Foi aplicado o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade nas médias dos estádios de desenvolvimento de *Bemisia tabaci* biótipo B; ¹ Valores transformados (1/x) e submetidos ao teste de Scott-Knott ao nível de 1% de significância.

4.2.2 Teste sem livre chance de escolha

Para este teste não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, o que seria uma possível indicação de que o ASM não interfere diretamente na oviposição da mosca-branca, quando esta não tem chance de escolha. No entanto, frente aos resultados obtidos no teste com livre chance de escolha, o ASM parece interferir na escolha da planta para ovopositar.

Tabela 4. Número médio de indivíduos vivos de *Bemisia tabaci* biótipo B durante seu ciclo de vida em plantas de tomate tratadas e não tratadas com ASM em três experimentos independentes.

| | Experimento I | | | Experimento II | | | Experimento III | | |
|---------|---------------|---------|---------|----------------|---------|---------|-----------------|---------|---------|
| | H2O | ASM 50 | ASM 100 | H2O | ASM 50 | ASM 100 | H2O | ASM 50 | ASM 100 |
| Ovos | 13,6 a | 12,4 a | 10,2 a | 21,8 a | 16,2 a | 21,4 a | 21,0 a | 18,2 a | 16,8 a |
| Ninfas | 75,6% a | 66,8% a | 64,7% a | 74,2% a | 64,2% a | 71,8% a | 76,0% a | 55,0% b | 52,8% b |
| Adultos | 46,9% a | 36,8% a | 43,0% a | 52,1% a | 41,9% a | 44,6% a | 37,6% a | 25,4% a | 25,6% a |

As médias nas linhas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. * Foi aplicado o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade nas médias dos estádio de desenvolvimento de *Bemisia tabaci* biótipo B.

5. CONCLUSÕES

O ASM não foi capaz de impedir a infecção das plantas pelo ToCV através da inoculação com o vetor. Por outro lado, demonstrou leve indício de amenização dos sintomas e dos prejuízos trazidos pelo vírus no desenvolvimento das plantas, apesar de isso não ter refletido em ganho significativo de produtividade.

O crescimento dos tomateiros, com base no peso fresco das plantas infectadas com o ToCV, foi prejudicado em relação ao das plantas saudáveis. Esses prejuízos em média resultaram em perdas de 30% no peso fresco e produtividade.

Quanto a biologia da mosca-branca, não foi observada influência na oviposição, número de ninfas e eclosão de adultos quando os insetos foram confinados nas plantas tratadas com ASM. Entretanto, quando os insetos tiveram chance de escolha entre as plantas tratadas ou não com ASM, ocorreu maior preferência por ovopositar em plantas não tratadas. Por fim, os possíveis benefícios gerados pelo ASM aos tomateiros

devem ser avaliados sob uma perspectiva de custo/benefício, pois esse produto é de custo elevado. De tal forma que aplicações correlatas as utilizadas neste estudo incrementariam em aproximadamente R\$ 600,00 por hectare de tomateiros cultivados.

6. REFERÊNCIAS

- ACCOTTO G. P.; VAIRA A. M.; VECCHIATI M.; FINETTI SIALER M. M.; GALLITELLI D.; DAVINO M. First report of Tomato chlorosis virus in Italy. *Plant Disease*, v.85, n.11, p.1208, 2001.
- ALBUQUERQUE, L. C.; VILLANUEVA, F.; RESENDE, R. O.; NAVAS-CASTILLO, J.; BARBOSA, J. C.; INOUE-NAGATA, A. K. Molecular characterization reveals Brazilian *Tomato chlorosis virus* to be closely related to a Greek isolate. *Tropical Plant Pathology*, v. 38, n. 4, p. 332-336, 2013.
- ALVAREZ-RUIZ P.; JIMENEZ C. G.; LEYVA-LÓPEZ N. E.; MÉNDEZ-LOZANO J. First report of Tomato chlorosis virus infecting tomato crops in Sinaloa, Mexico. *Plant Pathology*, v.56, n.6, p.1043, 2007.
- ANDRADE, C. C. L.; RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. A.; SILVEIRA, P. R.; RIOS, J. A.; OLIVEIRA J. R.; MARIANO, R. L. R. Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa. *Tropical Plant Pathology*, vol. 38, n.1, jan-fev: 28-34, 2013.
- ARAUJO, F.F.; MENEZES, D.. Induction of resistance in tomato by biotic (*Bacillus subtilis*) and abiotic (Acibenzolar-S-Metil) inducers. *Summa Phytopathologica*, v.35, n.3, p.169-172, 2009
- ARAUJO, J. S. P.; GONÇALVES, K. S.; OLIVEIRA, B. C.; RIBEIRO, R. L. D.; POLIDORO, J. C. Efeito do acibenzolar-S-methyl sobre murcha-bacteriana do tomateiro. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.23, n.1, p.05-08, jan.-mar. 2005.
- BARBOSA, J. C.; COSTA, H.; GIORIA, R.; REZENDE, J. A. M. Occurrence of *Tomato chlorosis virus* in tomato crops in five Brazilian states. *Tropical Plant Pathology*, v. 36, n. 4, p. 256-258, 2011.
- BARBOSA J. C.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. B. Low Genetic Diversity Suggests a Single Introduction and Recent Spread of Tomato chlorosis virus in Brazil. *Journal of Phytopathology*, v. 161, p. 884-886, 2013.
- BARBOSA, J. C.; TEIXEIRA, A. P. M.; MOREIRA, A. G.; CAMARGO, L. E. A.; BERGAMIN FILHO, A.; KITAJIMA, E. W.; REZENDE J. A. M. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Brazil. *Plant Disease*, v.92, n.12, p.1709, 2008.
- BAYSAL, O.; SOYLU, E. M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Pathology*, v. 52, p. 747-753, 2003.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. 2011. Princípios Gerais de Controle. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de fitopatologia. 4. ed. São Paulo: Ceres, p. 307-323, v. 1.
- BONALDO, S. M., PASCHOLATI, S. F., ROMEIRO, R. S. 2005. Indução de Resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; Resende, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, p. 263.
- BOS, L. Introduction to Plant Virology.1. ed. London: Longman, 160p, 1983.
- BOSTOCK, R. M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 55, p. 99-109, 1999.
- CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; PEREIRA, R. B.; COSTA, J. C. B; CARVALHO, C. P. S. Atividade de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1721-1730, 2006.

- CAVALCANTI, L. S., BRUNELLI, K. R., STARGARLIN, J. R. 2005. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds.). Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, p. 81-124.
- CHESTER, K.S. The problem of acquired physiological immunity in plants. *The Quarterly Review of Biology*, v.8, n.3, p. 275-324, 1933.
- CIPOLLONI, D. F.; REDMAN, A. M. Age-dependet effects of jasmonic acid treatment and wind exposure on foliar oxidase activity and insect resistance in tomato. *Journal of Chemical Ecology*, New York, v. 25, n. 1, p. 271-281, 1999.
- CÓRDOVA, P. J.M. Resistência de genótipos de tomateiro à infecção com *Tomato chlorosis virus* e tolerância à doença. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.
- CORREA, R. S. B.; MORAES, J. C.; AUAD, A. M.; CARVALHO, G. A. Silicon and Acibenzolar-S-Methyl as Resistance Inducers in Cucumber, against the Whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) Biotype B. *Neotropical Entomology*, v.34, n.3, p. 429-433, 2005.
- CORTÊS, H. P. Introdução aos hormônios vegetais. Embrapa. p.131-157, 2000.
- DOVAS, C. I.; KATIS, N. I.; AVGELIS, A. V. Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 86, p. 1345-1349, 2002.
- FAIZE, M.; FAIZE, L.; KOIKE, N.; ISHIZAKA, M.; ISHII, H. Acibenzolar-S-methyl-induced resistance to Japanese pear scab is associated with potentiation of multiple defense responses. *Phytopathology*, v. 94, p. 604-612, 2004.
- FAO. FAOSTAT. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 07 fev. 2016.
- FILGUEIRA, F. A. R.. Novo Manual de Olericultura – Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3ª ed. Minas Gerais, Viçosa, UFV, p. 421, 2008.
- FREITAS, Debora Maria Sansini. *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato chlorosis virus* (ToCV): relações com a *Bemisia tabaci* biótipo B e eficiência de um inseticida no controle da transmissão do ToSRV. 2012. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-25102012-083603/>>. Acesso em: 2013-11-22.
- GORLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUFBEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K.H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell*, v.8, p.629-643, 1996.
- GRAVENA, S.; BENETOLI, I.; MOREIRA, P. H. R.; YAMAMOTO, P. T. Euseius citrifolius Denmark & Muma predation on citrus leprosis mite *Brevipalpus phoenicis* (Gejsskes) (Acari: Phytoseiidae: tenuipalpidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 23, n. 2, p. 209-218, 1994.
- GUIMARÃES, L. M. P.; PEDROSA, E. M. R.; COELHO, R. S. B.; MARANHÃO, S. R. V. L.; CHAVES, A.; MIRANDA, T. L. Effect of methyl jasmonate and potassium silicate on the parasitism of *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus zeae* in sugarcane. *Nematologia Brasileira*, v. 32, n. 1, p. 50-55, 2008.
- GUZZO, S.D.; CASTRO, R.M. de; KIDA, K.; MARTINS E.M.F. AÇÃO PROTETORA DO ACIBENZOLAR-S-METHYL EM PLANTAS DE CAFEEIRO CONTRA FERRUGEM. Arquivos do Instituto Biologia, São Paulo, v.68, n. 1, p. 89-94, jan./jun., 2001.
- HUTCHESON, S. W. Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology*, v. 36, p. 59-90, 1998.

- IBGE; Produção agrícola municipal, Rio de Janeiro, v. 37, p.1-91, 2010.
- IBGE; Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Rio de Janeiro v.25, n.02, p.1-88 fev.2012.
- INBAR, M.; DOOSTDAR, H.; SONODA, R. M.; LEIBEE, G. L.; MAYER, R. T. Elicitors of plant defensive systems reduce insect densities disease incidence. *Journal of Chemical Ecology*, v. 24, n.1, p. 135-148, 1998.
- KATAYA A. R. A.; STAVRIDOU, E.; FARHAN, K.; LIVIERATOS, I. C. Nucleotide sequence analysis and detection of a Greek isolate of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Pathology*, v. 57, p. 819-824, 2008.
- KODA, Y. The role of the jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. *International Review of Cytology*, v. 135, p.155-199, 1992.
- KOSAKA, H.; AIKAWA, T.; OGURA, N.; TABATA, K.; KIYOHARA, T. Pine wilt disease caused by the pine wood nematode: The induced resistance of pine trees by the avirulent isolates of nematode. *European Journal of Plant Pathology*, v. 107, p. 667-675, 2001.
- KOZLOWISKI, G.; BUCHALA, A.; METRAUX, J. P. Methyl jasmonate protects Norway SPRUCE [*Picea abies* (L.) Karst.] seedlings against *Pythium ultimum* Trow. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 55, n. 1, p. 53-58, 1999.
- KUNZ W.; SCHULTER R.; MAETZKE T. The chemistry of benzothiadiazole plant activators. *Pesticide Science*, v. 50, n.4, p.275-282, 1997.
- LOURENÇÃO, A. L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. *Bragantia*, Campinas, v. 53, p. 53-59, 1994.
- LOURENÇÃO, A. L.; ALVES, A. C.; FUGI, C. G. Q.; MATOS, E. S. Outbreaks of *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Hemiptera: Aleyrodidae) under Field Conditions in the State of São Paulo, Brazil. *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 37, n. 1, p. 89-91, 2008.
- LIMA, L. H. C.; MORETZOHN, M. C.; OLIVEIRA, M. R. V. Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 23, p. 1-5, 2000.
- LOURO, D.; ACCOTTO, G. P.; VAIRA, A. M. Occurrence and Diagnosis of *Tomato chlorosis virus* in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, v.106, n.6, p. 589-592, 2000.
- LOZANO, G., MORIONES, E., NAVAS-CASTILLO, J. Complete nucleotide sequence of the RNA2 of the crinivirus *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology*, v. 151, p. 581-587, 2006.
- LOZANO, G., MORIONES, E., NAVAS-CASTILLO, J. Complete sequence of the RNA1 of a European isolate of Tomato chlorosis virus. *Arch. Virol*, v.152, p.839-841, 2007.
- MARTE, M.; BUONAURO, R.; TORRE, G.; DELLA TORRE, G. Induction of systemic resistance to tobacco powdery mildew by *tobacco mosaic virus*, *tobacco necrosis virus* or ethephon. *Journal of Phytopathology*, v. 138, p. 137-144, 1993.
- MAUCH-MANI, B.; METRAUX, J. P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to plant pathogen attack. *Annals of Botany*, London, v. 82, n. 5, p. 535-540, 1998.
- MEERA, M. ; SHIVANNA, M. B.; KAGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. Persistence of induced systemic resistance in cucumber in relation to root colonization by plant-growth promoting fungal isolates. *Crop Protection*, v. 14, p. 123-130, 1995.

- NASCIMENTO, A. R.; FERNANDES, P. M.; SILVA, E. A.; ROCHA, M. R. FONTES DE FOSFITO E ACIBENZOLAR-S-METIL NO CONTROLE DE DOENÇAS E PRODUTIVIDADE DO TOMATEIRO. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 24, n. 1, p. 53-59, 2008.
- NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S. Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies. *Annual Review of Phytopathology*, v. 49, p. 219-248, 2011.
- NAVAS-CASTILLO, J., MORIONES, E., 2000. ToCV: a new threat to European horticulture. In: *European Whitefly Studies Network Newsletter*, n. 3, John Innes Centre, Norwich, GB.
- Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação, FAO. Disponível em: FAOSTAT. 2011 <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>, Consultado em 15/nov/2013.
- OOSTENDORP, M.; KUNZ, W.; DIETRICH, B.; STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology*, v. 107, p. 19-28, 2001.
- PAPPU, H. R.; CSINOS, A. S.; MCPHERSON, R. M.; JONES, D. C.; STEPHENSON, M. G. Effect of acibenzolar-S-methyl and imidacloprid on suppression of Tomato spotted wilt Tospovirus in flue-cured tobacco. *Crop Protection*, v.19, p.349-354, 2000.
- PARADELA, A. L.; SCACHETTI, A. P.; MUNHOZ, R.; BORIM JR., N.; CALAFIORI, M. H.; GALLI, M. A. Eficiência de BION (acibenzolar-s-methyl) como indutor de resistência para o complexo bacteriano (*Xanthomonas vesicatoria*; *Pseudomonas syringae* pv *tomato* e *Clavibacter michiganense subsp michiganense*). *Revista Ecosystema*, v. 26 n. 1 jan. – jul. 2001
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência . In: BERGAMIN FILHO et al. *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. 3ª Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, v. 1, cap. 22, p. 417-453.
- PASCUAL, S.; NOMBELA, G.; AVILS, M.; MUÑIZ, M. Induced resistance in tomato to whitefly *Bemisia tabaci* by Bion. *International Organisation for Biological and Integrated Control wprs Bulletin*, v. 26, n. 10, p. 61-64, 2003
- REGLINSKI, T.; LYON, G.D.; NEWTON, A.C. Induction of resistance mechanism in barley by yeast-derived elicitors. *Annals of Applied Biology*, Cambridge, v. 124, p. 509-517, 1994.
- REPKA, V., FISCHEROVA, I., SILHAROVA, K. Biological activity of the elicitor released from mycelium of a grapevine isolate of the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Vitis*. V. 40, p. 205-212, 2001.
- RUESS, W.; KUNZ, W.; STAUB, T.; MÜLLER, K.; POPPINGER, N.; SPEICH, J.; AHL GOY, P. Plant Activator CGA 245704, a new technology for disease management. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 101, Supplement, 424, 1995.
- RUESS, W.; MÜLLER, K; KNAUF-BEITER, G.; KUNZ, W.; STAUB, T. Plant activator CGA 245704: an innovative approach for disease control in cereals and tobacco. Brighton Crop Protection Conference-Pest and Diseases. In Ciba's Contribution, p. 9. 1996.
- SANTIN, M. R. Uso de fertilizantes organo-minerais e indutores de resistência no desempenho agrônômico do tomateiro estaqueado. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012. 114p. Dissertação de Mestrado.
- SCARPONI, L.; BUONAURIO, R.; MARTINETTI, L. Persistence and translocation of a benzothiadiazole derivative in tomato plants in relation to systemic acquired resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Pest Management Science*, v. 57, p. 262-268, 2001.
- SEGEV, L.; WINTERMANTEL, W. M.; POLSTON, J. E.; LAPIDOT, M. First report of *Tomato chlorosis virus* in Israel. *Plant Disease*, v.88, p. 1160, 2004.
- STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. *ANNUAL Review of Phytopathology*, v. 35. p. 235-270, 1997.

- AGROFIT .MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/ap_produto_form_detalhe_cons?p_id_produto_fo rmulado_tecnico=5480&p_tipo_janela=NEW. Acesso em: 06 mar. 2014.
- STOUT, M. J.; WORKMAN, K. V.; BOSTOCK, R. M.; DUFFEY, S. S. Stimulation and attenuation of induced resistance by elicitors and inhibitors of chemical induction in tomato (*Lycopersicon esculentum*) foliage. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 86, n. 3, p. 267-279, 1998.
- TAKESHITA, M.; OKUDA, S.; HYODO, A.; HAMANO, K.; FURUYA, N.; TSUCHIYA, K. Induction of Antiviral Responses by Acibenzolar-S-Methyl Against *Curcubit chlorotic yellows virus* in Melon. *Phytopathology*. v.103, p. 960-965, 2013.
- THALER, J. S.; FIDANTSEF, A. L.; BOSTOCK, R. M. Antagonism between jasmonate and salicylate-mediated induced plant resistance: effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato. *Journal of Chemical Ecology*, v. 28, p.1131–1159, 2002.
- THALER, J. S. Induced resistance in agricultural crops: Effects of jasmonic acid on herbivory and yield of tomato plants. *Environmental Entomology*, v. 28, n. 2, p. 30-37, 1999.
- TSAI, W. S.; SHIH, S. L.; GREEN, S. K.; HANSON, P.; LIU, H. Y. First report of the occurrence of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in Taiwan. *Plant Disease*, v.88, p.311, 2004.
- TZANETAKIS, I. E.; MARTIN, R. R.; WINTERMANTEL, W. M. Epidemiology of criniviruses: an emerging problem in world agriculture. *Frontiers Microbiology*, v.4, n.119, 2013.
- VALLAD, G. E.; GOODMAN, R. M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, v. 44, p. 1920-1934, 2004.
- VAN LOON, L. C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 12, p. 245-264, 1994.
- VIEIRA, E. L.; SOUZA, G. S.; SANTOS, A. R.; SANTOS SILVA, J.; Manual de Fisiologia Vegetal. São Luis: EDUFMA, 2010. 230p.
- WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, v. 64, n. 5, p. 1263-1280, 2013.
- 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 of Virology*, Vienna, v. 150, 2287-2298 p., 2005.
- WINTERMANTEL, W. M.; WISLER, G. C. Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 90, n.6, 814-819 p., 2006.
- WISLER, G. C.; LI, R. H.; LIU, H. Y.; LOWRY, D. S.; DUFFUS, J. E. Tomato chlorosis virus: a new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology*, v.88, n. 5, p.402-409, 1998.