

Efeito da infecção precoce por *Begomovirus* com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial

Leonardo de B. Giordano¹; Maria Esther de N. Fonseca; João B.C. da Silva; Alice K. Inoue-Nagata; Leonardo S. Boiteux¹

Embrapa Hortaliças, C. Postal 0218, 70359-970 Brasília-DF; ¹Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq/MCT. E-mail: giordano@cnpq.embrapa.br

RESUMO

Dados a respeito dos efeitos da infecção por espécies sul-americanas de *Begomovirus* com genoma bipartido na fisiologia da produção do tomateiro são ainda escassos na literatura. O presente trabalho foi realizado visando estimar o impacto da infecção precoce em parâmetros de produtividade e teor de sólidos solúveis (°Brix) utilizando uma cultivar de tomateiro para processamento industrial suscetível a *Begomovirus*. A inoculação controlada das mudas (18 dias após semeadura) foi realizada inicialmente em casa de vegetação usando moscas-brancas (*Bemisia tabaci* biótipo B) virulíferas, sendo as mudas expostas aos insetos por quatro dias. Um grupo de mudas não inoculadas (controles) foi mantido isolado em uma casa de vegetação livre do inseto vetor. Plantas inoculadas e não inoculadas foram simultaneamente transplantadas em campo e dispostas em um delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições com dez plantas por parcela. A análise de seqüência de nucleotídeos de parte do genoma do DNA-A do vírus utilizado na inoculação indicou ser um isolado distinto, mas geneticamente relacionado com *Tomato chlorotic mottle virus* (uma das espécies do complexo de *Begomovirus* infectando tomateiro no Brasil). Foi observada diferença significativa para produção total, sendo 109,0 t/ha nas plantas controle e 48,2 t/ha nas mudas submetidas à inoculação precoce; tendo-se redução de aproximadamente 60% na produtividade. A diferença mais acentuada foi observada para o parâmetro número de frutos por planta. As plantas não infectadas apresentaram uma média de 66 frutos, enquanto que nas plantas infectadas esta média foi de 38 frutos. O peso médio e o teor de sólidos solúveis dos frutos não foram significativamente influenciados pela infecção precoce. Desta forma, existe a possibilidade de reduzir perdas de produtividade devido à infecção de *Begomovirus* por meio do manejo adequado do sistema de produção, incluindo isolamento de viveiros e sementeiras e datas de transplante. Com estes resultados salienta-se a importância epidemiológica de, quando possível, retardar ao máximo o processo de infecção precoce por *Begomovirus* em mudas de tomateiro.

Palavras-chave: *Lycopersicon esculentum*, *Bemisia tabaci*, mosca-branca, geminivírus.

ABSTRACT

Effect of early infection by a bipartite *Begomovirus* species on processing tomato fruit characteristics

There is a small amount of information dealing with tomato yield and quality losses due to infection by viral species of the bipartite *Begomovirus* complex occurring in South America. A trial was carried out in order to determine the impact of an early *Begomovirus* infection on yield and quality parameters using a susceptible processing cultivar. Plants were inoculated for four days under controlled conditions using viruliferous whiteflies (*Bemisia tabaci* biotype B) 18 days after sowing. Control (non-inoculated) plants were kept in an isolated greenhouse without the presence of the vector. Seedlings of control and inoculated plants were transplanted to the field in the same day. A randomized block design with four replications (10 plants per plot) was used. Sequence analysis of a segment from the viral DNA-A component indicated that the inoculum employed in the present trial was an isolate distinct yet genetically related to *Tomato chlorotic mottle virus* (one species of the Brazilian *Begomovirus* complex). A significant yield difference of about 60% was observed between control and infected plants (109.0 t/ha vs. 48.2 t/ha, respectively). The major difference was observed in the number of fruits per plant (an average of 66 fruits on control plants versus 38 fruits on early inoculated plants). No significant difference was observed for average fruit weight and total amount of soluble solids. These results indicate that some simple and useful management strategies such as isolation of seedling production areas and selection of adequate transplanting time could minimize yield losses due to *Begomovirus* infection. In addition, the results reinforce the epidemiological importance of avoiding precocious plant exposure to potentially viruliferous whiteflies, especially when working with highly susceptible tomato genotypes.

Keywords: *Lycopersicon esculentum*, *Bemisia tabaci* biotype B, whitefly, geminivirus.

(Recebido para publicação em 4 de novembro de 2004 e aceito em 13 de julho de 2005)

O primeiro registro formal de doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) causadas por espécies do gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) no Brasil foi o relato da ocorrência de plantas apresentando sintomas do tipo “mosaico dourado” e “clorose infecciosa” transmitidos pela mosca-bran-

ca *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo na década de 1960 (FLORES et al., 1960). *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) foi a espécie de *Begomovirus* caracterizada como sendo o agente causal destas doenças (MATYIS et al., 1975).

Até o início da década de 1990, *B. tabaci* biótipo A e *Trialeurodes*

vaporariorum foram as duas únicas espécies de mosca-branca observadas colonizando o tomateiro no Brasil. No entanto, novos relatos de doenças do tipo “mosaico dourado” e “mosaico rugoso” passaram a se intensificar no Brasil após a introdução de *B. tabaci* biótipo B (= *B. argentifolii*) nos meados da dé-

cada de 1990 (RIBEIRO et al., 1994; FRANÇA et al., 1996). O hábito alimentar polífago desta nova espécie/biótipo favoreceu a sua rápida disseminação geográfica com registro de severas infestações do inseto em tomates do Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo e nos estados produtores de tomate do Nordeste (FRANÇA et al., 1996; RIBEIRO et al., 1998; FARIA et al., 2000). Foi também observado, simultaneamente com a disseminação de *B. tabaci* biótipo B, um aumento na diversidade de espécies de *Begomovirus* capazes de infectar tomateiro no Brasil (RIBEIRO et al., 2003). Um complexo de cerca de uma dezena de espécies de *Begomovirus* foi caracterizado via sequenciamento de segmentos de genomas de isolados virais coletados nas principais regiões produtoras de tomate no Brasil, todos apresentando genoma bipartido (RIBEIRO et al., 2003).

Fontes de resistência efetivas contra as distintas espécies de *Begomovirus* que estão ocorrendo no Brasil têm sido detectadas (BOITEUX et al., 2001, SANTANA et al., 2001) e os primeiros híbridos de tomate para consumo *in natura* com resistência a *Begomovirus* têm sido colocados no mercado. No entanto, a quase totalidade das cultivares atualmente utilizadas são extremamente suscetíveis. Perdas de produção induzidas por algumas espécies deste complexo viral atingiram montantes da ordem de 40 a 100% em tomate para consumo *in natura* no Distrito Federal e Minas Gerais (FARIA et al., 2000). Cerca de 20 a 70% de plantas com sintomas foram observadas em tomate de mesa em São Paulo (RIBEIRO et al., 1998).

Nos anos de 2000-2003, houve um crescimento considerável da incidência de begomovirose em tomate para processamento industrial, resultando em grandes perdas nas regiões produtoras do Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste. Campos com 100% de plantas infectadas foram regularmente observados em tomate para processamento industrial em Pernambuco e na Bahia (RIBEIRO et al., 2003). Uma análise criteriosa tem indicado que a magnitude destas perdas em tomate para processamento industrial poderia ser

reduzida por meio da adoção de técnicas de manejo da cultura visando reduzir a exposição precoce das mudas a populações de mosca-branca virulíferas. Tais técnicas incluiriam, por exemplo, o isolamento dos viveiros e escolha de idades mais adequadas para o transplante das mudas em campo. O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito da infecção precoce na produtividade e no teor de sólidos solúveis (°Brix) dos frutos de uma cultivar de tomateiro suscetível a isolados brasileiros de *Begomovirus*.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido em casa de vegetação e no campo experimental da Embrapa Hortaliças, em Brasília (DF), durante os meses de março a julho de 2003. Sementes da cultivar de tomate Viradoro (GIORDANO et al., 2000), resistente a espécies de *Tospovirus* do complexo do vira-cabeça, mas suscetível a espécies de *Begomovirus*, foram semeadas em duas bandejas de isopor (128 células) contendo substrato Plantmax®. Após o semeio, as duas bandejas permaneceram durante um período de 17 dias em uma casa de vegetação livre de mosca-branca. Dezoito dias após o semeio, quando as mudas apresentavam dois pares de folhas definitivas, uma das bandejas foi transferida para uma casa de vegetação com alta população de moscas-brancas virulíferas, obtidas de colônias mantidas em plantas de tomate infectadas com um isolado de *Begomovirus* coletado na região de Brasília. As plantas inoculadas foram mantidas nestas condições por 96 horas quando as moscas-brancas foram eliminadas usando o inseticida Imidacloprid.

As plantas inoculadas foram, em seguida, removidas para uma casa de vegetação livre de insetos juntamente com o grupo de plantas não inoculadas (controles). Todas as mudas foram transplantadas para campo quatro dias após a inoculação. Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições, espaçamento de 1,0 m entre linhas e 0,3 m entre plantas e dez plantas por parcela. Trinta e cinco dias após o transplante, a infecção foi estimada vi-

sualmente por meio do índice de severidade da doença, utilizando-se uma escala de notas (1=sem sintomas; 2=amarelecimento e enrugamento dos folíolos; 3=enrugamento severo, clorose internerval, epinastia e redução severa do crescimento). A colheita dos frutos foi realizada 107 dias após o transplante, quando a maioria dos frutos se apresentava completamente amadurecida. Foram estimados a produção de frutos por hectare, o número médio de frutos por planta, o peso médio e o teor de sólidos solúveis dos frutos. Foram contados e pesados todos os frutos de cada planta e determinado o teor de sólido solúveis (°Brix), obtido por meio de refratômetro manual, sendo utilizados dez frutos por parcela. Procedeu-se a análise de variância, comparando-se as médias das características avaliadas pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

Para a identificação da espécie viral empregada como inóculo, em condições de casa de vegetação, foram coletadas amostras foliares dentro das parcelas inoculadas. Plantas dentro dos controles não inoculados que apresentaram sintomas do tipo *Begomovirus* em campo foram também coletadas para determinar se alguma espécie viral, diferente da empregada como inóculo, estava presente em condições de campo. O DNA total foi extraído individualmente de cada planta usando uma modificação do método de CTAB e solventes orgânicos (BOITEUX et al., 1999). Um segmento do componente A do DNA viral foi seletivamente amplificado via "Polymerase Chain Reaction" (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores "universais" desenvolvidos para detecção de *Begomovirus* (ROJAS et al., 1993). Eletroforese em ágar-gel (1,2%) dos produtos obtidos após PCR indicou a presença de um único amplicon com cerca de 1300 pares de bases. Uma alíquota do produto de PCR foi diretamente sequenciada (em ambas as direções) usando o kit Big-dyeIII em um sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems), do Laboratório de Análise Genômica da Embrapa Hortaliças. A análise da sequência foi feita empregando o algoritmo BlastN (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) e as sequências foram alinhadas pelo método Clustal W dentro do aplicativo computacional LaserGene (Madison, WI).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie viral utilizada como fonte de inóculo constituiu-se em um vírus distinto porém apresentando um maior relacionamento genético (73,7% de identidade) com a espécie *Tomato chlorotic mottle virus* (GenBank AY049209) (RIBEIRO et al., 2003). Foi observada uma diferença significativa para expressão de sintomas entre plantas inoculadas e controles na avaliação realizada aos 35 dias após o transplante. Não foi observado nenhum escape, sendo que 100% das plantas inoculadas precocemente apresentavam sintomas característicos de infecção por *Begomovirus* incluindo enrugamento foliar severo, clorose internerval, epinastia e redução severa do crescimento, com índice de severidade de doença com valores iguais a 3,0. Estes resultados comprovaram a eficiência do método de inoculação usando moscas-brancas virulíferas. Nesta avaliação, a maioria das plantas originárias de mudas não inoculadas (controles) apresentavam-se assintomáticas e receberam nota média 1,2 para o índice de severidade de doença. Algumas das poucas plantas que exibiram sintomas devido a uma provável infecção tardia a campo mostram-se predominantemente infectadas por um isolado relacionado (93,0% de identidade) com *Tomato golden vein virus* (GenBank AY 751742), uma nova espécie de *Begomovirus* recentemente descrita infectando tomateiro no Brasil (ALBUQUERQUE et al., 2004).

Diferenças estatisticamente significativas foram também observadas entre as plantas originárias de mudas infectadas precocemente e as não infectadas (controles) para a produtividade e número médio de frutos por planta. Foi observada diferença significativa para produção total, sendo 109,0 t/ha nas plantas controle e 48,2 t/ha nas mudas submetidas à inoculação precoce; tendo-se redução de aproximadamente 60% na produtividade (Figura 1). A redução na produtividade deveu-se, principalmente, à redução significativa do número médio de frutos por planta. As plantas não infectadas apresentaram uma média de 66 frutos, enquanto que nas plantas infectadas esta média foi de

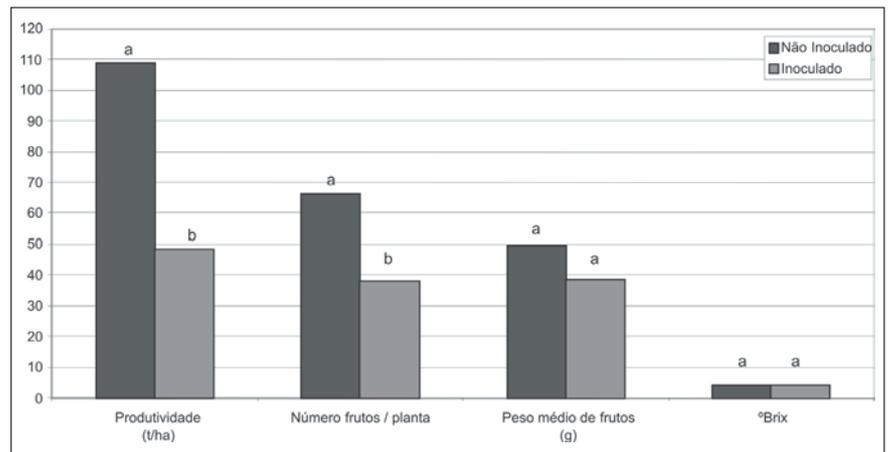


Figura 1. Efeito da infecção precoce de mudas de tomateiro por um isolado geneticamente relacionado com o *Tomato chlorotic mottle virus* na produtividade (t/ha), número de frutos por planta, peso médio de frutos (g) e teor de sólidos solúveis (expresso em °Brix) da cultivar suscetível 'Viradoro'. Médias das características avaliadas (pares de colunas) indicadas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de probabilidade). Brasília, Embrapa Hortaliças, 2003.

38 frutos. O peso médio dos frutos não foi significativamente reduzido nas plantas infectadas. A concentração de sólidos solúveis também não foi significativamente influenciada pela infecção precoce (Figura 1), refletindo, provavelmente, um efeito compensatório devido ao menor número de frutos nas plantas infectadas.

Como descrito, as plantas infectadas apresentam características típicas de clorose internerval, rugosidade, mosaico dourado, diminuição de área foliar, deformação foliar e redução de porte. No entanto, os dados relatados aqui demonstram que existe um outro componente neste quadro sintomatológico que é a acentuada redução no número de frutos por planta. Estudos adicionais serão necessários para demonstrar se esta resposta está associada com uma redução do número de flores ou por uma maior incidência de frutos abortados, ou ambos fatores combinados. É importante salientar que a observação de que o peso médio de fruto não é afetado pode resultar em avaliações subestimadas das potenciais perdas de produção em tomateiro devido a infecção por espécies de *Begomovirus*. Este fato pode erroneamente indicar aos produtores de tomate que algumas das medidas básicas adotadas para controle preventivo possam ser abrandadas.

Uma análise criteriosa dos resultados permite concluir que ocorre significativa redução na produtividade de plan-

tas provenientes de mudas precocemente infectadas. Desta forma, existe a possibilidade de reduzir, por meio de técnicas de manejo do sistema de produção, os prejuízos econômicos causados por espécies de *Begomovirus*. Este manejo incluiria a opção preferencial pelo sistema de transplantio (aos invés de semeadura direta a campo, já praticamente abandonada nas condições brasileiras), o isolamento físico de sementeiras e a escolha de idade das mudas mais adequadas para transplantio. A análise destes resultados salienta a importância epidemiológica de se retardar ao máximo o processo de infecção por *Begomovirus* em mudas de tomateiro associado ao controle apropriado dos vetores e eliminação de fontes de inóculo, principalmente de plantas de tomateiro previamente infectadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao técnico Antônio Francisco da Costa (Embrapa Hortaliças) pelo auxílio na coleta e análise dos dados.

LITERATURA CITADA

ALBUQUERQUE, L.C.; FERNANDES-CARRIJO, F.R.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; DE ÁVILA, A.C.; FONSECA, M.E.N.; NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A.K. A new *Begomovirus* species in tomato in Central Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, p.S218-S219, 2004.

- BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; SIMON, P.W. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v.124, p.32-38, 1999.
- BOITEUX, L.S.; INOUE-NAGATA, A.K.; GIORDANO, L.B. Diversity of geminiviruses affecting tomatoes (*Lycopersicon* spp.) in Brazil and perspectives of genetic control. *Virus Reviews and Research*, v.6, p.50, 2001.
- FARIA, J.C.; BEZERRA, I.C.; ZERBINI, F.M.; RIBEIRO, S.G.; LIMA, M.F. Situação atual das geminivirose no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v.25, p.125-137, 2000.
- FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K.; KRAMER, M. Observações de "clorose infecciosa" das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico*, São Paulo, v.26, p.65-69, 1960.
- FRANÇA, F.H.; VILLAS BÔAS, G.L.; CASTELO-BRANCO, M. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera:Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.25, p.369-372, 1996.
- GIORDANO, L.B.; DE ÁVILA, A.C.; CHARCHAR, J.M.; BOITEUX, L.S.; FERRAZ, E. Viradoro: A *Tospovirus*-resistant processing tomato cultivar adapted to tropical environments. *HortScience*, v.35, n.7, p.1368-1370, 2000.
- MATYIS, J.C.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R.; COSTA, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica*, v.1, p.267-275, 1975.
- RIBEIRO, S.G.; MELO, L.V.; BOITEUX, L.S.; KITAJIMA, E.W.; FARIA, J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.19, p.330, 1994.
- RIBEIRO, S.G.; DE ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; FERNANDES, J.J.; FARIA, J.C.; LIMA, M.F.; GILBERTSON, R.L.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZERBINI, F.M. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. *Plant Disease*, v.82, p.830, 1998.
- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVÍCIUS, L.P.; DE ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA H.; ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v.148, p.281-295, 2003.
- ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L.; RUSSELL, D.R.; MAXWELL, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease*, v.77, n.4, p.340-347, 1993.
- SANTANA, F.M.; RIBEIRO, S.G.; MOITA, A.W.; MOREIRA JÚNIOR, D.J.; GIORDANO, L.B. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. *Euphytica*, v.122, p.45-51, 2001.
-