

KELY LIMA CAMBRAIA

**AVALIAÇÃO DE DUAS DIFERENTES FONTES DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS DO
VIRA-CABEÇA EM TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* Mill.) FRENTE A
ISOLADOS DE TOSPOVÍRUS DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Prof.ª Dr.ª. ANTONIA DOS REIS FIGUEIRA

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

1997

P
30888

MFU29317

KELY LIMA CAMBRAIA

**AVALIAÇÃO DE DUAS DIFERENTES FONTES DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS DO
VIRA-CABEÇA EM TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* Mill.) FRENTE A
ISOLADOS DE TOSPOVÍRUS DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. ANTONIA DOS REIS FIGUEIRA

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

1997

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da
Biblioteca Central da UFLA

Cambraia, Kely Lima

Avaliação de duas diferentes fontes de resistência ao vírus do vira-cabeça em
tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) frente a isolados de tospovirus do
Estado de Minas Gerais / Kely Lima Cambraia. – Lavras : UFLA, 1997.

71 p. : il.

Orientador: Antonia dos Reis Figueira.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Tomate - Doença. 2. Variedade resistente. 3. Vira-cabeça. 4. Tospovirus.
5. TSWV. 6. TCSV. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

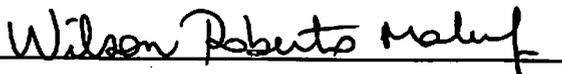
CDD-635.64298

KELY LIMA CAMBRAIA

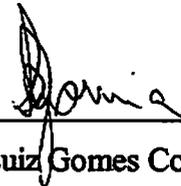
**AVALIAÇÃO DE DUAS DIFERENTES FONTES DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS DO
VIRA-CABEÇA EM TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* Mill.) FRENTE A
ISOLADOS DE TOSPOVIRUS DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

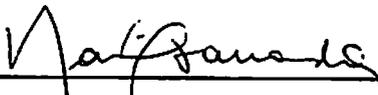
APROVADA em 29 de agosto de 1997.



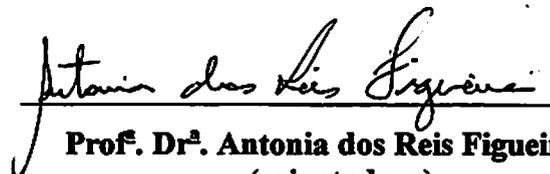
Prof. Dr. Wilson Roberto Maluf



Dr. Luiz Gomes Correia



Dr.ª Maria Mércia Barradas



Prof.ª Dr.ª Antonia dos Reis Figueira
(orientadora)

Dedico

Ao meu marido, Luiz Fernando, minha alegria, meu impulso para vencer etapas

Aos meus pais, Cambraia e Iracy,

Aos meus irmãos e cunhada, Patrícia, Renato, Júnior e Jacqueline

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Fitopatologia, pela minha formação; ao Prof. Hilário Antônio de Castro, pelo apoio e incentivo; aos funcionários do setor de Virologia: Augusto, Graça, Carlos, Eliana, Antônio Carlos e Sérgio;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos, sem a qual não seria possível a minha formação;

À Prof^ª. Antonia dos Reis Figueira, pela orientação, pela amizade e presteza em todos os momentos;

Ao Prof. Wilson Roberto Maluf, pelos ensinamentos e sugestões;

Ao Dr. Luiz Gomes Corrêa, Coordenador de Horticultura do Departamento Técnico da EMATER-MG, pela sua atenção, dedicação e importante colaboração para a execução deste trabalho; a todos os técnicos e funcionários desta empresa, que direta ou indiretamente contribuíram na coleta e envio de material, indispensável para a minha pesquisa;

Ao Prof. Daniel Furtado Ferreira, pela orientação nas análises estatísticas;

À HortiAgro, pelo material fornecido;

Ao CNPH/EMBRAPA, pela espécie de tospovírus gentilmente concedida;

Ao meu marido, Luiz Fernando, pelo apoio, atenção, incentivo e carinho que me dispensou nos momentos mais difíceis dessa jornada;

Aos colegas da pós-graduação, pela agradável convivência;

À amiga e colega Eneida, pelo encorajamento e pela presença constante na realização dos trabalhos de laboratório;

Enfim, meus agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 O tomateiro.....	3
2.2 O vírus do vira-cabeça do tomateiro	4
2.3 Caracterização, morfologia e organização genômica	5
2.4 Detecção	8
2.5 Estirpes, hospedeiros diferenciais e gama de hospedeiros	9
2.6 Sintomatologia	11
2.6.1 Transmissão	13
2.6.1.1 Vetor	13
2.6.1.2 Sementes	14
2.7 Controle dos tospovírus	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Avaliação do comportamento de duas linhagens de tomate a isolados de TSWV coletados no estado de Minas Gerais	23
3.1.1 Escolha das regiões e amostragem	23
3.1.2 Diagnose e caracterização dos isolados	25
3.1.2.1. Inoculação em planta indicadora	25
3.1.2.2. Classificação dos isolados	26
3.1.2.3. Teste serológico ELISA (“Enzyme-linked immunosorbent assay”)	26
3.1.3 Manutenção dos isolados virais	27
3.1.4 Reação de duas linhagens de <i>L. esculentum</i> a isolados de tospovírus	28
3.2 Avaliação da reação e da multiplicação de isolados de TSWV com diferentes agressividades nas linhagens estudadas	29

	Página
3.2.1 Obtenção do inóculo e inoculação	30
3.2.2. Condução	31
3.2.3 Avaliação da severidade	31
3.2.4 Análise dos dados	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Agressividade em <i>N. tabacum</i> cv. Turkish dos isolados de TSWV coletados no estado de Minas Gerais	33
4.2 Reação das linhagens de <i>L. esculentum</i> a isolados de TSWV coletados no estado de Minas Gerais	38
4.2.1 Avaliação da reação das linhagens estudadas a um isolado de TCSV.....	45
4.3 Avaliação da reação e da multiplicação de isolados de TSWV com diferentes agressividades nas linhagens estudadas	45
5 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Reação de plantas de fumo TNN à primeira inoculação dos isolados de TSWV coletados em tomateiros naturalmente infectados em campo na Região Metalúrgica de Minas Gerais. UFLA, Lavras-MG, 1996/1997.....	34
2	Reação de plantas de fumo TNN à primeira inoculação dos isolados de TSWV coletados em tomateiros naturalmente infectados em campo na Região do Triângulo Mineiro. UFLA, Lavras-MG, 1996.....	35
3	Reação de plantas de fumo TNN à primeira inoculação dos isolados de TSWV coletados em tomateiros naturalmente infectados em campo nas Regiões Noroeste de Minas e Jequitinhonha. UFLA, Lavras-MG, 1996/1997...	36
4	Reação de plantas de fumo TNN à primeira inoculação dos isolados de TSWV coletados em tomateiros naturalmente infectados em campo na Região Sul de Minas. UFLA, Lavras-MG, 1996/1997.....	37
5	Reação de três linhagens de <i>L. esculentum</i> a isolados de TSWV coletados na Região Metalúrgica de Minas Gerais. UFLA, Lavras-MG, 1996.....	39
6	Reação de três linhagens de <i>L. esculentum</i> a isolados de TSWV coletados na Região do Triângulo Mineiro. UFLA, Lavras-MG, 1996/1997.....	40
7	Reação de três linhagens de <i>L. esculentum</i> a isolados de TSWV coletados nas Regiões Noroeste de Minas e Jequitinhonha. UFLA, Lavras-MG, 1996/1997.....	41
8	Reação de três linhagens de <i>L. esculentum</i> a isolados de TSWV coletados na Região Sul de Minas. UFLA, Lavras-MG, 1996/1997.....	42
9	Reação das linhagens TOM 556, BPX320F-7902 e Santa Clara a quatro isolados de TSWV inoculados mecanicamente - 1º ensaio. UFLA, Lavras-MG, 1997.....	46

Tabela		Página
10	Reação das linhagens TOM 556, BPX320F-7902 e Santa Clara a quatro isolados de TSWV inoculados mecanicamente - 1º ensaio. UFLA, Lavras-MG, 1997.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Municípios amostrados no estado de Minas Gerais Extraído do Anuário Estatístico de Minas Gerais, 1987.....	24

RESUMO

CAMBRAIA, Kely Lima. **Avaliação de duas diferentes fontes de resistência ao vira-cabeça do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) frente a isolados de tospovírus do estado de Minas Gerais.** Lavras: UFLA, 1997. 83p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).*

Duas linhagens de tomate, TOM 556 e BPX320F-7902 (com resistência a tospovírus oriunda de Rey de Los Tempranos e Stevens, respectivamente), ambas com background genético da cv. Santa Clara, foram caracterizadas quanto à reação a isolados de TSWV - “Tomato Spotted Wilt Virus” e a um isolado de TCSV - “Tomato Chlorotic Spot Virus”. Foram inoculados mecanicamente 69 isolados de TSWV das regiões mais representativas da produção de tomate em Minas Gerais, e um isolado de TCSV recebido do CNPH-EMBRAPA. Para a diagnose dos isolados nas amostras recebidas, bem como para a multiplicação do inóculo, foi empregada a inoculação mecânica em *Nicotiana tabacum* cv. Turkish (TNN) e o teste serológico DAS-ELISA, empregando-se os antissoros produzidos para TSWV, comercializados pela Sanofi Pasteur e Agdia. Os dados revelaram que as linhagens TOM 556 e BPX320F-7902 comportaram-se como tolerante e resistente, respectivamente, a todos os isolados de tospovírus testados. A linhagem BPX320F-7902 apresentou alto nível de resistência a diferentes isolados de tospovírus. Avaliou-se também a reação dessas linhagens estudadas a isolados de tospovírus, com diferentes severidades,

* Orientadora: Antonia dos Reis Figueira. Membros da banca: Wilson Roberto Maluf, Luiz Gomes Correia e Maria Mércia Barradas.

investigando-se a velocidade de multiplicação do vírus na planta. Para isso, elas foram inoculadas mecanicamente com quatro isolados de tospovírus e avaliadas em três épocas distintas (aos 10, 20 e 30 dias após a inoculação). Para todos os isolados testados, a linhagem BPX320F-7902 recebeu nota igual a 1, apresentando plantas com desenvolvimento normal e ausência de sintomas, com valores negativos para teste DAS-ELISA nas três épocas de avaliação, comprovando a sua resistência do tipo imune. A linhagem TOM 556 não inibiu a multiplicação viral em seus tecidos, podendo esta multiplicação ser igual ou até superior à encontrada na testemunha Santa Clara. Apesar disso, sua resistência do tipo tolerância permaneceu bastante evidente: os resultados obtidos nos ensaios demonstram a efetividade da linhagem TOM 556 no sentido de retardar a expressão de sintomas e, conseqüentemente, reduzir os prejuízos econômicos. Os ensaios evidenciam que tanto a resistência tipo imunidade, proveniente da cv. Stevens, como a do tipo tolerância, proveniente da cv. Rey de Los Tempranos, são efetivas no sentido de controle genético do vira-cabeça do tomateiro.

SUMMARY

AVALIATION OF TWO DIFFERENT SOURCES OF RESISTANCE TO TOSPOVIRUS FROM MINAS GERAIS

Two tomato breeding lines, TOM 556 and BPX320F-7902 (with tospovirus resistance derived from Rey de Los Tempranos and Stevens, respectively), both in the background of cv. Santa Clara, were evaluated for their reactions to 69 TSWV - "Tomato Spotted Wilt Virus" isolates and 01 TCSV - "Tomato Chlorotic Spot Virus" isolate. The tomato lines were mechanically inoculated with 69 TSWV isolates (obtained from the most representative tomato producing counties in the State of Minas Gerais) and the TCSV isolate (obtained from the CNPH/EMBRAPA, in Brasília-DF). All tospovirus isolates were previously maintained by mechanical inoculation in *Nicotiana tabacum* cv. Turkish (TNN) and checked via the DAS-ELISA serological test. TOM 556 and BPX320F-7902 were tolerant and resistant, respectively, to all tospovirus isolates tested. BPX320F-7902 showed a high degree of resistance to the different tospovirus isolates. Reaction of the breeding lines to 4 tospovirus isolates selected for their differential degree of disease severity was assessed, and so was the rate of virus multiplication in the plants. This was done by mechanical inoculation with the 4 isolates separately, followed by measures of both symptoms and virus titres at three different dates (10, 20 and 30 days after inoculation). BPX320F-7902 presented plants with symptoms rated 1

(plants with normal development and absence of symptoms) for all 4 tospovirus isolates, and reacted negatively to the DAS-ELISA test in all 3 evaluation dates, demonstrating its immune type of resistance. TOM 556 did not inhibit virus multiplication, and final titre can be equal to or higher than that found in the susceptible check Santa Clara. Nonetheless, its tolerance type of resistance was evident: the results demonstrate its effectiveness in the direction of postponing symptom expression and therefore reducing economical damage. The trials showed that both the immunity type of resistance obtained from cv. Stevens and the tolerance type of resistance obtained from Rey de Los Tempranos can be effectively deployed in the genetic control of the spotted wilt disease of tomatoes.

1. INTRODUÇÃO

Entre as viroses que afetam o tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), os tospovírus se destacam pelas grandes perdas, tanto na produtividade, como na qualidade dos frutos, ocasionando graves prejuízos econômicos. O desenvolvimento de medidas de controle para o complexo patológico do vira-cabeça se depara com uma série de limitações, reforçadas pelo amplo círculo de hospedeiras, pela diversidade do vírus e do vetor e pela ineficiência do controle químico do inseto-vetor. Ressalta-se, ainda, que as cultivares mais plantadas são altamente suscetíveis a esta virose. O uso de variedades resistentes tem sido sugerido como a medida de controle mais apropriada (Ávila, 1993a; Resende e Cupertino, 1996).

A identificação de fontes de resistência tem favorecido este processo. Maluf, Toma-Braghini e Corte (1991) conseguiram incorporar gene(s) de resistência do acesso Rey de Los Tempranos, uma fonte de resistência em *L. esculentum*, em *backgrounds* genéticos comerciais de ampla aceitação no Brasil. Uma das linhagens que tem sido considerada bastante promissora, por suas características agronômicas e de tolerância aos tospovírus, é a denominada TOM-556. Segundo estes autores, a resistência encontrada em Rey de Los Tempranos é possivelmente controlada por alelo(s) recessivo(s). No entanto, Juliatti e Maluf (1995) descreveram que esta resistência é controlada por pelo menos 1 a 3 genes com dominância parcial. Outro acesso de *L. esculentum* resistente ao vírus é a cultivar Stevens, originária de um programa de melhoramento na África do Sul e relatada como portadora de um gene dominante de *L. peruvianum*, que

controla a resistência aos tospovírus (Stevens, Scott e Gergerich, 1992). A linhagem BPX320F-7902, obtida através do cruzamento de F1 (Santa Clara x Stevens) x Santa Clara, seguido de sucessivas autofecundações, também tem apresentado características agronômicas excelentes, aliadas à resistência a diversos isolados de Tospovírus (Juliatti e Maluf, 1995; Resende, 1996) comum à cv. Stevens.

Devido à grande variabilidade de isolados e espécies de tospovírus existentes no Brasil, existe a preocupação de que a resistência dessas linhagens possa vir a ser quebrada por qualquer um deles, a exemplo do que aconteceu na África do Sul e Hawai, com cultivares portadoras do gene Sw-5, oriundo da cultivar Stevens (Goldbach e Kuo, 1996). Portanto, antes que essas linhagens sejam liberadas em nível comercial, existe a necessidade de se testar a sua reação ao maior número possível de isolados de tospovírus, provenientes de diferentes regiões onde elas possam vir a ser cultivadas.

Este trabalho apresenta os resultados dos estudos realizados com o objetivo de investigar a reação das linhagens de tomateiro, TOM 556 e BPX320F-7902, a isolados de tospovírus coletados nas diversas regiões onde se cultiva o tomate em Minas Gerais, bem como de investigar o comportamento de isolados com diferentes agressividades nas linhagens estudadas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O tomateiro

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma espécie olerícola pertencente à família das solanáceas, largamente cultivada em todo o mundo. Originária das regiões andinas do Peru, Bolívia e Equador, teve como centro de domesticação o México, particularmente as regiões de Puebla e Vera Cruz (Nagai, 1990).

Entre as hortaliças cultivadas, é considerada aquela de produção e utilização mais universal. No Brasil, ocupa lugar de destaque quanto à importância econômica e social, principalmente pelo alto consumo, tanto “in natura” como industrializado, gerando uma quantidade significativa de empregos e contribuindo para o aumento da renda per capita no setor agropecuário. Superado apenas pela batata, é a segunda hortaliça mais consumida no país. Embora não possua um grande valor nutricional, comparado às demais hortaliças, o tomate torna-se uma importante fonte de vitaminas e sais minerais na dieta do brasileiro por ser consumido em maior quantidade, com maior frequência e em grande parte sem cocção (Filgueira, 1982).

Segundo dados do Anuário...(1995), com uma produtividade média de 43 t/ha, o país produz cerca de 2,3 milhões de toneladas. Esta produção se distribui por vários estados, estando porém concentrada na região Sudeste. Entre os principais estados produtores encontram-se: São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Goiás e Rio de Janeiro. No ano de 1996, somente o Estado de Minas Gerais produziu 306.718 toneladas de tomate, que foram comercializadas por

mais de cento e treze milhões de reais, tendo proporcionado cerca de 26.800 empregos diretos nesse setor (Congresso... 1997).

Apesar de sua larga expansão no país, a cultura do tomateiro ainda apresenta uma série de entraves, principalmente ligados a problemas fitossanitários. Embora existam no mercado diversas cultivares resistentes a uma gama de patógenos, existe ainda um grande número de doenças causadas por fungos (pinta-preta, septoriose, requeima, etc), bactérias (*Erwinia carotovora*, *Xanthomonas campestris*), nematóides e vírus (TMV - "Tobacco Mosaic Virus", PVY - "Potato Virus Y", TYTV - "Tomato Yellow Top Virus", TCTV - "Tomato Curly Top Virus" e os tospovirus (TSWV - "Tomato Spotted Wilt Virus", TCSV - "Tomato Chlorotic Spot Virus", TGSV - "Tomato Groundnut Spot Virus", INSV - "Impatiens Necrotic Spot Virus") que continuam a causar perdas na cultura, limitando o seu cultivo (Maffia, Martins e Matsuoka, 1980).

2.2 O vírus do vira-cabeça do tomateiro

O vírus do vira-cabeça do tomateiro foi observado pela primeira vez na Austrália, em 1915, causando grandes perdas na cultura do tomate (Brittlebank, 1919, citado por Best, 1968). Atualmente apresenta uma ampla distribuição geográfica, causando perdas consideráveis e afetando a produção de alimentos e o cultivo de ornamentais em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Ie, 1970; Francki e Hatta, 1981; Ávila, 1993a, Resende e Cupertino, 1996).

No Brasil, o primeiro relato de vira-cabeça foi feito no estado de São Paulo, em 1936, por Bitancourt, que verificou a presença de manchas concêntricas em frutos comercializados no mercado. Encontrada em quase todas as regiões do país, a doença conhecida como vira-cabeça do tomateiro é considerada uma das mais importantes viroses nas condições brasileiras, constituindo-se num fator limitante ao cultivo do tomateiro nas regiões Sudeste, Centro-Oeste (Lima, 1986) e

Sul do país (Lima Neto et al., 1988). Sua incidência tem sido maior em épocas e locais em que ocorre alta população de tripes vetores (Costa, 1944; Costa et al., 1964; Yuki e Costa, 1988).

Em Minas Gerais, Figueira (1985) aponta o vira-cabeça como a virose mais freqüente e a de maior importância para a cultura neste estado.

A doença pode ocorrer em plantas de qualquer idade, sendo porém mais comum nos dois primeiros meses após o transplante das mudas para o campo, quando é também mais drástica, ocasionando a morte de plantas durante todo o ciclo da cultura (Costa, 1944; Costa et al., 1964; Tokeshi e Carvalho, 1980). As epidemias de tospovírus ocorrem mais freqüentemente nas épocas quentes e chuvosas do verão e no final desta estação (Yuki e Costa, 1988). Porém, em locais de altitudes mais elevadas, bem como nos meses mais frios e secos do ano, a incidência de vira-cabeça é menor (Costa et al., 1964).

2.3 Caracterização , morfologia e organização genômica

Até recentemente, considerava-se que a enfermidade vira-cabeça do tomateiro era causada por único tipo de vírus, o TSWV - “Tomato Spotted Wilt Virus”, membro-tipo do gênero *Tospovirus*. Hoje, o vira-cabeça é considerado um complexo patológico em função da identificação de outros variantes genéticos que têm sido descritos, não só no Brasil, mas em todos os países do mundo onde ocorre. Durante o “International Symposium on Tospovirus and Thrips of Floral and Vegetable Crops”, realizado em Taiwan (1995), foram apresentados trabalhos relatando uma série de isolados de tospovírus caracterizados total ou parcialmente, os quais representam fortes candidatos a novas espécies do gênero. Atualmente, só o TSWV e o INSV - “Impatiens Necrotic Spot Virus” são aceitos como espécies de tospovírus pelo “International Committee on Taxonomy of Viruses” (Pozzer et al., 1996). Além do TCSV - “Tomato Chlorotic

Spot Virus”, GRSV - “Groundnut Ring Spot Virus”, já propostos como novas espécies, também o WSMV - “Watermelon Silver Mottle Virus”, o GBNV - “Groundnut Bud Necrosis Virus”, o MSWV - “Melon Spotted Wilt Virus”, GYSV - “Groundnut Yellow Spot Virus” e mais três isolados, Chry 1 / Br-11t e Br-09², foram citados como espécies distintas das já relatadas. Desta forma, o gênero *Tospovirus* abriga espécies adicionais caracterizadas através de propriedades serológicas, composição da proteína do nucleocapsídeo, bem como pela sequência de nucleotídeos dos RNAs virais e pela reação de diferentes hospedeiras (Ávila, 1992, 1993a, 1993b; Goldbach e Kuo, 1996). Este gênero foi incluído na família Bunyaviridae, por apresentar grande similaridade com alguns vírus dessa família, que infectam animais (Francki et al., 1991; Ávila, 1993a). As partículas virais quase isométricas, com diâmetro de 70-110 nm, são circundadas por uma membrana ou envoltório lipoproteico (Ie, 1970; Francki e Hatta, 1981). Este possui duas glicoproteínas (G1 e G2) de 78 e 52 kDa respectivamente. O genoma viral consiste de três segmentos de RNAs de fita simples, denominadas de L-RNA (8,9kb); M-RNA (4,8kb) e S-RNA (2,9kb), sendo cada um encapsulado por uma proteína (N) de aproximadamente 29 kDa, formando nucleocapsídeos pseudocirculares (Mohamed, 1981).

O L-RNA (8897 nucleotídeos) apresenta polaridade negativa e contém uma única subunidade codificadora traduzível (ORF = “open reading frame”) correspondendo à tradução de um produto de 331,5 kDa que provavelmente representa a transcriptase viral. Os outros dois segmentos, M-RNA e S-RNA, apresentam uma organização do genoma do tipo “ambisense” contendo duas ORFs. Estes RNAs se expressam via síntese de dois mRNA subgenômicos transcritos a partir das fitas no sentido viral e anti-viral. O M-RNA, composto por 4821 nucleotídeos codifica no sentido anti-viral uma proteína precursora (127,4 kDa) das duas glicoproteínas G1(79K) e G2 (58K) e, no sentido viral, uma proteína não estrutural denominada

Nsm de 33,6 kDa. O S-RNA é formado por 2916 nucleotídeos e codifica no sentido anti-viral a proteína N do nucleocapsídeo de 28,8 kDa e no sentido viral uma proteína não estrutural (NSs) de 52,4 kDa (Haan et al., citados por Resende, 1993). É um dos vírus de maior instabilidade “in vitro”, o que tem limitado os estudos físicos e químicos. O ponto de inativação térmica (TIP) é de 40-46°C e sua longevidade “in vitro”(LIV) é de 2-5 horas. O uso de tampão fosfato 0,01M (pH 7.0), contendo sulfito de sódio na mesma molaridade para a extração do inóculo, prolonga significativamente a longevidade do vírus no extrato viral, facilitando a transmissão mecânica (Ie, 1970, Francki e Hatta, 1981). Costa e Forster (1941) observaram que as partículas virais permanecem infectivas numa diluição de até 1:1000 em água destilada (DEP).

Uma séria dificuldade nos ensaios para avaliação de germoplasmas resistentes a viroses é a manutenção e multiplicação de isolados de vírus. No caso do TSWV, repicagens sucessivas do vírus, por inoculação mecânica, podem levar ao aparecimento de mutantes contendo segmentos defectivos interferentes de L-RNA, que resultam em acúmulo progressivo de nucleotídeos, redução de glicoproteínas, atenuação de sintomas e dificuldades na purificação de partículas complexas do vírus (Ávila et al., 1990; Resende, 1993). A fim de se evitar este inconveniente, para a preservação de tospovírus utiliza-se mais comumente a transmissão por enxertia ou por meio de tripes-vetor, e o armazenamento em nitrogênio líquido (Ávila *et al.*, 1990). Um outro método também eficiente para a conservação de vírus, particularmente aqueles mais instáveis como os do gênero *Tospovirus*, é a liofilização (Duval e Cupertino, 1993). Através da comparação de quatro métodos de preservação de tospovírus: manutenção “in vivo” empregando inoculação mecânica em fumo TNN; enxertia; liofilização e manutenção em nitrogênio líquido, Juliatti (1994) constatou que este último método foi o único que preservou a infectividade de todos os isolados de

tospovírus testados por um período de até 18 meses, além de não haver contaminação por outros vírus.

2.4 Detecção

Os tospovírus apresentam grande variabilidade e ampla distribuição no Brasil (Nagata et al., 1993; 1995). Das espécies descritas até o momento apenas 5 foram relatadas no Brasil, quais sejam: TSWV, TCSV, GRSV, isolados Chry 1 e Br-11t e isolado Br-09z (Ávila, 1993a; Resende et al., 1996). Segundo levantamento realizado, Nagata et al.(1995) observaram uma distribuição regional característica de três espécies de tospovírus: TSWV, TCSV, GRSV. O TSWV foi encontrado predominantemente no Distrito Federal e Paraná e o TCSV principalmente encontrado no estado de São Paulo. Em Minas Gerais foram encontradas as três espécies, com predominância das duas últimas. Entretanto, o número de amostras coletadas parece não ter sido representativo.

Embora a reação em plantas hospedeiras ainda seja adotada como uma maneira de diagnosticar tospovírus, ela parece não ser uma técnica adequada quando se deseja separar espécies, pois muito freqüentemente pode ocorrer sobreposição do círculo de hospedeiras entre elas (Ávila, 1992). Além disso, observa-se comumente a atenuação ou mesmo a supressão dos sintomas após algumas transmissões mecânicas. Deste modo, o uso de hospedeiras seria útil apenas para detectar a presença de um isolado de tospovírus.

Devido à sua instabilidade “in vitro”, os primeiros pesquisadores a trabalharem com esse vírus tiveram muitas dificuldades na sua purificação (Best, 1968), e o faziam apenas parcialmente (Best et al., 1967). Várias tentativas foram realizadas visando identificar serologicamente o TSWV (Feldman e Boninsegna, 1968). Antissoro efetivo na detecção do TSWV só foi obtido em 1986, por Gonalves e Trujillo, que conseguiram detectar o vírus em tecidos foliares de *Carica papaya* L.(Caricaceae), *Gomphrena globosa* L.(Amaranthaceae), *Vinca rosea* L.(Apocynaceae),

Nicotiana tabacum L.(Solanaceae), *Lycopersicon esculentum* Mill.(Solanaceae) e *Lactuca sativa* L.(Asteracea). A distinção, bem como a detecção das espécies de tospovírus, tanto em extratos vegetais como no inseto vetor, é feita atualmente através do teste ELISA , utilizando-se antissoros policlonais de alta especificidade ao vírus completo e à proteína do nucleocapsídeo (Cho et al., 1988; Ávila et al., 1990; Wang e Gonsalves, 1990; Resende et al., 1991). Este método tem sido utilizado em detrimento ao sistema anterior de distinção de isolados que os classificava em isolados mais ou menos agressivos em função da sua virulência na planta de tomate (Cupertino et al., 1981).

Técnicas moleculares, como o uso de hibridização com sondas de cDNA e PCR-“Polymerase Chain Reaction”, têm sido relatadas como efetivas na detecção de tospovírus (Ronco et al., 1989; Weekes et al., 1996). Essas técnicas permitem detectar espécies diferentes de tospovírus simultaneamente, inclusive aquelas ainda não descritas (Pozzer et al., 1996).

2.5 Estirpes, hospedeiros diferenciais e gama de hospedeiros

A existência de uma grande diversidade genotípica é esperada entre os diferentes isolados de tospovírus, considerando que são vírus cosmopolitas, ocorrendo nos mais diversos nichos ecológicos e hospedeiros (Ávila, 1993b). Vários isolados têm sido encontrados infectando diferentes espécies de plantas induzindo os mais diversos sintomas. Best (1968) acreditava que as moléculas de RNA, que compõem o vírus, eram as responsáveis pelo aparecimento de novas estirpes e variabilidade dos sintomas. Estudos mais recentes comprovam e elucidam esta teoria , mostrando que o genoma tripartido dos tospovírus pode sofrer recombinações resultando em variantes do vírus que diferem dos isolados parentais em várias características fenotípicas, tais

como morfologia da lesão, movimento sistêmico e habilidade de quebrar a resistência de plantas transgênicas contendo o gene N da nucleoproteína do TSWV (Qiu et al., 1995).

Isolados de TSWV encontrados em tomateiros da região de Lavras-MG foram separados baseando-se na expressão de sintomas em três hospedeiras: *Nicotiana tabacum* L. cv. Turkish NN (TNN), *Datura stramonium* e *Lycopersicon esculentum* cv. Kada (Barbosa e Figueira, 1990).

Sendo os tospovírus de fácil transmissão mecânica, o uso de hospedeiras indicadoras, freqüentemente, tem sido utilizado para diagnosticar TSWV no Brasil. Como plantas indicadoras podem ser usadas: *Petunia hybrida* Vilm., *Nicotiana tabacum* L. cv. Turkish NN (TNN), *Cucumis sativus* L. (cotilêdones), *Datura stramonium* L., *Vinca rosea* L., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Tropaeolum majus* L., destacando-se entre elas a *Petunia*, devido à rapidez na reprodução dos sintomas, formando lesões locais sob condições favoráveis dentro de 2-4 dias (Ie, 1970; Francki e Hatta, 1981). Estudos realizados por Barradas e Ferrari (1992), sugerem o emprego rotineiro de *Petunia integrifolia* Hooke como hospedeira, por apresentar sintomas característicos do vira-cabeça, e ser de fácil cultivo. Cupertino et al. (1981), tentativamente, classificaram isolados de tospovírus de acordo com a sua virulência e hospedeira de origem.

Contudo, observa-se que essas classificações, exclusivamente fenotípicas, não foram conclusivas devido à falta de outros dados moleculares e serológicos que pudessem diferenciar estirpes e espécies de vírus. O conceito de espécie foi introduzido recentemente na taxonomia moderna de vírus pelo "International Committee on Taxonomy of Viruses", evitando assim o uso de conceitos pouco discriminativos como serogrupos e serotipos (Francki et al., 1991).

Grandes perdas, causadas pelo vira-cabeça, ocorrem em função da vasta gama de hospedeiros. De acordo com Ávila (1992, 1993b), cerca de 550 espécies vegetais, de aproximadamente 70 famílias, incluindo mono e dicotiledôneas, podem ser infectadas por

tospovírus. Entre as espécies hospedeiras encontram-se importantes hortaliças, fruteiras e ornamentais, bem como plantas silvestres que desempenham um importante papel, como reservatório de vírus, ou como hospedeiras do inseto vetor (Costa e Forster, 1942; Barradas, Alexandre e Vicente., 1979, 1981, 1982) sendo a grande maioria pertencente as famílias Solanaceae, Compositae e Leguminosae (Francki e Hatta, 1981). A lista de hospedeiros do vírus do vira-cabeça, incluindo plantas cultivadas e da vegetação espontânea, é relatada por Costa e Forster (1942). Já foram relatadas no Brasil cerca de 46 plantas hospedeiras, entre elas, as seguintes são as de ocorrência mais freqüente, podendo funcionar como hospedeiro às vezes sem exibir sintomas aparentes: *Nicotiana tabacum* L. (fumo), e outras do mesmo gênero, *Solanum tuberosum* L. (batata), *S. nigrum* L. (maria-pretinha), *S. dulcamara* L., *S. melongera* L.(berinjela), *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomateiro), *Datura stramonium* L. (datura), *Nicandra physaloides* Gaerth., *Physalis peruviana* L., *P. brasiliensis* Sendt., *Capsicum annum* L. (pimentão), *C. frutescens* L. (pimentas), *Petunia* sp (petunia) - Solanaceae; *Amaranthus* sp. (caruru) - Amaranthaceae; *Bidens pilosa* L. (picão), *Lactuca sativa* L. (alface) - Asteraceae; *Tropaeolum majus* L. - Tropaeolaceae; e *Portulaca oleraceae* L. (beldroega) - Portulacaceae (Tokeshi e Carvalho, 1980). Novas hospedeiras do vírus tem sido identificadas (Barradas, Alexandre e Vicente, 1981, 1982; Reifschneider et al., 1989; Barradas e Ferrari, 1992; Jordá, Ortega e Juarez, 1995).

2.6 Sintomatologia

Fatores como espécie e variedade do hospedeiro, idade, estado nutricional, condições ambientais e estirpes do vírus atuam como determinantes da sintomatologia apresentada (Costa, 1944; Costa et al., 1964; Francki e Hatta, 1981) por plantas infectadas por tospovírus.

Inicialmente, as plantas jovens apresentam um retardamento ou paralisação do crescimento, seguido por perda da cor verde nas folhas e arqueamento do ráquis para baixo. Nos folíolos observam-se deformação e um enrolamento do limbo para cima, mostrando cor bronzeada e/ou lesões necróticas. Anéis necróticos ou cloróticos também podem ser observados nas folhas e nos frutos infectados. Se a estirpe for agressiva, a necrose se estende aos pecíolos, sépalas e ráquis, podendo causar a morte da ponta de crescimento e de toda a planta.(Costa, 1944; Costa et al., 1964, Tokeshi e Carvalho, 1980; Figueira, 1985).

Estirpes mais fracas não causam necrose, somente arroxamento das folhas, arqueamento, enrolamento e clorose dos folíolos . Geralmente o ponteiro curva-se para um dos lados, sintoma este que deu origem ao nome da doença (vira-cabeça). Nos frutos verdes podem ser freqüentemente observadas, interna ou externamente, lesões necróticas em forma de anéis. Já nos frutos maduros, manchas circulares ou concêntricas podem aparecer como consequência da despigmentação da polpa naqueles locais (Costa, 1944; Costa et al.,1964; Tokeshi e Carvalho, 1980). A ocorrência de partículas do vírus pode ser observada somente nos frutos, permanecendo os demais tecidos da planta livres do vírus. Isto pode ser explicado pela preferência do tripses vetor pela flor amarela, levando à infecção localizada no fruto (Pavan, 1992; Pavan et al., 1993). Desta forma a doença pode ocasionar prejuízos totais à cultura, quer seja pela destruição da planta ou pela desvalorização dos frutos já formados.

As condições ambientais exercem importante papel sobre a incidência desta doença, influenciando tanto a manifestação dos sintomas como o seu desenvolvimento, além de atuar sobre a proliferação do inseto vetor (Costa, 1944).

Estudos realizados por Hokama e Mondail (1990), empregando a inoculação mecânica do vírus, revelaram que a temperatura de 32^oC é a ideal para a expressão de sintomas causados pelo

TSWV em *Cucumis sativus* L.(pepino) e em *Nicotiana glutinosa* L.. Observou-se também que a 16°C não ocorreu infecção em ambos os hospedeiros avaliados.

Os sintomas internos ou histológicos são caracterizados pelo acúmulo de partículas virais nas cavidades do retículo endoplasmático das células das raízes, caules, folhas e pétalas infectadas (Ie, 1970; Francki e Hatta, 1981). Em adição, inclusões podem ser observadas no citoplasma de células infectadas, na forma de viroplasmas, caracterizadas pela ocorrência freqüente de massas densas e aglomerados de túbulos com cerca de 40 nm de diâmetro. Freqüentemente também se observam filamentos alongados, flexíveis, ou em arranjo paracristalino que representa a proteína não-estrutural (NSs) codificada pelo S RNA (Ávila, 1993a). O estágio de infecção viral e/ou a estirpe podem induzir variações no aparecimento das inclusões.

2.6.1 Transmissão

2.6.1.1 Vetor

Espécies de tripses (Thysanoptera: Thripidae) como: *Thrips tabaci* Lind., *Frankliniella schultzei* Trybom, *F. occidentalis* Perg. e *F. fusca* Hind., desempenham um papel preponderante na disseminação das diferentes tospoviroses na natureza (Francki e Hatta, 1981; Ávila, 1993a), migrando dentro do campo de produção, e deste para ervas daninhas ou espécies silvestres, inoculando plantas sadias durante todo seu ciclo de vida (Ávila, 1993a). O vetor mais importante dos tospovírus no Brasil parece ser o tripses *Frankliniella paucispinosa* (Costa et al., 1964; Figueira, 1985), considerado sinônimo de *F. schultzei* por De Santis (1970) citado por Pavan et al.(1993). Costa et al.(1964) relatam que, apesar da espécie *Thrips tabaci* ocorrer comumente em outras olerícolas e ser descrita como vetor do TSWV em outros países, parece não ter importância como vetor deste vírus a nível nacional. O tempo de aquisição das partículas virais pelo vetor é

bastante variável (4 - 45 min), ocorrendo somente no estágio larval dos insetos em plantas infectadas, cabendo ao inseto adulto a função de transmitir o vírus (Pozzer et al., 1996). O período mínimo de aquisição é de 15 min. para *T. tabaci*, e o período de incubação ou período latente varia de 4-10 dias, dependendo da espécie do vetor. Estudos recentes evidenciam que a relação vírus/vetor é do tipo circulativa-propagativa (Cho et al., 1988; Ullman et al., 1993). Estes autores, utilizando-se de ELISA e análise imunocitoquímica, demonstraram o acúmulo, em tripes, de quantidades significativas de proteína do nucleocapsídeo e proteína não-estrutural (Nss), codificadas pelo S RNA. O fato dos tospovírus se replicarem ativamente no inseto vetor permite que este permaneça infectivo durante todo seu ciclo de vida (25-30 dias). Um fato observado é que o vírus não é transmitido para a progênie do inseto vetor infectado (Ie, 1970; Francki e Hatta, 1981). Além da disseminação por inseto vetor, o TSWV pode também ser transmitido através de inoculações do extrato de plantas infectadas (Costa e Forster, 1938; Ie, 1970).

2.6.1.2 Sementes

Existem relatos da transmissão de TSWV em sementes de *Cineraria* (96%) e tomate. Mas, neste segundo caso, encontrou-se apenas 1% de infecção, sendo o vírus aparentemente transportado no tegumento, e não no embrião da semente (Ie, 1970). Trabalhos mais recentes sobre a transmissão do vírus por sementes obtiveram resultados negativos (Reifschneider et al., 1989; Pavan, 1992). Pavan (1992) atribui o fato à incapacidade do vírus de infectar grãos de pólen, sendo observado algumas vezes contaminando o tegumento externo da semente, o que inviabiliza sua transmissão por semente, uma vez que o TSWV comporta-se como um vírus altamente instável na ausência de célula hospedeira.

2.7 Controle dos tospovírus

Embora não existam dados quantificando as perdas provocadas pelos tospovírus, a nível de campo, estes são no presente os vírus que mais causam danos econômicos em hortaliças no Brasil, representando também uma grande ameaça à emergente indústria de plantas ornamentais. O controle dessa enfermidade apresenta uma série de dificuldades, notadamente pelo amplo círculo de hospedeiras e pela diversidade de espécies do vírus e do vetor (Pozzer et al., 1996).

As medidas de controle adotadas quase sempre não apresentam a eficiência desejada. Práticas culturais, eliminação de plantas infectadas no campo, erradicação de ervas daninhas, destruição do inseto vetor, uso de extratos vegetais inibidores da multiplicação viral, são exemplos de algumas delas, com sucesso limitado.

Os primeiros relatos sobre o uso de inseticidas para controle de tripes foram feitos por Costa, Forster e Fraga Júnior, em 1950. Em ensaio posterior, Costa e Costa (1971) obtiveram algum sucesso, empregando inseticida sistêmico granulado no solo, tanto no canteiro como no campo, combinado com pulverizações adicionais. Novas tentativas foram feitas usando-se inseticidas foliares combinados com granulados sistêmicos no solo (Costa e Costa, 1972; Costa, Costa e Nagai, 1977). Estes pesquisadores relatam que, apesar dos defensivos terem sido usados intensamente, em altas concentrações, não controlaram eficientemente a população de vetores. Embora o uso de inseticidas seja recomendado como uma medida de controle da virose, Resende e Cupertino (1996) afirmam que este controle não tem sido efetivo, uma vez que o vírus pode ser transmitido antes que os produtos possam eliminar os insetos vetores.

Como método de controle alternativo, substâncias antivirais e inibidores naturais têm sido testados em alguns sistemas vírus-planta, com resultados positivos. De Fazio, Kudamatsu e

Vicente (1987) verificaram que o ácido acetil salicílico (AAS) e o ácido poliacrílico (PA) foram capazes de inibir a reação local e reduzir a percentagem de plantas sistemicamente infectadas, respectivamente. No entanto, estas drogas só se mostraram eficientes quando houve um intervalo igual ou maior do que 48 horas entre o tratamento e a inoculação mecânica. Inibidores naturais extraídos de *Amaranthus viridis* L., *Bougainvillea spectabilis* Willd., *Chenopodium amaranticolor* - Coste e Reyn., *Mirabilis jalapa* L. e *Phytolaca thirsiflora* Fenzl. (ordem Caryophyllales) mostraram-se efetivos na inibição de infecção sistêmica de pelo menos 50% de plantas de tomate (Noronha et al., 1989).

Considerando-se a baixa eficiência e a inviabilidade econômica das várias estratégias de controle das tospoviroses apresentadas até o momento, a resistência varietal constitui-se na medida de controle mais apropriada. Existem vários relatos na literatura sobre a identificação de fontes de resistência em espécies de *Lycopersicon*, selvagens e cultivadas. A espécie *Lycopersicon pimpinellifolium* foi uma das primeiras a serem relatadas como fonte de resistência a tospovírus, porém esta não se mostrou uniforme, em ensaios realizados durante dois anos por Smith (1944). As espécies *L. hirsutum* e *L. peruvianum* também foram citadas por Costa (1944) como resistentes ao vírus.

Kikuta, Hendrix e Frazier (1945) desenvolveram no Hawai uma cultivar chamada Pearl Habor, resistente a um isolado local, porém esta comportou-se como suscetível a um isolado de New Jersey (Holmes, 1948). Por outro lado, resistência ao isolado de New Jersey foi observada em duas cultivares sul americanas, oriundas da Argentina, Rey de Los Tempranos e Manzana, mas quando testadas no Hawai, comportaram-se como suscetíveis.

No Brasil, Nagai e Costa (1967) avaliaram os germoplasmas *Lycopersicon pimpinellifolium* (PI 126410), Rey de Los Tempranos, Plantense, Tambau e Rei Umberto e

verificaram que estes possuíam certo nível de resistência a determinadas estirpes do vírus, porém abaixo do nível desejável. Com o objetivo de localizar fontes de resistência a tospovírus para uso em programas de melhoramento, Cupertino et al.(1986) avaliaram, em testes de inoculação, feitos em casa-de-vegetação, os níveis de resistência a esse vírus apresentados por linhagens e cultivares de *Lycopersicon esculentum*, *L. cheesmanii*, *L. peruvianum*, *L. pimpinellifolium* e híbridos de *L. esculentum* x *L. pimpinellifolium* (mais propriamente classificados como *L. esculentum* var. *cerasiforme*). Como inóculo foram usados isolados do vírus coletados em lavouras de ervilha, pimentão e tomate, que se mostraram virulentos a tomate “Santa Cruz Kada”, os quais foram mantidos em *Datura stramonium* e *Nicotiana rustica*. De acordo com os resultados obtidos, das 120 introduções testadas, 46 se apresentaram como resistentes. Dessas, 37 eram *L. peruvianum*, 4 híbridos de *L. esculentum* x *L. pimpinellifolium* e 5 *L. pimpinellifolium*.

Maluf, Toma-Braghini e Corte (1991), testaram trinta e dois acessos de *Lycopersicon* spp, sendo selecionados cinco acessos quanto a sua maior tolerância ou resistência à TSWV: *L. peruvianum* (LA -444-1), *L. hirsutum* (PI 127826), *L. hirsutum* var. *glabratum* (PI 134417), *L. pimpinellifolium* (PI 732293-2V) e *L. esculentum* (Rey de Los Tempranos). Estes pesquisadores conseguiram incorporar gene(s) de resistência do acesso Rey de Los Tempranos, uma fonte de resistência em *L. esculentum*, em genótipos desejáveis agronomicamente, de base genética semelhante à Santa Clara e Ângela Gigante I-5100. Assim, duas novas linhagens com resistência a tospovírus foram obtidas, respectivamente, TSWV-556 (TOM 556) e TSWV-547 (TOM 547). Neste ensaio, o termo resistência não foi usado necessariamente como sinônimo de imunidade, mas como todo mecanismo de reduzir perdas na cultura, conforme citado por Cooper e Jones (1983). Maluf, Toma-Braghini e Corte (1991) relataram que a resistência derivada de Rey de Los Tempranos seja do tipo tolerância controlada por alelos recessivos. No entanto, Juliatti e Maluf

(1995) ao estudarem a herança da resistência ao vira-cabeça nas linhagens TOM 556 e TOM 547 (com diferentes “backgrounds” genéticos, sendo quase isogênicas as cultivares suscetíveis Santa Clara e Ângela Gigante I-5100, respectivamente, e com resistência oriunda de Rey de Los Tempranos), estimaram que esta é controlada por pelo menos 1 a 3 genes com dominância parcial. De acordo com Juliatti, Maluf e Figueira (1994), a resistência proveniente de Rey de Los Tempranos parece ser do tipo parcial ou incompleta, porém efetiva contra uma ampla gama de isolados.

Comparando os níveis de expressão de sintomas e de multiplicação de tospovírus na planta, Resende (1996) verificou que em TOM 547 e TOM 556, apesar da alta concentração de vírus nos tecidos, quando comparadas com suas contrapartidas comerciais suscetíveis, Ângela Gigante I-5100 e Santa Clara, respectivamente, mostraram-se mais resistentes ao desenvolvimento de sintomas de doenças, retardando o efeito do vírus. Em materiais com resistência proveniente de Rey de Los Tempranos, esta autora relata que, embora ocorra multiplicação do vírus na planta, os sintomas não aparecem na mesma velocidade que esta multiplicação, resultando em resistência do tipo tolerância, confirmando os resultados obtidos por Maluf, Toma-Braghini e Corte (1991).

Paterson, Scott e Gergerich (1989) utilizaram a técnica DAS-ELISA na avaliação de 20 cultivares de *L. esculentum* (entre elas Rey de Los Tempranos), 52 acessos de *L. pimpinellifolium* e 8 acessos de *L. peruvianum*, quanto à resistência a um isolado de TSWV. De acordo com estes autores, devem-se inocular 6 a 10 plantas de uma variedade suscetível em cada bandeja, a fim de se monitorar a eficiência do método de transmissão. Neste ensaio, algumas plantas de *L. pimpinellifolium* e todos os acessos de *L. peruvianum* mostraram-se resistentes, apresentando ausência de sintomas e DAS-ELISA negativo. Os autores comentam que a resistência encontrada em *L. peruvianum* é controlada por fatores múltiplos. Entretanto Maluf, Toma-Braghini e Corte

(1991), acreditam que os critérios utilizados por Paterson, Scott e Gergerich (1989) para identificar plantas resistentes, podem ser um tanto drásticos para detectar mecanismos de resistência outros que não a imunidade, levando a descartar acessos tais como Rey de Los Tempranos, o qual tem uma resistência do tipo tolerância, funcional no sentido de retardar a expressão de sintomas, escapando dos prejuízos econômicos.

Kumar, Ullman e Cho (1993) avaliaram a resposta de cinco cultivares e oito espécies selvagens de *Lycopersicon*, para resistência a tospovírus por inoculação mecânica e transmissão por tripes. Ambos os métodos de inoculação resultaram em infecção sistêmica em todos os acessos, exceto *L. peruvianum*. Grande variação na porcentagem de plantas infectadas ocorreu quando se compararam os dois métodos. Observou-se que a inoculação por tripes resultou em poucas plantas infectadas comparada à inoculação mecânica nas cultivares de *L. esculentum* (Manzana, Brasil e Anahu) e em *L. hirsutum* var. *glabratum*. Análises comparativas mostraram que a suscetibilidade é mais eficientemente avaliada através da inoculação mecânica, mas estes pesquisadores ressaltam que o seu uso unicamente pode resultar em perdas de germoplasmas valiosos, uma vez que espécies com resistência à transmissão por vetor poderiam não ser identificadas.

Desde os primeiros estudos visando a identificar fontes de resistência a tospovírus, acessos de *L. peruvianum* são apontados como germoplasmas de alto grau de resistência. Porém, a incompatibilidade nos cruzamentos de *L. esculentum* e *L. peruvianum* dificultava a utilização dessa fonte (Smith, 1944; Costa, 1944). A obtenção de híbridos interespecíficos tornou-se possível através do uso de técnicas biotecnológicas, conseguindo-se assim o cruzamento entre as duas espécies mencionadas. A partir de calos obtidos da cultura “in vitro” de embriões resultantes do cruzamento entre *L. esculentum* e *L. peruvianum*, Siqueira, Fonseca e Sondhal (1988)

conseguiram regenerar plantas. O mesmo resultado foi obtido por Duval , Caldas e Cupertino (1993). Avanços no melhoramento do tomateiro visando à resistência ao vírus do vira-cabeça foram obtidos com o emprego de materiais derivados da hibridização interespecífica entre *L. esculentum* e *L. peruvianum* (Nagai et al., 1991; Duval et al., 1993a), que resultou na obtenção da cultivar resistente Stevens (Van Zijl, Bosh e Coetzee, 1986).

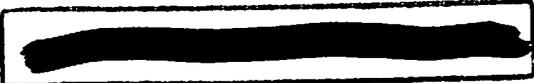
Ensaio objetivando a identificar possíveis fontes de resistência a TSWV em *L. cheesmanii*, *L. chilense*, *L. chmielewskii*, *L. hirsutum*, *L. parviflorum*, *L. pennellii* e *L. peruvianum*, foi conduzido por Stevens, Scott e Gergerich (1994). Dos materiais testados, detectou-se resistência em trinta e três acessos de *L. chilense*, e também em *L. peruvianum* sendo que doze acessos apresentaram algumas plantas infectadas, e oito acessos não apresentaram nenhuma. Sintomas visuais associados ao teste DAS-ELISA foram utilizados nas avaliações.

Outro germoplasma de *L. esculentum*, a cultivar Stevens, é relatado (Van Zijl, Bosh e Coetzee, 1986) como resistente a isolados de diversas origens. Esta cultivar foi desenvolvida na África do Sul a partir do cruzamento entre *L. esculentum* e *L. peruvianum*. Estudando a herança da resistência a TSWV, nesta cultivar, Stevens, Scott e Gergerich (1992) concluíram ser esta controlada por um gene dominante, denominado Sw-5. De acordo com os dados obtidos, a penetrância do gene dominante pode ser estimada em 98,7%, sugerindo que, numa população, 1,3% das plantas podem apresentar sintomas da doença. Duval et al.(1993a) relatam que a ocorrência de penetrância incompleta poderá, eventualmente, explicar o aparecimento de algumas plantas suscetíveis em materiais resistentes. Ultzen et al.(1995) questionam o uso da cultivar Stevens como fonte de resistência, devido ao acúmulo de partículas do vírus em genótipos portadores do gene Sw-5, resultando no aparecimento de sintomas no fruto. Progênie oriundas do cruzamento de F1(Santa Clara x Stevens) x Santa Clara, e sucessivas autofecundações, foram

avaliadas a nível de campo, selecionando-se plantas para formato de fruto e hábito de crescimento do tipo Santa Clara, e resistência a tospovírus, obtendo-se, assim, linhagens com nível de resistência semelhante ao da cultivar Stevens e com características agrônômicas de Santa Clara (Juliatti e Maluf, 1995; Resende, 1996). Dentro destas podemos destacar a linhagem BPX 320F-7902, uma linhagem já fixada para resistência a tospovírus obtida nas primeiras gerações de autofecundação. Resende (1996) relata que isto foi possível por esta resistência ser governada pelo gene Sw-5, oriundo de Stevens com herança monogênica e alta herdabilidade para esta característica. A superioridade, quanto ao nível de resistência a tospovírus, dos híbridos contendo a fonte de resistência de Stevens face aos com fonte de resistência proveniente de Rey de Los Tempranos, é relatada por Resende (1996). Embora o Sw-5 tenha se mantido como um gene de resistência “durável”, já foi relatada, na África do Sul e Hawai, a ocorrência de isolados capazes de quebrar a resistência deste gene (Goldbach e Kuo, 1996). Pozzer et al.(1996) comentam que genótipos portadores do gene Sw-5 vêm sendo avaliados em diversas regiões do Brasil e na presença de diferentes isolados de tospovírus, não tendo sido observada a quebra de resistência por nenhum dos isolados brasileiros.

Boiteux e Giordano (1993) conduziram estudos de herança visando a determinar as bases genéticas da resistência em tomate a duas espécies de tospovírus, TSWV - “Tomato Spotted Wilt Virus” e TCSV - “Tomato Chlorotic Spot Virus”. Os resultados indicam que o mesmo gene (provavelmente o Sw-5) é o responsável pelo controle da resistência em ambas as espécies, e que seu modo de ação se assemelha à resistência vertical, mas com ação contra um grande número de variantes fenotípicos e espécies dentro do gênero tospovírus.

Diferentes genótipos foram testados para resistência a tospovírus, nas condições do Distrito Federal, tendo como testemunhas algumas cultivares comerciais suscetíveis. Três



materiais possuidores do gene Sw-5 (TSW-10, XPH-8013 e XPH-8014) apresentaram as menores percentagens de plantas infectadas (Giordano, Boiteux e Horino, 1994), confirmando resultados anteriormente obtidos, onde a presença deste gene conferiu resistência a diferentes isolados de tospovirus (Van Zijl, Bosh e Coetzee, 1986; Stevens, Scott e Gergerich, 1992; Boiteux e Giordano, 1993).

Uitzen et al.(1995) conseguiram altos níveis de resistência ao TSWV, transformando uma linhagem de tomate suscetível com um gene da nucleoproteína do TSWV, níveis estes que foram mantidos nos híbridos derivados da linhagem de tomate paternal. A estratégia de produção de plantas transgênicas, expressando segmentos do genoma viral, tem sido estudada na tentativa de se obter resistência a infecções viróticas, contudo os trabalhos ainda não são conclusivos (Pozzer et al., 1996).

Stevens, Lamb e Rhoads (1995) realizaram o mapeamento do locus Sw-5 utilizando as técnicas RAPD (“Random amplified polymorphic DNA”) e RFLP (“Restriction fragment length polymorphisms”), na tentativa de identificar marcadores moleculares. Foi verificado numa população F₂ interespecífica que o gene Sw-5 se encontra perto do telômero do cromossomo 9, estando compreendido entre dois marcadores, CT71 e CT220.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação do comportamento de duas linhagens de tomate a isolados de TSWV coletados no estado de Minas Gerais

3.1.1 Escolha das regiões e amostragem

As amostras foram coletadas nas regiões que, segundo levantamento fornecido pelo escritório central da EMATER-MG, são mais representativas na produção de tomate no estado de Minas Gerais. Dentro de cada região, os municípios amostrados foram os seguintes: 1. Metalúrgica: Igarapé, Pará-de-Minas, Mateus Leme, Jequitibá, Paraobepa, Santana do Pirapama, Barbacena, Carandaí; 2. Triângulo: Araguari, Uberlândia; 3 e 4. Noroeste e Vale do Jequitinhonha: Juramento, Taiobeiras; 5. Sul: Alfenas, Fama, Lavras, Ijaci, Pouso Alegre (Anuário..., 1987). Isolados dos municípios de Caratinga, Iapu e de Viçosa não puderam ser incluídos neste ensaio, devido à perda das amostras recebidas.

A coleta de hastes de tomateiros, com sintomas típicos de vira-cabeça, foi efetuada com o auxílio dos escritórios regionais e locais da EMATER-MG. De cada município foram avaliadas cerca de 10-20 amostras em média, constituídas de 3 a 4 hastes, sendo cada uma retirada de uma



FIGURA 1 - Municípios Amostrados no Estado de Minas Gerais

planta no campo de produção. O período de amostragem compreendeu os meses de junho/1996 a abril/1997, incidindo sobre os meses de maior concentração da cultura em cada município. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificadas e encaminhadas para o laboratório de análise viral.

Além destes isolados, foi incluído um outro de TCSV, enviado pelo CNPH/EMBRAPA.

3.1.2 Diagnose e caracterização dos isolados

O trabalho de diagnose foi desenvolvido em casa-de-vegetação e no Laboratório de Fitovirologia do Departamento de Fitopatologia da UFLA, utilizando-se o método de inoculação mecânica em planta indicadora associado à técnica serológica ELISA (“Enzyme-linked immunosorbent assay”).

3.1.2.1 Inoculação mecânica em planta indicadora

Para a diagnose, bem como para a multiplicação do inóculo, foi empregada a inoculação mecânica em plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Turkish NN (TNN), cultivar pré-selecionada pelas suas características de hipersensibilidade ao vírus do mosaico do fumo e suscetibilidade ao vírus do vira-cabeça do tomateiro (Ie, 1970; Francki e Hatta, 1981; Costa e Silva, 1989).

A obtenção da indicadora foi realizada através de semeadura em bandejas plásticas de dimensão 30x50x15 cm, e posterior transplântio para vasos com capacidade de 2 kg.

Os extratos das plantas a serem testadas foram obtidos através da maceração de folhas com sintomas em almofariz de porcelana esterilizado, na presença de tampão fosfato 0,01M, pH-7,0, contendo sulfito de sódio na mesma molaridade.

O extrato de cada amostra foi friccionado nas folhas de 3 plantas de fumo TNN no estádio de 2 pares de folhas definitivas, previamente polvilhadas com carborundo 600 mesh, fazendo-se em seguida uma lavagem cuidadosa das mesmas. Após a inoculação, as plantas, já identificadas, foram mantidas em casa-de-vegetação até a leitura visual dos sintomas.

3.1.2.2 Classificação dos isolados

Os isolados foram classificados quanto à sua agressividade em plantas de fumo TNN, seguindo os seguintes parâmetros:

Isolado Forte - planta com necrose intensa (lesões necróticas, anéis necróticos, anéis necróticos concêntricos).

Isolado Médio - planta com necrose moderada (riscas e lesões necróticas, anéis necróticos).

Isolado Fraco - planta com nenhuma ou pouca necrose (riscas e lesões necróticas, ausência de anéis necróticos), apresentando bronzeamento e/ou amarelecimento.

3.1.2.3 Teste serológico DAS-ELISA (“Double antagonic sandwich - Enzyme-linked immunosorbent assay”)

O teste serológico ELISA foi empregado para a identificação da espécie de tospovirus, utilizando antisoros policlonais para TSWV produzidos por Sanofi Diagnostics Pasteur e Agdia.

Os tampões para cobertura [carbonato-bicarbonato; pH-9,6], extração da amostra [PBS (tampão fosfato salino) + 0,1% Tween 20 + 2% PVP(polivinilpirrolidona)], conjugado [PBS + 0,2% BSA + 0,05% Tween 20; pH-7,0], lavagem [PBS + 0,1% Tween-20 + 0,001% azida sódica], substrato [dietanolamina; pH-9,8] e diluições, foram preparados no Laboratório de

Fitovirologia do DFP/UFLA. As diluições seguiram a tabela que acompanha as instruções do fabricante para a realização de 1000 testes.

Para cobertura inicial das placas, utilizaram-se 50 μ l de solução de anticorpo por orifício. Após cobertas, as placas foram incubadas em câmara úmida por 2 horas à 37°C.

O extrato para realização do teste foi preparado a partir de folhas com sintomas, retiradas das amostras recebidas. As folhas foram maceradas em tampão de extração (na concentração de 1g de folha: 5 ml de tampão), incluindo, além das amostras recebidas, controle positivo constituído por plantas infectadas da cv. Santa Clara e controle negativo constituído por plantas saudas. O extrato foi distribuído nas placas (50 μ l por orifício) e incubado por uma noite em câmara úmida, a 4°C. No dia seguinte as placas foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato salino (PBST). Em seguida acrescentou-se a solução do conjugado (50 μ l por orifício), incubando por mais 2 horas em câmara úmida à 37°C, lavando-se a placa após este período, mais 3 vezes com PBST. Finalmente acrescentou-se o substrato (P-nitrofenilfosfato-PNP), incubando novamente em câmara úmida por 2 horas à temperatura ambiente. Os valores de absorbância, a 405 nm, foram lidos em um leitor de placas Dynatech modelo MRX 800. Foram considerados como positivos, valores $\geq 2 \times$ CN (controle negativo).

3.1.3 Manutenção dos isolados virais

Parte das amostras recebidas foram inicialmente inoculadas mecanicamente em plantas de fumo TNN, sendo a outra parte retirada, fragmentada e colocada em frascos de vidro, devidamente identificados, que foram mergulhados em butijões contendo nitrogênio líquido (-196°C).

3.1.4 Reação de duas linhagens de *Lycopersicon esculentum* a isolados de tospovirus

O ensaio foi conduzido em casa-de-vegetação do DFP/UFLA, no período de junho/1996 a abril/1997.

As linhagens de tomate empregadas, descritas por Juliatti(1994) e Resende(1996), possuem as seguintes características:

TOM-556 - linhagem com 'background' semelhante a Santa Clara e resistência a tospovírus proveniente de Rey de Los Tempranos.

BPX320F-7902 - linhagem proveniente de sucessivas seleções do cruzamento entre as cultivares Stevens (resistente a tospovírus) e Santa Clara (suscetível), tendo como fonte original de resistência *L. peruvianum*.

Santa Clara - cultivar comercial padrão, suscetível ao vira-cabeça do tomateiro.

As sementes das linhagens foram fornecidas pela HortiAgro Sementes Ltda., situada em Ijaci-MG. As plantas foram obtidas através de semeadura em bandejas plásticas de dimensão 30x50x15cm, e posterior transplântio para vasos com capacidade de 2kg, colocando-se 2 plantas/vaso.

Como inóculo, selecionaram-se cerca de 10 isolados de cada região, os quais apresentavam sintomas típicos de vira-cabeça em fumo e com DAS-ELISA positivo para TSWV. Para serem empregados como inóculo neste ensaio, os isolados foram multiplicados em plantas de fumo TNN, conforme descrito anteriormente.

Cada isolado foi inoculado mecanicamente em 10 plantas de cada linhagem, com 2 plantas/vaso (TOM-556, BPX320F-7902, Santa Clara). Como controle, foram utilizadas 2 plantas sadias de cada linhagem para acompanhamento da evolução dos sintomas nas plantas inoculadas.

A inoculação mecânica das plantas receptoras foi efetuada quando estas estavam com 2 pares de folhas definitivas. Durante a permanência do ensaio em casa-de-vegetação, controles fitossanitários e adubações nitrogenadas foram realizados, efetuando-se também, um monitoramento diário das temperaturas máximas e mínimas ocorridas. Os sintomas foram observados diariamente, durante 30 dias a partir da inoculação, sendo a avaliação realizada conforme escala de notas (Maluf, Toma-Braghini e Corte, 1991), onde:

- 1 - ausência de sintomas;
- 2 - sintomas leves em plantas com desenvolvimento normal e ligeiro amarelecimento ou arroxamento dos folíolos inferiores e ausência de anéis necróticos;
- 3 - plantas com amarelecimento e arroxamento mais intenso nos folíolos e alguns pontos necróticos nos folíolos inferiores ou caule;
- 4 - planta com redução acentuada no crescimento, presença de muitos pontos necróticos nos folíolos e/ou caule e amarelecimento generalizado;
- 5 - plantas com necrose severa ou plantas mortas.

3.2 Avaliação da reação e da multiplicação de isolados de TSWV com diferentes agressividades nas linhagens estudadas

Para verificar se a severidade de sintomas apresentados pela linhagem tolerante em relação a isolados mais agressivos é devido à maior velocidade de multiplicação do vírus no interior de seus tecidos ou à maior agressividade dos isolados em questão, foi feita a inoculação mecânica de quatro isolados de TSWV nas linhagens TOM 556, BPX320F-7902 e Santa Clara.

3.2.1 Obtenção do inóculo e inoculação

Dos isolados coletados no estado de Minas Gerais e já identificados por DAS-ELISA como TSWV (conforme metodologia descrita anteriormente), foram selecionados quatro isolados de acordo com a severidade apresentada em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.): isolados mais agressivos - com reação necrótica sistêmica, causando freqüentemente a morte do topo da planta; isolados menos agressivos - de reação amarelo-arroxeadada (Cupertino *et al.*, 1981). Deste modo, utilizaram-se dois isolados caracterizados como mais agressivos, oriundos dos municípios de Fama e Igarapé e dois caracterizados como menos agressivos, oriundos dos municípios de Ubaporanga e Taiobeiras. Porém, estes últimos isolados diferem dos primeiros por terem passado por uma inoculação mecânica a mais.

As plantas de tomate foram cultivadas em vasos, com 2 plantas/vaso. Folhas de fumo infectadas foram maceradas em almofariz de porcelana esterilizado na proporção 4g de folha/ 20 ml de tampão fosfato 0,01M, pH-7,0, e sulfito de sódio na mesma molaridade (Duval *et al.*, 1993b). O extrato foi inoculado mecanicamente por fricção com carborundo 600 mesh.

Foram realizados dois ensaios com os 3 genótipos, sendo o segundo ensaio montado 7 dias após o primeiro. No primeiro ensaio, foram empregadas plantas com 15 dias de idade no momento da inoculação mecânica. No segundo ensaio, as plantas utilizadas estavam mais novas, com cerca de 10 dias de idade no momento da inoculação mecânica.

A montagem dos ensaios seguiu o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3 linhagens x 4 isolados) subdividido no tempo (3 épocas de avaliação), sendo cada parcela constituída por dez plantas.

Procedeu-se a um monitoramento diário das temperaturas máximas e mínimas, com emprego de um termo-higrógrafo, cujas médias semanais estão na Tabela 1A.

3.2.2 Condução

Os ensaios foram conduzidos em casa-de-vegetação do DFP/UFLA, durante o período de maio a junho/1997, em Lavras - MG. Foram utilizados três genótipos diferentes já testados para resistência a tospovirus (BPX 320F-7902, TOM 556 e Santa Clara), bem como quatro isolados de TSWV coletados em Minas Gerais, conforme descrito anteriormente.

3.2.3 Avaliação da severidade

Em ambos os ensaios, utilizando o critério de sintomatologia (Maluf, Toma-Braghini e Corte, 1991) e o teste serológico DAS-ELISA, as plantas foram avaliadas em três épocas distintas. Desta forma, foram realizados três testes serológicos para cada ensaio, com o intuito de se verificar o comportamento do vírus em cada genótipo testado em três fases do ciclo da planta. O extrato para realização do teste serológico DAS-ELISA foi preparado a partir das folhas situadas logo abaixo dos ponteiros das plantas inoculadas. No primeiro ensaio, a primeira avaliação se deu aos dez dias após a inoculação (com plantas aos vinte e cinco dias de idade), a segunda vinte dias após a inoculação (com plantas aos trinta e cinco dias de idade), e a terceira trinta dias após a inoculação (com plantas aos quarenta e cinco dias de idade). No segundo ensaio, a primeira avaliação se deu aos dez dias após a inoculação (com plantas aos vinte dias de idade), a segunda vinte dias após a inoculação (com plantas aos trinta dias de idade), e a terceira trinta dias após a inoculação (com plantas aos quarenta dias de idade). A avaliação dos sintomas foi realizada conforme escala de notas descrita anteriormente.

3.2.4 Análise dos dados

Os dois ensaios foram analisados separadamente utilizando delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial subdividido no tempo através do programa Sisvar*. O teste de média empregado foi o Scott e Knott (1974), por não proporcionar ambigüidade.

* (FERREIRA, D.F. Sistema de análise de variância - Sisvar; programa não publicado).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Agressividade em *Nicotiana tabacum* cv. Turkish dos isolados de TSWV coletados em sete regiões do estado de Minas Gerais

A agressividade dos isolados de TSWV em *Nicotiana tabacum* cv. Turkish (TNN) coletados em 5 regiões de planejamento de Minas Gerais está representada nas Tabelas 1 a 4.

Pode-se observar que, em todas as regiões amostradas foram encontrados isolados causando sintomas fortes, médios e também bastante fracos. Porém em três regiões, Noroeste / Jequitinhonha e Sul , foram encontrados apenas isolados de agressividade alta e média. Em geral, o aumento da temperatura, na maioria dos casos, promoveu o aparecimento precoce dos sintomas nas plantas de fumo e temperaturas mais baixas levaram a um retardamento no aparecimento dos mesmos. Praticamente, em todas as regiões algumas amostras de tomate recebidas mostraram infecção dupla, com TSWV e com o Vírus do Mosaico do Fumo (TMV), constatada através de inoculação mecânica em planta indicadora TNN.

TABELA 1 - Reação de plantas de fumo TNN à primeira inoculação dos isolados de TSWV coletados em tomateiros naturalmente infectados em campo na Região Metalúrgica de Minas Gerais. UFLA, Lavras-MG, 1996/1997.

ORIGEM DO ISOLADO	APARECIMENTO DE SINTOMAS (dias após a inoculação)	AGRESSIVIDADE DO ISOLADO	TEMP.(°C) MÉDIA**	
			MÍN.	MÁX.
7 - Mateus Leme	10	FRACO*	8,2	30,3
8 - Mateus Leme	11	FRACO*	8,2	30,3
9 - Mateus Leme	10	FRACO*	8,2	30,3
11 - Mateus Leme	10	FORTE	8,2	30,3
12 - Mateus Leme	10	FRACO*	8,2	30,3
13 - Mateus Leme	10	FRACO*	8,2	30,3
14 - Mateus Leme	10	FRACO*	8,2	30,3
15 - Mateus Leme	10	FRACO*	8,2	30,3
86 - Mateus Leme	6	FORTE	19,6	38,44
87 - Mateus Leme	5	FORTE	19,6	38,4
88 - Mateus Leme	8	MÉDIO	18,8	37,3
82 - Igarapé	6	FORTE	19,2	37,6
83 - Igarapé	14	FRACO	19,2	37,6
16 - Pará-de-Minas	11	FRACO	8,8	33,1
19 - Pará-de-Minas	11	MÉDIO	8,0	33,1
20 - Pará-de-Minas	11	FORTE	8,0	33,1
21 - Pará-de-Minas	11	MÉDIO	8,0	33,1
22 - Pará-de-Minas	11	FORTE	8,0	33,1
24 - Jequitibá	17	MÉDIO	11,2	34,6
25 - Paraopeba	17	FRACO	11,2	34,6
26 - Jequitibá	14	MÉDIO	11,9	34,8
27 - Jequitibá	14	FORTE	11,9	34,8
28 - Jequitibá	10	MÉDIO*	11,9	34,8
29 - S ^{ma} Pirapama	10	FRACO	11,9	34,8
44 - Jequitibá	9	FORTE	11,9	34,8
45 - Jequitibá	9	FORTE	11,9	34,8
47 - S ^{ma} Pirapama	5	FORTE	11,9	34,8
93 - Carandaí	10	MÉDIO	19,1	37,2
97 - Barbacena	5	MÉDIO	19,6	36,3
103 - Barbacena	5	FORTE	19,6	36,3
114 - Barbacena	5	MÉDIO	18,8	36,7
115 - Barbacena	5	FORTE	18,6	36,4
116 - Barbacena	5	FORTE	18,6	36,4
117 - Barbacena	5	MÉDIO	18,6	36,4
137 - Barbacena	12	FRACO*	15,9	35,6
139 - Barbacena	12	FRACO*	15,9	35,6
141 - Barbacena	12	FRACO*	15,9	35,6

*Isolado contaminado com TMV.

** Temperatura média observada durante o período de permanência do ensaio em casa-de-vegetação.

TABELA 2 - Reação de plantas de fumo TNN à primeira inoculação dos isolados de TSWV coletados em tomateiros naturalmente infectados em campo na Região do Triângulo Mineiro. UFLA, Lavras-MG, 1996.

ISOLADO DO ISOLADO	APARECIMENTO DE SINTOMAS (dias após a inoculação)	AGRESSIVIDADE DO ISOLADO	TEMP. (°C) MÉDIA**	
			MÍN.	MÁX.
23 - Uberlândia	10	FORTE	11,2	34,6
30 - Uberlândia	4	FORTE	11,9	34,8
31 - Araguari	7	MÉDIO	11,9	34,8
32 - Araguari	7	FORTE	11,9	34,8
33 - Araguari	7	FRACO*	11,9	34,8
34 - Araguari	7	MÉDIO	11,9	34,8
35 - Araguari	7	FORTE	11,9	34,8
36 - Araguari	7	FORTE	11,9	34,8
37 - Araguari	7	FORTE	11,9	34,8
38 - Araguari	10	FORTE	11,9	34,8
39 - Araguari	10	FORTE	11,9	34,8
41 - Araguari	12	MÉDIO	11,9	34,8

*Isolado contaminado com TMV.

** Temperatura média observada durante o período de permanência do ensaio em casa-de-vegetação.

TABELA 3 - Reação de plantas de fumo TNN à primeira inoculação dos isolados de TSWV coletados em tomateiros naturalmente infectados em campo nas Regiões Noroeste e Jequitinhonha . UFLA, Lavras-MG, 1996/1997.

ISOLADO DO ISOLADO	APARECIMENTO DE SINTOMAS (dias após a inoculação)	AGRESSIVIDADE DO ISOLADO	TEMP. (°C) MÉDIA**	
			MÍN.	MÁX.
48 - Juramento	5	FORTE	18,4	39,1
52 - Juramento	5	FORTE	18,4	39,1
53 - Juramento	5	FORTE	18,4	39,1
55 - Juramento	5	FORTE	18,4	39,1
56 - Juramento	5	MÉDIO	18,4	39,1
144 - Taiobeiras	5	MÉDIO	16,0	35,6
145 - Taiobeiras	5	FORTE	16,0	35,6
146 - Taiobeiras	5	MÉDIO*	16,0	35,6
147 - Taiobeiras	5	FORTE	16,0	35,6
148 - Taiobeiras	5	MÉDIO	16,0	35,6
152 - Taiobeiras	5	FORTE	16,0	35,6
154 - Taiobeiras	5	FORTE	16,0	35,6
162 - Taiobeiras	6	FORTE	16,0	35,6

*Isolado contaminado com TMV.

** Temperatura média observada durante o período de permanência do ensaio em casa-de-vegetação.

TABELA 4 - Reação de plantas de fumo TNN à primeira inoculação dos isolados de TSWV coletados em tomateiros naturalmente infectados em campo na Região Sul de Minas. UFLA, Lavras - MG, 1996/1997.

ISOLADO DO ISOLADO	APARECIMENTO DE SINTOMAS (dias após a inoculação)	AGRESSIVIDADE DO ISOLADO	TEMP. (°C) MÉDIA**	
			MÍN.	MÁX.
104- Pouso Alegre	5	MÉDIO*	18,6	36,4
110- Pouso Alegre	6	FORTE	18,8	36,7
123 - Lavras	5	FORTE	22,1	39,5
125 - Ijaci	5	FORTE	22,1	39,5
126 - Ijaci	5	MÉDIO*	22,1	39,5
127 - Ijaci	5	MÉDIO	22,1	39,5
134 - Alfenas	5	MÉDIO	16,9	36,5
135 - Fama	5	FORTE	16,8	37,1

*Isolados contaminados com TMV.

** Temperatura média observada durante o período de permanência do ensaio em casa-de-vegetação.

4.2 Reação das linhagens de *Lycopersicon esculentum* a isolados de TSWV coletados no estado de Minas Gerais

Os resultados da reação das três linhagens de *L. esculentum* a esses isolados de TSWV coletados no estado de Minas estão apresentados nas Tabelas 5 a 8.

Os dados obtidos mostram que, para quase todos os isolados testados, houve correspondência na severidade dos sintomas induzidos, pelo mesmo isolado, em plantas de fumo e tomate. Apenas sete isolados (53-Juramento; 145,146,148-Taiobeiras e 114,115,116-Barbacena) diferiram na severidade dos sintomas induzidos nas duas hospedeiras. Apesar de terem sido bastante severos no fumo, seus sintomas foram atenuados quando foram transferidos do fumo para o tomate. Isso pode ter sido devido à atenuação de sintomas que acontece quando se fazem transmissões mecânicas sucessivas dos tospovírus. Ávila (1992; 1993a) e Resende et al. (1994) observaram que a presença de moléculas interferentes de RNA defectivo (DI) de tospovírus, geradas durante sucessivas inoculações mecânicas do vírus, interferem na multiplicação do próprio vírus, atenuando os sintomas da doença. Resende et al. (1994) relatam a formação de RNAs D.I., em *N. rustica* e *Datura* após 4 e 6 passagens mecânicas sequenciais, respectivamente. Entretanto, os outros 62 isolados passaram pelas mesmas duas inoculações mecânicas, ou seja, quando chegaram do campo, foram multiplicados em fumo para serem reinoculados pela segunda vez nas linhagens de tomate em teste. Mesmo assim, mantiveram a correspondência de sintomas nas duas hospedeiras. Isso parece indicar que esses sete isolados possuíam alguma propriedade biológica que poderia torná-los mais instáveis “in vitro” que os outros isolados testados, levando a uma atenuação mais rápida dos sintomas. Poderia também ser devido a uma diferença de agressividade ou a uma interação diferencial com o fumo e o tomate.

TABELA 5 - Reação de três linhagens de *L. esculentum* a isolados de TSWV coletados na Região Metalúrgica de Minas Gerais. UFLA, Lavras-MG, 1996/1997.

ORIGEM DOS ISOLADOS	NOTAS ATRIBUÍDAS ÀS PLANTAS INOCULADAS (MÉDIA DE 10 PLANTAS)			SEVERIDADE EM PLANTAS DE FUMO
	TOM 556	BPX 320F-7902	SANTA CLARA	
7 - Mateus Leme	2	1	2	FRACO
8 - Mateus Leme	2	1	2	FRACO
9 - Mateus Leme	2	1	2	FRACO
11 - Mateus Leme	4	1	5	FORTE
12 - Mateus Leme	2	1	2	FRACO
13 - Mateus Leme	2	1	2	FRACO
14 - Mateus Leme	2	1	2	FRACO
15 - Mateus Leme	2	1	2	FRACO
86 - Mateus Leme	4	1	5	FORTE
87 - Mateus Leme	4	1	5	FORTE
88 - Mateus Leme	3	1	4	MÉDIO
82 - Igarapé	3	1	5	FORTE
83 - Igarapé	2	1	3	FRACO
16 - Pará-de-Minas	2	1	3	FRACO
19 - Pará-de-Minas	3	1	4	MÉDIO
20 - Pará-de-Minas	4	1	5	FORTE
21 - Pará-de-Minas	3	1	4	MÉDIO
22 - Pará-de-Minas	4	1	5	FORTE
24 - Jequitibá	3	1	4	MÉDIO
25 - Paraopeba	2	1	3	FRACO
26 - Jequitibá	3	1	4	MÉDIO
27 - Jequitibá	4	1	5	FORTE
28 - Jequitibá	3	1	3	MÉDIO
29 - St ^{ma} Pirapama	2	1	3	FRACO
44 - Jequitibá	3	1	5	FORTE
45 - Jequitibá	4	1	5	FORTE
47 - St ^{ma} Pirapama	4	1	5	FORTE
93 - Carandaí	3	1	4	MÉDIO
97 - Barbacena	3	1	4	MÉDIO
103 - Barbacena	3	1	5	FORTE
114 - Barbacena	2	1	3	MÉDIO
115 - Barbacena	3	1	4	FORTE
116 - Barbacena	2	1	3	FORTE
117 - Barbacena	3	1	4	MÉDIO
137 - Barbacena	2	1	2	FRACO
139 - Barbacena	2	1	2	FRACO
141 - Barbacena	2	1	2	FRACO
MÉDIAS	2,8	1	3,53	

* Escala de notas : 1. ausências de sintomas; 2. sintomas leves em plantas com desenvolvimento normal e ligeiro amarelecimento ou arroxamento dos folíolos inferiores e ausência de anéis necróticos; 3. plantas com amarelecimento e arroxamento mais intenso nos folíolos e alguns pontos necróticos nos folíolos inferiores ou caule; 4. planta com redução acentuada no crescimento, presença de muitos pontos necróticos nos folíolos e/ou caule e amarelecimento generalizado; 5. plantas com necrose severa ou plantas mortas.

TABELA 6 - Reação de três linhagens de *L. esculentum* a isolados de TSWV coletados na Região do Triângulo Mineiro. UFLA, Lavras-MG, 1996.

ORIGEM DOS ISOLADOS	NOTAS ATRIBUÍDAS ÀS PLANTAS INOCULADAS (MÉDIA DE 10 PLANTAS)			SEVERIDADE EM PLANTAS DE FUMO
	TOM 556	BPX320F-7902	SANTA CLARA	
23 - Uberlândia	4	1	5	FORTE
30 - Uberlândia	4	1	5	FORTE
31 - Araguari	3	1	4	MÉDIO
32 - Araguari	3	1	5	FORTE
33 - Araguari	2	1	3	FRACO
34 - Araguari	3	1	4	MÉDIO
35 - Araguari	3	1	5	FORTE
36 - Araguari	4	1	5	FORTE
37 - Araguari	4	1	5	FORTE
38 - Araguari	4	1	5	FORTE
39 - Araguari	4	1	5	FORTE
41 - Araguari	3	1	4	MÉDIO
MÉDIAS	3,42	1	4,58	

* Escala de notas : 1. ausências de sintomas; 2. sintomas leves em plantas com desenvolvimento normal e ligeiro amarelecimento ou arroxamento dos folíolos inferiores e ausência de anéis necróticos; 3. plantas com amarelecimento e arroxamento mais intenso nos folíolos e alguns pontos necróticos nos folíolos inferiores ou caule; 4. planta com redução acentuada no crescimento, presença de muitos pontos necróticos nos folíolos e/ou caule e amarelecimento generalizado; 5. plantas com necrose severa ou plantas mortas.

TABELA 7 - Reação de três linhagens de *L. esculentum* a isolados de TSWV coletados nas Regiões Noroeste e Jequitinhonha. UFLA, Lavras-MG, 1996/1997.

ORIGEM DOS ISOLADOS	NOTAS ATRIBUÍDAS ÀS PLANTAS INOCULADAS (MÉDIA DE 10 PLANTAS)			SEVERIDADE EM PLANTAS DE FUMO
	TOM 556	BPX320F-7902	SANTA CLARA	
48- Juramento	4	1	5	FORTE
52 - Juramento	3	1	5	FORTE
53 - Juramento	3	1	4	FORTE
55 - Juramento	3	1	5	FORTE
56 - Juramento	3	1	4	MÉDIO
144 - Taiobeiras	2	1	4	MÉDIO
145 - Taiobeiras	2	1	3	FORTE
146- Taiobeiras	2	1	3	MÉDIO
147 - Taiobeiras	3	1	5	FORTE
148 - Taiobeiras	2	1	3	MÉDIO
152 - Taiobeiras	3	1	5	FORTE
154 - Taiobeiras	3	1	5	FORTE
162 - Taiobeiras	3	1	5	FORTE
MÉDIAS	2,77	1	4,31	

* Escala de notas : 1. ausências de sintomas; 2. sintomas leves em plantas com desenvolvimento normal e ligeiro amarelecimento ou arroxamento dos folíolos inferiores e ausência de anéis necróticos; 3. plantas com amarelecimento e arroxamento mais intenso nos folíolos e alguns pontos necróticos nos folíolos inferiores ou caule; 4. planta com redução acentuada no crescimento, presença de muitos pontos necróticos nos folíolos e/ou caule e amarelecimento generalizado; 5. plantas com necrose severa ou plantas mortas.

TABELA 8 - Reação de três linhagens de *L. esculentum* a isolados de TSWV coletados na Região Sul de Minas. UFLA, Lavras-MG, 1996/1997.

ORIGEM DOS ISOLADOS	NOTAS ATRIBUÍDAS ÀS PLANTAS INOCULADAS (MÉDIA DE 10 PLANTAS)			SEVERIDADE EM PLANTAS DE FUMO
	TOM 556	BPX320F-7902	SANTA CLARA	
100 - Lavras	4	1	5	FORTE
104 - Pouso Alegre	3	1	4	MÉDIO
110 - Pouso Alegre	4	1	5	FORTE
123 - Lavras	4	1	5	FORTE
125 - Ijaci	4	1	5	FORTE
126 - Ijaci	3	1	4	MÉDIO
127 - Ijaci	3	1	4	MÉDIO
134 - Alfenas	3	1	5	MÉDIO
135 - Fama	4	1	5	FORTE
MÉDIAS	3,56	1	4,67	

* Escala de notas : 1. ausências de sintomas; 2. sintomas leves em plantas com desenvolvimento normal e ligeiro amarelecimento ou arroxamento dos folíolos inferiores e ausência de anéis necróticos; 3. plantas com amarelecimento e arroxamento mais intenso nos folíolos e alguns pontos necróticos nos folíolos inferiores ou caule; 4. planta com redução acentuada no crescimento, presença de muitos pontos necróticos nos folíolos e/ou caule e amarelecimento generalizado; 5. plantas com necrose severa ou plantas mortas.

Nos casos de infecção dupla, quando TSWV e o Vírus do Mosaico do Fumo (TMV) estavam presentes simultaneamente na mesma planta, foi possível verificar que o TMV apresentou uma vantagem competitiva em relação aos TSWV, havendo uma predominância na expressão de seus sintomas, tanto na TOM 556 como na cv. Santa Clara.

Para todos os isolados avaliados, a linhagem BPX320F-7902 recebeu nota 1, apresentando plantas com desenvolvimento normal e ausência de sintomas, comprovando possuir a resistência do tipo imune oriunda de Stevens. Resende (1996), chegou à mesma observação, constatando a nível de campo, que linhagens portadoras do gene de resistência Sw-5 (BPX320E-7902, BPX320E-3905 e BPX320E-4903), comportaram-se de maneira semelhante à da cultivar Stevens. Pozzer et al.(1996) relatam também que outros genótipos portadores do gene Sw-5 avaliados em várias regiões do Brasil e na presença de diferentes isolados de tospovírus, não apresentaram quebra de resistência por nenhum dos isolados brasileiros testados. Os dados das Tabelas 5 a 8 permitem afirmar que nenhum dos isolados de TSWV coletados no estado de MG, testados neste ensaio, foi capaz de superar a resistência encontrada na linhagem BPX320F-7902. Isso indica que esta linhagem apresenta um alto nível de resistência a diferentes isolados de TSWV, com grande probabilidade de ser lançada como cultivar em Minas Gerais. Os dados evidenciam que, pelo menos até o momento, não existe em nossas condições um isolado capaz de superar esta resistência. Outros autores, trabalhando com linhagens portadoras do gene Sw-5 de Stevens, constataram que alguns isolados, da África do Sul e Hawai, quebraram sua resistência (Goldbach e Kuo, 1996), mostrando tratar-se de uma resistência do tipo vertical. Entretanto, pelo número e diversidade de isolados de tospovírus que têm sido testados neste e em outros trabalhos (Stevens, Scott e Gergerich, 1992; 1994; Resende, Maluf e Resende, 1995; Pozzer et al., 1996) essa parece ser uma possibilidade bastante remota em Minas Gerais.

Para a linhagem TOM 556 foram atribuídas notas variando de 2 a 4. Observando-se as referidas tabelas, pode-se verificar que, quando se utilizaram isolados menos agressivos, as notas correspondentes foram também mais baixas. Porém, utilizando-se isolados de maior agressividade, a reação observada nesta linhagem foi um pouco mais drástica, encontrando-se plantas com necrose intensa e acentuada redução do crescimento. Apesar disso, quando comparada com a reação observada na cultivar suscetível Santa Clara, constatou-se que, nesta, os sintomas foram muito mais severos, levando a planta à morte, na maioria dos casos. Considerando-se que as plantas de TOM 556 quando inoculadas, nesse trabalho, foram submetidas a uma forte pressão de inóculo e se encontravam numa fase jovem, em que são muito suscetíveis a viroses, o fato desta apresentar uma reação menos severa que a cultivar suscetível demonstra o seu alto potencial para utilização como planta tolerante. Sabe-se que a pressão de inóculo é muito maior quando se inocula mecanicamente do que em infecções naturais causadas pelo vetor, fazendo com que determinados materiais genéticos possam mostrar resistência à transmissão por tripes, mas não necessariamente à inoculação mecânica (Kumar, Ullman e Cho, 1993). Maluf, Toma-Braghini e Corte (1991) constataram que materiais com resistência oriunda de Rey de Los Tempranos, se mostraram resistentes à transmissão por tripes, o que pode ser um reflexo do menor inóculo inicial, juntamente com o fato de que a multiplicação do vírus na planta não está associada à manifestação de sintomas, resultando em um retardamento na manifestação da doença e, conseqüentemente, em uma resistência de campo. Como a infecção na linhagem TOM 556 pode ocorrer mais tarde, a nível de campo esta tolerância é muito desejável, podendo levar a uma boa convivência com a doença.

4.2.1 Avaliação da reação das linhagens estudadas a um isolado de TCSV

Quando inoculadas com o isolado de TCSV do CNPH-EMBRAPA, as linhagens tiveram a seguinte reação: BPX320F-7902 - imune; TOM 556 - recebeu nota 3; Santa Clara - recebeu nota 5. Esses resultados indicam que as linhagens TOM 556 e BPX320F-7902 podem apresentar resistência não somente ao TSWV, como também a outras espécies, como foi o caso de TCSV.

4.3 Avaliação da reação e da multiplicação de isolados de TSWV com diferentes agressividades nas linhagens estudadas

Os quadros de análise de variância realizada para os dois ensaios estão apresentados nas Tabelas 2A e 3A. Pelos dados obtidos, observa-se que houve uma clara interação entre Época x Isolado x Linhagem, nos dois ensaios. Efetuaram-se as análises de variância entre linhagens separadamente para cada combinação isolado x época. Os quadros de análise de variância do desdobramento de linhagens, dentro de cada época de avaliação, e para cada isolado, estão representados nas Tabelas 4A e 5A.

Os valores do teste de médias Scott e Knott obtidos no 1º ensaio, juntamente com a sintomatologia apresentada pelas linhagens, nas três épocas de avaliação para cada isolado, são encontrados na Tabela 9. Como se pode observar, nas tabelas referidas, a multiplicação inicial do vírus, para todos os isolados testados, foi mais lenta na linhagem TOM 556 em relação à testemunha Santa Clara, podendo com o tempo igualar-se ou até superar a multiplicação encontrada na Santa Clara. Já a linhagem BPX320F-7902 não proporcionou multiplicação do vírus nem expressão de sintomas nas plantas, confirmando sua resistência tipo imunidade conferida pelo gene Sw-5 de Stevens.

TABELA 9 - Reação das linhagens TOM 556, BPX320F-7902 e Santa Clara a quatro isolados de TSWV inoculados mecanicamente - 1º ensaio. UFLA, Lavras-MG, 1997.

ISOLADOS DE TSWV	Absorbância média ¹ (Ab) a 405 nm, de 30 plantas no teste DAS-ELISA e notas ² (Nt) atribuídas aos sintomas de cada uma das linhagens aos 10, 20 e 30 dias após a inoculação mecânica com os isolados de TSWV relacionados - 1º ensaio. UFLA, Lavras-MG, 1997.																	
	TOM 556						BPX320F-7902						SANTA CLARA					
	10 DIAS		20 DIAS		30 DIAS		10 DIAS		20 DIAS		30 DIAS		10 DIAS		20 DIAS		30 DIAS	
	Ab	Nt	Ab	Nt	Ab	Nt	Ab	Nt	Ab	Nt	Ab	Nt	Ab	Nt	Ab	Nt	Ab	Nt
FAMA	0,144a*	1	1,214c	2	0,314b	2	0,126a	1	0,135a	1	0,113a	1	0,416b	2	0,935b	3	0,497c	3
UBAPORANGA	0,252a	1	1,225c	2,3	0,117a	1	0,137a	1	0,128a	1	0,121a	1	0,850b	2,5	0,964b	3	0,153a	1
IGARAPÉ	2,092b	2	3,031b	3	2,424c	3	0,114a	1	0,111a	1	0,128a	1	3,086b	3	3,141b	4	1,721b	4,5
TAIOBEIRAS	0,209a	1	1,968c	2,4	0,122a	1	0,121a	1	0,113a	1	0,132a	1	0,505b	2,3	1,085b	3	0,188a	1,3

*Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott e Knott ($\alpha = 0,05$).

¹ Absorbância média do controle negativo (CN) = 0,1427; valores positivos $\geq 2 \times$ CN

² Escala de notas : 1. ausências de sintomas; 2. sintomas leves em plantas com desenvolvimento normal e ligeiro amarelecimento ou arroxamento dos folíolos inferiores e ausência de anéis necróticos; 3. plantas com amarelecimento e arroxamento mais intenso nos folíolos e alguns pontos necróticos nos folíolos inferiores ou caule; 4. planta com redução acentuada no crescimento, presença de muitos pontos necróticos nos folíolos e/ou caule e amarelecimento generalizado; 5. plantas com necrose severa ou plantas mortas.

Da primeira para a segunda época de avaliação, houve uma tendência de evolução dos sintomas, bem como da multiplicação viral em todas as plantas testadas das linhagens TOM 556 e Santa Clara, para todos os isolados. Na terceira época de avaliação, verificou-se uma redução na concentração de vírus nas linhagens TOM 556 e Santa Clara, mais acentuada nesta última, para o isolado de Igarapé, que se mostrou mais agressivo nesse experimento. A observação da sintomatologia apresentada por estas linhagens sugere que o aumento aparente na concentração de vírus na TOM 556 relativamente a Santa Clara, para esse isolado, poderia ser devido à maior suscetibilidade das plantas de Santa Clara, que receberam notas variando de 4 a 4.5, e que, devido ao seu péssimo desenvolvimento, não ofereceram condições para que a multiplicação viral ocorresse. O mesmo não ocorreu com o isolado de Fama, que foi menos agressivo e que apresentou maior multiplicação nas plantas de Santa Clara do que em TOM 556, nessa época de avaliação.

Os isolados de Ubaporanga e Taiobeiras induziram um comportamento diferenciado nas linhagens estudadas. Aos 10 dias após a inoculação mecânica, não induziram sintomas na linhagem TOM 556, a exemplo do que foi observado também com o isolado de Fama. Aos 20 dias, foi observado um aumento na multiplicação viral em todas as linhagens, entretanto, aos 30 dias após a inoculação, apresentaram valores negativos para o teste DAS-ELISA associados à ausência total de sintoma nos 2/3 superior da planta, indicando ausência de translocação do vírus do ponto de inoculação para as partes mais novas das plantas. Este fato sugere que pode ter havido alguma deleção na partícula, devido às transmissões mecânicas sucessivas, gerando partículas defectivas (DI), e que esta deleção poderia ser no sentido de prejudicar a proteína responsável pelo transporte do vírus célula-a-célula. Sabe-se que o movimento das partículas virais, de uma para outra célula e a longas distâncias, depende de fatores ligados ao vírus, como proteínas capsidiais, e

à planta hospedeira como os plasmodesmas e proteínas a eles associadas (Lucas, Ding e Van der Schoot, 1993; Lucas e Gilbertson, 1994; Dolja et al., 1995;; Carrington et al., 1996). Portanto, existe a probabilidade de que os RNAs defectivos, que são observados nesses tipos de partículas DI, possam apresentar alguma alteração no código responsável pela produção desse tipo de proteína de movimento.

Quando se avaliaram os níveis de expressão de sintomas e de multiplicação de tospovírus na planta, verificou-se que a linhagem TOM 556 não inibiu a multiplicação de vírus nos tecidos, mas apesar dessa alta concentração de vírus, quando comparada com a testemunha Santa Clara, mostrou-se mais resistente ao desenvolvimento de sintomas da doença, apresentando sintomas atenuados, mesmo quando inoculada com o isolado de Igarapé, de agressividade nitidamente maior. Resende (1996) chegou à mesma conclusão quando comparou os níveis de expressão de sintomas na linhagem TOM 556 em relação à multiplicação dos isolados de tospovírus por ela testados.

Juliatti e Maluf (1995) acreditam que a resistência presente na linhagem TOM 556 seja controlada por pelo menos 1 a 3 genes com dominância parcial. Assim, pelo modo de herança oligogênica e pelo mecanismo de resistência tipo tolerância observado nestes ensaios, a resistência da linhagem TOM 556, proveniente de Rey de Los Tempranos, também se comportou como sendo do tipo horizontal, efetiva contra uma ampla gama de isolados, confirmando resultados obtidos por Juliatti, Maluf e Figueira (1994). Fraser (1990) supõe que sistemas oligogênicos similares à resistência parcial poderão conferir maior estabilidade perante as variações de vírus de plantas em condições de campo, sendo mais difíceis de serem superados. O adiamento na expressão dos sintomas da doença, conforme constatado por Maluf, Toma-Braghini e Corte (1991) e Resende (1996) torna a linhagem TOM 556 um material muito promissor no controle de

tospovírus, considerando que esta tolerância é altamente desejável a nível de campo, podendo diminuir os danos econômicos.

Os valores do teste de médias Scott e Knott, juntamente com a sintomatologia apresentada pelas linhagens, nas três épocas de avaliação para cada isolado, no 2^a ensaio, se encontram na Tabela 10.

TABELA 10 - Reação das linhagens TOM 556, BPX320F-7902 e Santa Clara a quatro isolados de TSWV inoculados mecanicamente- 2º ensaio. UFLA, Lavras-MG, 1997.

Absorbância média ¹ (Ab) a 405 nm, de 30 plantas no teste DAS-ELISA e notas ² (Nt) atribuídas aos sintomas de cada uma das linhagens aos 10, 20 e 30 dias após a inoculação mecânica com os isolados de TSWV relacionados - 2º ensaio. UFLA, Lavras-MG, 1997.																		
ISOLADOS DE TSWV	TOM 556						BPX320F-7902						SANTA CLARA					
	10 DIAS		20 DIAS		30 DIAS		10 DIAS		20 DIAS		30 DIAS		10 DIAS		20 DIAS		30 DIAS	
	Ab	Nt	Ab	Nt	Ab	Nt	Ab	Nt	Ab	Nt	Ab	Nt	Ab	Nt	Ab	Nt	Ab	Nt
FAMA	0,580b*	1	0,425b	1	0,690b	2,3	0,126a	1	0,118a	1	0,154a	10	0,606b	2,5	0,500b	2,5	0,659b	3
UBAPORANGA	0,125a	1	0,152a	1	0,167a	1	0,127a	1	0,138a	1	0,145a	1	0,529b	2,3	0,205a	2	0,215a	1
IGARAPÉ	2,958b	1	1,965b	1	2,904b	2,5	0,112a	1	0,128a	1	0,139a	1	3,041b	2,7	2,366c	3	3,066c	3,5
TAIOBEIRAS	0,586b	1	0,189a	1	0,216a	1	0,122a	1	0,140a	1	0,139a	1	0,679b	2	0,198a	1	0,333b	2

*Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott e Knott ($\alpha = 0,05$).

¹ Absorbância média do controle negativo (CN) = 0,1427; valores positivos $\geq 2 \times$ CN

² Escala de notas : 1. ausências de sintomas; 2. sintomas leves em plantas com desenvolvimento normal e ligeiro amarelecimento ou arroxamento dos folíolos inferiores e ausência de anéis necróticos; 3. plantas com amarelecimento e arroxamento mais intenso nos folíolos e alguns pontos necróticos nos folíolos inferiores ou caule; 4. planta com redução acentuada no crescimento, presença de muitos pontos necróticos nos folíolos e/ou caule e amarelecimento generalizado; 5. plantas com necrose severa ou plantas mortas.

A exemplo do 1º ensaio, não houve multiplicação dos isolados nem expressão de sintomas na linhagem BPX320F-7902, confirmando sua resistência tipo imunidade derivada da cv. Stevens (gene Sw-5). Já as plantas de TOM 556 apresentaram (Tabela 10) inicialmente uma concentração viral semelhante à da linhagem Santa Clara, quando inoculadas com os isolados de Fama, Igarapé e Taiobeiras. Esta maior multiplicação viral inicial pode ser atribuída ao fato da inoculação mecânica ter sido efetuada numa fase em que as plantas estavam mais jovens do que as utilizadas no 1º ensaio, podendo desta forma estar mais suscetíveis.

Aos 20 dias após a inoculação mecânica, houve uma tendência de estabilização dos sintomas, com redução da multiplicação viral nas plantas testadas, para todos os isolados. Isso poderia ser explicado pela queda na temperatura que ocorreu nesta época de avaliação, passando a temperatura média mínima de 12,3°C para 8,7°C e a máxima de 29,6°C para 27,6°C (Tabela 1A). É possível que, com a queda na temperatura, a multiplicação viral nas plantas testadas tenha sido inibida, o que não aconteceu com o desenvolvimento da planta, resultando na redução da concentração de vírus detectada em seus tecidos. É bastante comum haver uma tendência à maior multiplicação viral em temperaturas mais altas. Hokama e Mondail (1990) observaram que a temperatura de 32°C é a ideal para expressão de sintomas de TSWV inoculado mecanicamente em *Cucumis sativus* L. e em *Nicotiana glutinosa* L..

Na terceira época de avaliação, verificou-se uma evolução dos sintomas, acompanhada por um aumento na concentração de vírus nas linhagens TOM 556 e Santa Clara, exceto para o isolado de Ubaporanga. Este aumento na concentração de vírus poderia também ser explicado por uma alteração na temperatura média mínima e máxima, respectivamente, de 8,7°C para 11,7°C e de 27,6°C para 33,0°C (Tabela 1A), na época de avaliação do ensaio, favorecendo a multiplicação viral no interior dos tecidos das plantas testadas.

Para as três linhagens, aos 20 dias após a inoculação mecânica com os isolados de Ubaporanga e Taiobeiras, foram obtidos valores negativos no teste DAS-ELISA, revelando novamente a não translocação do vírus do ponto de inoculação, para outras partes da planta. Isso deve ter acontecido pelo mesmo motivo discutido anteriormente para o 1º ensaio.

De modo geral, nos dois ensaios, a linhagem TOM 556 não inibiu a multiplicação viral em seus tecidos. Apesar disso, pode-se constatar que sua resistência do tipo tolerância não se descaracterizou, o que pode ser constatado observando-se a sintomatologia apresentada pelas plantas e os dados do 2º ensaio, onde a linhagem TOM 556 apresentou, já no final de ciclo, concentração de vírus menor que a encontrada na cv. Santa Clara, mesmo quando inoculada com isolado mais agressivo, numa fase em que as plantas estavam mais jovens que as utilizadas no 1º ensaio.

Tanto no 1º como no 2º ensaio, para todos os isolados testados, a linhagem BPX320F-7902 recebeu nota igual a 1, apresentando plantas com desenvolvimento normal e ausência de sintomas. Nas três épocas de avaliação, os valores obtidos para a linhagem BPX320F-7902, pelo teste DAS-ELISA, foram negativos para os quatro isolados testados, indicando ausência de multiplicação viral. Desta forma, como era esperado, a linhagem BPX320F-7902 comprovou sua resistência do tipo imune, não permitindo a multiplicação viral no interior de seus tecidos. Resultados semelhantes foram obtidos por Stevens, Scott e Gergerich (1992), nos quais populações obtidas a partir do cruzamento com a cv. Stevens, apresentaram testes negativos para ELISA, quando inoculadas com cinco isolados de TSWV de diferentes regiões geográficas. Resende (1996), avaliando a reação de linhagens portadoras do gene Sw-5 a um isolado de TSWV, também obteve valores negativos para o teste ELISA e ausência de sintomas nas plantas.

Em comunicação pessoal, W.R. Maluf (1997)* relata que três híbridos, Jessica e Jessica Plus (com fonte de resistência oriunda de Rey de Los Tempranos) e Jessica Star (o qual associa as fontes de resistência de Rey de Los Tempranos e Stevens), já se encontram disponíveis comercialmente. Este último material, por apresentar maior diversidade quanto as fontes de resistência a tospovírus, poderá contribuir para uma maior estabilidade das fontes de resistência empregadas ao longo do tempo. Assim, a utilização destes híbridos, notadamente o Jessica Star, possibilitaria um excelente controle das tospoviroses via resistência varietal, mesmo no caso de identificação de novas espécies ou estirpes de tospovírus capazes de tornar a resistência de Stevens, controlada pelo gene Sw-5, ineficaz.

* Prof. Wilson Roberto Maluf. Departamento de Fitotecnia, UFLA-M.G.

5. CONCLUSÕES

1. A linhagem BPX320F-7902 (com fonte de resistência oriunda da cv. Stevens) foi imune a um isolado de TCSV e a 69 isolados de TSWV provenientes de diversas regiões de Minas Gerais.
2. A linhagem TOM 556 (com resistência proveniente de Rey de Los Tempranos) foi tolerante a um isolado de TCSV e a 69 isolados de TSWV provenientes de diversas regiões de Minas Gerais.
3. A linhagem TOM 556, não inibiu a multiplicação viral em seus tecidos, tendo a concentração final do vírus sido igual ou até maior a encontrada na testemunha Santa Clara; no entanto, os sintomas da doença foram sistematicamente mais atenuados na linhagem TOM 556, relativamente a Santa Clara .
4. A maior multiplicação dos isolados, que causaram sintomas mais severos na linhagem tolerante TOM 556, parece indicar que essa severidade pode estar relacionada a uma maior concentração de vírus em seus tecidos.
5. TOM 556 parece ser o material mais adequado para a discriminação do grau de agressividade dos isolados de tospovírus.
6. A linhagem TOM 556 foi efetiva no sentido de retardar a manifestação dos sintomas da doença, reduzindo assim os prejuízos econômicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DE MINAS GERAIS. Belo Horizonte: Secretaria do Estado de Planejamento e Coordenação Geral, Superintendência Central de Estatística e Informação, 1987. v.6.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de Janeiro: FIBGE, 1995. v.55.
- ÁVILA, A.C. **Diversity of Tospovirus**. Wageningen: Wageningen Agricultural University, 1992. 136p. (Tese- Doutorado em Virologia de Plantas).
- ÁVILA, A.C. Vírus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV): organização do genoma, taxonomia, diagnose e controle. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.11, n.2, p.179- 183, nov. 1993a.
- ÁVILA, A.C. Vírus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV): organização do genoma, transmissão, citopatologia, classificação e identificação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, p.252-253, ago. 1993b. (Suplemento).
- ÁVILA, A.C. de; HUGUENOT, C.; RESENDE, R. de O.; KITAJIMA, E.W.; GOLDBACH, R.W.; PETERS, D. Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. **Journal of General Virology**, London, v.71, p.2801-2807, 1990.
- BARBOSA, C.J.; FIGUEIRA, A.R. Suscetibilidade de cultivares de tomate à estirpes do vírus de vira-cabeça do tomateiro (TSWV) identificado em Lavras-MG. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.15, n.2, p.137, jul. 1990. (Abstr.).
- BARRADAS, M.M.; ALEXANDRE, M.A.V.; VICENTE, M. Solanáceas silvestres como hospedeiras experimentais de vírus. II - *Solanum lycocarpum* St. Hil., *S. mammosum* L. e *S. robustum* Wendl. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.46, n.3/4, p.117-126, jul./dez. 1979.

- BARRADAS, M.M.; ALEXANDRE, M.A.V.; VICENTE, M. Solanáceas silvestres como hospedeiras experimentais de vírus. III- *Solanum diflorum* Vell., *S. jatrophiifolium* Dun. e *S. seaforthianum* Andr. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.48, n.1/4, p.23-29, jan./dez. 1981.
- BARRADAS, M.M.; ALEXANDRE, M.A.V.; VICENTE, M. Solanáceas silvestres como hospedeiras experimentais de vírus. IV- *Solanum fastigiatum* Willd., *S. grandiflorum* R. et P. e *S. sisymbriifolium* Lam. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.49, n.1/4, p.43-49, jan./dez. 1982.
- BARRADAS, M.M.; FERRARI, J.T. *Petunia integrifolia* var. *integrifolia*, hospedeira experimental de vírus. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.59, n.1/2, p.43-48, jan./dez. 1992.
- BEST, R.J. Tomato spotted wilt virus. In: SMITH, K.M.; LAUFER, M.A. (eds.). **Advances in virus reseach**. New York: [s.n.], 1968. v.13, p.65-146.
- BEST, R.J; OLIVEIRA, A.R.; MATIELLO, J.B; KITAJIMA, E.W; COSTA, A.S. Purificação parcial do vírus de vira-cabeça do tomateiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, v.1, n.1, p.18, fev. 1967.
- BITANCOURT, A.A. A mancha anular do tomate. **O Biológico**, São Paulo, v.2, n.3, p.98-100, mar. 1936.
- BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L.B. Genetic basis of resistance against two tospovirus species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Euphytica**, Wageningen, v.71, n.1-2, p.151-154, 1993.
- CARRINGTON, J.C.; KASSCHAU, K.D.; MAHAJAN, S.K.; SCHAAD, M.C. Cell-to-cell and long distance transport of viruses in plantas. **The Plant Cell**, Rockville, v.8, n.10, p.1669-1681, Oct. 1996.
- CHO, J.J.; MAU, R.F.L.; HAMASAKI, R.T.; GONSALVES, D. Detection of tomato spotted wilt virus in individual thrips by enzyme-linked immunosorbent assay. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, n.10, p.1348-1352, 1988.

- CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, Manaus, 1997. **Resumos...Manaus:** Sociedade Brasileira de Olericultura do Brasil, 1997. n.p.(342 Resumos).
- COOPER, J.L.; JONES, A.T. Responses of plants to viruses: proposal for the use of terms. **Phytopathology**, St. Paul, v.73, n.2, p.127-128, Feb. 1983.
- COSTA, A.S. Observações sobre vira-cabeça em tomateiros. **Bragantia**, Campinas, v.4, p.489-508, jan./jun. 1944.
- COSTA, A.S.; CARVALHO, A.M.B.; COSTA, C.L.; NAGAI, H. Moléstia de vírus do tomateiro. **Boletim do Campo**, Campinas, v.183, p.8-26, out./nov. 1964.
- COSTA, A.S.; FORSTER, R. A transmissão mecânica de vira-cabeça por fricção do suco. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.13, n.5-6, p.249-263, maio/jun. 1938.
- COSTA, A.S.; FORSTER, R. Identidade do vírus de vira-cabeça e sua inclusão no grupo do vírus do "spotted wilt". **Bragantia**, Campinas, v.1, n.7, p.491-516, jul. 1941.
- COSTA, A.S.; FORSTER, R. Lista de hospedeiras do vírus de vira-cabeça. **Bragantia**, Campinas, v.2, n.3, p.83-91, mar. 1942.
- COSTA, A.S.; FORSTER, R.; FRAGA JÚNIOR, C. Controle de vira-cabeça do tomate pela destruição do vetor. **Bragantia**, Campinas, v.10, n.1, p.1-9, jan. 1950.
- COSTA, C.L.; COSTA, A.S. Controle de vira-cabeça do tomateiro pela combinação de tratamento inseticida com o aumento do número de plantas por cova. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Piracicaba, v.4, p.75-77, 1971.
- COSTA, C.L.; COSTA, A.S. Controle de vira-cabeça do tomateiro pela destruição do vetor. IV. Novas comparações de inseticidas foliares com um granulado sistêmico. **Revista de Olericultura**, Fortaleza, v.12, p.120-121, jul. 1972.
- COSTA, C.L.; COSTA, A.S.; NAGAI, H. Controle de vira-cabeça do tomateiro pela destruição do vetor. III. Efeito de inseticida sistêmico granulado combinado com pulverizações. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.2, p.23-34, fev. 1977.

- COSTA, A.S.; SILVA, D.M. Origem do fumo TNN, planta-teste padrão na seção de virologia do Instituto Agrônomo de Campinas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.15, p.41, jan./mar. 1989.
- CUPERTINO, F.P.; ÁVILA, A.C.; ARAÚJO, M.T.; KITAJIMA, E.W. Caracterização de isolados de vira-cabeça para emprego em programa de melhoramento do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, n.2, p.525, jul. 1981.
- CUPERTINO, F.P.; ÁVILA, A.C.; ARAÚJO, M.T.; MALUF, W.R. Fontes de resistência ao vírus de vira-cabeça em *Lycopersicon*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, n.2, p.330-331, jun. 1986.
- DE FAZIO, G. de; KUDAMATSU, M.; VICENTE, M. Efeito antiviral do ácido acetil salicílico e do ácido poliacrílico sobre o vírus de vira-cabeça do tomateiro ("Brazilian tomato spotted wilt virus-TSWV") em plantas de fumo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.12, n.1, p.53-57, abr. 1987.
- DOLJA, V.V.; HALDEMAN-CAHILL, R.; MONTGOMERY, A.E.; VANDRBOSCH, K.A.; CARRINGTON, J.C. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of Tobacco Etch Potyvirus. **Virology**, New York, v.206, p.1007-1016, 1995.
- DUVAL, C.M.; CALDAS, L.S.; CUPERTINO, F.P. Obtenção por cultura de embriões de híbridos entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum*, resistentes a tospovirus. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.11, n.1, p.14-17, maio 1993.
- DUVAL, C.M.; CUPERTINO, F.P. Preservação da infectividade de isolados de tospovirus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, n.2, p.233-237, jun. 1993.
- DUVAL, C.M.; CUPERTINO, F.P.; LUIZ, A.B.P.; GIORDANO, L.B. Avaliação de germoplasma de tomate para resistência a um isolado de tospovirus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, n.4, p.548-550, dez. 1993a.
- DUVAL, C.M.; CUPERTINO, F.P.; LUIZ, A.B.P.; GIORDANO, L.B. Metodologia de inoculação de tospovirus visando avaliação de germoplasma de tomate. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, n.4, p.516- 521, dez. 1993b.

- FELDMAN, J.M.; BONINSEGNA, J. Antiserum for tomato spotted wilt virus. **Nature**, London, v.219, n.5149/5152, p.183-184, July 1968.
- FIGUEIRA, A.R. Doenças causadas por vírus. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n.131, p.51-55, nov. 1985.
- FILGUEIRA, F.A.R. Tomate: a mais universal das hortaliças. In: **Manual de Olericultura: Cultura e comercialização de hortaliças**. 2.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1982. Cap.8, v.2, p.223-300.
- FRANCKI, R.I.B.; FAUQUET, C.M.; KNUDSON, D.I.; BROWN, F. - Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, New York, v.2, p.1-450, 1991. (Supplement).
- FRANCKI, R.I.B.; HATTA, T. Tomato spotted wilt virus. In: KURSTAK, E. (ed.). **Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis**. New York: North Holland Biomedical, 1981. Cap.17, p.491-512.
- FRASER, R.S.S. The genetics of resistance to plant virus. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.28, p.179-200, 1990.
- GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; HORINO, Y. Avaliação em condições de campo de genótipos de tomate para resistência a tospoviroses. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.12, n.2, p.176-178, nov. 1994.
- GOLDBACH, R.; KUO, G. Introduction. **Acta Horticulturae**, Taiwan, n.431, p.21-26, Sept. 1996.
- GONSALVES, D.; TRUJILLO, E.E. Tomato spotted wilt virus in papaya and detection of the virus by ELISA. **Plant Disease**, St. Paul, v.70, n.6, p.501-506, June 1986.
- HOKAMA, K.; MONDAIL, S.N. Effect of temperature on symptom expression of tomato spotted wilt virus in cucumber and *Nicotiana glutinosa*. **Review of Plant Pathology**, Richmond, v.69, n.6, p.362, 1990. (Abst. 2917).

- HOLMES, F.O. Resistance to spotted wilt in tomato. **Phytopathology**, St. Paul, v.38, n.6, p.467-473, June 1948.
- IE, T.S. Tomato spotted wilt virus. **Description of Plant Viruses**, Warwick, n.39, Oct. 1970.
- JORDÁ, C.; ORTEGA, A. JUAREZ, M. New hosts of tomato spotted wilt virus. **Plant Disease**, St. Paul, v.79, n.5, p.538, 1995.
- JULIATTI, F.C. **Reação hospedeira, infectividade e controle genético da resistência a tospovirus em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. Lavras: UFLA, 1994. 127p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- JULIATTI, F.C.; MALUF, W.R. Controle genético da resistência do tomateiro a um isolado de tospovirus (TSWV) - análise em plantas individuais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, n.1, p.39-47, mar. 1995.
- JULIATTI, F.C.; MALUF, W.R.; FIGUEIRA, A.R. Reação de linhagens avançadas de tomateiro a isolados de tospovirus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, n.1, p.62-68, mar. 1994.
- KIKUTA, K.; HENDRIX, J.W.; FRAZIER, W.A. **Pearl Harbor, a tomato variety resistant to spotted wilt in Hawaii**. Honolulu: University of Hawaii Agricultural Experiment Station, 1945. (Circular, 24).
- KUMAR, N.K.; ULLMAN, D.E.; CHO, J.J. Evaluation of *Lycopersicon* germplasm for tomato spotted wilt tospovirus resistance by mechanical and thrips transmission. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, n.9, p.938-941, Sept. 1993.
- LIMA, J.A.A. Principais problemas de plantas ocasionadas por vírus no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.11, n.2, p.263-264, jun. 1986.
- LIMA NETO, V. da C.; LIMA, M.L.R. da C.; SOUZA, V.B.V. de; TOMAZ, R.; NIEDERHEITMANN, R.E. Vira-cabeça do tomateiro; problema para a cultura na região metropolitana de Curitiba. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, Curitiba, v.10, n.1/2, p.29-31, 1988.

LUCAS, W.J.; DING, B.; VAN DER SCHOOT, C. Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. **New Phytopathology**, v.125, p.435-476,1993.

LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.32, p.387-411, 1994.

MAFFIA, L.A.; MARTINS, M.C.P.; MATSUOKA, K. Doenças do tomateiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.66, n.6, p.42-60, jun. 1980.

MALUF, W.R.; TOMA-BRAGHINI, M.; CORTE, R.D. Progress in breeding tomatoes for resistance to tomato spotted wilt. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.14, n. 2, p.509-525, abr. 1991.

MOHAMED, N.A. Isolation and characterization of subviral structures from tomato spotted wilt virus. **Journal of General Virology**, Cambridge, v.53, p.197-206, 1981.

NAGAI, H. Avanços obtidos com o melhoramento genético do tomate no Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO E ABASTECIMENTO DE TOMATE, 1, Viçosa, 1990. **Anais ... Viçosa:UFV**, 1990. p.88-107.

NAGAI, H.; COSTA, A.S. Fontes de resistência as moléstias de vírus do tomateiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Piracicaba, v.1, n.1, p.69-71, fev. 1967.

NAGAI, H.; MELO, A.M.T.; LOURENÇÃO, A.L.; SIQUEIRA, W.J. Avanços no melhoramento de tomateiro visando resistência ao vírus de vira-cabeça. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.9, n.1, p.50, maio 1991. (Resumo)

NAGATA, T.; ÁVILA, A.C.; TACULTES, P.C.T.M.; BARBOSA, C.J.; JULIATTI, F.C.; KITAJIMA, E.W. Occurrence of different tospoviruses in six states of Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, n.1, p.90-95, mar. 1995.

NAGATA, T.; BOITEUX, L.S.; IIZUKA, N.; DUSI, A.N. Identification of phenotypic variation of tospovirus isolates in Brazil based on serological analysis and differential host response. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, n.3, p.425-430, set. 1993.

- NORONHA, A.B.; DUARTE, L.M.L.; ALEXANDRE, M.A.V.; VICENTE, M. Inhibition of tomato spotted wilt virus (TSWV) systemic infection in tomato plants by caryophyllales extracts. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.14, n.3/4, p.283-287, out./dez. 1989.
- PATERSON, R.G.; SCOTT, S.J.; GERGERICH, R.C. Resistance in two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolated of tomato spotted wilt virus. *Euphytica*, Wageningen, v.43, n.1-2, p.173-178, Sept. 1989.
- PAVAN, M.A. Sintomas de vira-cabeça só em frutos. Explicação do fato com base no estudo de alguns parâmetros relacionados com a epidemiologia da doença. Piracicaba: ESALQ, 1992. 93p. (Tese - Doutorado em Agronomia).
- PAVAN, M.A.; COSTA, A.S.; KUROZAWA, C.; FORTI, L.C.; GUIMARÃES, A.M. Colonização do tomateiro e de ervas daninhas pelo tripses vetor do vírus do vira-cabeça do tomateiro. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.11, n.2, p.122-125, nov. 1993.
- POZZER, L.; RESENDE, R.O.; LIMA, M.I.; KITAJIMA, E.W.; GIORDANO, L.B.; ÁVILA, A.C. Tosspovirus: uma visão atualizada. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v.4, p.95-148, 1996.
- QIU, W.P.; GESKE, S.M.; TIANI, C.H.; MOYER, J.W. Reassortants of tomato spotted wilt tospovirus express various phenotypes. *Phytopathology*, St. Paul, v.85, n.10, p.1146, Oct. 1995.
- REIFSCHNEIDER, F.J.B.; CAFE, A.C.; DUSI, A.N.; KITAJIMA, E.W. Brown pod, a disease caused by tomato wilt virus on pea in Brazil. *Tropical Pest Management*, London, v.35, n.3, p.304-306, July/Sept. 1989.
- RESENDE, L.V. Mecanismos de resistência a tospovirus e capacidade de combinação de linhagens de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) do grupo Santa Cruz. Lavras:UFLA, 1996. 156p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- RESENDE, L.V.; MALUF, W.R.; RESENDE, J.T.V. Caracterização de linhagens de tomateiro *Lycopersicon esculentum* Mill., do tipo Santa Clara quanto à resistência ao vírus do vira-cabeça. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.13, n.1, p.110, maio 1995. (Resumo 262).

- RESENDE, R.O. **Generation and characterization of mutants of tomato spotted wilt virus.** Wageningen: Wageningen Agricultural University, 1993. 115p. (Tese - Doutorado em Virologia de Plantas).
- RESENDE, R.O.; ÁVILA, A.C.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Comparison of polyclonal antisera in the detection of tomato spotted wilt virus using the double antibody sandwich and cocktail ELISA. **Journal of Phytopathology**, Amsterdam, v.132, p.46-56, 1991.
- RESENDE, R.O.; ÁVILA, A.C.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Effects of the host and the inocula concentration in the generation of defective interfering RNAs of tospoviruses. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, p.341, ago. 1994.(Suplemento).
- RESENDE, R.O.; CUPERTINO, F.P. Doenças causadas por vírus em tomateiro **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.184, p.19-27, 1996.
- RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; BEZERRA, I.C.; LIMA, M.I.; GIORDANO, L.B.; KITAJIMA, E.W.; ÁVILA, A.C. New tospoviruses found in Brazil. **Acta Horticulturae**, Taiwan, n.431, p.78-89, Sept.1996.
- RONCO, A.E.; DALBÓ, E.; GHIRINGHELLI, P.D.; MEDRANO, C.; ROMANOVSKI, V.; DARACHU, A.N.; GRAU, O. Cloned cDNA probes for the detection of tomato spotted wilt virus. **Phytopathology**, St. Paul, v.79, n.11, p.1309-1313, Nov. 1989.
- SIQUEIRA, W.J.; FONSECA, M.I.S.; SONDHAL, M. Regeneração de plantas híbridas entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum* a partir de calos com dois anos de cultura "in vitro". **Bragantia**, Campinas, v.47, n.1, p.1-8, 1988.
- SCOTT, A.J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v.30, p.507-512, Sept. 1974.
- SMITH, P.G. Reaction of *Lycopersicon* spp. to spotted wilt. **Phytopathology**, St. Paul, v.34, p.504-505, 1944.
- STEVENS, M.R.; LAMB, E.M.; RHOADS, D.D. Mapping the Sw-5 locus for tomato spotted wilt virus resistance in tomatoes using RAPD e RFLP analyses. **Theoretical and Applied Genetics**, Viena, v.90, n.3/4, p.451-456, Mar. 1995.

- STEVENS, M.R.; SCOTT, S.J.; GERGERICH, R.C. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. **Euphytica**, Wageningen, v.59, n.1, p.9-17, Nov. 1992.
- STEVENS, M.R.; SCOTT, S.J.; GERGERICH, R.C. Evaluation of seven *Lycopersicon* species for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV). **Euphytica**, Wageningen, v.80, p.79-84, Aug. 1994.
- TOKESHI, H.; CARVALHO, P.C.T. Doenças do tomateiro. In: GALLI, F. (coord.). **Manual de Fitopatologia**; doenças das plantas cultivadas. 2.ed. São Paulo: Ceres, 1980. v.2, p.511-552.
- ULLMAN, D.E.; GERMAN, T.L.; SHERWOOD, J.L.; WESTCOT, D.M.; CANTONE, F.A. Tosspovirus replication in insect vector cells: immunocytochemical evidence that the nonstructural protein encoded by the S-RNA of tomato spotted wilt tospovirus is present in thrips vector cells. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, n.4, 1993.
- ULTZEN, T.; GIELEN, J.; VENEMA, F. et al. Resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tomato hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v.85, n.1/3 p.159-168, 1995.
- VAN ZIJL, J.J.B.; BOSCH, S.E.; COETZEE, C.P.J. Breeding tomatoes for processing in South Africa. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.194, p.69-75, 1986.
- WANG, M.; GONSALVES, D. ELISA detection of various tomato spotted wilt virus isolates using specific antisera to structural proteins of the virus. **Plant Disease**, St. Paul, v.74, n.2, p.154-158, Feb. 1990.
- WEEKES, R.J.; MUNFORD, R.A.; BARKER, I.; WOOD, K.R. Diagnosis of tospoviruses by reverse-transcription polymerase chain reaction. **Acta Horticulturae**, Taiwan, n.431, p.159-166, Sept.1996.
- YUKI, V.A.; COSTA, A.S. Epidemiologia do vírus do vira-cabeça em Campinas, SP, mantém-se estável em 50 anos. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.14, n.1/2, p.56, jan./jun.1988.

ANEXOS

TABELA 1A - Médias semanais das temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) máximas e mínimas no interior de casa-de-vegetação, no período de permanência dos ensaios . UFLA, Lavras - MG, 1996 - 1997.

ANO 1996	SEMANA	TEMP. ($^{\circ}\text{C}$)	SEMANA	TEMP. ($^{\circ}\text{C}$)
MESES	JULHO		AGOSTO	
	08 - 14.07	8,1 - 33,0	05 - 11.08	10,4 - 34,4
	15 - 21.07	9,6 - 33,4	12 - 18.08	10,2 - 33,9
	22 - 28.07	6,3 - 33,0	19 - 25.08	11,9 - 34,8
	29 - 04.08	11,2 - 33,2		
	OUTUBRO		NOVEMBRO	
	07 - 13.10	18,7 - 39,6	04 - 09.11	20,4 - 37,6
	14 - 20.10	17,4 - 37,9	10 - 17.11	20,6 - 36,9
	21 - 27.10	19,6 - 39,0	18 - 24.11	17,7 - 34,3
	28 - 03.11	17,9 - 39,9	25 - 01.12	17,5 - 38,0
	DEZEMBRO			
	02 - 08.12	19,5 - 37,6		
	09 - 15.12	21,2 - 40,9		
	16 - 22.12	21,2 - 42,1		
	23 - 29.12	22,9 - 39,2		

TABELA 1A. Continuação.

ANO 1997	SEMANA	TEMP. (°C)	SEMANA	TEMP. (°C)
MESES	JANEIRO		FEVEREIRO	
	30 - 05.01	22,1 - 34,6	03 - 09.02	18,3 - 39,7
	06 - 12.01	22,3 - 42,0	10 - 16.02	17,4 - 40,1
	13 - 19.01	21,6 - 39,7	17 - 23.02	18,5 - 39,1
	20 - 26.01	21,4 - 40,9	24 - 02.03	19,0 - 38,1
	27 - 02.02	22,7 - 40,2		
	MARÇO		ABRIL	
	03 - 09.03	18,2 - 36,7	31 - 06.04	17,6 - 33,9
	10 - 16.03	17,5 - 39,6	07 - 13.04	15,0 - 36,4
	17 - 23.03	15,7 - 37,7	14 - 20.04	18,4 - 37,9
24 - 30.03	15,7 - 34,4	21 - 27.04	15,7 - 35,3	
		28 - 04.05	16,5 - 38,4	
MAIO / JUNHO				
	19 - 25.05	12,9 - 30,2		
	26 - 02.06	11,1 - 31,4		
	03 - 09.06	12,3 - 29,6		
	10 - 16.06	8,7 - 27,6		
	17 - 23.06	11,7 - 33,0		

TABELA 2A - Análise de variância das absorbâncias pelo teste DAS-ELISA para três linhagens de tomate inoculadas com quatro isolados de tospovirus em três épocas de avaliação. 1º ensaio - UFLA, Lavras-MG, 1997.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Linhagem	2	23,42804	11,71402	654,816**
Isolado	3	34,59116	11,53039	644,551**
Linhagem* Isolado	6	17,78521	2,96420	165,699**
Erro 1	24	0,42934	0,01789	
Época	2	8,69719	4,34859	691,932**
Época*Linhagem	4	6,82013	1,70503	271,299**
Época*Isolado	6	1,00958	0,16826	26,774**
Época*Isolado*Linhagem	12	2,27676	0,18973	30,189**
Erro 2	48	0,30167	0,00628	
Total	107	95,33907		
Média Geral: 0,78145				
CV 1 : 17,1				
CV 2 : 10,1				

** Significativo ao nível de 1%

TABELA 3A - Análise de variância das absorvâncias pelo teste DAS-ELISA para três linhagens de tomate inoculadas com quatro isolados de tospovirus em três épocas de avaliação. 2º ensaio - UFLA, Lavras-MG, 1997.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Linhagem	2	17,22087	8,61044	1232,986**
Isolado	3	49,20863	16,40288	2348,837**
Linhagem*Isolado	6	24,95984	4,15997	595,694**
Erro 1	24	0,16760	0,00698	
Época	2	1,27458	0,63729	223,845**
Época*Linhagem	4	0,67628	0,16907	59,385**
Época*Isolado	6	1,11910	0,18652	65,513**
Época*Isolado*Linhagem	12	0,77163	0,06430	22,586**
Erro 2	48	0,13666	0,00285	
Total	107	95,53518		
Média Geral: 0,69276				
CV 1 : 12,1				
CV 2 : 7,7				

** Significativo ao nível de 1%

TABELA 4A - Análise de variância relativa ao efeito das linhagens de tomateiro nas absorvâncias pelo teste DAS-ELISA para cada combinação isoladfo de TSWV x época de avaliação. 1^o ensaio - UFLA, Lavras-MG, 1997.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Lin(I1, Ep. 10)*	2	0,158407	0,079204	12,6026**
Lin(I1, Ep. 20)	2	1,884414	0,942207	149,9206**
Lin(I1, Ep. 30)	2	0,221803	0,110902	17,6463**
Lin(I2, Ep. 10)	2	0,878848	0,439424	69,9196**
Lin(I2, Ep. 20)	2	1,971349	0,985675	156,8370**
Lin(I2, Ep. 30)	2	0,002409	0,001204	0,1916
Lin(I3, Ep. 10)	2	13,739444	6,869722	1093,0855**
Lin(I3, Ep. 20)	2	17,724127	8,862064	1410,0998**
Lin(I3, Ep. 30)	2	8,308223	4,154111	660,9873**
Lin(I4, Ep. 10)	2	0,242834	0,121417	19,3194**
Lin(I4, Ep. 20)	2	5,170558	2,585279	411,3603**
Lin(I4, Ep. 30)	2	0,007719	0,003859	0,6141
Residuo	48	0,301666	0,006285	

*Lin = linhagem; I1 = isolado de Fama, I2 = isolado de Ubaporanga, I3 = isolado de Igarapé, I4 = isolado de Taiobeiras; Ep. = época de avaliação (aos 10, 20 e 30 dias após a inoculação mecânica).

** Significativo ao nível de 1%

1. *Tableau des dépenses effectuées par le Gouvernement de la République de Cuba pendant l'année 1967*
 2. *Tableau des dépenses effectuées par le Gouvernement de la République de Cuba pendant l'année 1968*

Tableau des dépenses effectuées par le Gouvernement de la République de Cuba pendant l'année 1967

<i>N°</i>	<i>Libellé</i>	<i>Montant</i>	<i>Unité</i>	<i>Mois de l'année</i>
1	Salaires et traitements	100 000 000	000 000	12
2	Indemnités	10 000 000	000 000	12
3	Contributions sociales	10 000 000	000 000	12
4	Autres dépenses	10 000 000	000 000	12
5	Matériel	10 000 000	000 000	12
6	Services	10 000 000	000 000	12
7	Transport	10 000 000	000 000	12
8	Énergie	10 000 000	000 000	12
9	Équipement	10 000 000	000 000	12
10	Construction	10 000 000	000 000	12
11	Recherche et développement	10 000 000	000 000	12
12	Autres dépenses	10 000 000	000 000	12
13	Subventions	10 000 000	000 000	12
14	Autres dépenses	10 000 000	000 000	12
15	Autres dépenses	10 000 000	000 000	12
16	Autres dépenses	10 000 000	000 000	12
17	Autres dépenses	10 000 000	000 000	12
18	Autres dépenses	10 000 000	000 000	12
19	Autres dépenses	10 000 000	000 000	12
20	Autres dépenses	10 000 000	000 000	12

1. *Tableau des dépenses effectuées par le Gouvernement de la République de Cuba pendant l'année 1968*
 2. *Tableau des dépenses effectuées par le Gouvernement de la République de Cuba pendant l'année 1969*

1. *Tableau des dépenses effectuées par le Gouvernement de la République de Cuba pendant l'année 1969*
 2. *Tableau des dépenses effectuées par le Gouvernement de la République de Cuba pendant l'année 1970*

TABELA 5A - Análise de variância relativa ao efeito das linhagens de tomateiro nas absorvâncias pelo teste DAS-ELISA para cada combinação isoladfo de TSWV x época de avaliação. 2º ensaio - UFLA, Lavras-MG, 1997.

Fontes de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Lin(I1, Ep. 10)*	2	0,435699	0,217849	76,5189**
Lin(I1, Ep. 20)	2	0,246364	0,123182	43,2672**
Lin(I1, Ep. 30)	2	0,543976	0,271988	95,5349**
Lin(I2, Ep. 10)	2	0,325658	0,162829	57,1931**
Lin(I2, Ep. 20)	2	0,007466	0,003733	1,3112
Lin(I2, Ep. 30)	2	0,007712	0,003856	1,3543
Lin(I3, Ep. 10)	2	16,683955	8,341978	2930,0929**
Lin(I3, Ep. 20)	2	8,541665	4,270832	1500,1162**
Lin(I3, Ep. 30)	2	16,239481	8,119740	2852,0328**
Lin(I4, Ep. 10)	2	0,533520	0,266760	93,6986**
Lin(I4, Ep. 20)	2	0,005724	0,002862	1,0053
Lin(I4, Ep. 30)	2	0,057398	0,028699	10,0805**
Residuo	48	0,136656	0,002847	

*Lin = linhagem; I1 = isolado de Fama, I2 = isolado de Ubaporanga, I3 = isolado de Igarapé, I4 = isolado de Taiobeiras; Ep. = época de avaliação (aos 10, 20 e 30 dias após a inoculação mecânica).

** Significativo ao nível de 1%