



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

ETIOLOGIA VIRAL DA DOENÇA FOGO MEXICANO DO TOMATEIRO

VÍVIAN DOS SANTOS LUCENA-LEANDRO

Brasília – DF

2020

VÍVIAN DOS SANTOS LUCENA LEANDRO

ETIOLOGIA VIRAL DA DOENÇA FOGO MEXICANO EM TOMATEIRO

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília
como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre
em Fitopatologia pelo
Programa de Pós-Graduação
em Fitopatologia

Orientador

Prof^a. Dr^a Alice Kazuko Inoue-Nagata

BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Lucena-Leandro, Vívian dos Santos

Etiologia Viral da Doença Fogo Mexicano em Tomateiro / Vívian dos Santos Lucena-Leandro.
Brasília, 2020.

Número de páginas p 77. : il.

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. Etiologia – Fogo Mexicano.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Etiologia Viral da Doença Fogo Mexicano em Tomateiro.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur

*À minha bisa Maria José,
Meus avôs Ezequiel Profeta de Lucena &
Valdivino Francisco dos Santos e
Meu tio Bruno Moura dos Santos
(Todos In Memoriam)
Vocês são a minha rocha!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe/orientadora, Alice Kazuko Inoue-Nagata, que desde a graduação apostou em mim e me estimulou a crescer. Sempre com muita calma, paciência e atenção me ensinou a ser uma fitopatologista. Apesar de eu ter sido a causa dos seus cabelos brancos dos últimos dois anos, sempre dedicou muito tempo à mim, seja corrigindo ou elogiando. Espero que algum dia eu seja pelo menos 1/3 do que a senhora é como mãe, orientadora e profissional. Fui agraciada durante todo o mestrado por ter a melhor orientadora.

Ofereço minha gratidão à minha família marido Denilson Leandro e Petter, por terem me aguentado, fortalecido e acreditado, que nunca me deixaram desistir em várias caminhadas durante esses seis anos de matrimônio.

Nem sei como agradecer aos meus pais Edvaldo José de Lucena e Vanessa Moura dos Santos pelo suporte oferecido, por vibrarem em cada conquista minha- mesmo que tenha sido singela. Espero ser sempre motivo de orgulho para vocês. Ambos são minhas raízes, de onde extraio toda a sustentação que preciso para seguir em frente. Amo muito vocês.

Por ser a irmã mais velha, espero inspirar meus irmãos a buscarem a felicidade na vida pessoal e profissional. Terão uma longa caminhada até alcançá-la, pois é árduo esse caminho e espero que algum dia sejamos agraciados com essa dádiva. Penso em vocês cada vez que conquisto algo. Gostaria que soubessem o quanto agradeço à Deus por ter vocês na minha vida, e por me amarem tanto. Agradeço em especial à minha irmã Amanda, Larissa, Maitê e afilhada Clarice por me darem tanto incentivo.

Agradeço à minha avó, aos meus tios, tias, cunhado e primas por terem tanta paciência, por tantos convites que recusei nesses dois anos por conta dessa fase da minha vida. Eu os amo tanto e senti muita falta de estarmos juntos, no entanto sempre me apoiaram e incentivaram.

Sou muito grata a família que ganhei nessa jornada, a equipe do Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Embrapa Hortaliças: Anna, Camila, Cris, Erick, Erich, Erick, Gabriel, Gustavo, seu Hamilton, Jéssica, “Lucitchu”, Márcio, Mirtes, Mônica, Natália, Paulinha, Ragassi, Renato, Tadeu, Thaís, Thiago, Thiago W. e Zé Luiz. Vocês foram meu apoio e combustível em vários momentos.

Obrigada ao produtor João Filho, proprietário da área localizada no Núcleo Rural Taquara-DF, que permitiu e colaborou com diversos ensaios desenvolvidos em sua lavoura.

Aos meus amigos Lucas, Géssica, Aurenir, P. Darliny, Adriana, Ramon e Micheline. Vocês tem a capacidade de estimular o melhor de mim. Obrigada por acreditarem no meu potencial e por entenderem essa fase da minha vida.

Obrigada a toda equipe do Departamento de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília, pela rica oportunidade de fazer o mestrado. Agradeço cada aluno,

professor e demais frequentadores por qualquer contribuição na minha formação.

Agradeço aos membros da banca examinadora Renato Resende, Mônica Macêdo e Thaís Santiago, por aceitarem participar e contribuírem com essa dissertação.

À Embrapa Hortaliças, pela infraestrutura e todo amparo que me foi disponibilizado.

Às instituições Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Por fim e mais importante, agradeço à Deus, por tudo o que tenho e sou.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da **Professora Doutora Alice Kazuko Inoue-Nagata**, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Povoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do distrito Federal (FAP-DF).

ETIOLOGIA VIRAL DA DOENÇA FOGO MEXICANO EM TOMATEIRO

VÍVIAN DOS SANTOS LUCENA-LEANDRO

DISSERTAÇÃO APROVADA em __/__/2020 por:

Prof.^a. Dr.^a. Mônica Alves de Macêdo
Examinador Externo

Prof. Dr. Renato de Oliveira Resende
Examinador Interno

Prof. Dr.^a. Thaís Ribeiro Santiago
Examinador Interno Suplente

Prof. Dr.^a. Alice Kazuko Inoue-Nagata
Orientador (Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL

BRASIL

2020

SUMÁRIO

| | |
|---|----------|
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 4 |
| OBJETIVO GERAL..... | 6 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 6 |
| CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA..... | 7 |
| 1. TOMATEIRO..... | 8 |
| 2. DOENÇAS DO TOMATEIRO..... | 10 |
| 2.1 Víruses do Tomateiro..... | 12 |
| 2.1.1 Gênero <i>Begomovirus</i> | 12 |
| 2.1.2 Gênero <i>Orthospovirus</i> | 13 |
| 2.1.3 Gênero <i>Cucumovirus</i> | 13 |
| 2.1.4 Gênero <i>Tobamovirus</i> | 14 |
| 2.1.5 Gênero <i>Crinivirus</i> | 14 |
| 2.1.6 Gênero <i>Tymovirus</i> | 14 |
| 3. FAMÍLIA <i>POTYVIRIDAE</i> | 15 |
| 3.1 Critérios Taxonômicos da Família <i>Potyviridae</i> | 15 |
| 3.2 Gênero <i>Potyvirus</i> | 17 |
| 3.2.1 Organização Genômica dos <i>Potyvirus</i> | 17 |
| 3.2.2 Ciclo de Infecção..... | 18 |
| 3.2.3 Transmissão de PVY..... | 19 |
| 3.2.4 Epidemiologia..... | 20 |
| 3.2.5 Classificação de Estirpes de PVY em Batateira..... | 21 |
| 3.2.6 Classificação de Patotipos de PVY em Pimenteira..... | 21 |
| 3.2.7 PVY em Tomateiro..... | 22 |
| 3.2.8 Distribuição Mundial..... | 22 |
| 3.2.9 Métodos de Controle..... | 23 |
| LITERATURA CITADA..... | 23 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 2: ETIOLOGIA VIRAL DA DOENÇA FOGO MEXICANO EM TOMATEIRO..... | 35 |
| RESUMO..... | 36 |
| ABSTRACT..... | 38 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 40 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 41 |
| 2.1 Monitoramento de Tomateiros ao Longo do Cultivo Quanto à Detecção de PVY e Aparecimento de Sintomas de Necrose Foliar..... | 41 |
| 2.2 Associação de Plantas com Sintoma de Necrose com a Infecção por PVY..... | 45 |
| 2.3 Posição das Folhas Sintomáticas em Planta Infectada..... | 45 |
| 2.4 Avaliação da Distribuição de PVY no Tomateiro por Dot-ELISA..... | 45 |
| 2.5 Incidência de Plantas com Sintoma..... | 45 |
| 2.6 Avaliação da Produtividade..... | 46 |
| 2.7 Seleção do Isolado PVY-TOMNEC para Testes de Inoculação e Determinação da Sequência do Genoma por Sequenciamento de Alto Desempenho..... | 46 |
| 2.8 Reprodução de Sintoma por Plantas Artificialmente Inoculados por PVY..... | 48 |
| 3. RESULTADOS..... | 49 |
| 3.1 Aparecimento de Sintomas de Necrose em Folhas de Tomateiro e Correlação com a Detecção de PVY..... | 49 |
| 3.2 Associação de Plantas com Sintoma de Necrose com a Infecção por PVY..... | 49 |
| 3.3 Posição de Folhas Sintomáticas em Plantas Infectadas..... | 52 |
| 3.4 Distribuição de PVY em Folhas de Tomateiro por Dot-ELISA..... | 56 |
| 3.5 Avaliação da Distribuição da Doença na Lavoura..... | 54 |
| 3.6 Efeito da Infecção por PVY na Produtividade do Tomateiro..... | 56 |
| 3.7 Caracterização e Filogenia do Isolado PVY-TOMNEC..... | 58 |
| 3.8 Indução de Sintoma de Necrose a partir da Infecção por PVY..... | 60 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 64 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 66 |
| LITERATURA CITADA..... | 68 |

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro *Solanum lycopersicum* é uma das principais espécies cultivadas classificadas como solanáceas. Segundo o IBGE (2019) o tomate é a hortaliça de maior importância econômica no Brasil, sendo a segunda com maior área plantada, produzindo mais de quatro milhões de toneladas em 2016. Atualmente, o Brasil é o oitavo produtor mundial (FAO, 2017). Os três estados com maior produção são: Goiás, São Paulo e Minas Gerais (Dossa & Fuchs, 2017). Segundo dados compilados pela FAO (2017), o processamento industrial global de tomate aproximou-se de 40 milhões de toneladas. Para fins de cultivo comercial, o tomateiro é uma cultura anual cuja propagação é feita por sementes. É classificado em crescimento determinado- o crescimento pára após surgimento de inflorescências - ou indeterminado - cujo crescimento continua após surgimento das mesmas. A produção é destinada para o processamento industrial ou consumo *in natura* (Naika *et al.*, 2006).

Diversos vírus têm o tomateiro como hospedeiro. Um das espécies de maior importância é o *Potato virus Y*, que pertence ao gênero *Potyvirus* da família *Potyviridae*. No ranking dos principais vírus de plantas do mundo, o potato virus Y (PVY) está classificado na quinta posição (Scholthof *et al.*, 2011), estando distribuído em quase todo o mundo (Thompson *et al.*, 2007). As folhas de tomateiro infectadas por PVY apresentam sintoma inicial de clorose entre as nervuras que progridem para pontos necróticos que podem coalescer em lesões e podendo ocorrer nanismo em toda a planta (Zerbini & Maciel-Zambolin, 1999). Há uma redução no número de frutos produzidos, devido ao abortamento de flores, porém não há relato de sintomas nos frutos. Algumas estirpes podem causar mosaico associado à necrose do pecíolo e das nervuras na face abaxial das folhas, curvando-as para baixo (Silva *et al.*, 2006; Inoue-Nagata *et al.*, 2005).

O PVY é transmitido por vários pulgões de maneira não circulativa não persistente, onde as partículas ficam retidas no estilete e não circulam no corpo do inseto. Uma picada de prova em uma planta infectada seguida de outra picada de prova em planta sadia possibilita a transmissão do vírus (Sigvald, 1984). As partículas do PVY no estilete dos pulgões não persistem por mais de três horas e o tempo de aquisição e transmissão é em segundos, sem período de latência (Hull, 1994). Mais de 40 espécies de pulgões são capazes de transmitir o PVY, revelando baixa especificidade

com o vetor (Kennedy *et al.*, 1962; Sigvald, 1984). A espécie que apresenta maior eficiência de transmissão é o *Myzus persicae* e a transmissão experimental de PVY pode ser feita por inoculação mecânica, que serve de alerta para a necessidade de cuidado com os tratos culturais em condições de campo para evitar transmissão de plantas infectadas para não infectadas (De Bokx & Huttinga, 1981).

O genoma do PVY é formado por ssRNA senso positivo de ~9,7 kb e ~900 nm de comprimento. Possui duas ORF's sendo: uma grande sintetizando uma polyproteína, que posteriormente é clivada em várias proteínas multifuncionais, e uma ORF pequena denominada PIPO (Chung *et al.*, 2008). Sua partícula é monopartida alongada e flexuosa com simetria helicoidal, não envelopada (ICTV, 2020; Viralzone, 2020; Rezende & Kitajima, 2011).

Segundo Bance (1991), o processo replicativo dos potyvírus inicia-se pela entrada da partícula viral na célula por intermédio do vetor ou por ferimentos. A partir de sua entrada há uma decapsidação, onde o genoma é exposto possibilitando a tradução inicial. A polyproteína e a PIPO são sintetizadas e clivadas em proteínas funcionais. Depois são feitas diversas cópias do RNA viral pelo processo replicativo e consequentes traduções. Algumas proteínas traduzidas podem ser distribuídas na região do citoplasma formando um aglomerado de proteínas virais e da hospedeira, formando corpos de inclusões do tipo cata-vento e de outros formatos (Edwardson *et al.*, 1984). Com todas as proteínas sintetizadas, as partículas são montadas e ocorre o movimento célula-a-célula pelos plasmodesmas, sendo que todo o ciclo ocorre no citoplasma da célula infectada (Talbot *et al.*, 2009).

Segundo Edwardson *et al.* (1974), o PVY infecta diversas solanáceas como: tomate (*Solanum lycopersicum*), batata (*Solanum tuberosum*), pimenta e pimentão (*Capsicum* spp.) e tabaco (*Nicotiana tabacum*). Há vários anos o tomateiro não apresentava relatos de epidemias de PVY muito provavelmente pelo amplo uso de cultivares resistentes comercializadas, por exemplo, aqueles desenvolvidos pela equipe do Dr. Nagai (Nagai *et al.* em 1992). No entanto, segundo observação da equipe de Virologia da Embrapa Hortaliças em visitas de campo em lavouras e relato de produtores e técnicos na região do Goiás e Distrito Federal nos últimos dez anos, surtos de ocorrência de tomateiros com manchas necróticas presentes na parte mediana da

planta têm sido observados com frequência e associados à detecção de PVY. A inoculação em tomateiro Santa Clara resulta em infecção, porém, não há aparecimento de necrose. Isso gerou dúvidas quanto ao real agente etiológico e sobre as condições de aparecimento do sintoma de necrose. Considerando a severidade dos sintomas e a incidência crescente de plantas com sintomas de necrose, este trabalho foi iniciado com o objetivo de determinar o agente etiológico e a caracterização da doença que entre os produtores é conhecida como “Fogo Mexicano”.

OBJETIVO GERAL

Definir a etiologia da doença viral Fogo Mexicano do Tomateiro

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Monitorar a infecção natural de tomateiros por PVY em associação com o surgimento do sintoma de necrose em telado e campo;
- ✓ Associar plantas com sintoma de necrose com a detecção de PVY em teste sorológico;
- ✓ Avaliar o período de tempo entre a infecção e a expressão do sintoma de necrose;
- ✓ Avaliar em quais folhas o sintoma de necrose é observado nas cultivares Santy e Guará;
- ✓ Analisar a distribuição de PVY em folhas de tomateiro por Dot-ELISA;
- ✓ Monitorar a distribuição e avanço da doença Fogo Mexicano em campo;
- ✓ Avaliar o efeito da infecção por PVY na produtividade do tomateiro;
- ✓ Analisar o genoma de PVY isolado de planta com sintoma de necrose do campo monitorado;
- ✓ Avaliar o aparecimento do sintoma de necrose a partir da inoculação experimental de PVY

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. TOMATEIRO

Segundo Kimura & Sinha (2008), o tomateiro é uma planta cultivada, classificada na espécie *Solanum lycopersicum* na seção *Lycopersicon*, juntamente com diversas espécies selvagens. Carl von Linné, em 1753, nomeou o tomateiro como *Solanum lycopersicum*, onde “lyco” corresponde a lobo e “persicum” significa pêssego. Porém, Philip Miller, um ano depois, separou o tomate comestível dos não comestíveis, devido à crença de que alguns eram venenosos. Então, o tomate comestível foi denominado *Lycopersicon esculentum*, separando-o em um novo gênero. Todavia, esta alteração de Miller viola o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICBN) pois os critérios usados para a separação não são determinantes para a mudança de gênero e, mesmo *L. esculentum* sendo usado amplamente, o tomateiro passou a ser classificado novamente em *Solanum lycopersicum* de Lineu.

Possivelmente os membros do gênero *Solanum* originaram-se no oeste da América do Sul, no Equador, Peru e Chile. Diversas espécies selvagens são encontradas no Oeste da América do Sul, nos Andes e nas Ilhas Galápagos, porém, a análise genética de cultivares primitivas aponta que o México é o centro de domesticação do tomateiro (Rick, 1991).

Segundo Long (2001), o tomateiro foi inicialmente cultivado na Europa, mas não por interesse alimentício e sim ornamental dos frutos. Os europeus acreditavam que eram venenosos e por isso a hortaliça demorou para ser usada na culinária (Filgueira, 2003). Kimura & Sinha (2008) apontam que a colonização das Américas pelos europeus foi o fator que ampliou o cultivo de tomate. Possivelmente os colonizadores foram os responsáveis pela distribuição de tomateiro para outros países durante o século XVI, contestando a teoria de que foram os mexicanos. Atualmente o tomateiro é uma das principais plantas cultivadas em todo o mundo. O suposto ancestral do atual tomateiro cultivado é o selvagem *Solanum pimpinellifolium*, onde seus frutos são pequenos e leves. O outro possível ancestral é o tomate cereja *S. lycopersicum* subespécie *cerasiforme*, cujos frutos são levemente maiores que *S. pimpinellifolium*. Provavelmente os tomateiros cultivados foram resultados dos cruzamentos com esses indivíduos selvagens, selecionando as plantas com frutos cada vez maiores, resultando em 10 cm de diâmetro e 500g ou mais em cada fruto. Além do tamanho, outro principal interesse dos cultivadores de tomateiro é o Brix do fruto, que corresponde ao conteúdo de sólidos

solúveis totais (açúcares e ácidos), medido por um refratômetro em unidades Brix, sendo de grande importância para a produção comercial (Eshed & Zamir, 1995).

No México, o fruto é chamado de “*jitomate*”. O nome tomate é originado de um uso espanhol atribuído à palavra mexicana Náhuatl "*xictomatl*" ("*xictli*": umbigo e "*tomatl*": tomate), sinonimizando o tomate a um umbigo e referindo-se à cicatriz deixada na fruta pelo pedúnculo (OECD, 2017).

Para fins de cultivo comercial, o tomateiro é uma cultura anual cuja propagação é feita por sementes. O tomateiro possui dois tipos de crescimento: o determinado - pára o crescimento após surgimento de inflorescências - ou indeterminado - cujo crescimento continua após surgimento das mesmas. A produção do tomate é dividida para processamento industrial e mesa, destinado ao consumo *in natura* (Naika *et al.*, 2006). O tomateiro de crescimento indeterminado, sob certas condições, pode ser perene ou semi-perene, a depender das podas de rejuvenescimento, capina, irrigação e proteção contra geadas, mas o cultivo é predominantemente anual. Para fins comerciais, em se tratando de tomateiro de crescimento determinado, o cultivo é anual (Geisenberg & Stewart, 1986).

Em plantas com hábito determinado, os frutos amadurecem praticamente juntos, no intervalo entre duas ou três semanas (Naika *et al.*, 2006). Popularmente esses tomates são conhecidos como rasteiros (Nascimento *et al.*, 2012) e, neste caso, a colheita é mecanizada para a indústria, porém dependendo do produtor e da cultivar, são feitas colheitas manuais para consumo *in natura* (Jacinto *et al.*, 2012).

As plantas com hábito indeterminado necessitam de tutoramento. Os frutos não amadurecem todos juntos, exigindo colheita manual, durante o período entre 50 e 90 dias (Filgueira, 2003).

O tomate possui compostos significativamente benéficos à saúde humana, como vitaminas B e C, licopenos, carotenoides e mais de 10 sais minerais (Borguini, 2002). Segundo Silva & Giordano (2000), a cultura é reconhecida como fonte geradora de emprego e renda, em todos os segmentos de sua cadeia reprodutiva, desde o plantio à mesa do consumidor, seja em alimentos processados ou consumo *in natura*.

Segundo o IBGE (2019), o tomate é a hortaliça de maior importância econômica no Brasil, sendo a segunda com maior área plantada, produzindo mais de quatro milhões de toneladas em 2016. Atualmente o Brasil é o oitavo produtor mundial (FAO, 2017). Os três estados com maior produção são: Goiás, São Paulo e Minas Gerais (Dossa &

Fuchs, 2017). Dados da FAO (2017) mostram que o processamento industrial global de tomate aproximou-se de 40 milhões de toneladas.

2. DOENÇAS E PRAGAS DO TOMATEIRO

Ao cultivar o tomateiro, o produtor enfrenta diversas pragas e doenças que afetam o tomateiro. Esses problemas reduzem a produtividade e qualidade do fruto. A seguir são apresentadas resumidamente as principais pragas e patógenos do tomateiro com as recomendações de manejo. São encontrados insetos, artrópodes, vírus, fungos, oomicetos, bactérias, fitoplasmas, viroides, plantas daninhas, nematoides e também danos fisiológicos de origem abiótica.

Importante ressaltar que os afídeos (várias espécies), mosca-branca (*Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*) e tripses (várias espécies) são insetos-vetores transmissores de diversos vírus, tendo o tomateiro como hospedeiro. A larva minadora *Lyriomyza trifolii* e *Tuta absoluta* são capazes de causar grandes danos às folhas e algumas vezes ao fruto (OECD, 2017). A broca pequena do tomateiro (*Neoleucinodes elegantalis*) causa a perfuração do fruto e posteriormente ocorre o apodrecimento na polpa dos frutos, ocasionando até 90% de perdas na produção, e está disseminada em quase todas as regiões produtoras do Brasil (Carneiro *et al.*, 1998). Já a broca-grande (*Helicoverpa zea* e *H. armigera*) pode causar 80% de perdas na produção pela destruição da parte interna do fruto (Tay *et al.*, 2013). A aplicação de inseticidas é a estratégia mais usada para controle dessas pragas e as pulverizações são iniciadas quando o inseto é encontrado na área. (Savary *et al.*, 2006). O controle cultural é de extrema importância, pois consiste em várias práticas, como: mudas saudáveis, cultivo protegido, tipos de tutoramento, destruição de restos culturais e outros. Essas práticas têm capacidade de contribuir para interromper o ciclo biológico do inseto (OECD, 2017; Silva *et al.*, 2006).

As doenças fúngicas causam grandes danos econômicos à tomaticultura. Segundo Inoue-Nagata *et al.* (2016) os principais fungos e oomicetos que afetam a cultura no Brasil são: *Stemphyllium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Verticillium dahliae*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria* spp., *Phytophthora infestans*, *Septoria lycopersici*, *Pseudoidium neolycopersici* e *Oidiopsis haplophyllie*.

Os tratamentos com fungicidas para controle dos fungos e oomicetos são componentes-chave no manejo integrado de diversas doenças. A principal limitação desse método é o surgimento de indivíduos com resistência, causada pela seleção de populações resistentes, por diversos mecanismos (Zhonghua & Michailides, 2005). Outros métodos devem ser aplicados para manter sob controle os fungos, incluindo a redução da umidade, remoção de restos culturais e partes das plantas infectadas. A rotação adequada de fungicidas de diferentes classes é de extrema importância. O plantio de genótipos tolerantes/resistentes tem sido empregado a diversos organismos (Hahn, 2014). Além disso, vários estudos voltados ao controle biológico têm surgido, sendo muito promissores em campo e atualmente existem produtos disponíveis para compra (Pal & Gardener, 2006).

O tomateiro enfrenta diversas doenças de origem bacteriana, segundo Inoue-Nagata *et al.* (2016) as principais no Brasil são: cancro-bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), mancha-bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*), pinta-bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), murcha-bacteriana (complexo de *Ralstonia solanacearum*) e talo oco e podridão-mole dos frutos (*Pectobacterium* spp. e *Dickeya* spp.). O crescimento dessas bactérias varia de 18 a 30° C, dependendo da espécie. Os principais métodos de controle consistem no uso de sementes tratadas, uso de cultivares resistentes, evitar o plantio próximo a lavouras velhas, usar adubação equilibrada sem excesso de nitrogênio, evitar ferimentos mecânicos ou por insetos nas plantas, reduzir volume de água na irrigação, de preferência adotar o gotejamento, pulverizar com produtos cúpricos e antibióticos, eliminar plantas doentes e fazer rotação de cultura.

Plantas atacadas por nematoides normalmente são observadas em reboleiras, apresentando parte aérea pouco desenvolvida, plantas raquíticas, folhas amareladas e murchas. As principais espécies que o tomateiro hospeda são as parasitas obrigatórias *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. enterolobii* e *M. hapla*. Atacam as raízes causando as galhas, devido ao desenvolvimento das fêmeas e massas de ovos (Inoue-Nagata *et al.*, 2016).

2.1 Viroses do Tomateiro

Diversos vírus infectam o tomateiro e a incidência pode variar dependendo principalmente da infestação e disseminação dos vetores, além de fatores como: época do ano, região e tipo de cultivo (Jones & Barbetti, 2012). Em cultivo de tomateiro de hábito indeterminado no Brasil são observadas begomoviroses, criniviroses, tospoviroses, potyviroses, cucumoviroses e tobamoviroses, enquanto no tomateiro de hábito determinado as principais são as begomoviroses, criniviroses e orthotospoviroses (Inoue-Nagata, 2013; Macedo *et al.*, 2014).

As principais características desses gêneros de vírus que infectam o tomateiro encontram-se descritos abaixo.

2.1.1 Gênero *Begomovirus*

Os vírus deste gênero pertencem à família *Geminiviridae* e apresentam partícula geminada, com genoma composto por ssDNA circular (Lazarowitz & Shepherd, 1992). Várias espécies pertencentes ao gênero *Begomovirus* são relatadas infectando tomateiro no Brasil, sendo que 14 são consideradas definitivas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Virus (ICTV). Acredita-se que *Tomato severe rugose virus* (acrônimo: ToSRV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), *Tomato golden vein virus* (TGVV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) são as principais espécies em tomateiro no Brasil (Fernandes, 2008; Inoue-Nagata *et al.*, 2016).

A maioria das espécies dos begomovírus possui genoma bipartido com os componentes denominados DNA-A e DNA-B. Geralmente o DNA-A codifica proteínas necessárias para replicação e encapsidação do genoma, enquanto o DNA-B codifica genes relacionados ao movimento do vírus na planta (Palmer & Rybicki, 1998; Rojas *et al.*, 2005).

No Brasil em 1975 ocorreu o primeiro relato de moscas-brancas juntamente com tomateiro infectado por vírus da espécie *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) em São Paulo (Matyis *et al.*, 1975). A transmissão ocorre de maneira persistente-circulativa não

propagativa (Cicero & Brown, 2016). Os begomovírus induzem nanismo em toda a planta, enrolamento e bolhosidade nas folhas, clorose, mosaico, abortamento de flores, frutos pequenos e não comercializáveis (Rojas *et al.*, 2018).

2.1.2 Gênero *Orthospovirus*

Viroses conhecidas por vira-cabeça-do-tomateiro são causadas por vírus que pertencem à família *Tospoviridae* e gênero *Orthospovirus* (ICTV, 2020). O tipo de genoma dos membros dessa família caracteriza-se por três moléculas de ssRNA senso negativo ou ambisenso (German *et al.*, 1992; Fauquet *et al.*, 2005). Seis espécies de tospovírus são relatadas no Brasil e dessas quatro infectam o tomateiro: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) (Nagata *et al.*, 1995; Ávila *et al.*, 1996; Resende *et al.*, 1996; Bezerra *et al.*, 1999).

Os orthospovírus são transmitidos naturalmente de maneira circulativa-propagativa pelos insetos denominados tripes (ordem Thysanoptera), principalmente dos gêneros *Frankliniella* e *Thrips* (Wijkamp *et al.*, 1993; Riley *et al.*, 2011). Esses vírus também são transmitidos mecanicamente (Pozzer *et al.*, 1996). Os sintomas comumente notados são bronzeamento, mosaico, deformação foliar, manchas cloróticas e necróticas, curvatura e morte das folhas no ápice do tomateiro, onde há desenvolvimento de várias lesões necróticas pequenas de coloração marrom escura, que posteriormente coalescem formando extensas áreas necrosadas, há uma redução no tamanho das folhas além de manchas anelares nos frutos (Inoue-Nagata *et al.*, 2016).

2.1.3 Gênero *Cucumovirus*

Segundo o ICTV (2020), os cucumovírus estão classificados dentro da família *Bromoviridae*. O genoma é composto por três moléculas de ssRNA encapsidadas separadamente de senso positivo (Palukaitis *et al.*, 1992; Fauquet *et al.*, 2005). A espécie *Cucumber mosaic virus* (CMV) foi detectada no Brasil em bananeiras no estado de São Paulo (Silberschmidt & Nóbrega, 1941). A transmissão natural é feita por afídeos, cuja interação vírus-vetor é de maneira não-circulativa não-persistente, sendo possível também serem transmitidos por inoculação mecânica (Chen & Francki, 1990; Nault, 1997; Costa, 1998). Os principais sintomas de infecção por CMV em tomateiro

são: mosqueado, deformação do limbo foliar, afilamento de folhas conhecidas como “cordão de sapato” (Inoue-Nagata *et al.*, 2005).

2.1.4 Gênero *Tobamovirus*

Os tobamovírus são da família *Virgaviridae* apresentam partículas cilíndricas, alongadas e rígidas, sendo o genoma constituído por uma molécula de RNA fita simples, senso positivo (Lewandowski & Dawson, 1994; Fauquet *et al.*, 2005). Esses vírus são transmitidos por sementes por longa distância (Demski, 1981; Erkan & Delen, 1985) e apresentam alta eficiência na transmissão mecânica pelo atrito entre plantas, manuseio humano e ferramentas usadas nos tratos culturais (Zaitilin & Israel, 1975). Não há relatos de vetores para esse vírus e para o tomateiro a espécie mais importante é o *Tomato mosaic virus* (ToMV), para o qual os principais sintomas são: mosaico e deformação com folhas finas e alongadas e os frutos apresentam manchas verdes, necrose e deformação (Jones *et al.*, 1991; Inoue-Nagata *et al.*, 2005).

2.1.5 Gênero *Crinivirus*

Os membros da família *Closteroviridae* e pertencentes ao gênero *Crinivirus* (ICTV, 2020) possuem partículas longas e flexuosas, cujo genoma é bipartido com duas moléculas de ssRNA senso positivo (Fauquet *et al.*, 2005). Apenas a espécie *Tomato chlorosis virus* (ToCV) foi relatada em tomateiros no Brasil (Barbosa *et al.*, 2008). O primeiro relato foi em São Paulo e, em seguida, foi detectado em outros estados produtores de tomate (Barbosa *et al.*, 2011). Não são transmitidos mecanicamente, sendo apenas pelo inseto-vetor mosca-branca, das espécies *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum* e *T. abutiloneus* e o tipo de interação vírus-vetor é não-circulativa semi-persistente (Wintermantel & Wisler, 2006). Os sintomas dessa virose são manchas cloróticas internervais que aparecem nas folhas mais velhas e avançam lentamente para as folhas superiores e algumas vezes apresentam enrolamento foliar, sem sintomas nos frutos (Wisler *et al.*, 1998; Barbosa *et al.*, 2008).

2.1.6 Gênero *Tymovirus*

As partículas dos tymovírus da família *Tymoviridae* são isométricas com genoma monopartido de RNA fita simples, senso positivo (Koenig & Lesemann, 1981;

Fauquet *et al.*, 2005). Em 1965 foi relatado o primeiro tymovírus no Brasil em berinjela (Kitajima, 1965). No ano de 2012 foi caracterizado um tymovírus infectando tomateiros no Brasil, causando mosaico e bolhosidades nas folhas, a espécie foi nomeada como *Tomato blistering mosaic virus* com acrônimo ToBMV (De Oliveira *et al.*, 2013). Essa espécie é transmissível mecanicamente, por sementes e por meio de coleópteros vetores (Koenig & Lesemann, 1981; Martelli *et al.*, 2002).

3. FAMÍLIA POTYVIRIDAE

A família *Potyviridae* será apresentada em maiores detalhes por contemplar o vírus-alvo de estudo desta dissertação. Segundo Wylie *et al.* (2017), *Potyviridae* é uma família de vírus de plantas de RNA, abrangendo oito gêneros que se diferenciam pela gama de hospedeiros, características genômicas e filogenia. A maioria possui genomas monopartidos exceto os vírus do gênero *Bymovirus*, que são bipartidos. É uma família com grande variação entre os vírus: alguns membros têm um círculo amplo de hospedeiros e infectam plantas em 30 famílias diferentes, enquanto outros têm um número limitado de hospedeiras, e algumas espécies são transmitidas mecanicamente ou por sementes (ICTV, 2020).

Segundo descrição no Viralzone (2020), os vírions nesta família não apresentam partícula envelopada, sendo flexíveis e filamentosas lineares com simetria helicoidal. O tamanho do genoma varia de 8,5-12 kb, enquanto o comprimento da partícula pode variar de 650-900 nm nos monopartidos e nos bipartidos de 500-600 e 200-300 nm e de 12-15 nm de diâmetro. No citoplasma das células vegetais infectadas, corpos de inclusões são produzidos à medida em que replicam seu genoma de ssRNA senso positivo, sendo caracterizado pela cauda poliadenilada na extremidade 3' e pela proteína VPg ligada na extremidade 5' (Marques *et al.*, 2016).

3.1 Critérios Taxonômicos da Família *Potyviridae*

Os gêneros são diferenciados por critérios biológicos, transmissão por vetores específicos e dados moleculares. Para todas as ORF's, o critério de demarcação dos gêneros é de <46% de identidade de nucleotídeos, com a ressalva de não separar rymovírus dos potyvírus, que se diferenciarão pelos vetores distintos (Adams *et al.*, 2005; Gibbs & Ohshima, 2010).

O gênero *Bevemovirus* possui apenas uma espécie de acordo com o ICTV (2020) denominada *Bellflower veinal mottle virus* (BVMoV), capaz de infectar plantas ornamentais cultivadas na Coréia do Sul (Seo *et al.*, 2017). Apenas a espécie *Blackberry virus Y* é aceita pelo ICTV pertencendo ao gênero *Brambyvirus*, infectando plantas de amoras silvestres nos Estados Unidos (Susaimuthu *et al.*, 2008). Já o gênero *Bymovirus* apresenta seis espécies aceitas, sendo caracterizadas pelo genoma bipartido e transmitidas pelo fungo *Polymyxa graminis*. São relatados na Europa, Ásia e América do Norte infectando trigo e na Alemanha foi detectado em centeio (Chen, 1999). De acordo com o ICTV (2020), as espécies que compõem o gênero são: *Barley mild mosaic virus*, *Barley yellow mosaic virus*, *Oat mosaic virus*, *Rice necrosis mosaic virus*, *Wheat spindle streak mosaic virus* e *Wheat yellow mosaic virus*.

Os ipomovírus são transmitidos por moscas-brancas de maneira não-circulativa semi-persistente (Andret-Link & Fuchs, 2005). Alguns membros deste gênero causam sérias perdas em batata doce (*Ipomoea batatas*), pepino (*Cucumis sativus*), melão (*C. melo* e outras espécies selvagens), melancia (*Citrullus lanatus*), mandioca (*Manihot esculenta*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e berinjela (*Solanum melongena*), sendo relatadas na África, Ásia, Israel, Jordânia, Estados Unidos e Iêmen (Dombrovski *et al.*, 2014). De acordo com o ICTV (2020), *Cassava brown streak virus*, *Coccinia mottle virus*, *Cucumber vein yellowing virus*, *Squash vein yellowing virus*, *Sweet potato mild mottle virus*, *Tomato mild mottle virus* e *Ugandan cassava brown streak virus* pertencem ao gênero *Ipomovirus*.

Oito espécies são aceitas pelo ICTV (2020) dentro do gênero *Macluravirus*. Estas espécies infectam plantas da família Zingiberaceae, que inclui o gengibre (Liou *et al.*, 2003), alcachofra (Erkan *et al.*, 2014), diversas espécies da família Dioscoreaceae - inhame e cará (Zhang *et al.*, 2016), porém nenhuma das espécies ocorre no Brasil, tendo relatos apenas na China e Turquia.

O gênero *Poacevirus* é formado por três espécies, sendo que vírus das espécies *Triticum mosaic virus* (TriMV) e *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) infectam gramíneas nos Estados Unidos, Paquistão, Índia e África do Sul (Hall *et al.*, 1998; Seifers *et al.*, 2009) e de *Caladenia virus A* (CaIVA) infectam orquídeas na Austrália (Wylie *et al.*, 2012).

O gênero *Roymovirus* possui apenas *Rose yellow mosaic virus* (RYMV) como espécie, detectadas em roseiras nos Estados Unidos (Mollov, 2013). No gênero *Rymovirus*, três espécies infectam gramíneas, sendo transmitidas por ácaros (Zagula *et al.*, 1992). O gênero *Tritimovirus* abrange seis espécies que infectam gramíneas transmitidas por ácaros (Young *et al.*, 2012). O gênero *Potyvirus* será descrito detalhadamente abaixo.

Um estudo voltado para determinar os critérios moleculares para discriminação de gêneros e espécies da família *Potyviridae* realizado por Adams *et al.*, (2005) sugeriu que o critério de demarcação de espécie seja de 76-77% de identidade de nucleotídeos do genoma completo e 82% de identidade de aminoácidos a partir da sequência da polyproteína.

3.2 Gênero *Potyvirus*

O gênero *Potyvirus* é o de maior importância na família *Potyviridae*, possuindo 175 espécies aceitas pelo ICTV 2020. Patógenos importantes, como *Soybean mosaic virus* (SMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) e *Bean common mosaic virus* (BCMV), são capazes de causar sintomas semelhantes, desde uma leve lesão em mosaicos até necrose letal (Gao *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014).

A espécie-tipo é o *Potato virus Y* cujas principais hospedeiras segundo De Bokx & Huttinga (1981) são plantas da família Solanaceae, incluindo a batata (*Solanum tuberosum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate, pimenta (*Capsicum frutescens*) e pimentão (*Capsicum annuum*). A seguir será apresentado detalhes sobre as características do gênero e também do PVY, que é o vírus alvo deste estudo.

3.2.1 Organização Genômica dos *Potyvirus*

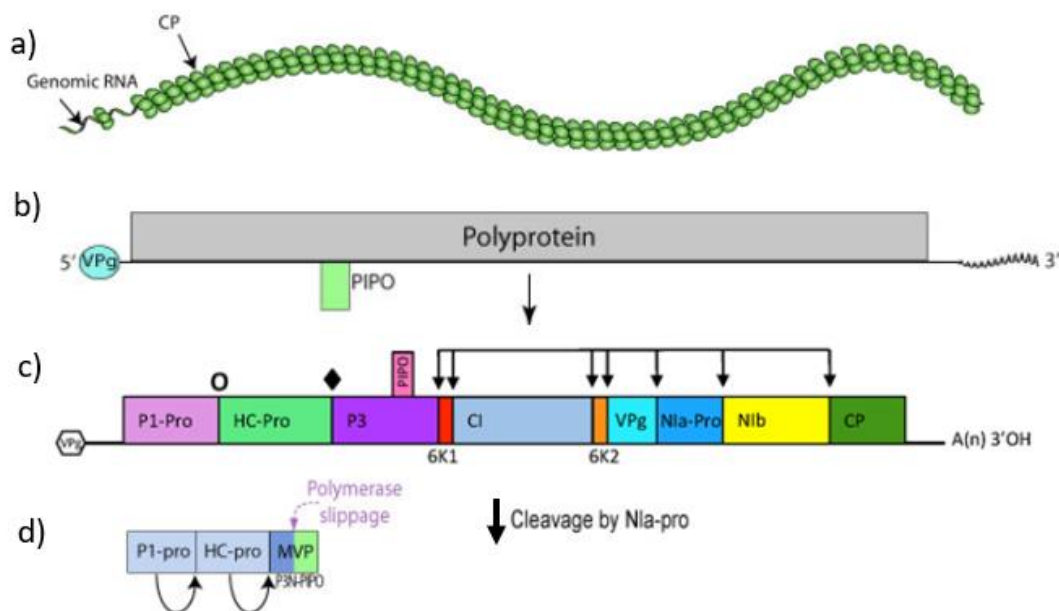
De acordo com o ICTV (2020), a morfologia da monopartícula não envelopada é baseada em vírions filamentosos e flexuosos de simetria helicoidal, com comprimento de 680 a 900 nm, enquanto a largura varia de 11 a 13 nm (Figura 1a). O genoma contém uma molécula única de RNA linear fita simples, senso positivo, com cerca de 9,7 kb. O mapa genômico característico do grupo (Figura 1b) é de uma única ORF, que sintetiza uma polyproteína que posteriormente é clivada em diversas proteínas funcionais (Figura

1c) e uma ORF pequena denominada PIPO (Figura 1d, Chung *et al.*, 2008). Na extremidade 5' possui uma proteína associada ao genoma, denominada VPg, e na extremidade 3' apresenta uma cauda poliadenilada (ViralZone, 2020; Figura 1b, 1c).

3.2.2 Ciclo de Infecção

Segundo Urcuqui-Ichima *et al.* (2001), a replicação se inicia após a decapsidação do genoma e síntese da polyproteína, que em seguida é clivada em várias proteínas (Figura 1c). A VPg (21 kDa a 24kDa) liga-se à extremidade 5' e funciona como um primer iniciando a replicação. Posteriormente pode estar envolvida com fatores de tradução eIF4E e supressora de silenciamento gênico. A primeira proteína a ser clivada a partir da polyproteína é a P1 que atua como protease que se autocliva em *cis* (Figura 1c), cuja massa molecular varia de acordo com o gênero ou espécie de 32 kDa a 64 kDa e está associada com a sintomatologia.

Figura 1- Partícula viral e estratégia de expressão de proteínas dos potyvírus.



Legenda: a) Representação esquemática de uma partícula alongada e flexuosa de um potyvírus; b) esquema ilustrativo do genoma viral contendo duas ORF's, polyproteína e PIPO, e a representação da proteína VPg ligada ao genoma na

extremidade 5' e uma cauda poliadenilada na extremidade 3'; c) representação das proteínas processadas com os sítios de clivagem de cada protease; d) esquema da expressão da PIPO na polyproteína.

Fonte: ICTV (2020) e ViralZone (2020) adaptadas.

A proteína seguinte é a HC-pro (56 kDa a 58 kDa) que também se cliva em *cis* (Figura 1c), atuando em situações diversas: transmissão por afídeos, movimento sistêmico, associação de sinergismo com outros vírus, desenvolvimento de sintomas e supressora de silenciamento gênico (Urcuqui-Ichima *et al.*, 2001). A proteína P3 tem massa molecular de 38 kDa e é responsável pela patogenicidade, enquanto a proteína 6K2 tem massa de 6 kDa e realiza a ligação do complexo viral de replicação do genoma (Urcuqui-Ichima *et al.*, 2001). O peptídeo 6K1 (6kDa) tinha função desconhecida até o estudo realizado por Cui & Wang (2016), que comprovou que a mesma é necessária para replicação viral e infecção precoce. A CI tem massa de 70 kDa, atua na formação dos corpos de inclusões citoplasmáticas, apresenta função ATPase, RNA helicase e movimento célula-célula (Urcuqui-Ichima *et al.*, 2001). A proteína NIa-pro é a protease que atua em *cis* e em *trans* (Figura 2c) de outras seis proteínas sendo responsável pela interação proteína-proteína. A NIB (58 kDa) é acumulada na forma de corpos de inclusões nucleares, com função de RNA polimerase dependente de RNA e está envolvida na replicação do genoma (Urcuqui-Ichima *et al.*, 2001). A capa proteica (CP) é a proteína mais abundante, pois envolve todo o material genômico do vírus (com tamanho de 28 kDa a 40 kDa), sendo responsável também pelo movimento viral, amplificação do genoma e transmissão pelo vetor (Urcuqui-Ichima *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2008). A PIPO (*Pretty Interesting Potyviridae ORF*) é uma ORF além da polyproteína que foi identificada pela primeira vez no *Turnip mosaic virus* (Chung *et al.*, 2008) e está presente dentro do cístron da P3 (Figura 1d), que segundo Olsper *et al.* (2016) se sobrepõe à região de codificação da P3 (na ORF da polyproteína) sendo essencial para a movimentação e infectividade viral (Adams *et al.*, 2012; Wylie *et al.*, 2017).

A produção das proteínas é feita em quantidades iguais, ou seja, o vírus necessita de grandes quantidades de CP e poucas quantidades das outras proteínas, porém todas

as proteínas serão produzidas igualmente e os excessos serão armazenados nas células infectadas, a maioria delas na forma de inclusões (Shukla *et al.*, 1992).

3.2.3 Transmissão de PVY

O PVY é transmitido por pulgões de maneira não-circulativa não-persistente, incapaz de circular no corpo do vetor nem se replicar no mesmo, sendo que as partículas ficam retidas no estilete (Hull, 1994). Uma picada de prova em uma planta infectada seguida de outra picada de prova em planta sadia possibilita a transmissão do vírus (Sigvald, 1984). As partículas do PVY no estilete dos pulgões não persistem por mais de três horas e o tempo de aquisição e transmissão é em segundos, sem período de latência (Hull, 1994). Mais de 40 espécies de pulgões são capazes de transmitir o PVY e a espécie com maior eficiência é o *Myzus persicae*; e devido ao grande número de espécies vetoras, é possível perceber a baixa especificidade com o vetor (Kennedy *et al.*, 1962; Sigvald, 1984). A transmissão experimental de PVY pode ser feita por inoculação mecânica, alertando também o cuidado com os tratos culturais em condições de campo para evitar transmissão de plantas infectadas para não infectadas (De Bokx & Huttinga, 1981).

3.2.4 Epidemiologia

A dispersão do PVY pode ocorrer a longas distâncias por meio de mudas infectadas e por pulgões alados (Nemecek, 1995), enquanto à curta distância ocorre pela transmissão por contato (Coutts & Jones, 2015) ou por pulgões ápteros (Boiteau, 1997).

Diversos ensaios voltados à transmissão de PVY por contato (folhas e tubérculos), estabilidade da partícula em diversas superfícies e inativação foram realizados por Coutts & Jones (2015). Metade das plantas submetidas ao contato folha-folha de planta infectada com planta sadia foram positivas para PVY em cada um dos sete experimentos, com diferentes isolados. Também houve infecção em folhas de plantas sadias com tubérculos infectados. Os cortes de tubérculos sadios com lâmina que havia cortado tubérculos infectados ocasionou em baixa ou nenhuma infecção. Quanto aos testes de estabilidade da partícula em diversas superfícies e sobrevivência da seiva seca revelaram que as partículas podem permanecer viáveis em diversas situações. Dois alvejantes foram capazes de inativar as partículas de PVY. Deste modo, vale

ressaltar os cuidados com os tratos culturais, já que a transmissão por contato pode ocorrer.

O círculo de hospedeiras do PVY segundo De Bokx & Huttinga (1981) é voltado principalmente às plantas da família Solanaceae, como: tomateiro, batateira, pimenteira, *physalis* e várias espécies de tabaco. As quenopodiáceas *Chenopodium amaranticolor* e *C. quinoa* apresentam sintomas de lesões locais.

3.2.5 Classificação de Estirpes de PVY em Batateira

O PVY de batateira pode ser classificado em três estirpes não recombinantes, sendo duas baseadas em sintomatologia em fumo: a estirpe PVY^O induz mosaico sistêmico, enquanto PVY^N induz necrose das nervuras, necrose e mosaico. O vírus recombinante PVY^C induz sintoma do tipo “stiple streak” em cultivares de batata que possuem o gene *Nc* (De Bokx & Huttinga, 1981; Singh *et al.*, 2008). A análise das estirpes de genomas não recombinantes resulta na formação de três clados filogenéticos distintos (Glais *et al.*, 2002; Karasev e Gray, 2013; Lorenzen *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2008). Entretanto, há diversos relatos de isolados recombinantes de PVY, que representam grande risco à produção de batata, pois estão frequentemente associadas a variações da doença, aumentando sua agressividade, como por exemplo a doença da necrose anelar do tubérculo (PTNRD) em cultivares de batata suscetíveis (Beczner *et al.*, 1984; Glais *et al.*, 2002; Le Romancer *et al.*, 1994), que também pode induzir rachaduras em forma de canoa também em tubérculos (Benedict *et al.*, 2015). A sorologia com anticorpo monoclonal é capaz de diferenciar as estirpes (Nikolaeva *et al.*, 2012). As perdas de produtividade em batateira por causa do enrolamento-das-folhas chegaram a 50% (Câmara *et al.*, 1986; Filgueira & Câmara, 1986), e batateiras infectadas pelas estirpes O, N, C e NTN as perdas podem variar de 30-100%, dependendo da cultivar (Kus, 1995).

3.2.6 Classificação de Patotipos de PVY em Pimenteira

O PVY que infecta as pimenteiras (*Capsicum* spp.) não é classificado por estirpes e sim em patotipos, sendo baseada a partir do tipo de resposta de resistência (Selassie *et al.*, 1985). O patotipo zero não supera nenhum gene de resistência, enquanto o patotipo 1 é capaz de superar apenas o gene *pvr2^l*. O patotipo 2 supera apenas o gene

*pvr2*² e último patotipo denominado 1-2 tem capacidade de superar os dois genes de resistência (revisado por Romero *et al.*, 2001). A pimenteira infectada com PVY apresenta folhas com mosaico, mosqueado, clareamento das nervuras e necrose. Os frutos podem ter tamanho reduzido, mosaico e leve deformação (Cerkaskas, 2004).

3.2.7 PVY em Tomateiro

Segundo Inoue-Nagata *et al.*, (2016) a potyvirose em tomateiro apresentava alta incidência e severas perdas no Brasil, porém a oferta e uso de cultivares resistentes desenvolvidas por Nagai *et al.* (1992) ocasionaram queda na sua incidência. Contudo, tem sido observado nos últimos anos surtos de PVY na tomaticultura, nos estados do Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. Sintomas de necrose foliar, mosaico, nanismo em toda a planta são comumente observados (Silva *et al.*, 2006). São relatados outros sintomas como: necrose na face abaxial das folhas com aspecto de “riscas”, curvamento dos folíolos para baixo e manchas necróticas na parte mediana da planta (Inoue-Nagata *et al.*, 2016).

Em tomateiro, não existem classificações de estirpes ou patotipos como em batateira e pimenteira para o PVY (Singh *et al.*, 2008). Essa classificação do PVY no tomateiro não ocorreu devido à ausência de estudos voltados para a virose na cultura.

3.2.8 Distribuição Mundial

A distribuição do PVY é ampla em todo o mundo, sendo relatadas em diversos países e em todos os continentes (Figura 2).

Figura 2- Distribuição mundial de *Potato virus Y*



Fonte: Plantwise.org (2020).

3.2.9 Métodos de Controle

O principal método de controle é baseado no uso de cultivares resistentes. São descritos diversos genes de resistência para a pimenteira, como citados nos tópicos anteriores. Esses genes permitem que os produtores de ambas culturas consigam produzir sem sérios danos causados pelo PVY. Para o tomateiro, que é a cultura alvo desta dissertação, foi realizado um trabalho de melhoramento resultando na cultivar Ângela, obtida a partir do cruzamento entre a cultivar Santa Cruz e PI 126410, que se mostrou resistente a PVY e outros patógenos (Nagai *et al.*, 1992). Desde então, poucas pesquisas foram realizadas em tomateiro voltadas ao PVY no Brasil (Lourenção *et al.*, 2005) e no mundo (Chikh-Ali, 2016).

O controle químico com pesticidas não é recomendado, pois apresenta baixa eficiência na redução da disseminação do vírus, logo o recomendado é a eliminação de plantas hospedeiras de pulgões como pimenteiras e physalis nas proximidades e mudas preparadas com telas antiafídeos (Inoue-Nagata *et al.*, 2016).

LITERATURA CITADA

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; FAUQUET, C. M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of virology*, v. 150, n. 3, p. 459-479, 2005.

ADAMS M. J.; ZERBINI F. M.; FRENCH R.; RABENSTEIN F.; STENGER DC.; VALKONEN, J. P. T.; Family Potyviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) *Virus taxonomy. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier, Amsterdam, pp 1069–1089, 2012.

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

ÁVILA, A. C.; *et al.* Ocorrência de vírus em batata em sete estados do Brasil. *Horticultura Brasileira*, v. 27, n. 4, p. 490-497, 2009.

ÁVILA, A. C.; LIMA, M. F.; RESENDE, R. O.; POZZER, L.; FERRAZ, E.; MARANHÃO, E. A. A.; CANDEIA, J. A.; & COSTA, N. D.; Identificação de tospovírus em hortaliças no sub-médio São Francisco utilizando DAS-ELISA e Dot-ELISA. *Fitopatologia Brasileira* 21: 503-508, 1996.

BANCE, V. B.; Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y. *Virology*, v. 182, n. 2, p. 486-494, 1991.

BARBOSA, J. C.; *et al.* First report of Tomato chlorosis virus infecting tomato crops in Brazil. *Plant Disease*, v. 92, n. 12, p. 1709-1709, 2008.

BARBOSA, J. C.; *et al.* Occurrence of Tomato chlorosis virus in tomato crops in five Brazilian states. *Tropical Plant Pathology*, v. 36, n. 4, p. 256-258, 2011.

BECZNER L.; HORVATH H.; ROMHANYI L.; FORSTER H.; Etiology of tuber ringspot disease in potato. *Potato Res* 27:339–351, 1984.

BENEDICT C.; MCMORAN D.; INGLIS D.; KARASEV A.V.; Tuber symptoms associated with recombinant strains of Potato virus Y in specialty potatoes under northwestern Washington growing conditions. *Am J Potato Res* 92:593–602, 2015.

BEZERRA, I.C.; RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; KORMELINK, R.; & ÁVILA, A.C.; Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from Chrysanthemum and one from Zucchini. *Phytopathology* 89: 823-830, 1999.

BOITEAU, G.; Comparative propensity for dispersal of apterous and alate morphs of three potato-colonizing aphid species. *Canadian Journal of Zoology*, v. 75, n. 9, p. 1396-1403, 1997.

BORGUINI, R.G.; Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) orgânico: o conteúdo nutricional e a opinião do consumidor. Piracicaba, SP. p 46 a 50. 2002.

CÂMARA F. L. A.; CUPERTINO F. P.; FILGUEIRA F. A. R.; Incidência de vírus em cultivares de batata multiplicadas sucessivamente em Goiás. *Fitopatologia Brasileira* 11: 711-716, 1986.

CARNEIRO, J. S.; HAJI, F. N. P.; SANTOS, F.; Bioecologia e controle da broca pequena do tomateiro *Neoleucinodes elegantalis*. Embrapa Meio-Norte-Circular Técnica (INFOTECA-E), 1998.

CERKAUSKAS, R.; *et al.* Potato virus Y Aphid-transmitted potyvirus. Pepper diseases. p. 1-2, 2004.

CHEN, B.; & FRANCKI, R.I.B.; Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *Journal of General Virology* 71: 939-944, 1990

CHEN, J.; Molecular comparisons amongst wheat bymovirus isolates from Asia, North America and Europe. *Plant pathology*, v. 48, n. 5, p. 642-647, 1999.

CHIKH-ALI, M.; *et al.* Biological and molecular characterization of a tomato isolate of Potato virus Y (PVY) of the PVY C lineage. *Archives of virology*, v. 161, n. 12, p. 3561-3566, 2016.

CHUNG, B. Y.; MILLER, W. A; ATKINS, J. F; FIRTH, A. E. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc Natl Acad Sci*, v. 105, p. 5897-5902, 2008.

CICERO J.M.; BROWN J.K.; Bemisia tabaci-mediated transmission of begomoviruses: history and anatomical, biological, and cellular interactions. In *Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens*, ed. J Brown, pp. 211230–62. St Paul, MN: Am. Phytopathol. Soc, 2016.

COSTA, C. L.; 1998. Vetores de vírus de plantas - Insetos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)* 6: 103-171.

COUTTS, B. A.; & JONES, R. A. C.; Potato virus Y: Contact transmission, stability, inactivation, and infection sources. *Plant Disease*, v. 99, n. 3, p. 387-394, 2015.

CUI, H.; & WANG, A.; Plum Pox Virus 6K1 protein is required for viral replication and targets the viral replication complex at the early stage of infection. *Journal Virology* May 15; 90(10): 5119–5131, 2016.

DE BOKX, J. A; HUTTINGA, H. Potato virus Y. *CMI/AAB Descriptions of plant viruses*, v. 242, p. 6pp, 1981.

- DE OLIVEIRA, Virgínia Carla et al. Characterization of a novel tymovirus on tomato plants in Brazil. *Virus genes*, v. 46, n. 1, p. 190-194, 2013.
- DOMBROVSKY, Aviv; REINGOLD, Victoria; ANTIGNUS, Yehezkel. Ipomovirus— an atypical genus in the family Potyviridae transmitted by whiteflies. *Pest management science*, v. 70, n. 10, p. 1553-1567, 2014.
- DOSSA, Derli & FUCHS, Felipe. Tomate: análise técnico-econômica e os principais indicadores da produção nos mercados mundial, brasileiro e paranaense. *Boletim Técnico*, v. 3, 2017.
- EDWARDSON, J. R. *et al.* Potyvirus cylindrical inclusions-- Subdivision-IV. *Phytopathology*, v. 74, n. 9, p. 1111-1114, 1984.
- EDWARDSON, J. R. *et al.* Some properties of the potato virus Y-group. Some properties of the potato virus Y-group., n. 4, 1974.
- ERKAN, S. *et al.* The new report of artichoke latent virus (ArLV) from globe artichoke in Turkey. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, v. 51, n. 3, p. 265-269, 2014.
- ESHED, Y. & ZAMIR, D. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* 141: 1147–1162, 1995.
- FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U. & BALL, L.A. *Virus taxonomy - Classification and nomenclature of viruses*. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. San Diego, 2005.
- FERNANDES, F. R. *et al.* Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus genes*, v. 36, n. 1, p. 251-258, 2008.
- FILGUEIRA F.A.R. *Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2003.
- FILGUEIRA FAR; CÂMARA FLA. Comportamento de cultivares européias de batata em gerações sucessivas. *Horticultura Brasileira* 4: 29-31, 1986.

GAO L, DING X, LI K, LIAI W, ZHONG Y, REN R, LIU Z, ADHIMOOLAM K, ZHI H. Characterization of soybean mosaic virus resistance derived from inverted repeat-SMV- HC- Pro genes in multiple soybean cultivars. *Theor Appl Genet* 128(8):1489–1505, 2015.

GEISENBERG, C. & STEWART K. “Field crop management”, in Atherton, J.G. and J. Rudich (eds.), *The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement*, Chapman & Hall, London, pp. 511-557, 1986.

GERMAN, T.L.; ULLMAN, D.E. & MOYER, J.W. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annual Review of Phytopathology* 30: 315-348, 1992.

GIBBS, A. OHSHIMA, K. Potyviruses and the digital revolution. *Annual review of phytopathology*, v. 48, p. 205-223, 2010.

GLAIS L, TRIBODET M, KERLAN C. Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVYNW and PVYNTN variants are single to multiple recombinants between PVYO and PVYN isolates. *Arch Virol* 147:363–378, 2002.

HAHN, M. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study. *Journal of chemical biology*, v. 7, n. 4, p. 133-141, 2014.

HALL, J. S. *et al.* Molecular cloning, sequencing, and phylogenetic relationships of a new potyvirus: sugarcane streak mosaic virus, and a reevaluation of the classification of the Potyviridae. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 10, n. 3, p. 323-332, 1998.

HULL, R. Molecular biology of plant virus-vector interactions. In: *Advances in Disease Vector Research*. Springer, New York, NY, 1994.

INOUE-NAGATA, A.K.; ÁVILA, A.C. & LOPES, C.A. Doenças viróticas. In: Lopes, C.A. & Ávila, A.C. (eds.). *Doenças do tomateiro*. 2ª ed. Embrapa. Brasília-DF. p. 77-94, 2005.

INOUE-NAGATA, A.K. Doenças viróticas. In: Alvarenga, M.A.R. (ed.). *Tomate: produção em campo, casa de vegetação e hidroponia*. 2ª ed. Editora Universitária de Lavras. Lavras-MG. p. 329-344, 2013.

INOUE-NAGATA, A. K. *et al.* Manual de Fitopatologia. Volume 2. Doenças das Plantas Cultivadas. Minas Gerais. Editora Ceres. 2016.

JACINTO, L.U.; SOARES, B.B.; RANGEL, R. & JACINTO, A.F.V. Transplântio e colheita mecanizada. In: Clemente, F.M.V.T & Boiteux, L.S. (eds.). Produção de tomate para processamento industrial. 1ª ed. Embrapa. Brasília-DF. p. 315-327, 2012.

JONES, J.P.; STALL, R.E. & ZITTER, T.A. Compendium of tomato diseases. 1ª ed. APS Press. Saint Paul, 1991.

JONES, R.A.C; BARBETTI, M. J. Influence of climate change on plant disease infections and epidemics caused by viruses and bacteria. Plant Sciences Reviews, v. 22, p. 1-31, 2012.

KARASEV, A. V. & GRAY, S. M. Continuous and emerging challenges of Potato virus Y in potato. Annu. Rev. Phytopathol. 51:571-586, 2013.

KENNEDY, J. S. *et al.* A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. A conspectus of aphids as vectors of plant viruses., 1962.

KIMURA, S.; SINHA, N. Tomato (*Solanum lycopersicum*): a model fruit-bearing crop. Cold Spring Harbor Protocols, v. 2008, n. 11, p. pdb. emo105, 2008.

KITAJIMA, E.W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. Journal of Electron Microscopy 14: 119-121, 1965.

KOENIG, R. & LESEMANN, D.E. Tymoviruses. In: Kurstak, E. (ed.). Comparative diagnosis of viral diseases. 1ª ed. Elsevier. Amsterdam. p. 33-60, 1981.

KUS M. The epidemic of the tuber necrotic ringspot strain of Potato virus Y (PVYNTN) and its effect on potato crops in Slovenia. In: European Association for Potato Research Meeting, Virology Section. 9. Proceedings...Bled: EAPR. p.159-160, 1995.

LAZAROWITZ, S.G. & SHEPHERD, R.J. Geminiviruses: genome structure and gene function. Critical Reviews in Plant Sciences 11: 327-349, 1992.

LE ROMANCER M, KERLAN C, NEDELLEC M. Biological characterization of various geographical isolates of Potato virus Y including superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathol* 43:138–144, 1994.

LEWANDOWSKI, D. J. & DAWSON, W.O. 1994. Tobamoviruses. In: Webster, R.G. & Granoff, A. (eds.). *Encyclopedia of virology*. 1^a ed. Academic Press. New York. p. 1436-1441, 1994.

LIU, R. F.; YAN, H. Z.; HONG, J. L. Molecular evidence that aphid-transmitted *Alpinia mosaic virus* is a tentative member of the genus *Macluravirus*. *Archives of virology*, v. 148, n. 6, p. 1211-1218, 2003.

LONG T. J. “Una semblanza de las Solanaceae”, *Etnobiología*, Vol. 1, pp. 17-23, 2001.

LORENZEN, J. H., MEACHAM, T., BERGER, P. H., SHIEL, P. J., CROSSLIN, J. M., HAMM, P. B., & KOPP, H. Whole genome characterization of Potato virus Y isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. *Arch. Virol.* 151:1055-1074, 2006.

LOURENÇÃO, A.L., SIQUEIRA, W.J., MELO, A.M.T., PALAZZO, S.R.L., MELO, P.C.T. & COLARICCIO, A. Resistência de cultivares e linhagens de tomateiros a Tomato chlorotic spot virus e a Potato virus Y. *Fitopatologia Brasileira* 30: 609- 614, 2005.

MACEDO, M.A.; BARRETO, S.S.; HALLWASS, M. & INOUE-NAGATA, A.K. High incidence of Tomato chlorosis virus alone and in mixed infection with begomoviruses in two tomato fields in the Federal District and Goiás state, Brazil. *Tropical Plant Pathology* 39: 449-452, 2014.

MARQUES, J. A. *et al.* *Manual de Fitopatologia Volume 1 Princípios e conceitos*. Minas Gerais. Editora Ceres, 2016

MARTELLI, G.P.; SABANADZOVIC, S.; SABANADZOVIC, N.A.; EDWARDS, M.C. & DREHER, T. The family Tymoviridae. *Archives of Virology* 147: 1837-46, 2002.

- MATYIS J.C, SILVA D.M, OLIVEIRA A.R, COSTA A.S. Purification and morphology of tomato golden mosaic virus (in Portuguese). *Summa Phytopathol* 1: 267–275, 1975.
- MOLLOV, D; LOCKHART, B; ZLESAK, D. Complete nucleotide sequence of rose yellow mosaic virus, a novel member of the family Potyviridae. *Archives of virology*, v. 158, n. 9, p. 1917-1923, 2013.
- NAGAI, H., LOURENÇÃO, A.L. & SIQUEIRA, W.J. Tomato breeding for resistance to diseases and pests in Brazil. *Acta Horticulturae* 301:91-97. 1992.
- NAGATA, T.; ÁVILA, A.C.; TAVARES, P.C.T.; BARBOSA, C.J.; JULIATTI, F.C. & KITAJIMA, E.W. Occurrence of different tospoviruses in six states of Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 20: 90-95, 1995.
- NAIKA, S. *et al.* A Cultura do tomate. Wageningen: Fundação Agromisa e CTA, v. 104, p. 104, 2006.
- NASCIMENTO, W.M.; MELO, P.C.T & FREITAS, R.A. Produção de sementes. In: Clemente, F.M.V.T & Boiteux, L.S. (eds.). *Produção de tomate para processamento industrial*. 1ª ed. Embrapa. Brasília-DF. p. 53-75, 2012.
- NAULT, L.R. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Annals of the Entomological Society of America* 90: 521-541, 1997.
- NEMECEK, T. The role of aphid behaviour in the epidemiology of potato virus Y: A simulation study. 1995.
- NIKOLAEVA O.V, ROOP D, GALVINO-COSTA S.F.B, FIGUEIRA A.R, GRAY S.M, KARASEV A.V. Epitope mapping for monoclonal antibodies recognizing tuber necrotic strains of Potato virus Y. *Am J Potato Res* 89:121–128, 2012.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), *Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 7: OECD Consensus Documents, Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology*, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264279728-en>. 2017.

OLSPERT, A; CARR, J.P; FIRTH, A.E. Mutational analysis of the Potyviridae transcriptional slippage site utilized for expression of the P3N-PIPO and P1N-PISPO proteins. *Nucleic acids research*, v. 44, n. 16, p. 7618-7629, 2016.

PAL, K. K; GARDENER, B. M. *Biological control of plant pathogens*, 2006.

PALMER, K.E. & RYBICKI, E.P. The molecular biology of mastreviruses. *Advances in Virus Research* 50: 183-234, 1998.

PALUKAITIS, P.; ROOSSINCK, M.J.; DIETZGEN, R.G. & FRANCKI, R.I.B. Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research* 41: 281-348, 1992.

POZZER, L.; RESENDE, R.O.; LIMA, M.I.; KITAJIMA, E.W.; GIORDANO, L.B. & ÁVILA, A.C. Tospovírus: uma revisão atualizada. *Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)* 4: 95-148, 1996.

RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; BEZERRA, I.C.; LIMA, M.I.; KITAJIMA, E.W. & ÁVILA, A.C. 1996. New tospoviruses found in Brazil. *Acta Horticulturae* 431: 78-89, 1996.

REZENDE, J. A. M. & KITAJIMA, E. W. *Manual de Fitopatologia*. 4 ed. Capítulo 10. Editora Agronômica Ceres, 2011.

RICK, C.M. *Tomato*. Longman Scientific and Technical, Essex, England, 1991.

RILEY, D.G.; JOSEPH, S.V.; SRINIVASAN, R. & DIFFIE, S. Thrips vectors of tospoviruses. *Journal of Integrated Pest Management* 1: 1-10, 2011.

ROJAS, M. R. *et al.* World management of geminiviruses. *Annual review of phytopathology*, v. 56, p. 637-677, 2018.

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

ROMERO, A. *et al.* Characterization of typical pepper-isolates of PVY reveals multiple pathotypes within a single genetic strain. *Virus research*, v. 79, n. 1-2, p. 71-80, 2001

SAVARY, S., P.S. TENG, L. WILLOQUET & F.W. NUTTER Jr. Quantification and modeling of crop losses: A review of purposes. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 44: 89-112, 2006.

SCHOLTHOF, K. B. G. *et al.* Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, v. 12, n. 9, p. 938-954, 2011.

SEIFERS, D. L. *et al.* Identification of the wheat curl mite as the vector of Triticum mosaic virus. *Plant Disease*, v. 93, n. 1, p. 25-29, 2009.

SELASSIE, K. G. *et al.* Variabilité naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France. Caractérisation et classification en pathotypes, 1985.

SEO, Jang-Kyun *et al.* The complete genome sequence of a novel virus, bellflower veinal mottle virus, suggests the existence of a new genus within the family Potyviridae. *Archives of virology*, v. 162, n. 8, p. 2457-2461, 2017.

SHUKLA, D. D; LAURICELLA, R; WARD, C. W. Serology of Potyviruses: current problems and some solutions. In: BARNETT, O. W. *Potyvirus Taxonomy*, Springer, Wien and New York. *Archives of Virology*, v. 5, p. 31-46, 1992.

SIGVALD, R. The relative efficiency of some aphid species as vectors of potato virus Y o (PVY o). *Potato Research*, v. 27, n. 3, p. 285-290, 1984.

SILBERSCHMIDT, K.M. & NÓBREGA, N.R. Sobre uma doença de vírus em bananeira. *Biológico* 7: 216-219, 1941.

SILVA, J. B. C. *et al.*, Cultivo de Tomate para industrialização: Sistemas de Produção. Circular Embrapa Hortaliças. 2. ED. 2006.

SILVA J.B.C; GIORDANO LB. Tomate para processamento industrial. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças. 168p, 2000.

SINGH, R. P., VALKONEN, J. P. T., GRAY, S.M., BOONHAM, N., JONES, R. A. C., KERLAN, C., & SCHUBERT, J. Discussion Paper: The naming of Potato virus Y strains infecting potato. *Arch. Virol.* 153:1-13, 2008.

SUSAIMUTHU, J., TZANETAKIS, I. E., GERGERICH, R. C., & MARTIN, R. R. A member of a new genus in the Potyviridae infects *Rubus*. *Virus Res.* 131:145-151, 2008.

TALBOT, N. J. (Ed.). *Annual Plant Reviews, Plant-Pathogen Interactions*. Capítulo 3. John Wiley & Sons, 2009.

TAY, W. T *et al.* A brave new world for an old-world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Plos one*, v. 8, n. 11, p. e80134, 2013.

THOMPSON *et al.* Geographical Distribution of Potato virus Y along with strains. *Aps journals*, p. 7, 2007.

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Potyvirus protein: a wealth functions. *Virus Research*, v. 74, p.157-175, 2001.

WIJKAMP, I.; LENT, J.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R. & PETERS, D. Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of General Virology* 74: 341-349, 1993.

WINTERMANTEL, W.M. & WISLER, G.C. Vector specificity, host range and genetic diversity of Tomato chlorosis virus. *Plant Disease* 90: 814-819, 2006.

WYLIE, S. J. *et al.* *Caladenia virus A*, an unusual new member of the family Potyviridae from terrestrial orchids in Western Australia. *Archives of virology*, v. 157, n. 12, p. 2447-2452, 2012.

WYLIE S.J, ADAMS M, CHALAM C, KREUZE J, LÓPEZ-MOYA J.J, OHSHIMA K, PRAVEEN S, RABENSTEIN F, STENGER D, WANG A, ZERBINI F.M. ICTV Virus Taxonomy Profile: Potyviridae. *J Gen Virol* 98:352–354, 2017.

YANG Y, LIN J, ZHENG G, ZHANG M, ZHI H. Recombinant soybean mosaic virus is prevalent in Chinese soybean fields. *Adv Virol* 159(7):1793–1796, 2014.

YOUNG, B. A. *et al.* Tritimovirus P1 functions as a suppressor of RNA silencing and an enhancer of disease symptoms. *Virus research*, v. 163, n. 2, p. 672-677, 2012.

ZAGULA, K. R. *et al.* Potyviridae: genus rymovirus. In: Potyvirus Taxonomy. Springer, Vienna. p. 269-276, 1992.

ZERBINI, F.M. & MACIEL-ZAMBOLIM, E. A família Potyviridae Parte I. Revisão Anual de Patologia de Plantas 7:1-66. 1999.

ZAITILIN, M. & ISRAEL, H.M. 1975. Tobacco mosaic virus (type strain). Descriptions of Plant Viruses 151: 1-5, 1975.

ZHANG, P. *et al.* Complete genome sequence of yam chlorotic necrotic mosaic virus from *Dioscorea parviflora*. Archives of virology, v. 161, n. 6, p. 1715-1717, 2016.

ZHONGHUA M.A; MICHAILIDES, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. Crop Protection, v. 24, n. 10, p. 853-863, 2005.

<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>

https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/potyviridae/572/genus-potyvirus

https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/205/bunyaviridae

https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/bromoviridae/1108/genus-cucumovirus

https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/255/closteroviridae

https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/potyviridae#Summary

https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/potyviridae/568/genus-bymovirus

https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/potyviridae/569/genus-ipomovirus_2020

https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/potyviridae/570/genus-macluravirus

https://viralzone.expasy.org/50?outline=all_by_species

https://viralzone.expasy.org/48?outline=all_by_protein

<http://www.fao.org/home/en/>

<http://www.editoragazeta.com.br/flip/anuario-hortalicas-2017/files/assets/basichtml/page51.html>

<https://www.plantwise.org/knowledgebank/datasheet/43762>

CAPÍTULO 2

ETIOLOGIA VIRAL DA DOENÇA FOGO MEXICANO EM TOMATEIRO

LUCENA-LEANDRO, Vívian dos Santos. **Etiologia Viral da Doença Fogo Mexicano em Tomateiro**. 2020. Número de páginas (77p). Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF. Defesa em 13 de março de 2020. Orientador (a): Alice Kazuko Inoue Nagata.

RESUMO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é a hortaliça de maior importância econômica no Brasil, sendo a segunda com maior área plantada. A tomaticultura enfrenta diversas pragas e doenças, recentemente o sintoma Fogo Mexicano está sendo observado em tomateiro. Acredita-se que a doença esteja associada à espécie de vírus *Potato virus Y*, que pertence ao gênero *Potyvirus*. A transmissão do potato virus Y (PVY) é feita a partir da picada de prova (maneira não-persistente, não-circulativa) e por inoculação mecânica. Devido ao aumento de relatos do sintoma de necrose nas folhas do tomateiro, que é chamada popularmente de Fogo Mexicano por produtores das principais regiões do Brasil, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar a doença em tomateiros. Em uma área de plantio comercial localizada em Taquara, Planaltina, foram selecionadas 250 plantas com objetivo de monitorar a infecção e surgimento de sintomas de necrose foliar. Divididos em dez blocos de 25 plantas, as plantas foram coletadas semanalmente e testadas por Dot-ELISA contra o PVY. A primeira planta infectada que apresentou o sintoma de Fogo Mexicano estava localizada no bloco próximo à plantação de milho. Gradativamente, o vírus foi sendo detectado em outras 29 plantas e em seguida apresentaram sintoma de necrose. O bloco de maior incidência de PVY apresentou 7 plantas (23,3%), localizada próxima ao plantio de tomate em fase final. Verificou-se que, após a infecção, as plantas podem levar até cinco semanas para expressar os sintomas de necrose foliar. Amostras de 249 plantas, sendo 138 com sintoma de necrose e 111 sem sintoma, foram coletadas e submetidas ao teste de Dot-ELISA contra PVY, a fim de associar o sintoma à detecção de PVY. Para as plantas com sintoma, um total de 93,4 % das plantas foi positivo no teste sorológico e para as plantas sem sintoma, 85,6% foram negativas. Deste modo, foi possível associar o sintoma Fogo Mexicano com o PVY. Análises de sintomas e detecção de vírus por Dot-ELISA em plantas inteiras foram feitas e concluiu-se que o sintoma é expressado na parte mediana da planta e posteriormente em ramos mais novos. Com o intuito de mapear a localização de plantas com sintoma de Fogo

Mexicano, todas as plantas da lavoura foram analisadas a cada duas semanas. A maior incidência de plantas doentes foi na borda e próxima à plantação de milho. A produção em plantas com e sem sintoma de Fogo Mexicano foi avaliada e não foi possível concluir que a infecção reduz a produtividade da planta. O isolado PVY-TOMNEC foi coletado na área monitorada e molecularmente caracterizado. Esse isolado mostrou-se próximo filogeneticamente à estirpe C de PVY isolado de batateira, quando a sequência do genoma completo foi analisada. A inoculação de PVY-TOMNEC e outro isolado de PVY de tomateiro em plantas das cultivares Guará e Santy confirmou a infecção e indução de sintoma de necrose, típico de Fogo Mexicano. Baseado no conjunto de resultados obtidos, concluiu-se que PVY é o causador da doença Fogo Mexicano do tomateiro.

Palavras-chave: Tomateiro. Fogo Mexicano. Potato virus Y. PVY

LUCENA-LEANDRO, Vívian dos Santos. **Viral Etiology of Mexican Fire Disease in Tomato**. 2020. Number of pages (77p). Dissertation (Master in Phytopathology) - University of Brasília, Brasília, DF. Defense on March 13, 2020. Advisor: Alice Kazuko Inoue Nagata.

ABSTRACT

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is the most economically important vegetable in Brazil, being the second in cultivated area. The tomato cultivation is affected by several pests and diseases, among them the disease known as ‘Mexican Fire’ (Fogo Mexicano). The disease is believed to be associated with the *Potato virus Y* species, which belongs to the genus *Potyvirus*. The transmission of potato virus Y (PVY) occurs during the probing stage (non-persistent, non-circulating and non-propagating) and also by mechanical inoculation. Due to the increasing reports of Mexican Fire disease by producers in the main tomato growing regions of Brazil, this study had the objective to characterize the disease in tomato plants. In a commercial area located in Taquara, Planaltina, 250 plants were selected in order to monitor the infection and the appearance of symptom of leaf necrosis. Divided into ten blocks of 25 plants, the plants were weekly collected and tested by Dot-ELISA against PVY. The first infected plant that showed the Mexican Fire symptom was located in the plot next to the corn field. Gradually, the virus was detected in 29 other plants and later showed the symptoms of necrosis. The block with the highest incidence of PVY had 7 plants (23.3%), located close to the tomato field in the final stage. It was found that, after infection, the symptom of necrosis appeared within five weeks. Samples from 249 plants, 138 with necrotic symptoms and 111 asymptomatic, were collected and subjected to the Dot-ELISA test against PVY, in order to associate the symptom with the detection of PVY. From plants with symptoms, a total of 93.4% were positive in the serological test, and from plants without symptoms, 85.6% were negative. Hence, it was possible to associate the symptom of Mexican Fire with the detection of PVY. By analyzing the symptoms and by a detection test of Dot-ELISA in whole plants, it was concluded that the symptom is expressed in the middle part of the plant and progressively appears in younger leaves. In order to map the location of plants with the Mexican Fire symptom, all plants in the entire field were inspected every two weeks. The highest incidence of diseased plants was at the edge and close to the corn field.

After the analysis of the production of plants with and without the Mexican Fire symptom, it was not possible to conclude that the infection reduces the productivity of the plant. The PVY-TOMNEC isolate was collected in the monitored area and molecularly characterized. This isolate was found to be close to the strain C of PVY, when the complete genome sequence was analyzed. The inoculation of PVY-TOMNEC and another tomato isolate in plants of the cultivars Guar and Santy confirmed the infection and induction of the necrotic symptom, typical of Mexican Fire. Based on the set of obtained results, it was concluded that PVY is the causal agent of the disease Mexican Fire in tomatoes.

Keywords: Tomato. Mexican Fire. Potato virus Y. PVY

1. INTRODUÇÃO

O tomate é a hortaliça de maior importância econômica no Brasil (IBGE, 2019) e a segunda com maior área plantada, cuja produção ultrapassa mais de quatro milhões de toneladas (FAO, 2017). O cultivo do tomateiro é complexo, com alta incidência de diversas doenças. Recentemente, destaca-se a ocorrência de uma doença caracterizada por necrose nas folhas medianas das plantas com incidência preocupante no Distrito Federal, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (Inoue-Nagata *et al.*, 2016). Acredita-se que essa doença, conhecida popularmente como "Fogo Mexicano", esteja associada com o potato virus Y (PVY).

A potyvirose em tomateiro apresentava altas incidências (Inoue-Nagata *et al.*, 2016), porém após os trabalhos de melhoramento desenvolvidas pelo Dr. Nagai e sua equipe (1992), a incidência de PVY diminuiu drasticamente. Os sintomas característicos de PVY em tomateiro são: mosaico, necrose de nervura e nanismo.

O PVY é um potyvírus que segundo Kaliciak & Syller (2009) infecta plantas da família Solanaceae como batata (*Solanum tuberosum*), pimenta e pimentão (*Capsicum* spp.), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e tomate (*Solanum lycopersicum*). Plantas daninhas do gênero *Physalis* também são hospedeiras e podem ser encontradas em lavouras. É transmitido experimentalmente por inoculação mecânica (De Bokx & Huttinga, 1981) e naturalmente por diversas espécies de afídeos, sendo o principal o *Myzus persicae* (Kennedy *et al.*, 1962). A transmissão do PVY pelos pulgões é classificada como de maneira não-circulativa não-persistente, cujas partículas não circulam e não replicam no corpo do vetor, estando restritas apenas ao estilete do inseto (Hull, 1994).

As partículas do PVY são monopartidas do tipo filamentosa e flexuosa, de simetria helicoidal não envelopada. O genoma é composto por uma única molécula de ssRNA, senso positivo com cerca de 9,7 kb de tamanho (ICTV, 2020). A característica principal é o genoma composto por uma extensa ORF que sintetiza uma polyproteína, que é clivada em várias proteínas multifuncionais, e uma ORF curta chamada de PIPO (Chung *et al.*, 2008). Possui extensa cauda poliadenilada na extremidade 3' e a proteína VPg na extremidade 5' (ViralZone, 2020).

Devido ao crescente número de relatos de plantas de tomate com sintoma de necrose foliar, sendo chamado popularmente de Fogo Mexicano, e a falta de informações sobre a sua etiologia, ocorrência e dispersão, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de identificar o agente causal da doença Fogo Mexicano, bem como entender o desenvolvimento da doença em condições de infecção natural e experimental.

2. MATERIAL & MÉTODOS

2.1 Monitoramento de Tomateiros ao Longo do Cultivo Quanto à Detecção de PVY e Aparecimento de Sintomas de Necrose Foliar

A área selecionada está localizada no Núcleo Rural Taquara, na região administrativa de Planaltina em Brasília, Distrito Federal. O produtor João Filho é o proprietário da área cuja localização em latitude e longitude é: -15.659358, -47.534959 (Figura 3). O tamanho da lavoura é de 345,44 x 158,23 m. Estavam implantadas diversas culturas, como abobrinha, pepino, couve-flor, repolho e tomateiro da cultivar Cariri. A área monitorada de tomateiro das cultivares BS12, Santy e Guará foi equivalente a 20.160 plantas.

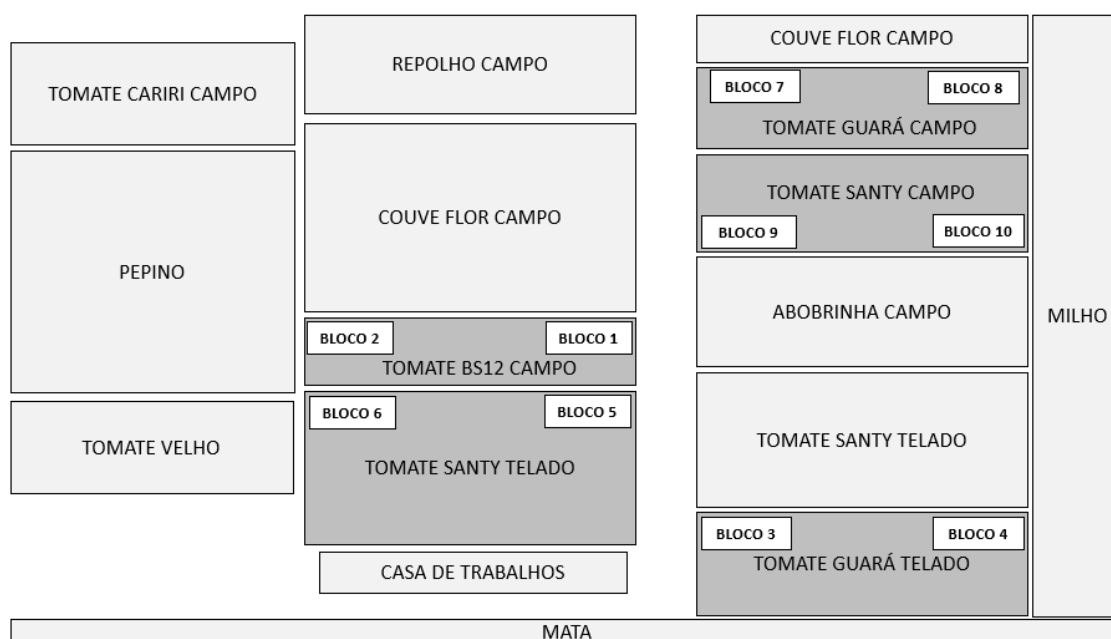
Figura 3. Localização da área experimental



Legenda: Vista aérea da lavoura monitorada em Taquara, DF. **Fonte:** Google Earth.

O monitoramento foi feito selecionando 25 plantas em 10 blocos (250 ao total). A demarcação dos blocos foi feita próxima às bordas, sempre iniciando da quinta linha, a partir da quinta planta. A demarcação dos blocos 1 a 6 (Figura 4) foi feita em 18/02/2019 em plantas transplantadas em 08/02/2019, sendo que as coletas foram iniciadas em 25/02/2019 em 12 avaliações semanais no total. Nos blocos 7 a 10, o transplântio foi realizado em 18/03/2019, sendo avaliados por 12 vezes. As avaliações nestes blocos foram iniciadas em 08/04/2019.

Figura 4. Croqui da área monitorada, localizada em Taquara, Distrito Federal.

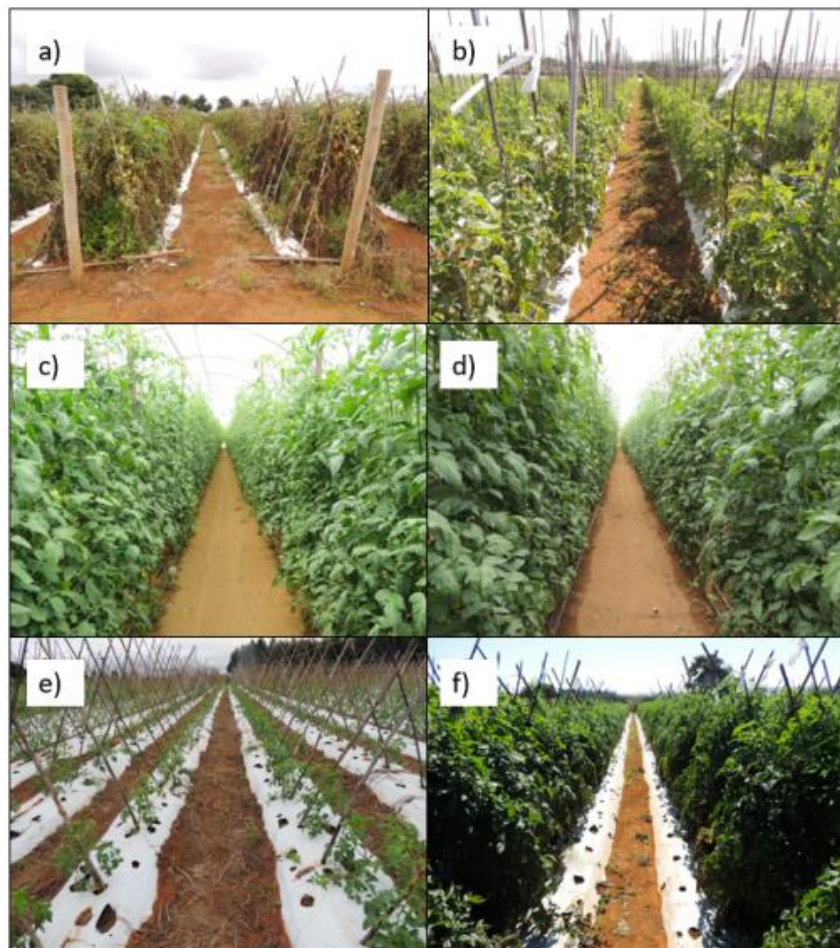


Fonte: A localização dos blocos avaliados está marcada em retângulos brancos: blocos 1 a 10.

No início da avaliação em 18 de fevereiro de 2019, a área selecionada possuía uma lavoura de tomateiro em fase final de colheita. Esta lavoura não foi monitorada. O plantio, nesta lavoura, foi feito em fileira dupla, com diversas plantas apresentando sintomas de manchas necróticas de provável origem bacteriana e de manchas necróticas de origem viral (Figura 5a). Plantas positivas em teste de detecção de PVY por Dot-ELISA foram observadas. Este plantio estava localizado próximo aos blocos 2 e 6. Os blocos 1 e 2 foram de tomateiro da cultivar BS12 (BlueSeeds) em campo aberto, linha simples (Figura 5b). Os blocos 3 e 4 foram da cultivar Guará (H.M. Clause) plantados com cobertura plástica superior em linha simples (Figura 5c). Já os blocos 5 e 6 foram

da cultivar Santy (Sakata Seeds) em estufa com cobertura plástica em fileira simples (Figura 5d). Os blocos 7 e 8 foram constituídos de mudas transplantadas em campo aberto, fileira dupla da cultivar Guará (Figura 5e). Por fim, os tomateiros dos blocos 9 e 10 pertencem a cultivar Santy, que foram plantados em campo aberto em fileira dupla (Figura 5f). Semanalmente as plantas foram avaliadas em relação à observação de sintomas de manchas necróticas nas folhas (Figura 6) suspeitas de infecção por PVY e folhas jovens foram coletadas de cada planta e submetidas ao teste de Dot-ELISA para antissoros contra *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), *Pepper mottle virus* (PMMoV) e PVY.

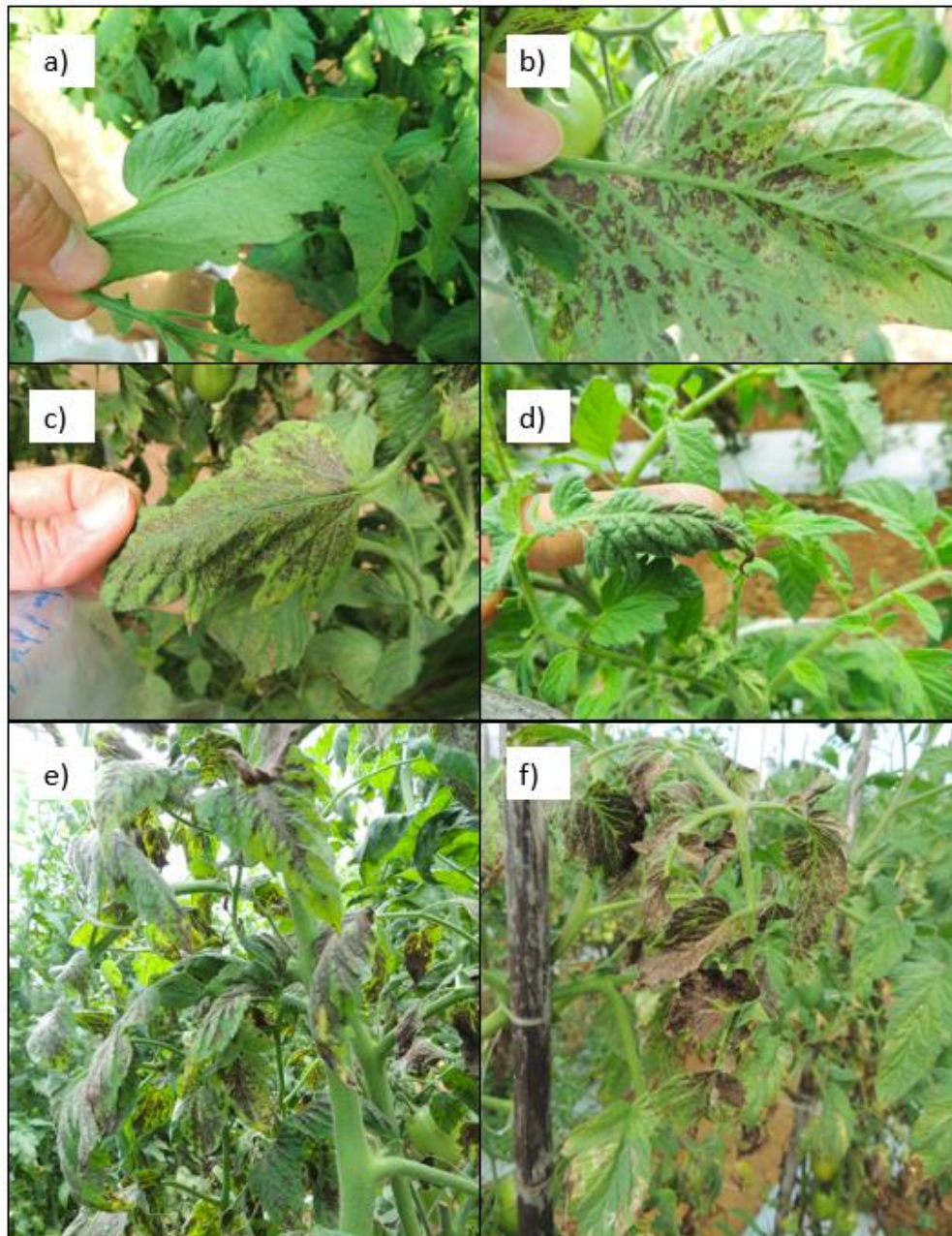
Figura 5. Exemplos de vista das áreas avaliadas nos blocos e fora dos blocos



Legenda: a) Tomateiro em fase final de colheita em área não avaliada; b) Foto representativa dos blocos 1 e 2 em campo da cultivar BS12; c) Foto representativa dos blocos 3 e 4 em telado da cultivar Guará; d) Foto representativa dos blocos 5 e 6 em

telado da cultivar Santy; e) Fotos representativas dos blocos 7 e 8 da cultivar Guará em campo; f) Foto representativa dos blocos 9 e 10 em campo da cultivar Santy.

Figura 6. Plantas de tomateiro apresentando sintomas de necrose atribuídos  doença “Fogo Mexicano”



Legenda: a) Sintoma inicial de pontos necróticos em folhas na face abaxial; b) Sintoma de manchas necróticas em coalescência na face abaxial; c) Necrose extensa na face adaxial; d) Enrolamento da folha para a face abaxial; e) Manchas necróticas generalizadas; f) Necrose avançada provocando seca das folhas.

2.2. Associação de Plantas com Sintoma de Necrose com a Infecção por PVY

Foram coletadas 138 plantas que apresentavam sintoma de necrose na face abaxial (e/ou adaxial) das folhas, típico do Fogo Mexicano, e 111 plantas sem sintoma (totalizando 249). As plantas foram coletadas aleatoriamente na área experimental, sendo fora dos blocos de monitoramento. Todas as plantas coletadas foram testadas por Dot-ELISA com o objetivo de associar o sintoma com a presença do PVY na planta.

2.3. Posição das Folhas Sintomáticas em Planta Infectada

Um total de 10 plantas da cultivar Guará e 11 plantas da cultivar Santy com folhas apresentando sintoma de necrose na parte abaxial foram selecionadas aleatoriamente a fim de analisar em quais folhas o sintoma era expressado, sem teste de detecção. A contagem foi realizada da folha mais nova para a folha mais velha. O objetivo deste teste foi avaliar se o sintoma era expresso apenas parte mediana da planta.

2.4. Avaliação da Distribuição de PVY no Tomateiro por Dot-ELISA

Com o intuito de verificar se em uma planta infectada por PVY é possível detectar o vírus em todas as folhas, foi realizado um teste de detecção de PVY em folhas destacadas de plantas com sintomas de necrose foliar. Foram selecionadas aleatoriamente três plantas da cultivar Santy que apresentavam sintoma de necrose na face abaxial das folhas. As folhas foram enumeradas dos ramos mais novos para os mais velhos e anotadas quais apresentavam sintomas, e, posteriormente, foi executado o teste Dot-ELISA de cada folha para determinar quais folhas apresentavam partículas virais de PVY.

2.5. Incidência de Plantas com Sintoma

Para a determinação da incidência de plantas sintomáticas na lavoura, todas as linhas da área foram examinadas e as plantas com sintoma foram marcadas, registrando a sua localização. Esta análise foi realizada em três avaliações nos blocos 1 a 6 (25/03, 08/04 e 22/04) e cinco avaliações nos blocos 7 a 10 (20/05, 03/06, 17/06, 01/07 e 15/07). Todas as plantas de tomateiro da área experimental foram avaliadas.

2.6. Avaliação da Produtividade

Para a avaliação do possível efeito na diminuição da produtividade causado pela infecção de plantas por PVY, 20 plantas da cultivar Santy e 22 plantas da cultivar Guará foram selecionadas na área e os frutos foram contados e pesados. Para o tomateiro Santy foram avaliadas 11 plantas com sintoma e 9 sem sintoma, enquanto para o tomate Guará foram 15 com sintoma e 7 sem sintoma. As amostras não foram submetidas ao teste de Dot-ELISA, e as plantas foram selecionadas na área experimental por infecção natural.

2.7. Seleção do isolado PVY-TOMNEC para Testes de Inoculação e Determinação da Sequência do Genoma por Sequenciamento de Alto Desempenho

Uma planta de tomateiro da cultivar Guará (Figura 7) com sintoma de necrose foliar na face abaxial foi coletada em 01/06/2019 na área selecionada localizada no Núcleo Rural Taquara (Distrito Federal) e avaliada por Dot-ELISA utilizando antissoros contra CMV, PepYMV, GRSV, TSWV, ToMV, PMMoV e PVY. Por sorologia, a infecção por PVY foi confirmada e para todos os outros antissoros testados o resultado foi negativo. O vírus foi identificado como PVY-TOMNEC.

Para determinar se a planta encontrava-se infectada com outro vírus de RNA, além do PVY, o RNA total foi sequenciado em plataforma Illumina. Primeiramente, a amostra foi submetida à extração de RNA total e avaliada para presença de PVY usando os primers universais para potyvirus descritos por Chen *et al* (2001), desenhados a partir da região consenso do gene NIb e incluindo parte da região codificadora da NIb, toda a capa proteica e toda a região não traduzida. A transcrição reversa foi feita a partir do iniciador M4T (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC (T) 15-3') com posterior PCR usando os primers degenerados Sprimer (5'-GGX AAY AAY AGY GGX CAZ CC-3'), e M4 (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'), cuja amplificação foi realizada em 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 47 °C e 2 minutos a 72 °C. O amplicon esperado é de 1,7 kbp.

Para determinação da sequência completa do genoma do isolado de PVY, o RNA total foi preparado para o sequenciamento pelo método next generation sequencing - NGS, realizada pela empresa MacroGen Inc. (Seoul, Coreia). A preparação

da biblioteca foi feita após remoção do RNA ribossomal de plantas com TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit. O sequenciamento foi realizado na Plataforma Illumina Novaseq, com a opção 100 bases com *paired-end*. Os *reads* foram trimados no Trimmomatic 0.35, Phred score automático para 0.34 (Bolger *et al.*, 2014). Os *contigs* foram montados pelo algoritmo Velvet versão 1.2.10 kmer (Zerbino & Birney, 2008). A análise dos *contigs* foi feita por megablast e tBLASTx no Geneious 9.1.8 com uma biblioteca RefSeq de vírus (*download* em 18/02/2019). Os *contigs* de interesse foram usados como referência para a montagem do genoma completo de PVY utilizando o mapeador Geneious (até 25 iterações). A sequência do genoma completo foi analisada pela ferramenta BLASTN para comparação com outras sequências do banco de dados (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Uma análise filogenética do genoma de PVY-TOMNEC foi realizada a partir de alinhamento de 32 sequências completas de isolados de PVY selecionadas do GenBank, de modo a obter isolados representativos das três estirpes de PVY (N, O e C). As análises evolutivas filogenéticas e moleculares foram conduzidas usando o MEGA versão X (Kumar, Stecher, Li, Knyaz e Tamura, 2018). A construção da árvore filogenética foi realizada pelo método de Maximum Likelihood, com dez mil repetições.

Figura 7. Visão da planta selecionada no campo para estudo genômico de PVY e usada como inóculo para avaliação da infecção em inoculação artificial



Legenda: a, b) Planta infectada por PVY-TOMNEC; c) Ilustração do procedimento de inoculação mecânica de plantas do campo com PVY-TOMNEC

2.8. Reprodução de Sintoma de Necrose em Plantas Artificialmente Inoculadas por PVY

Três ensaios foram realizados com o objetivo de reproduzir os sintomas de necrose em plantas inoculadas artificialmente com PVY. O primeiro ensaio foi conduzido em campo em Taquara. Plantas de Santy e Guará com 10 semanas após transplântio (emitindo a segunda inflorescência) foram selecionadas. Vinte e quatro plantas da cultivar Santy e Guará (totalizando 48 plantas) foram selecionadas e testadas por Dot-ELISA contra PVY, para garantir que as mesmas não estavam infectadas por PVY. Em seguida, as 24 plantas de cada cultivar foram divididas dois grupos de 12 plantas, cada grupo com plantas inoculadas mecanicamente com o isolado PVY-TOMNEC e inoculadas com tampão, como controle negativo. Em cada tratamento, as folhas mais jovens foram inoculadas duas vezes (Figura 7c), sendo a primeira em 20/05/2019 e a segunda em 27/05/2019. Avaliações de sintomas e Dot-ELISA foram realizadas 15 e 22 dias após a última inoculação (10/06 e 17/06 de 2019).

O segundo ensaio foi conduzido em telado e campo. Dez plantas das cultivares Santy e Guará foram utilizadas para cada tratamento, que consistiu de inoculao aos 15 dias e 30 dias após o transplantio, utilizando dois isolados virais: isolado 363 e PVY-TOMNEC. O isolado 363  um isolado de PVY obtido de tomateiro que apresentava sintoma de necrose das folhas jovens, tpico da doença fogo mexicano. O isolado foi inoculado em plantas de *Chenopodium amaranticolor* e isolado biologicamente a partir de três passagens de lesão local seguida inoculao em *Nicotiana tabacum* cv. TNN, para infeco sistmica e em seguida foi mantido congelado. Plantas indicadoras foram usadas em cada tratamento para confirmar a eficiência da inoculao. Plantas com aplicao de tampão de inoculao foram usadas como testemunhas do ensaio. Mudas de tomateiro foram transplantadas em vasos de 5 litros em telado com tela antiafdeo na Embrapa Hortaliças e, após a inoculao de cada um dos dois isolados (em 11/07/2019 e em 15/07/2019) e confirmao da infeco (testes em 19/07/2019 e 25/07/2019). Cinco plantas inoculadas com tampão em 15 dias após o transplantio (DAT) e cinco em 30 (DAT) foram levadas ao campo da cultivar Guará e o mesmo para Santy. Cinco plantas de Guará com 15 (DAT) e três plantas com 30 (DAT) inoculadas com PVY-TOMNEC também foram levadas ao campo. Cinco plantas de Santy com 15 (DAT) e duas com 30 (DAT) inoculadas com PVY-TOMNEC foram levadas ao campo. Para o isolado 363 da cultivar Guará cinco plantas inoculadas com 15 (DAT) e uma com 30 (DAT) foram levadas ao campo. Para Santy inoculadas com 363, cinco plantas inoculadas com 15 (DAT) e três plantas com 30 (DAT) foram levadas ao campo. O restante das plantas foram mantidas em telado. O transplantio em campo foi realizado em 01/08/2019. As plantas foram monitoradas semanalmente para avaliao do aparecimento de sintomas.

O terceiro ensaio foi realizado em telado, usando tomateiros da cultivar Santy e Guará. Mudas de Santy e Guará foram transplantadas em vasos de cinco litros e mantidas em casa de vegetao. Três idades de mudas foram avaliadas: 20 dias após a semeadura (DAS), 40 DAS e 60 DAS, com 20 plantas para cada idade, tratamento e cultivar, com duas repeties. As plantas foram inoculadas com o isolado PVY-TOMNEC, em três inoculaes no período de sete dias. Plantas com inoculao com tampão serviram de testemunha. Trinta dias após a última inoculao, cada planta foi avaliada por Dot-ELISA e a avaliao dos sintomas foi semanal.

3. RESULTADOS

3.1 Aparecimento de Sintomas de Necrose em Folhas de Tomateiro e Correlação com a Detecção de PVY

Uma lavoura de tomateiro consistindo de plantios com cobertura superior e em campo aberto foi monitorada quanto à ocorrência, distribuição e determinação do agente causal da doença Fogo Mexicano. Foi selecionado um produtor na área rural de Taquara, no norte do Distrito Federal. Esta é uma região importante do cinturão verde responsável pela produção de hortaliças para o mercado local e também para exportação para estados vizinhos. O local foi selecionado pelo histórico de ocorrência informado por produtores e técnicos de extensão (Emater) da região. Com previsão de plantio de tomateiro em tempos distintos ao longo de 7 meses, o produtor autorizou o trabalho de monitoramento da lavoura.

Blocos de monitoramento foram selecionados em duas etapas de plantio realizadas pelo produtor, consistindo de dez blocos com 25 plantas cada. O trabalho foi iniciado com seis blocos e posteriormente mais quatro blocos. Semanalmente as plantas foram avaliadas quanto ao aparecimento de sintomas de necrose foliar, típicos do fogo mexicano, amostras foram coletadas semanalmente e submetidas ao teste de detecção de vírus, incluindo PVY. Nas primeiras duas semanas nenhuma planta de 250 estava positiva para detecção de PVY. A primeira planta positiva foi detectada na terceira semana de avaliação, no bloco 4, localizada próxima à plantação de milho. Nesta planta, sintomas necróticos surgiram na face abaxial na quinta semana, i.e., após duas semanas da detecção do PVY por sorologia. Gradativamente, plantas com detecção positiva de PVY e posterior expressão de sintoma de necrose foram sendo observadas. No período de avaliação de 12 semanas, 30 plantas (12%) apresentavam sintomas e foram positivas para PVY (Tabela 1). O vírus foi detectado em outras 13 plantas, porém estas não apresentaram sintomas até a data da última avaliação, feitas até o dia 13/05/2019 na área 1 e até o dia 24/06/2019 na área 2, ambas com 12 semanas de avaliação. Todas as plantas com sintoma foram positivas para PVY. O bloco 6 apresentou o maior número de plantas infectadas com sintoma, com sete plantas, representando 23,3% de todas avaliadas (Tabela 1). Este bloco estava localizado ao lado de um plantio mais antigo de tomateiro, que foi eliminado após seis semanas do transplante das plantas (Figura 4). Os blocos 8 e 10, ao lado de plantação de milho, apresentaram cinco plantas

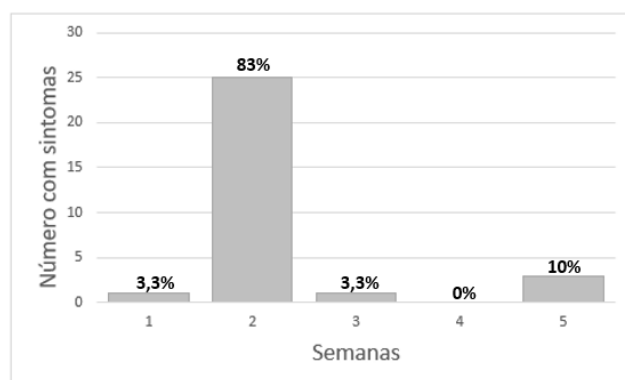
sintomáticas, seguidos dos blocos 4 e 9 com quatro plantas, sendo o bloco 4 ao lado do milho e o bloco 9 ao lado de repolho (Figura 4, Tabela 1). O único bloco em que nenhuma planta foi positiva e não apresentou sintoma foi o bloco 2, que consistia de plantas em cultivo aberto e ao lado de plantio de pepino (Figura 4). Os demais blocos apresentaram de uma a duas plantas com sintomas (Tabela 1). Esse resultado demonstrou que a incidência de PVY do sintoma de Fogo Mexicano foi variável e em geral baixa nesta lavoura. As plantas positivas para PVY com sintoma de necrose foram negativas em testes de Dot-ELISA para PMMoV, PepYMV, ToMV e GRSV.

Tabela 1. Plantas de tomateiro em cada bloco com expressão de sintoma de necrose e detecção de PVY

| Bloco | Nº de plantas | % |
|-------|---------------|------|
| 1 | 1 | 3,3 |
| 2 | 0 | 0 |
| 3 | 1 | 3,3 |
| 4 | 4 | 13,3 |
| 5 | 1 | 3,3 |
| 6 | 7 | 23,3 |
| 7 | 2 | 6,7 |
| 8 | 5 | 16,7 |
| 9 | 4 | 13,3 |
| 10 | 5 | 16,7 |
| Total | 30 | 100 |

O aparecimento de sintoma de necrose foi visualizado em plantas com detecção positiva de PVY uma semana depois em uma planta, em duas semanas para 25 plantas em três semanas para uma planta e em três plantas a expressão de sintomas foi observada após cinco semanas (Figura 8). Isso indicou que o sintoma de necrose está consistentemente associado à presença do PVY, i.e., indicando que o PVY deverá ser o agente causal do sintoma, e que para a maior parte das plantas, os sintomas podem ser observados após aproximadamente duas semanas da detecção do vírus.

Figura 8- Associação entre número de plantas com sintomas e número de semanas para a expressão de sintoma de necrose após a detecção de PVY.



3.2 Associação de Plantas com Sintoma de Necrose com a Infecção por PVY

Para confirmar a associação do sintoma de necrose com a infecção por PVY, no dia 15/04/2019 (67 dias após o transplante) foram coletadas folhas de 249 plantas da área experimental de Taquara, sendo 138 com sintoma de necrose (na face abaxial e adaxial) e 111 sem sintoma de necrose para a realização do teste de detecção de PVY. Das 138 plantas coletadas como sintomáticas, 129 foram positivas para PVY, correspondendo a 93,4%. As poucas plantas com sintoma que não foram positivas no teste de detecção podem estar relacionadas a outras doenças, como por exemplo o vira-cabeça do tomateiro e a mancha de estenfilio. A lavoura apresentava plantas infectadas pelo fungo *Stemphylium* spp., que também causa necrose em folhas de tomateiro, e também plantas com vira-cabeça. Já nas 111 plantas assintomáticas coletadas, apenas 16 ou 14,4% foram positivas para PVY, enquanto 95 foram negativas, correspondendo a 85,6% (Tabela 2). Esse resultado confirmou a associação entre a presença de PVY com a ocorrência de necrose nas folhas.

Tabela 2. Número de plantas coletadas com e sem sintoma de necrose e detecção de potato virus Y (PVY) por sorologia

| Sintoma | PVY + | PVY - | Total |
|-------------|-------|-------|-------|
| Com Necrose | 129 | 9 | 138 |
| Sem Necrose | 16 | 95 | 111 |

3.3. Posição de Folhas Sintomáticas em Plantas Infectadas

Considerando que a infecção por PVY causa sintoma de necrose e que essa necrose é normalmente observada apenas em folhas medianas, foi feita uma análise da posição das folhas com necrose em plantas sabidamente infectadas. Para este propósito, dez plantas da cultivar Guará e onze da cultivar Santy foram escolhidas aleatoriamente para análise. Para as duas cultivares, o sintoma foi observado da parte mediana da planta para os ramos mais novos (Tabela 3, 4). Os sintomas eram mais intensos nas folhas medianas do que nas folhas mais jovens. As 21 plantas avaliadas apresentaram sintomas da terceira folha verdadeira à décima oitava, em um total de 26 folhas analisadas por planta. Isso indicou que o sintoma de fogo mexicano é frequentemente mais observado

em folhas medianas, porém, também presentes em folhas jovens e não é observado em folhas maduras.

Tabela 3. Registro da folha de tomateiro da cultivar Santy com sintoma de necrose.

| Santy | Planta 1 | Planta 2 | Planta 3 | Planta 4 | Planta 5 | Planta 6 | Planta 7 | Planta 8 | Planta 9 | Planta 10 | Planta 11 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| Folha 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 3 | - | + | + | - | - | + | + | + | + | + | - |
| Folha 4 | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | - |
| Folha 5 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Folha 6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Folha 7 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Folha 8 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Folha 9 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Folha 10 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Folha 11 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Folha 12 | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Folha 13 | - | + | + | - | + | + | + | + | - | + | + |
| Folha 14 | - | + | + | - | + | - | + | + | - | + | + |
| Folha 15 | - | + | + | - | - | - | + | + | - | + | + |
| Folha 16 | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + |
| Folha 17 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + |
| Folha 18 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 19 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 20 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 21 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 22 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 23 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 24 | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 25 | X | X | - | - | X | - | - | - | X | - | - |
| Folha 26 | X | x | - | - | X | - | X | - | X | - | X |

Legenda: -: sem sintoma de necrose; +: com sintoma de necrose; X: sem a presença da
folha

Tabela 4. Registro da folha de tomateiro da cultivar Guará com sintoma de necrose

| Guará | Planta 1 | Planta 2 | Planta 3 | Planta 4 | Planta 5 | Planta 6 | Planta 7 | Planta 8 | Planta 9 | Planta 10 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Folha 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 3 | + | + | - | + | - | + | - | + | - | - |
| Folha 4 | + | + | + | + | - | + | - | + | + | - |
| Folha 5 | + | + | + | + | - | + | - | + | + | - |
| Folha 6 | + | + | + | + | - | + | - | + | + | + |
| Folha 7 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| Folha 8 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Folha 9 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Folha 10 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Folha 11 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Folha 12 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Folha 13 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Folha 14 | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + |
| Folha 15 | + | - | - | - | - | + | - | + | - | + |
| Folha 16 | + | - | - | - | - | + | - | + | - | + |
| Folha 17 | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Folha 18 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Folha 19 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 20 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 21 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 22 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 23 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 24 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 25 | - | X | X | - | - | - | - | - | - | - |
| Folha 26 | X | X | X | - | - | - | - | X | - | - |

Legenda: -: sem sintoma de necrose; +: com sintoma de necrose; X: sem a presença da folha

3.4. Distribuio de PVY em Folhas de Tomateiro por Dot-ELISA

Uma vez que foi observada o aparecimento de sintoma de necrose em folhas medianas em plantas infectadas, foi feita uma avaliao da distribuio de PVY ao longo das plantas infectadas a partir de teste sorológico. Uma seleo de três plantas da cultivar Santy foi feita de forma aleatória. Em seguida as folhas destacadas foram enumeradas do ramo mais novo ao ramo mais velho e também foram discriminadas as folhas com sintomas daquelas sem sintoma (Tabela 5). A planta 1 apresentava sintoma nas folhas: 6, 7, 8, 9, 12 e 13. Todavia a deteco de PVY foi positiva nas folhas: 2 a 9 e 12 a 16. Na segunda planta avaliada, as folhas enumeradas de 3 a 10 apresentavam sintomas (com exceo da 8), enquanto o vírus foi detectado nas folhas 1 a 10. A terceira planta apresentou sintomas nas folhas 5 a 12 e o vírus detectado nas folhas 1 a 13. Deste modo, os sintomas foram vistos a partir da 3a. folha verdadeira até a 13a. folha, enquanto a deteco do vírus foi possível nas folhas jovens até a 16a folha. Isso

indica que o vírus não estava presente e o sintoma de necrose não foi observado em folhas mais velhas, mas em folhas novas, o vírus poderá ser detectável por sorologia mesmo em folhas não sintomáticas.

Tabela 5. Análise de expressão de sintoma de necrose e detecção de PVY em folhas de planta infectada.

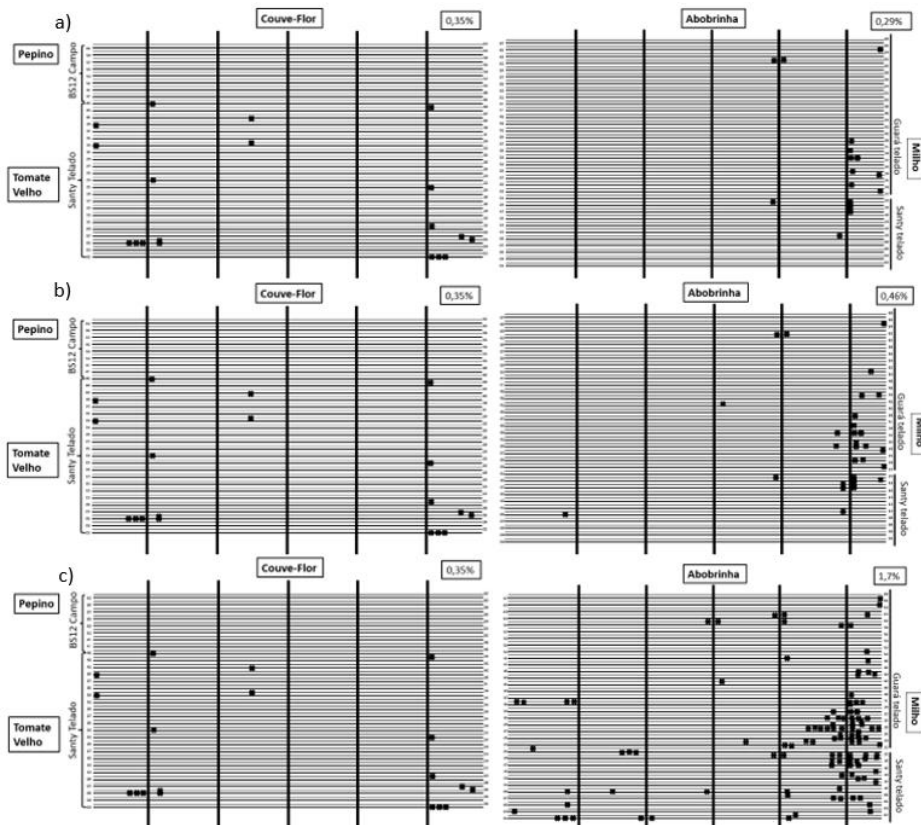
| Santy Planta 1 | Sintoma | ELISA | Santy Planta 2 | Sintoma | ELISA | Santy Planta 3 | Sintoma | ELISA |
|----------------|-----------|-----------|----------------|---------|-------|----------------|---------|-------|
| Folha 1 | - | - | Folha 1 | - | + | Folha 1 | - | + |
| Folha 2 | - | + | Folha 2 | - | + | Folha 2 | - | + |
| Folha 3 | - | + | Folha 3 | + | + | Folha 3 | - | + |
| Folha 4 | - | + | Folha 4 | + | + | Folha 4 | - | + |
| Folha 5 | - | + | Folha 5 | + | + | Folha 5 | + | + |
| Folha 6 | + | + | Folha 6 | + | + | Folha 6 | + | + |
| Folha 7 | + | + | Folha 7 | + | + | Folha 7 | + | + |
| Folha 8 | + | + | Folha 8 | - | + | Folha 8 | + | + |
| Folha 9 | + | + | Folha 9 | + | + | Folha 9 | + | + |
| Folha 10 | - | - | Folha 10 | + | + | Folha 10 | + | + |
| Folha 11 | - | - | Folha 11 | - | - | Folha 11 | + | + |
| Folha 12 | + | + | Folha 12 | - | - | Folha 12 | + | + |
| Folha 13 | + | + | Folha 13 | - | - | Folha 13 | - | + |
| Folha 14 | - | + | Folha 14 | - | - | Folha 14 | - | - |
| Folha 15 | - | + | Folha 15 | - | - | Folha 15 | - | - |
| Folha 16 | - | + | Folha 16 | - | - | Folha 16 | - | - |
| Folha 17 | - | - | Folha 17 | - | - | Folha 17 | - | - |
| Folha 18 | Eliminada | Eliminada | | | | Folha 18 | - | - |
| Folha 19 | Eliminada | Eliminada | | | | | | |
| Folha 20 | Eliminada | Eliminada | | | | | | |
| Folha 21 | Eliminada | Eliminada | | | | | | |

3.5. Avaliação da Distribuição e Avanço da Doença na Lavoura

Com o propósito de avaliar o número de plantas doentes e a distribuição e o progresso da doença em toda a área, os dois plantios de tomateiro foram monitorados. A área 1 incluía tomateiros das cultivares Santy e Guará plantados sob cobertura e também tomateiro plantado em campo aberto da cultivar BS12, sendo realizadas três avaliações do aparecimento de sintomas de necrose foliar em 25/03/2019, 08/04/2019 e 22/04/2019 e a posição de cada planta com sintoma registrada em um croqui da área (Figura 9). A primeira área era formada por uma média de 84 plantas por linha e 68 linhas (totalizando 5.712 plantas). Na primeira avaliação (Figura 9a) apenas 0,29% das plantas apresentavam sintomas, com distribuição aleatória. Na segunda (Figura 9b) e terceira (Figura 9c) avaliações, houve um ligeiro aumento de incidência para 0,4% e 1,7%, respectivamente. A maior incidência de plantas com sintoma foi observada em área próxima às bordas da lavoura e ao lado da plantação de milho. Houve uma tendência de

ocorrência de plantas infectadas em reboleiras, porém algumas infecções isoladas também foram observadas.

Figura 9. Incidência de plantas com sintoma de necrose na área 1 com três avaliações.

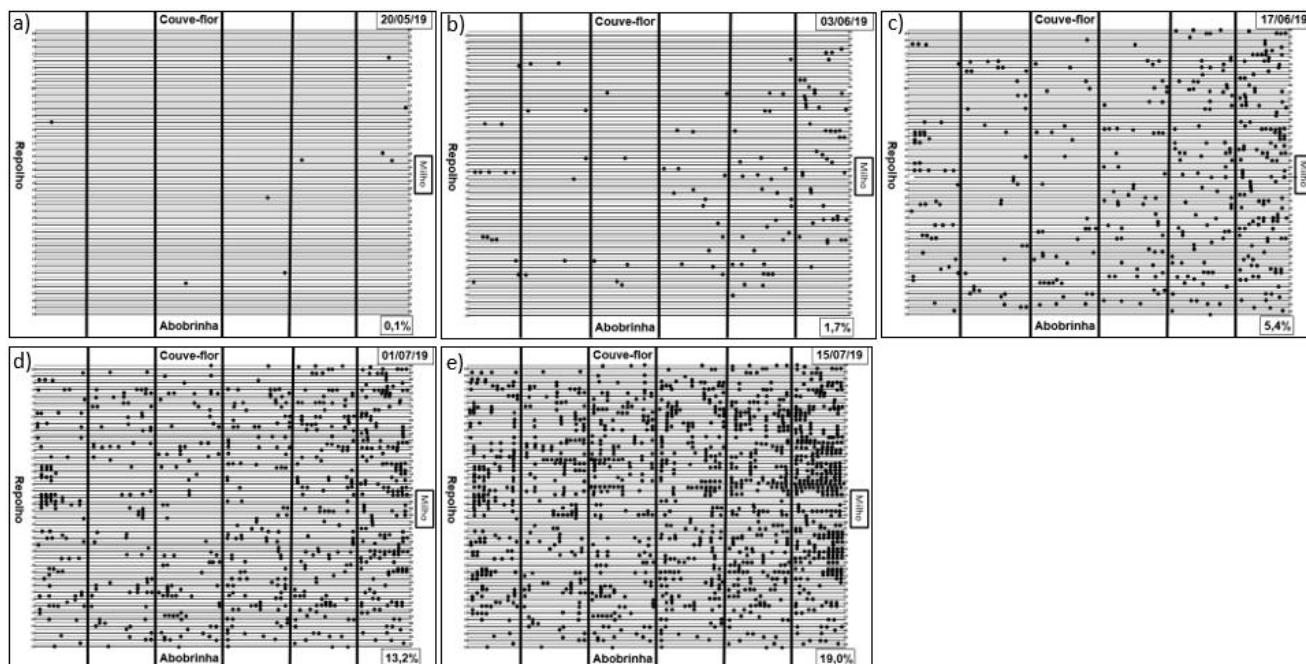


Legenda: Os pontos representam plantas com sintomas e sua posição nas linhas de cultivo.

A área 2 incluía tomateiros da cultivar Guará e Santy plantados em campo aberto (Figura 10), que foram submetidas a cinco avaliações: 20/05, 03/06, 17/06, 01/07 e 15/07/2019. Esta segunda área havia uma média de 86 plantas com 84 linhas (totalizando 14.448 plantas). Na primeira avaliação (Figura 10a), havia 0,1% de plantas com sintoma de necrose distribuídas em toda a área. Na segunda avaliação (Figura 10b), o número de plantas com sintomas aumentou para 1,7%, com tendência de concentração na borda mais perto de lavoura de milho. Na terceira (Figura 10c), as plantas com sintoma estavam mais agregadas e com maior incidência nas bordas da lavoura, com 5,4% de plantas com sintoma. Nas próximas (4a. e 5a.) avaliações, a incidência elevou-se de forma destacada para 13,2% e 19%, respectivamente (Figura 10d, 10e). As plantas

com sintomas estavam distribuídas ao longo de toda a lavoura, mas mais abundantes na borda perto da lavoura de milho.

Figura 10. Incidência de plantas com sintoma de necrose na área 2 com cinco avaliações



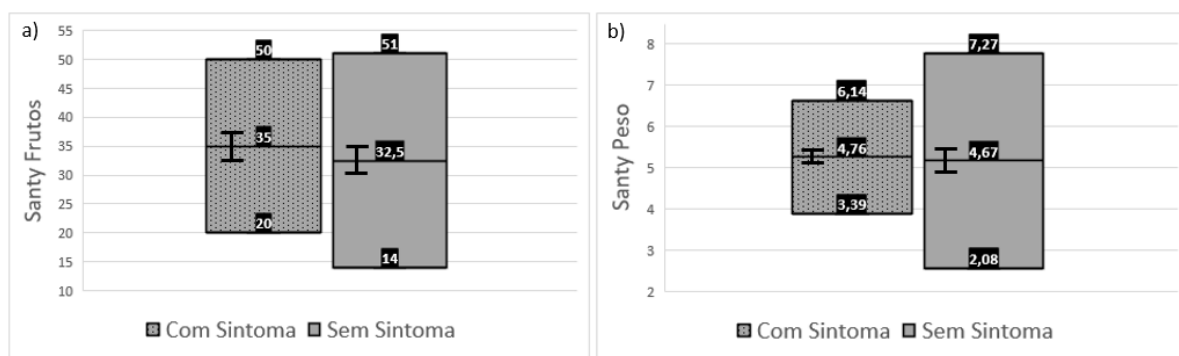
Legenda: Os pontos representam plantas com sintomas e sua posição nas linhas de cultivo.

3.6. Efeito da Infecção por PVY na Produtividade do Tomateiro

A fim de avaliar se a infecção causada por PVY provoca diminuição de produtividade, 20 plantas da cultivar Santy (sendo 11 com sintoma de necrose e 9 sem sintoma) e 22 (sendo 15 com sintoma e 9 sem sintoma) plantas da cultivar Guará foram selecionadas dentro da lavoura da área 1, apenas por infeco natural. Os frutos foram colhidos, contados e pesados. O número médio de frutos oriundos de plantas com sintoma da cultivar Santy foi de 35, enquanto o máximo e o mínimo foram de 50 e 20, respectivamente (Figura 11a). Já a média do número de frutos das plantas sem sintomas foi de 32,5, enquanto o máximo e o mínimo foram de 51 e 14, respectivamente (Figura 11a). O peso médio dos frutos da cultivar Santy das plantas com sintoma foi de 4,76, enquanto o máximo e o mínimo foram de 6,14 e 3,39 respectivamente (Figura 11b). Já o peso médio das plantas sem sintoma da cultivar Santy foi de 4,67, enquanto os pesos

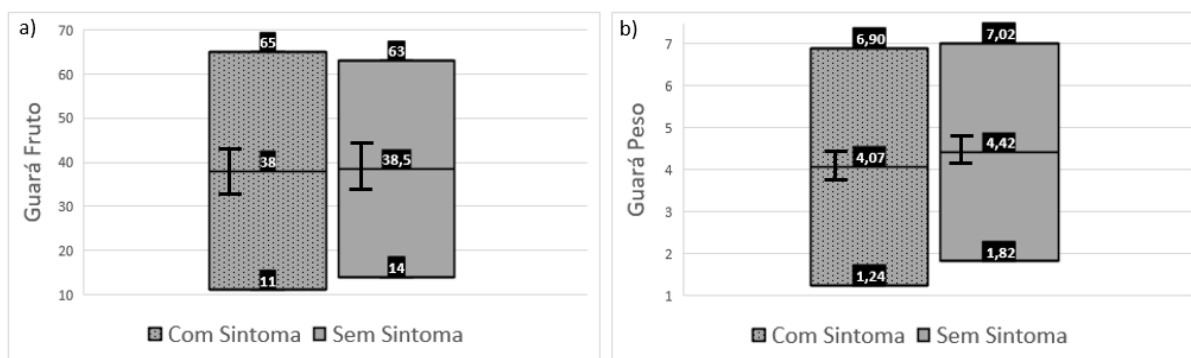
máximo e mínimo foram de 7,27 e 2,08 respectivamente (Figura 11b). Esses resultados sugeriram que não houve uma clara diferença na produtividade de plantas infectadas e não infectadas por PVY.

Figura 11. Produtividade pelo número de frutos e peso da cv. Santy em plantas com e sem sintoma de necrose



O número médio de frutos oriundos de plantas com sintoma da cultivar Guará foi de 38 frutos, com máximo e mínimo de 65 e 11 frutos respectivamente (Figura 12a). Todavia a média do número de frutos de plantas sem sintomas da cultivar Guará foi de 38,5, enquanto o máximo e o mínimo foram de 63 e 14, respectivamente (Figura 12a). O peso médio dos frutos da cultivar Guará com sintoma foi de 4,07, enquanto o máximo e o mínimo foram de 6,90 e 1,24 respectivamente (Figura 12b). Entretanto o peso médio das plantas sem sintoma da cultivar Guará foi de 4,42, enquanto o máximo e o mínimo foram de 7,02 e 1,82, respectivamente (Figura 12b). Assim como foi observado para a cultivar Santy, na cultivar Guará não houve um claro efeito da doença na produtividade de tomateiro.

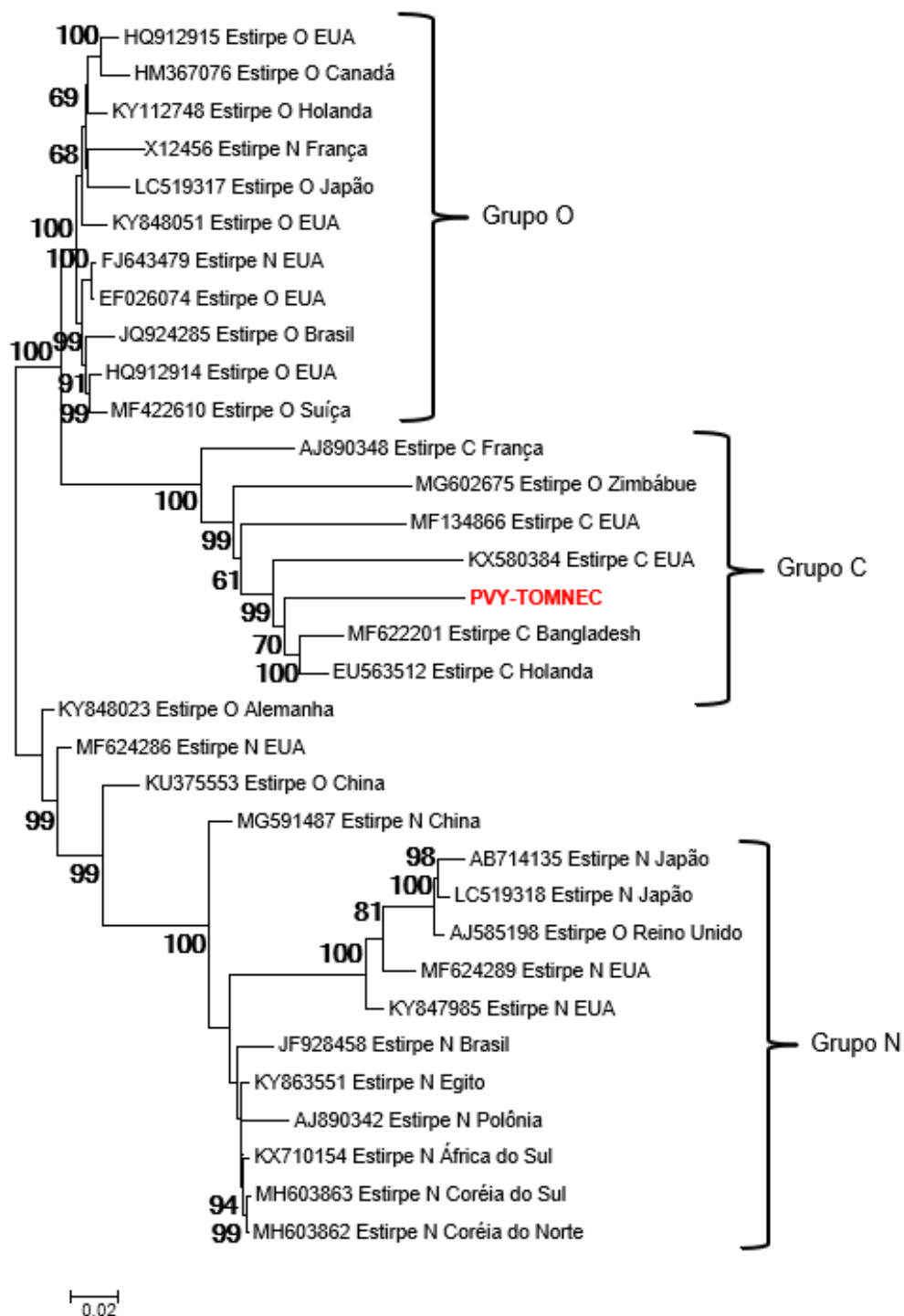
Figura 12. Produtividade pelo número de frutos e peso cv. Guará em plantas com e sem necrose



3.7 Caracterização e Filogenia do Isolado PVY-TOMNEC

Um isolado de PVY da lavoura foi selecionado para caracterização. Uma planta da cultivar Guará com sintoma claro de necrose e característico de fogo mexicano foi escolhido e o vírus isolado foi denominado de PVY-TOMNEC. O teste de detecção por RT-PCR mostrou que a planta estava infectada por um potyvírus e optou-se por determinar a sequência completa do genoma por NGS e verificar se haveria RNA de outro vírus presente na amostra. Somente *reads* correspondentes ao genoma de PVY foram encontrados, confirmando que apenas PVY estava presente na planta. Foi feito o sequenciamento do genoma completo por NGS e a sequência final comparada com os demais isolados de PVY. A sequência do genoma de PVY-TOMNEC apresentou 9689 nucleotídeos, faltando alguns nucleotídeos da extremidade 5'. A sequência compartilha 91,5% de identidade com o PVY estirpe C isolado PRI-509 (EU563512, 100% de cobertura e EValue de 0,0). Foi realizada uma análise filogenética utilizando 32 sequências completas de isolados de PVY provenientes de batateira do banco de dados selecionadas aleatoriamente, incluindo isolados das três estirpes (O, N e C) e não recombinantes. A árvore filogenética apresenta três agrupamentos: o primeiro com predominância das sequências da estirpe O, o segundo com a maioria das estirpes C e o terceiro com a maioria das estirpes N. O isolado PVY-TOMNEC agrupou-se com as sequências de isolados da estirpe C (Figura 13) em 100% das repetições. Esse resultado sugeriu que o isolado TOMNEC de tomateiro apresenta um ancestral comum aos isolados da estirpe C. Quanto à região geográfica, não foi possível agrupar as sequências.

Figura 13. Árvore filogenética do isolado PVY-TOMNEC com outros isolados de PVY do mundo



Legenda: A árvore filogenética foi montada pelo programa Mega versão X, a partir do alinhamento de 32 sequências completas selecionadas aleatoriamente do GenBank, de modo que houvesse número representativos das estirpes O, N e C. A construção foi

realizada pelo método Maximum Likelihood, com dez mil repetições. Os números de bootstrap menores que 59 foram eliminados.

3.8. Indução do Sintoma de Necrose a partir da Infecção por PVY

Com o objetivo de comprovar que a infecção de PVY induz sintoma de necrose em plantas infectadas, plantas de tomateiro sadias foram inoculadas com PVY e o aparecimento de sintomas foi monitorado em três ensaios. O primeiro ensaio foi conduzido em campo na área de produção do produtor. Foram selecionadas 24 plantas de cada cultivar (Guará e Santy) na lavoura. Ao total, 12 inoculadas com tampão e 12 inoculadas com o isolado PVY-TOMNEC. Nenhuma das plantas inoculadas com tampão de ambas as cultivares foram positivas no teste Dot-ELISA nem apresentaram sintomas de necrose foliar. Entre as plantas da cultivar Santy inoculadas, 12 foram positivas no Dot-ELISA e 10 apresentaram sintomas de necrose foliar. Para as plantas da cultivar Guará inoculadas, 10 apresentaram sintoma e as 10 estavam positivas no Dot-ELISA (Tabela 6). Esse resultado indicou que em condições de campo e em plantas maduras, há infecção por PVY por inoculação mecânica, seguido de aparecimento de sintoma de necrose foliar (Figura 13).

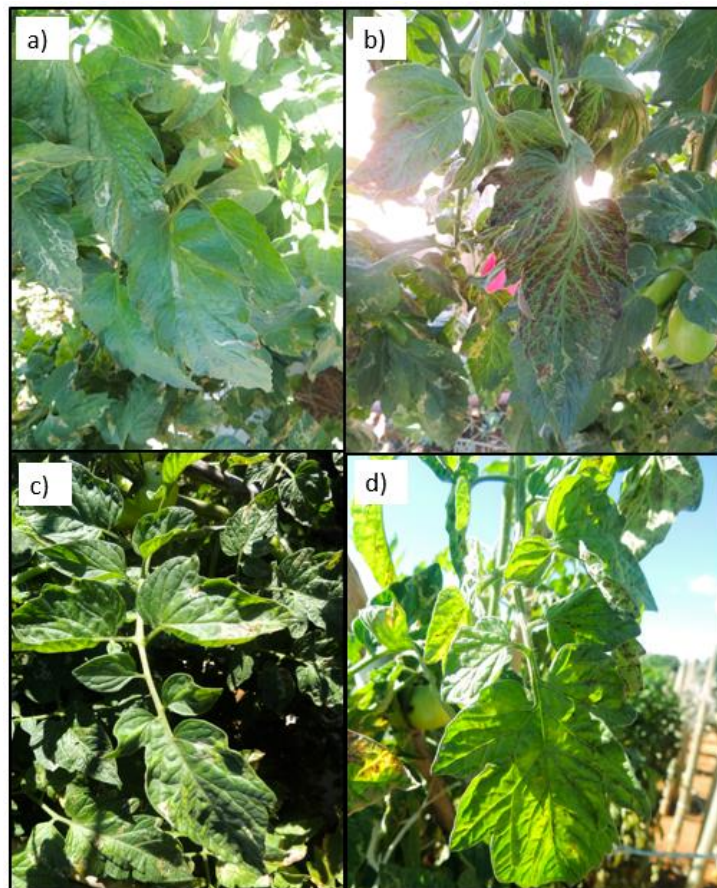
Tabela 6. Número de plantas com detecção positiva para PVY e com sintoma de necrose após inoculação com PVY-TOMNEC em tomateiro no campo

| Santy | ELISA | Sintoma | Total |
|-------------------|--------------|----------------|--------------|
| PVY-TOMNEC | 12 | 10 | 12 |
| Tampão | 0 | 0 | 12 |
| Guará | ELISA | Sintoma | Total |
| PVY-TOMNEC | 10 | 10 | 12 |
| Tampão | 0 | 0 | 12 |

O segundo ensaio consistiu de inoculação de tomateiro em condições de telado. Dez plantas das cultivares Santy e Guará foram utilizadas para cada tratamento, que consistiu de duas datas de inoculação, 15 dias e 30 dias após o transplante, e dois isolados virais PVY-TOMNEC e 363. Plantas com aplicação de tampão de inoculação foram testemunhas do ensaio. Mudas foram transplantadas em vasos e mantidas em telado e, após a inoculação e confirmação da infecção, metade das plantas infectadas foi transferida para área de produção em condições de campo. A hipótese é que haveria

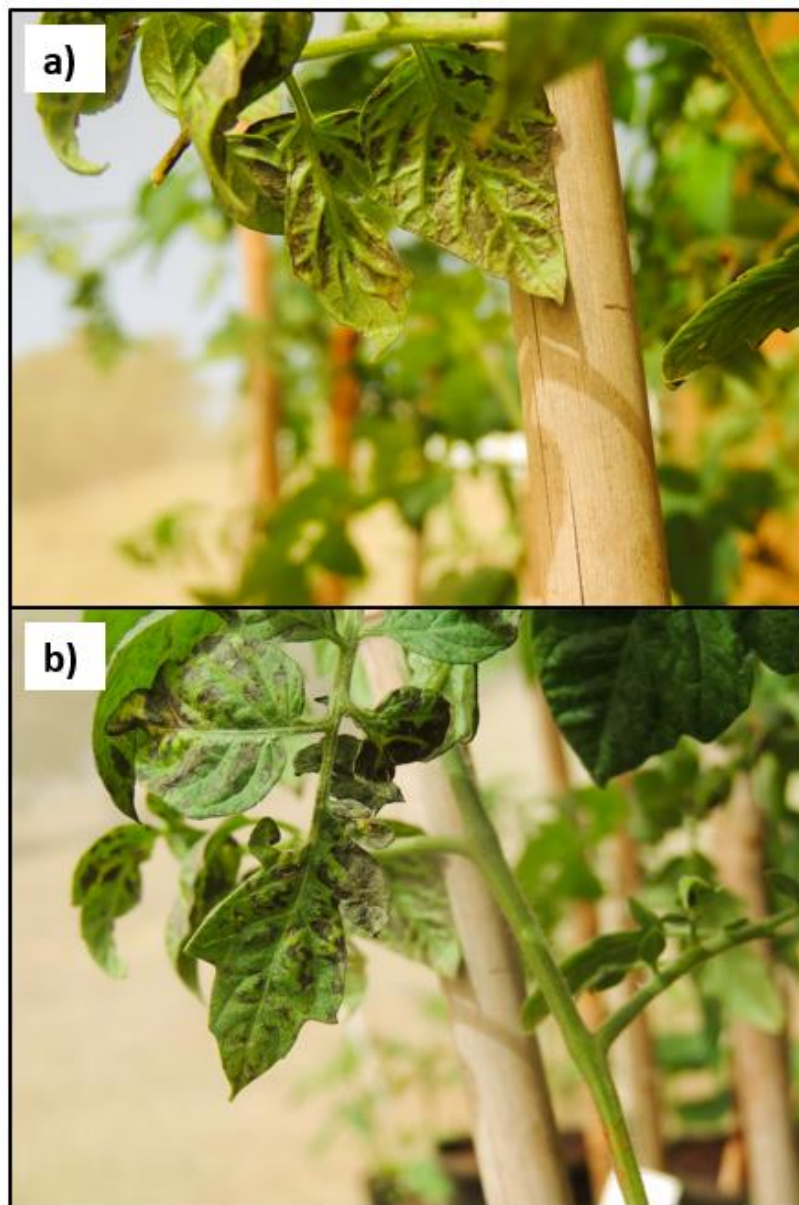
restrição da expressão de sintomas no telado por alguma causa desconhecida. Dentre as 13 plantas infectadas com PVY-TOMNEC da cultivar Santy que ficaram em telado, 6 plantas apresentaram sintomas. Dentre as 12 plantas que ficaram em telado inoculadas com PVY-TOMNEC da cultivar Guará, 8 apresentaram sintomas. Para o isolado 363 da cultivar Santy, entre as 12 plantas infectadas que permaneceram em telado, 10 apresentaram sintomas do Fogo Mexicano. Para as plantas inoculadas com o isolado 363 da cultivar Guará, 14 que permaneceram em telado, 9 apresentaram sintomas. Apenas as plantas que ficaram em telado apresentaram sintomas, as transportadas ao campo não apresentaram necrose foliar.

Figura 13. Plantas de tomateiro inoculadas em campo das cultivares Guará e Santy



Legenda: a) cv. Guará inoculada com tampão sem sintoma; b) cv. Guará inoculada com PVY-TOMNEC com sintoma; c) cv. Santy inoculada com tampão sem sintoma; d) cv. Santy inoculada com PVY-TOMNEC com sintoma.

Figura 14. Plantas com sintoma de necrose induzidos após inoculação mecânica dos isolados PVY-TOMNEC e 363



Legenda: a) Planta com sintoma de necrose inoculada com o isolado PVY-TOMNEC; b) Planta com sintoma de necrose inoculada com o isolado 363.

O terceiro ensaio foi realizado apenas em telado usando as cultivares Santy e Guará. O ensaio foi delineado com plantas de três idades: 20, 40 e 60 dias após o semeio (DAS), para cada cultivar (Santy e Guará). Vinte plantas de cada tratamento

foram inoculadas com PVY-TOMNEC, com três inoculações no período de sete dias. Plantas inoculadas com tampão serviram de testemunha.

Figura 15. Detecção de PVY e expressão de sintoma de necrose em plantas inoculadas aos 20, 40 e 60 dias após o transplanto da cultivar Santy

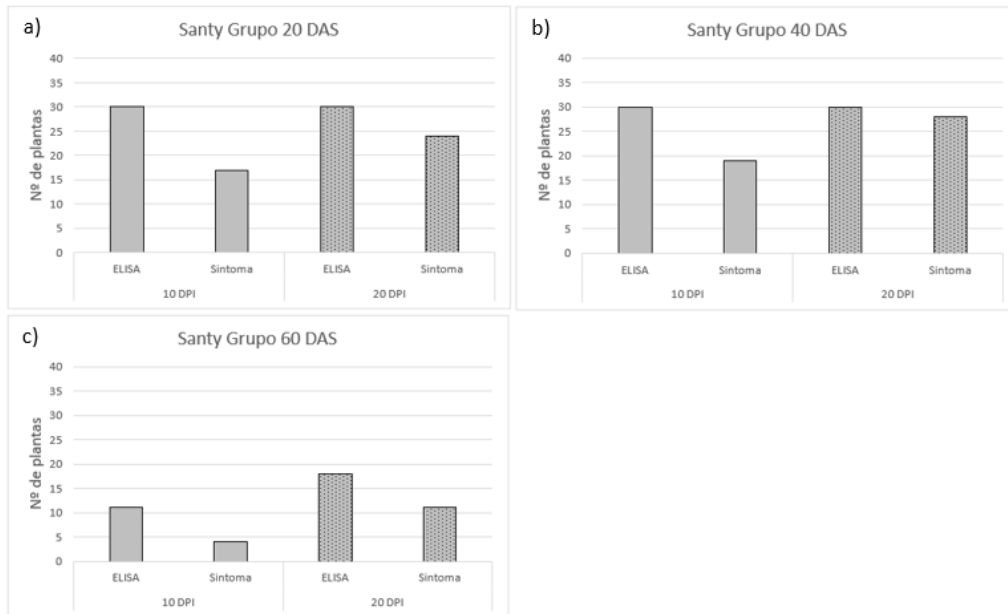
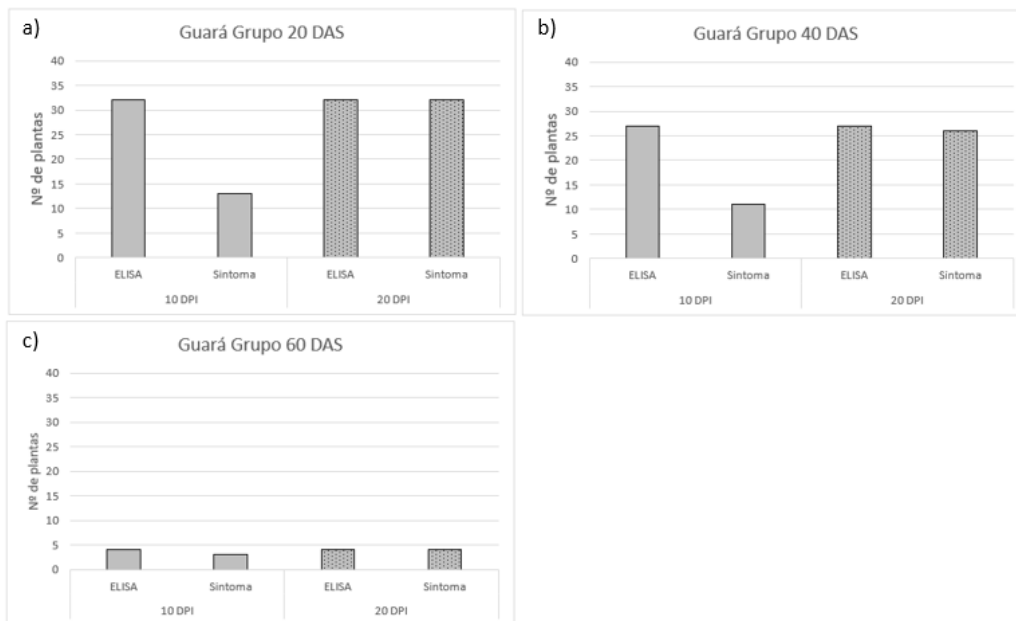


Figura 16. Detecção de PVY e expressão de sintoma de necrose em plantas inoculadas aos 20, 40 e 60 dias após o transplanto da cultivar Guar4



Duas avaliações foram realizadas, aos 10 e 20 dias após a inoculação (DPI) (Figura 15) Na cultivar Santy, em plantas inoculadas aos 20 dias pós-semeio, aos 10 DPI, 30 plantas infectadas por PVY foram observadas, sendo que 8 plantas apresentavam sintoma de necrose (Figura 15a). Aos 20 DPI, o número de plantas infectadas não aumentou, mas todas as plantas infectadas apresentavam sintoma de necrose (Figura 15a). Em plantas inoculadas aos 40 dias pós-semeio, o resultado foi semelhante e todas as plantas infectadas apresentaram sintomas após 20 dias (Figura 15b). Em plantas inoculadas aos 60 dias, a taxa de infecção foi mais baixa e nem todas as plantas infectadas apresentaram sintoma de necrose após 20 dias (Figura 15c). O resultado da inoculação na cultivar Guará foi essencialmente semelhante (Figura 16d, 16e, 16e). Esse resultado demonstrou que há uma associação entre a infecção por PVY e expressão de sintoma de necrose, a taxa de infecção é mais baixa em plantas mais maduras e que o aparecimento de necrose é variável, podendo ser normalmente observada até 20 dias após a infecção.

4. DISCUSSÃO

A primeira planta em que o vírus PVY foi detectado nas plantas sob monitoramento foi observada aos 31 dias após o transplântio e a mesma apresentou sintoma com 45 dias após o transplântio. Isso sugere que nesta área a infecção por PVY ocorreu de forma tardia. Nas primeiras semanas do plantio, pulgões não foram observados nas plantas, apesar de pulgões alados serem capturados em armadilhas amarelas colocadas ao longo da lavoura (dados não mostrados), confirmando que os vetores de PVY estão presentes na lavoura. O número de plantas infectadas que apresentaram sintomas na primeira área avaliada foi baixo. A maior frequência de plantas sintomáticas foi no bloco 6. Especula-se que a taxa de infecção foi maior nesta área por essas plantas estarem localizadas próximas à área de tomateiro velho com plantas infectadas por PVY. As plantas estavam ainda em fase de colheita e pulverizações com inseticidas não estavam sendo realizadas. Esse resultado ilustra a importância em estabelecer a lavoura em áreas livres de plantas infectadas.

Após a planta estar infectada por PVY, em condições de campo, o sintoma de necrose foi observado entre uma e cinco semanas. Os sintomas foram observados primeiramente na parte mediana das plantas e progredem para os ramos superiores. A

detecção das partículas virais só é feita das folhas medianas e ramos mais jovens, sendo que em folhas mais velhas não há detecção nem observação de sintomas. Isso sugere que o vírus tem dificuldade de se mover para folhas mais velhas na planta, tanto em plantas infectadas naturalmente, quanto em plantas inoculadas mecanicamente.

Os sintomas causados pela infecção por PVY foram: pontos necróticos na face abaxial das folhas que coalescem em manchas necróticas nos folíolos, tanto na face abaxial quanto na face adaxial. Há também o enrolamento dos folíolos para a face abaxial. Algumas plantas apresentaram clorose. A partir da consistente associação entre o sintoma de necrose nas folhas e o teste de detecção de PVY (Tabela 5, com índice de 93,4%), concluiu-se que a doença Fogo Mexicano, tipicamente caracterizado por manchas necróticas, deve ter como agente causal o PVY. A demonstração foi possível com uma série de testes de inoculação artificial de PVY (dois isolados) em condições de campo e de telado. Acredita-se que a dificuldade de se induzir a necrose em plantas inoculadas artificialmente em telado se deva ao uso generalizado da cultivar Santa Clara para esta finalidade na Embrapa Hortaliças. A cultivar Santa Clara é infectada quando inoculada com PVY, porém não expressa sintoma de necrose (dados não mostrados). As cultivares Santy, Guará e BS12 mostraram-se altamente suscetíveis à infecção por PVY e ao aparecimento de necrose.

A análise da distribuição e o avanço da doença nas áreas demonstrou que a incidência de plantas infectadas foi maior na segunda área do que na primeira. Isso pode sugerir que a primeira área serviu de fonte de inóculo de PVY para a segunda área. Como colônias de pulgões ápteros não foram observados em tomateiros, espera-se que os pulgões estavam se multiplicando em plantas hospedeiras presentes próximas às lavouras, por exemplo na lavoura de milho e em plantas daninhas. Nas avaliações, houve um maior número de plantas infectadas próximas à plantação de milho. É possível que os pulgões estavam na plantação de milho e eventualmente se alimentavam em tomateiro infectado e em tomateiro sadio. Nas visitas semanais, um maior número de pulgões alados foi observado na área 2 (dados não mostrados).

Apesar de provocar sintoma necrótico em tomateiro, o isolado PVY-TOMNEC apresentou maior proximidade filogenética com as sequências da estirpe C, que segundo De Bokx & Huttinga (1981) induzem lesões locais em folhas de batateira. Isso gerou

uma dúvida se todos os isolados de PVY causando Fogo Mexicano são isolados da estirpe C. Essa questão precisa ser investigada no futuro, com o sequenciamento e análise filogenética de vários isolados com sintoma de Fogo Mexicano e isolados que causam apenas mosaico em tomateiro.

Não foi possível demonstrar que a infecção por PVY reduz a produtividade de tomateiro. Segundo observações pessoais da equipe do laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Embrapa Hortaliças e relatos de produtores, as perdas causadas pelo Fogo Mexicano podem ser altas. Neste caso, acredita-se que a infecção foi tardia e assim não causou perdas significativas. Como a avaliação foi realizada em plantas naturalmente infectadas na área onde a taxa de infecção foi baixa e tardia, a avaliação não foi adequada. É necessário repetir esta avaliação em inoculações artificiais e realizadas em diferentes tempos após o transplante.

Apesar da importância do vírus, não se sabe se os isolados de PVY de batateira podem infectar tomateiro e pimenteira ou vice-versa. É possível que a batateira esteja atuando como fonte de inóculo de PVY para as outras duas solanáceas.

5. CONCLUSÕES

A doença conhecida como Fogo Mexicano é causada por PVY, deduzida a partir dos dados de associação de necrose com a detecção sorológica de PVY e pela indução de sintomas de necrose por inoculação artificial em plantas sadias.

O sintoma de necrose em plantas infectadas por PVY pode ser observado após uma a cinco semanas, primeiramente na parte mediana da planta e progredindo para os ramos mais jovens.

Os sintomas de pontos necróticos na face abaxial das folhas que coalescem em manchas necróticas nos folíolos, tanto na face abaxial quanto na face adaxial, enrolamento dos folíolos para a face abaxial e clorose da planta são característicos da doença Fogo Mexicano.

O PVY foi detectado nas partes jovens e medianas da planta infectada, mas não são detectadas em folhas mais velhas e assintomáticas.

A maior incidência de tomateiros infectados por PVY foi próxima à plantação de milho e ao tomate em fase de colheita, demonstrando a importância de eliminar cultivos antigos antes de conduzir plantios novos e evitar plantios próximos a hospedeiros de pulgões.

As cultivares de tomate sabidamente suscetíveis que apresentam sintomas de necrose são: Guará (H.M Clause), Santy (Sakata Seeds) e BS12 (BlueSeeds). A cultivar Santa Clara é infectada, porém não se observa o sintoma de necrose.

O isolado de PVY identificado na lavoura de Taquara agrupou-se com isolados classificados como estirpe C de batateira.

LITERATURA CITADA

BOLGER, A. M., LOHSE, M., & USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170, 2014. CHUNG, B. Y.; MILLER, W. A.; ATKINS, J. F; FIRTH, A. E. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc Natl Acad Sci*, v. 105, p. 5897-5902, 2008.

DE BOKX, J. A., & HUTTINGA, H. Potato Virus Y. *Descriptions of Plant Viruses*, No. 242. Online publication. Commonwealth Mycological Institute/ Association of Applied Biologists, Kew, Surrey, England. www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=242, 1981.

CHEN, J.; ADAMS, M. J. A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of virology*, v. 146, n. 4, p. 757-766, 2001.

CHUNG, B. Y.; MILLER, W. A; ATKINS, J. F; FIRTH, A. E. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc Natl Acad Sci*, v. 105, p. 5897-5902, 2008.

HULL, R. Molecular biology of plant virus-vector interactions. In: *Advances in Disease Vector Research*. Springer, New York, NY. p. 361-386, 1994.

INOUE-NAGATA, A. K. *et al.* Manual de Fitopatologia. Volume 2. Doenças das Plantas Cultivadas. Minas Gerais. Editora Ceres. 2016.

KALICIAK, Agnieszka; SYLLER, Jerzy. New hosts of Potato virus Y (PVY) among common wild plants in Europe. *European journal of plant pathology*, v. 124, n. 4, p. 707-713, 2009.

KENNEDY, John Stodart *et al.* A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. *A conspectus of aphids as vectors of plant viruses.*, 1962.

KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C e TAMURA K. MEGA X: Análise Genética Evolutiva Molecular em plataformas de computação. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549, 2018.

ZERBINO D.R. & BIRNEY E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, 18: 821-829, 2008.

<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>

https://viralzone.expasy.org/50?outline=all_by_species

<http://www.fao.org/home/en/>