

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EVANDRO KELLER

LEVANTAMENTO DE *Begomovirus* E *Crinivirus* EM CULTIVOS DE BATATA E  
TOMATE NO ESTADO DO PARANA, BRASIL

CURITIBA  
2020

EVANDRO KELLER

LEVANTAMENTO DE *Begomovirus* E *Crinivirus* EM CULTIVOS DE BATATA E  
TOMATE NO ESTADO DO PARANA, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Henrique da Silva Silveira  
Duarte

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Faier Calegario

CURITIBA  
2020

Keller, Evandro

Levantamento de Begomovirus E Crinivirus em cultivos de batata e tomate no estado do Paraná, Brasil. / Evandro Keller. - Curitiba, 2020.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Orientador: Henrique da Silva Silveira Duarte.

Coorientadora: Renata Faier Calegario.

1. Mosca branca. 2. Crinivírus. 3. Begomovirus. 4. Tomate - Doenças e pragas. 5. Batata - Doenças e pragas I. Duarte, Henrique Silva Silveira. II. Calegario, Renata Faier. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA  
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **EVANDRO KELLER** intitulada: **LEVANTAMENTO DE BEGOMOVÍRUS E CRINIVÍRUS EM CULTIVOS DE BATATA E TOMATE NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL**, sob orientação do Prof. Dr. HENRIQUE DA SILVA SILVEIRA DUARTE, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Maio de 2020.

Assinatura Eletrônica  
28/05/2020 12:56:01.0

HENRIQUE DA SILVA SILVEIRA DUARTE  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
28/05/2020 13:35:30.0

RENATA FAIER CALEGARIO  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
28/05/2020 15:42:22.0

KAREN SUMIRE KUBO  
Avaliador Externo (PONTIFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO  
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
28/05/2020 13:35:24.0

JÚLIO CÉSAR BARBOSA  
Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO FUNDAÇÃO DE  
ENSINO OCTÁVIO BASTOS - FEO)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me guiar pelos melhores caminhos e sempre me proteger.

A minha esposa, Camila ao meu filho Bernardo e minha filha Melissa, por todo apoio e amor concedido e por sempre acreditarem em mim.

A minha mãe, Adinir e meu nono e minha nona, Juvino e Hermínia, por ensinar os valores da vida e terem sido responsáveis pela pessoa que sou hoje.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte e a minha coorientadora, Prof. Dra. Renata Faier Calegario, pela confiança, amizade e por todos os ensinamentos que muito contribuíram para a minha formação profissional.

Aos meus amigos e colegas da pós-graduação, que sempre estiveram presentes em momentos bons e ruins e pela ótima convivência.

A todos os meus professores da pós-graduação, pelos ensinamentos passados durante os dois anos de faculdade.

Aos funcionários e técnicos da Universidade Federal do Paraná, em especial, àqueles do Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, por toda ajuda e companheirismo.

## RESUMO

Nas últimas décadas, a alta incidência de vírus transmitidos por mosca-branca tem sido um problema nos campos de tomate, ameaçando, mais recentemente, a cultura da batata. Um levantamento para estudar a ocorrência de *Begomovirus* e *Crinivirus* em campos de produção de tomate e batata foi conduzido de 2015 a 2018 em onze municípios do Estado do Paraná, Brasil. Amostras foliares foram coletadas em campos de Araucária, Campo do Tenente, Campo Largo, Castro, Contenda, Lapa, Faxinal, Morretes, Reserva, Palmeira e São Mateus do Sul. Amostras de mosca-branca foram coletadas em campos de tomate e batata para identificar a espécie predominante e investigar a presença de ambos os vírus no vetor. DNA e RNA totais foram extraídos das folhas e do vetor e foram testados por PCR e RT-PCR para detectar begomovírus e crinivírus, respectivamente, e por PCR para amplificar a região *mtCOI* do vetor. Os respectivos amplicons foram sequenciados para identificação do vírus e da mosca-branca e para realizar análises filogenéticas. Os resultados revelaram que das 215 plantas de tomate testadas, apenas 14 estavam infectadas por crinivírus, o que corresponde a 6,5% do total de amostras. Todas as amostras de tomate, batata e mosca-branca analisadas por PCR apresentaram reação negativa para begomovírus e as amostras de batata e mosca branca analisadas por RT-PCR também testaram negativo para crinivírus. No entanto, o ToCV foi detectado em uma amostra de mosca-branca coletada em tomateiro no município da Lapa. As análises filogenéticas revelaram que os isolados de crinivírus detectados em tomates e no vetor formaram um grupo monofilético com isolados de ToCV do Brasil e as populações de mosca-branca coletadas em ambas as culturas eram *Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor - MEAM 1. Esses resultados indicam uma baixa ocorrência de begomovírus e crinivírus que infectou lavouras de batata e tomate cultivadas no Paraná durante o período da pesquisa.

Palavras-chave: *Bemisia tabaci*. *Tomato chlorosis virus*. *Tomato severe rugose virus*

## ABSTRACT

In the last decades, the high incidence of viruses transmitted by whiteflies has been a problem in the tomato fields, threatening, more recently, the potato crops. A survey of *Begomovirus* and *Crinivirus* was conducted on cultivated tomatoes and potatoes plants from 2015 to 2018 to study their occurrence at eleven municipalities of the Parana state, Brazil. Leaf samples were collected in fields from Araucária, Campo do Tenente, Campo Largo, Castro, Contenda, Lapa, Faxinal, Morretes, Reserva, Palmeira and São Mateus do Sul. Whiteflies samples were collected in tomato and potato fields to identify the predominant specie and to investigate the presence of both viruses in the vector. Total DNA and RNA was extracted from the leaves and the vector and tested by PCR and RT-PCR to detect begomoviruses and the crinivirus, respectively, and by PCR to amplify the mtCOI region of the vector. Respectives amplicons were directly sequenced for virus and the whitefly identification and to perform phylogenetic analysis. The results revealed that of the 215 tomatoes plants tested, just 14 were infected by the virus which corresponds to 6.5% of the total analyzed samples. All PCR-analyzed samples of tomatoes, potatoes and whiteflies proved negative for begomoviruses and the RT-PCR of all samples of potatoes and whiteflies also proved negative for crinivirus. However, ToCV was detected in a whitefly sample collected in tomato field at the municipality from Lapa. The phylogenetic analysis revealed that the isolates of criniviruses detected in tomatoes and the vector form a monophyletic group with ToCV isolates from Brazil and all populations collected in both crops was *Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor - MEAM 1. These results indicate a low occurrence of *begomovirus* and *crinivirus* infecting cultivated potatoes and tomatoes crops in Paraná State during the survey period.

**Keywords:** *Bemisia tabaci*. *Tomato chlorosis virus*. *Tomato severe rugose virus*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	9
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	11
2.1	CULTURA DO TOMATE	11
2.2	A CULTURA DA BATATA	11
2.3	BEGOMOVÍRUS	13
2.4	CRINIVÍRUS	15
2.5	MOSCA-BRANCA	17
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	18
3.1	COLETA DAS AMOSTRAS	18
3.2	DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>BEGOMOVIRUS</i>	21
3.3	DETECÇÃO MOLECULAR DE CRINIVIRUS	21
3.4	EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>mtCOI</i> (SUBUNIDADE I)	23
3.5	SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	24
3.6	ANÁLISES FILOGENÉTICAS	24
3.7	DETECÇÃO SOROLÓGICA PELO MÉTODO DOUBLE ANTIBODY SANDWICH ELISA (DAS-ELISA)	25
3.7.1.	Primeira etapa: aderência dos anticorpos específicos dos vírus	25
3.7.2.	Segunda etapa: aderência dos antígenos	25
3.7.3.	Terceira etapa: adição do anticorpo conjugado específico, ligado a fosfatase alcalina	26
3.7.4.	Quarta etapa: adição do substrato e leitura das reações	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	27
4.1	DETECÇÃO MOLECULAR BEGOMOVIRUS	27
4.2	DETECÇÃO MOLECULAR CRINIVIRUS	27
4.3	IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIE DE MOSCA-BRANCA	32
4.4	TESTES SOROLÓGICOS	35
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	36
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	41
	REFERÊNCIAS	42



## 1 INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum*) e o tomate (*Solanum lycopersicum*) estão entre as hortaliças mais cultivadas no Brasil e no mundo, apresentando grande importância socio-econômica. No entanto, ambas culturas estão sujeitas a inúmeros problemas fitossanitários, incluindo os vírus transmitidos por mosca-branca (NAVAS-CASTILLO et al. 2011; FILHO; LIMA 2016). Entre as principais doenças de etiologia viral presentes nos campos de produção de tomate do país destacam-se os begomovírus, com prevalência da espécie *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e o crinivírus, *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (INOUE-NAGATA et al. 2016; ROJAS et al. 2018; MITUTI et al. 2019). Essas doenças, por compartilharem o mesmo vetor, encontram-se presentes também em campos de produção de batata representando uma grande ameaça aos cultivos (LIMA 2016; INOUE-NAGATA et al. 2016; MITUTI et al. 2019).

Os *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) possuem partículas icosaédricas geminadas (ca. 18 x 30 nm) e genoma composto por ssDNA circular, sentido positivo, com cerca de 2.5 a 3.0 Kb, podendo ser monopartidos, quando possuem somente o DNA-A, ou bipartidos, quando são compostos por DNA-A e DNA-B (BROWN et al. 2015). São transmitidos de maneira persistente/circulativa pelo complexo de espécies crípticas de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (ROSEN et al. 2015) e em plantas de batata e tomate causam sintomas de mosaico amarelo, clareamento de nervuras, deformação e enrolamento foliar e redução no porte da planta (LIMA 2016; INOUE-NAGATA et al. 2016; MITUTI et al. 2019).

O ToCV pertence ao gênero *Crinivirus* (família *Closteroviridae*) e apresenta partícula longa e flexível com aproximadamente 800 a 850 nm de comprimento. Seu genoma é bipartido e composto por ssRNA, sentido positivo (WINTERMANTEL et al. 2005). São transmitidos por moscas-brancas de maneira semi-persistente, incluindo as espécies do complexo *B. tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum* Haldeman e *T. abutilonea* Westwood, porém, essa última ainda não foi relatada no Brasil (WISLER et al. 1998; WINTERMANTEL e WISLER 2006).

Tomateiros infectados por ToCV apresentam sintomas de clorose internerval, principalmente nas folhas baixas, que se tornam quebradiças e podem apresentar manchas necróticas causando perda de área fotossintética e

levando a redução da produção (INOUE-NAGATA et al. 2016). Em plantas de batata, os sintomas do ToCV são menos acentuados do que em tomateiro, consistindo em clorose internerval e enrolamento suave nos bordos das folhas apicais (LIMA, 2016).

Desde o primeiro relato do ToCV em tomateiros no Brasil, na região de Sumaré, SP (BARBOSA et al. 2008), o vírus vem se disseminado amplamente pelo país (BARBOSA et al. 2011). Em batateira, o primeiro relato de ToCV foi em 2011, em Cristalina, Goiás (FREITAS et al. 2012), e desde então, diversos estudos envolvendo infecções causadas por begomovírus e crinivírus nas culturas da batata e do tomate, incluindo infecções mistas, têm sido realizados no Brasil para entender melhor o ciclo das relações vírus-vetor-hospedeiro das doenças nos campos de produção (MACEDO et al. 2014; LIMA 2016; MACEDO et al. 2019; MITUTI et al. 2019).

Um levantamento de doenças e mosca-branca em tomateiro no Brasil realizado no período de 2008 a 2011 demonstrou alto nível de infecção por *Begomovirus*, com predominância do ToSRV, e do ToCV em amostras do Estado do Paraná (QUEZADO-DUVAL et al., 2013). Posteriormente, em 2017, a presença das doenças também foi confirmada em amostras de tomateiros do Paraná por outro levantamento de viroses realizado na cultura envolvendo os estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraná (RIZO et al., 2017). Esses estudos apontaram para uma crescente disseminação dos vírus no estado, demonstrando a necessidade de expansão de novos estudos incluindo novas áreas do Paraná.

Como os begomovírus e crinivírus compartilham o mesmo vetor e possuem hospedeiros comuns que muitas vezes são plantados em áreas próximas, ambos podem ser disseminados pela mosca-branca entre as culturas da batata e do tomate. Informações sobre a ocorrência dessas viroses e das espécies de mosca-branca que ocorrem batateirais e em tomateiros no Estado do Paraná são escassas, sendo assim, este estudo teve como objetivos: a) investigar a ocorrência e distribuição de *Begomovirus* e do ToCV em cultivos da batata e de tomate de 11 municípios do Estado do Paraná; b) identificar a espécie de mosca-branca predominante em algumas regiões e c) verificar a presença dos vírus no inseto vetor.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CULTURA DO TOMATE

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é oriundo das regiões andinas do Peru, Bolívia e Equador, onde as temperaturas são moderadas e as precipitações pluviométricas não são muito intensas, mas sua ampla domesticação ocorreu no México, chamado então, de centro de origem secundário. Trata-se de uma planta dicotiledônea, pertencente à família *Solanaceae*. A condução e manejo da cultura são variáveis e a característica mais importante para defini-los é o hábito de crescimento, sendo esse dividido em duas categorias: determinado e indeterminado. É uma hortaliça com ampla adaptação à campo, cujo desenvolvimento e produção sofrem influência da temperatura, umidade do solo e fotoperíodo (GOFFAU; HILMI; DAM, 2006).

A China é a maior produtora mundial de tomate, sendo responsável por 31% da produção global, seguida da Índia e dos Estados Unidos. Atualmente, o Brasil encontra-se na nona posição no ranking mundial em produção da olerícola, com uma representatividade de 2,5%. Porém, a produção do país tende a crescer significativamente nos próximos anos, pois há uma alta disponibilidade de terras e de técnicas que possibilitam a competitividade econômica. No Brasil, Goiás ocupa o 1º lugar em produção com 17% da produção nacional, seguido de Minas Gerais e São Paulo com 16 e 15%, respectivamente.

O Paraná ocupa a quarta posição no ranking de produção, com 4,3 mil hectares em área total plantada. As principais regiões produtoras do Estado são os municípios de Londrina, Reserva, Faxinal e Marilândia do Sul que produzem juntos 33% do total estadual. A região metropolitana de Curitiba responde por 9% do total produzido (SEAB, 2018).

### 2.2 A CULTURA DA BATATA

A batata (*Solanum tuberosum* L) é uma planta herbácea de clima temperado, com centro de origem na Cordilheira dos Andes, América do sul. É difundida por todo o mundo, sendo considerada a hortaliça mais importante no

cenário mundial. A batata pertence à família das solanáceas e, diferentemente do tomate, responde a fotoperíodo e temperatura para tuberizar. O clima desempenha um papel importante na produção do tubérculo. Os campos mais produtivos estão nas regiões de temperatura amena e fotoperíodo curto, evitando problemas como redução no desenvolvimento, supressão do florescimento, tuberização precoce, dentre outros. Temperaturas ideais para o cultivo dessa hortaliça são máximas de 20 a 30°C e mínimas de 8 a 10°C (LOPES, 1999).

A produção mundial de batata em 2018 foi de aproximadamente 341 milhões de toneladas. O principal produtor mundial é a China, com mais de 90 milhões de toneladas, sendo que o Brasil ocupou a vigésima posição no ranking, com 3,9 milhões de toneladas, o que representa pouco mais de 1% do total da produção mundial. No Brasil, Minas Gerais lidera o ranking (com mais de 1,2 milhões de toneladas), seguido pelo Paraná com 824,4 mil toneladas plantadas em uma área aproximada de 29 mil hectares (SEAB, 2018).

A produção de batata no Paraná é dividida em duas safras. A primeira e mais representativa com cerca de 62% do total é conhecida como safra das águas sendo cultivada na primavera e verão. A segunda safra que produz os 38% restantes ocorre no verão e no outono. O núcleo regional de Curitiba concentra 30% da produção, seguido por Guarapuava com 27% e Ponta Grossa com 16%. A cultura da batata representa 22% do total de olerícolas plantadas no Estado, confirmando a sua importância na economia do Paraná (SEAB, 2018).

Por se tratar de uma planta propagada vegetativamente, as doenças causadas por vírus são um problema fitossanitário constante em campos de produção. Além disso, a presença de insetos vetores contribui para a disseminação e introdução de viroses nas lavouras (JAVIER et al., 2017).

Cerca de 50 vírus já foram descritos na cultura, sendo que 17 ocorrem no Brasil. Dentre eles, os mais frequentes são o *Potato virus Y* (PVY), o *Potato leafroll virus* (PLRV) o *Potato virus X* (PVX), e o *Potato virus S* (PVS) (KREUZE; JEEVALATHA; FIGUEIRA, 2020). No entanto, recentemente a ocorrência de alguns gêneros de vírus transmitidos por mosca-branca, como *Begomovirus* e de *Crinivirus*, têm aumentado nos campos de produção consistindo em um novo desafio para produtores e pesquisadores.

## 2.3 BEGOMOVÍRUS

Os *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) constituem o gênero de vírus de plantas com maior número de espécies descritas, causando doenças devastadoras em inúmeras espécies de plantas, incluindo o tomateiro e a cultura da batata (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). Possuem genoma composto por DNA circular de fita simples, sentido positivo e partículas icosaédricas geminadas, podendo ser monopartido ou bipartido. Os begomovírus nativos das Américas são na sua maioria bipartidos contendo DNA A e DNA B (BROWN et al., 2015). Macedo e colaboradores em 2018 relatou uma espécie de *Begomovirus* monopartido, o *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), ocorrendo em tomate na região nordeste do Brasil. A recombinação genética é a causa dessa diversidade de *Begomovirus* ocorrendo no campo. São transmitidos por mosca-branca (*Bemisia tabaci*) de maneira persistente, circulativa, para inúmeras espécies de plantas dicotiledôneas, incluindo algumas das principais hortaliças produzidas no Brasil como tomate e batata (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016).

Os sintomas em plantas de tomate são em geral o clareamento intenso das nervuras, manchas cloróticas na forma de mosqueado e mosaico amarelo, enrolamento e diminuição da área foliar (WISLER et al. 1998).

As principais espécies do gênero *Begomovirus* que ocorrem em tomateiro no Brasil e que prevalecem atualmente nos campos de produção são *Tomato severe rugose virus* (ToRSV), presente na região Central e sudeste do Brasil, *Tomato common mosaic virus* (ToCoMV) na região do espírito Santo e Minas Gerais e *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) mais comum em campos da região nordeste do país (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016).

O primeiro relato de begomovírus em batata no Brasil foi na década de 80, sendo identificado o *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) ocorrendo em baixa incidência no estado do Rio Grande do Sul. No entanto, levantamentos subsequentes revelaram perdas de 25 a 40% causadas pelo vírus, indicando a grande capacidade de disseminação da doença e seu elevado potencial de ameaça à produção de batata (LIMA, 2016). Posteriormente, relatos da ocorrência do ToYVSV e do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em regiões produtoras foram realizados nos estados de Goiás, São Paulo, Minas Gerais e

Distrito Federal, demonstrando o ressurgimento da doença em batata (SOUZA-DIAS et al., 2008; LIMA et al., 2011; INOUE-NAGATA et al., 2016).

Os sintomas de begomovírus em batata são: mosaico amarelo forte, clorose internerval, redução do tamanho de folhas, inicialmente das folhas apicais e redução do tamanho da planta (FILHO; LIMA 2016).

Como já mencionado, tanto o ToYVSV quanto o ToRSV, tratam-se de espécies que infectam primariamente a cultura do tomate. Desta forma, a constante associação de plantações de batata com tomate dentro de uma mesma propriedade ou entre propriedades vizinhas, além da presença intensiva de mosca-branca nas lavouras dificultam ainda mais o manejo dos *begomovirus* nessas solanáceas. Portanto, trata-se de um problema fitossanitário emergente na bataticultura que demanda inspeções frequentes para a detecção das espécies virais visando evitar o plantio de lotes de batata-semente contaminados e evitar a disseminação desses patógenos (FILHO; LIMA 2016).

Na cultura da batata, atualmente, as begomoviroses ocorrem em baixa incidência e não se encontram amplamente distribuídas nas principais regiões produtoras. No entanto, como trata-se de uma cultura propagada vegetativamente, existe uma grande preocupação de que os begomovírus migrem para os tubérculos, produzindo batatas sementes infectadas (de baixa qualidade) e resultando em rápida disseminação do vírus pelo país (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). Lima e colaboradores em 2012 observaram altas taxas de transmissão viral, cerca de 80 a 100%, em tubérculos obtidos de plantas infectadas por *Begomovirus*. De fato, preocupações desta natureza devem ser consideradas, frente a grande eficiência de transmissão dessas viroses pela mosca-branca e devido ao grande número de espécies desse gênero viral ocorrendo em outras espécies de solanáceas (por exemplo o tomate, representando um grande problema fitossanitário.

Desta forma, acredita-se que o tomateiro representa a maior fonte de inóculo para as infecções que estão ocorrendo em batata, já tendo sido demonstrado em trabalhos prévios a transmissão do ToYVSV por mosca-branca para plantas de batata após curtos períodos de alimentação do vetor em tomateiro infectado (FILHO; LIMA 2016).

## 2.4 CRINIVÍRUS

O gênero *Crinivirus* pertence à família *Closteroviridae*. Esta família é composta apenas por dois gêneros: *Crinivirus* e *Closterovirus*. Os *Crinivirus* caracterizam-se por possuírem partículas longas e flexíveis, medindo de 650-800 e 700-900 nm. Este gênero possui genoma bipartido ou tripartido formado por moléculas de RNA de fita simples, senso positivo. De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) o gênero *Crinivirus* possui 14 espécies, sendo o *Tomato chloris virus* (ToCV) e o *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) são as únicas espécies do gênero causando doenças importantes na cultura do tomate. São transmitidos por mosca-branca de maneira semi-persistente, incluindo as espécies *Bemisia tabaci* New World (NW), *Trialeurodes vaporariorum*, *B. tabaci* Middle East Asia Minor 1 (MEAM 1) e *T. abutilonea*, sendo as últimas duas mais eficientes na transmissão do vírus (ORFANIDOU et al., 2016; WINTERMANTEL; WISLER, 2006).

O primeiro relato do ToCV em tomateiro ocorreu na Flórida (EUA), em 1996 (WISLER et al., 1998). Porém, rapidamente o mesmo acabou se espalhando por todo o território mundial. Em 1999 foi constatado na Espanha; em 2000, em Portugal ; em 2004, em Israel (BARBOSA et al., 2011), até que entre 2006 e 2007 foi encontrado pela primeira vez no Brasil infectando tomateiros no município de Sumaré/SP (BARBOSA et al., 2008). Após alguns anos, a presença do vírus foi constatada em plantios do Rio de Janeiro, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Distrito Federal (BARBOSA et al., 2011; MACEDO et al., 2014). Estudos mais recentes apontam para disseminação dessa virose no estado do Paraná tratando-se, portanto, em um dos focos do levantamento que foi realizado nesse trabalho. Em 2013, ToCV foi detectado em cultivos de tomate nos municípios de Ponta Grossa no Paraná e Caxias do Sul, no Rio Grande do Sul (Júlio César Barbosa, *comunicação pessoal*). Além do tomateiro, o vírus infecta outras solanáceas como a batata, pimentão, beringela, fisalis, maria-pretinha e asteráceas como alface e zínia (FREITAS, 2012).

Os sintomas característicos da doença nas plantas infectadas incluem mosqueado clorótico irregular entre as nervuras, geralmente nas folhas baixas, que gradualmente avançam por toda a extensão da planta. As áreas cloróticas das folhas podem desenvolver pontos necróticos e as folhas mais

velhas podem ficar enroladas, grossas e quebradiças. Ocorre uma diminuição da área fotossintética ativa, causando perdas na produção e senescência precoce das plantas. Os sintomas observados fazem com que a doença seja atribuída a deficiência nutricional de magnésio, fitotoxidez ou mesmo senescência natural da planta. Em alguns casos o sintoma da virose pode ser confundida com sintomas de outras doenças que afetam os vasos condutores causando amarelecimento das folhas (FILHO; INOUE-NAGATA, 2015).

Em um levantamento realizado no período de 2008 até 2011, amostras de tomate provenientes do Paraná, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Santa Catarina, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e do Distrito Federal foram analisadas para a presença de diversas doenças, incluindo as de etiologia viral (QUEZADO-DUVAL et al., 2013). Nesse estudo, a diagnose foi baseada em testes moleculares para a detecção de *Begomovirus* e *Crinivirus*. No estado do Paraná, três lavouras de tomate do segmento mesa do município de Faxinal e uma em Marilândia do Sul foram visitadas no ano de 2010, mostrando alto nível de infecção por *Begomovirus*, com predominância da espécie TSRV, e crescente incidência de plantas infectadas por *Crinivirus* da espécie *Tomato chlorosis virus*. Além desses, o *Tospovirus* TSWV também se mostrou presente nesta região. Os sintomas causados pelos *Crinivirus* são observados mais tardiamente que aqueles causados por *Begomovirus*.

Em relação ao vetor mosca-branca, somente a *Bemisia tabaci* Middle East Asia Minor (MEAM), foi encontrado em todos os estados. No Paraná, em cultivo protegido, a espécie *Trialeurodes vaporariorum*, também vetora de *Crinivirus* foi encontrada (QUEZADO-DUVAL et al., 2013). ToSRV e ToCV são eficientemente transmitidos pela *B. tabaci* MEAM, porém a recente detecção da *B. tabaci* Mediterranean (MED) em plantas ornamentais, pode alterar esse cenário, se tornando uma ameaça ainda maior visto que a *B. tabaci* MED é capaz de manter e transmitir o ToCV durante 6 dias, enquanto a *B. tabaci* MEAM mantém apenas por 3 dias (MITUTI et al., 2019).

O primeiro relato de ToCV em batata ocorreu em 2011 no município de Cristalina, Goiás. Foram coletados quatro tubérculos de plantas apresentando sintomas de enrolamento nas folhas e, a partir de análises moleculares, foi possível detectar a presença do ToCV e de outras duas viroses que possuem



sintomas semelhantes, sendo o PLRV e o ToSRV. Esse relato comprova mais uma virose primeiramente detectada em tomate acometendo plantas de batata (FREITAS et al., 2012).

## 2.5 MOSCA-BRANCA

As moscas-brancas são insetos sugadores muito pequenos, com tamanho de 1 a 2 mm, pertencentes à ordem Hemiptera e família Aleyrodidae. A espécie *Bemisia tabaci* é a mosca-branca mais frequente em cultivos de hortaliças no Brasil e a principal transmissora de *Begomovirus* e *Crinivirus* para espécies de solanáceas como tomate, batata, pimentão, jiló, entre outras. O ciclo de vida desse inseto é formado por ovo, ninfa (quatro instares) e adulto. Na fase adulta, a espécie *Bemisia tabaci* possui dorso de coloração amarelo-palha, quatro asas membranosas recobertas com pulverulência branca. Os ovos apresentam coloração amarelada, com formato de pêra e são depositados isoladamente na face inferior da folha e presos por um pedicelo. As ninfas são translúcidas, de coloração amarelo a amarelo-pálido. A duração do período ovo-adulto varia de 20 a 25 dias. Ovos, ninfas e adultos localizam-se na face inferior das folhas, ovos e adultos são encontrados principalmente nas folhas mais novas e brotações, enquanto ninfas ocorrem nas folhas mais desenvolvidas, (FILHO; LIMA, 2016).

A relação do vetor com os vírus ocorre de três formas: não persistente, semi-persistente e persistente, sendo que os vírus de relação persistente são divididos quanto a sua replicação no vetor em propagativo e não-propagativo. As viroses de relação não persistente e semi-persistente, tem a característica de um curto período de aquisição (PA), porém perdem rapidamente a efetividade após a aquisição e geralmente são transmitidos pela picada de prova. No caso de viroses persistentes, o cenário muda, onde se precisa de um período de aquisição (PA) maior, mas por outro lado o período de latência (PL) desses vírus permite a sua transmissão por horas ou até dias, sendo possível a transmissão para a progênie (FIALLO-OLIVÉ et al., 2019).

As espécies de mosca-branca capazes de transmitir vírus são *Trialeurodes abutilonea*, *Trialeurodes vaporariorum* e *Bemisia tabaci*, sendo as duas últimas as que foram relatadas ocorrendo no Brasil. O primeiro relato da mosca-branca no Brasil ocorreu em 1929 (ALBERGARIA; CIVIDANES, 2002). Desde então, o

biótipo A de *Bemisia tabaci* era o único que ocorria no país. Porém, no início da década de 1990, o biótipo B foi introduzido através da importação de plantas ornamentais (LOURENÇÃO; NAGAI, 1994) e, devido à sua alta capacidade de oviposição, ciclo de vida curto e a ampla gama de hospedeiros, fez com que o MEAM 1 se tornasse o principal do país (BARBOSA et al., 2014). Recentemente foi relatado a presença do biótipo Q, com grande potencial de disseminação devido a menor susceptibilidade aos inseticidas. O primeiro relato ocorreu no estado do Rio Grande do Sul (DA FONSECA BARBOSA et al., 2015) e, posteriormente, em São Paulo e no Paraná (DE MORAES et al., 2017).

Existe uma grande diversidade genética e similaridade morfológica dentro do complexo *Bemisia tabaci*, que confunde e contradiz os taxonomistas. Na classificação mais recente são descritos o biótipo B como MEAM (Middle East-Asia Minor), assim denominada por ter sido originada do continente asiático e o biótipo A seria dividido em NW-1 (New World -1) e NW-2 (New world-2), tendo como origem o Novo Mundo. Já o biótipo Q pertence ao complexo conhecido como MED (Mediterranean), por ter sido originado na região do Mediterrâneo (FILHO; LIMA, 2016).

Os surtos de mosca-branca ocorrendo em regiões produtoras de tomate e batata, possibilitam um ambiente propício para epidemias das viroses, visto sua grande eficiência de transmissão das viroses e seu controle cada vez mais difícil pelo fato das moléculas químicas não controlarem o ciclo todo da praga e ter a performance afetada pela resistência adquirida ao longo do tempo, (FILHO; INOUE-NAGATA, 2015).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 COLETA DAS AMOSTRAS**

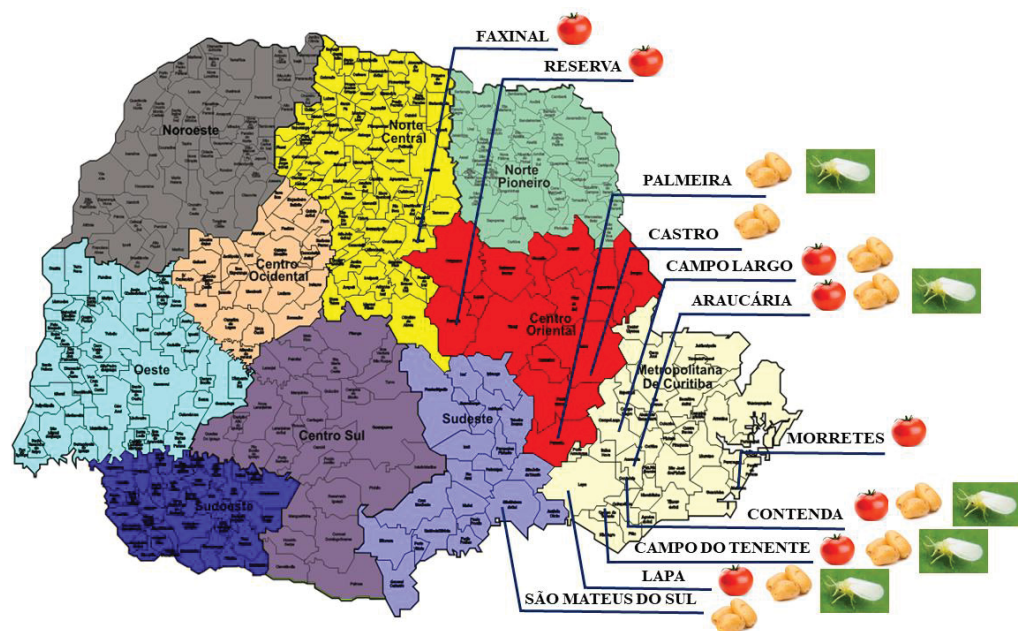
No período de 2015 a 2018 foram realizadas visitas e coletas em diferentes propriedades rurais destinadas à produção de batata e tomate, localizadas em municípios produtores do Estado do Paraná (Figura 1). As plantas de tomate foram coletadas nos municípios da Lapa, Reserva, Faxinal, Campo Largo, Morretes, Campo do Tenente, Araucária e Contenda. Para as plantas de batata

as coletas foram realizadas nos municípios de São Mateus do Sul, Castro e Palmeira, além dos já mencionados para a cultura do tomate.

Durante as visitas, foram feitas inspeções visuais das espécies cultivadas coletando-se plantas que apresentavam sintomas semelhantes aos induzidos por vírus como mosaico, mosqueado, clorose internerval, enrolamento das folhas e subcrescimento (Figura 2). Além de plantas sintomáticas, no último ano do estudo, em 2018, foram coletadas populações de mosca-branca nos municípios de Palmeira, Araucária, Contenda, Campo do Tenente e Lapa, visando a identificação da espécie predominante nas regiões avaliadas.

As plantas coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e transportadas dentro de caixas térmicas para garantir a integridade e a boa conservação das mesmas. Além disso, foram identificadas com nome da propriedade, cultivar, tipos de sintomas e data da coleta. No laboratório, as amostras foram fotografadas e, posteriormente, armazenadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . As moscas-brancas, foram coletadas com sugadores manuais e posteriormente armazenadas em microtubos contendo álcool 95% em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ .

FIGURA 1- MAPA DO ESTADO DO PARANÁ REPRESENTANDO OS MUNICÍPIOS ONDE FORAM REALIZADAS AS COLETAS.



FONTE: O autor (2020)

FIGURA 2 - PLANTAS DE BATATA COM SINTOMAS TÍPICOS DE VIROSE.



**A e B**, clorose internerval (Campo Largo – Campo 2); **C e D**, mosaico amarelo intenso, (Lapa e São Mateus Do Sul); **E**, mosaico e redução do tamanho foliar (Campo Largo-Campo 1); **F**, mosaico (Contenda)

### 3.2 DETECÇÃO MOLECULAR DE *BEGOMOVIRUS*

Discos foliares provenientes de plantas sintomáticas de tomate e batata foram submetidos à extração de DNA total, de acordo com o método de Dellaporta et al. 1983. Para a reação de polimerização em cadeia (PCR), utilizou-se 3 µL de DNA molde; 14,7 µL de água ultrapura; 2,5 µL de tampão 10X, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 0,5 µL de dNTP (10 mM); 1,25 µL de cada primer PAL1v1978 (forward) 5' GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTTYCCNGT 3' e PAR1c496 (reverse) 5' AATACTGCAGGGCTTYCTRTRACATRGG 3' (10mM) (ROJAS *et al.*, 1993) e 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5U/µl – Invitrogen), totalizando um volume de 25 µL. O programa da reação foi composto por uma etapa única inicial de aquecimento a 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos compostos por 94°C por 40 segundos, 54°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguido de uma etapa final de 10 minutos a 72°C. Ao final da reação um fragmento de aproximadamente 1200 pares de base correspondente a parte dos genes *rep* e *cp* era esperado para amostras positivas. Os fragmentos de DNA foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 0,9% corado com GelRed (Biotium).

### 3.3 DETECÇÃO MOLECULAR DE *CRINIVIRUS*

Para detecção de *Crinivirus* foi realizado a extração de RNA com o reagente Trizol®. Para tal, aproximadamente 0,1 g do tecido foliar de cada planta coletada foram transferidos para microtubos de 1,5 mL. Posteriormente, adicionou-se nitrogênio líquido onde o material foi macerado com o auxílio de pistilos até atingir uma consistência de pó bem fino. Em seguida foi adicionado 1 mL de Trizol para iniciar o processo de extração e para homogeneizar seguiu para agitação em vortex e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foi acrescentado 0,2 mL de clorofórmio e agitado vigorosamente por 20 segundos em vortex e em seguida incubado por 2 a 3 minutos na geladeira (4°C). Dado o tempo, as amostras foram centrifugadas com 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (superior) foi coletada para ser transferida para um novo tubo um volume aproximado de 400 µL. Em seguida, foram acrescentados 500 µL de álcool isopropílico e os tubos homogeneizados. Após

a agitação, foram novamente incubados a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. Nesta fase ocorreu a precipitação do RNA. Em seguida, procedeu-se uma nova centrifugação com 12000 rpm por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e, após centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Para lavagem do RNA, foi acrescentado 1 mL de etanol 70% (em água DEPC) e, após uma nova centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , o sobrenadante foi novamente descartado. O pellet foi seco por aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente e ressuspendido em 20  $\mu\text{L}$  água ultrapura acrescida de DEPC.

Para a amplificação dos fragmentos de interesse do gênero crinivírus utilizou-se como molde da reação 2,5  $\mu\text{L}$  do RNA total das amostras extraídas anteriormente, a fim de obter o cDNA molde. Além do RNA, adicionou-se 2,0  $\mu\text{L}$  do primer HS12 (reverse) 5' CCKCCACCAAARTCGTA 3' (10 mM) (DOVAS et al 2002) e 1,0  $\mu\text{L}$  água ultrapura. A reação foi levada ao termociclador para aquecimento a  $70^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Após esse período, foi transferida para o gelo por cerca de 3 a 5 minutos e, posteriormente, adicionou-se 2,5  $\mu\text{L}$  de buffer 5x; 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP; 3,5  $\mu\text{L}$  de água ultrapura com DEPC e 0,5  $\mu\text{L}$  enzima MMLV (200U/  $\mu\text{L}$  Invitrogen). Em seguida, a reação foi levada ao termociclador e aquecida por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . A quantidade de 3,0  $\mu\text{L}$  cDNA produzido na etapa anterior foi adicionada a um mix contendo 15,2  $\mu\text{L}$  água ultrapura; 0,8  $\mu\text{L}$  de Primer HS-11 (forward) 5' GGKTTRGAKTTYGGTACTAC 3'(10mM); 0,8  $\mu\text{L}$  de Primer HS-12 (reverse) 5' CCKCCACCAAARTCGTA 3' (10mM) (DOVAS et al., 2002); 0,3  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase ( 5U/ $\mu\text{L}$  Invitrogen); 0,8  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50mM); 1,5  $\mu\text{L}$  de dNTP (10mM) e 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10x. Em seguida, a reação foi levada ao termociclador para aquecimento à  $94^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos, seguida de 35 ciclos cada um composto por três etapas: desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos; anelamento a  $49^{\circ}\text{C}$  por 40 segundos e extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  por 50 segundos. Ao término da reação uma etapa de  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos foi acrescentada a reação e, após esse período a mesma foi mantida a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos ou até ser retirada do termociclador. As amostras seguiram para avaliação em gel de agarose 0,9% para ser observada a presença ou ausência de bandas de 587 pb, correspondente a parte da ORF *heat shock protein 70* (HSP70) tamanho esperado para o gênero *Crinivirus*. No gel, foram aplicados um marcador de peso molecular 100 pb (Sinapse); controle positivo, ou seja, uma planta com a presença do vírus; controle negativo, que corresponde a uma

planta sadia; o branco, que serviu como controle da reação e as amostras que foram avaliadas, juntamente com o corante de DNA Gel red (Biotium).

### 3.4 EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DO GENE *mtCOI* (SUBUNIDADE I)

A extração do DNA total foi realizada através do método de CTAB (DOYLE & DOYLE, 1991) com modificações. A partir de um indivíduo de mosca-branca, o mesmo foi inserido em microtubos de 1,5 mL. Em seguida, 400 µL de tampão de extração (100 mM TRIS pH 8,0; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl e 2% de CTAB) foram adicionados aos tubos e o inseto macerado com o auxílio de pistilos. Posteriormente, o material foi incubado a 65°C por 30 minutos, sendo 15 minutos seguido de agitação manual e mais 15 minutos. Após incubação, os microtubos foram submetidos a centrifugação por 6 minutos a 6000 rpm. Em seguida, o sobrenadante (aproximadamente 400 µL) foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 400 µL de clorofórmio/álcool isoamílico, na proporção (24:1) seguido de agitação suave. Após agitação, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 4°C e a 13500 rpm. O sobrenadante foi coletado e 0,6 volumes de isopropanol foi adicionado para precipitação do DNA seguido de agitação e deixado por 30 minutos a -20°C. Em seguida os microtubos foram submetidos a centrifugação por 20 minutos a 13500 rpm. O sobrenadante foi descartado e 500 µL de etanol 70% foi adicionado para lavagem do DNA seguida de nova centrifugação por 10 minutos a 13500 rpm. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet de DNA seco a temperatura ambiente. Por fim, o DNA foi ressuscitado em 20 µL de água ultrapura e uma alíquota analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed (Biotium), para avaliar a qualidade do DNA.

Para a amplificação dos fragmentos do gene *mtCOI* (subunidade I) utilizou-se como molde da reação o DNA extraído na etapa anterior. A reação foi composta de 3 µL de DNA molde; 13,7 µL de água ultrapura; 2,5 µL de tampão 10X, 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 1,0 µL de dNTP (2,5 mM); 1,0 µL do primer C1-J-2195 (forward) 5' TTGAATTTTTTGGTCATCCAGAAGT 3' (10 Mm); 1,0 µL do primer L2-N-3014 (reverse) 5' TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA 3' (SIMON et al., 1994) e 0,3 µL de Taq polimerase (5U/µl Invitrogen) totalizando um volume de 25 µL por reação. O programa utilizado para reação foi composto por 35

ciclos, incluindo uma etapa única inicial de aquecimento a 94°C por 5 minutos. Cada ciclo é composto de etapas de desnaturação por 30 segundos 94°C, anelamento por 45 segundos a 45°C e extensão por 1 minuto 72°C; para finalizar o programa, um último ciclo de 10 minutos a 72°C é acrescentado à reação. Ao final da reação espera-se amplificar um fragmento de 820 pares de base, correspondente a parte do gene *mtCOI* (subunidade I). As amostras seguiram para avaliação em gel de agarose 1% para ser observada a presença ou ausência de bandas de 820 pares de base. No gel, foram aplicados um marcador de comprimento 100 pb (Sinapse), o branco, que serviu como controle da reação e as amostras que foram avaliadas. Juntamente com as amostras foi aplicado o corante de DNA Gelred (Biotium).

### 3.5 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As amostras foram sequenciadas por um Sequenciador 3500xl Genetic Analyzerno. As sequências consensos geradas foram obtidas a partir das sequências forward e reverse com o auxílio do software MEGA 7.02 (TAMURA et al. 2011) e do BioEdit (HALL, 1999), sendo posteriormente comparadas com sequências disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

### 3.6 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As sequências consensos resultantes foram verificadas manualmente e ajustadas utilizando o programa on-line MAFT v.7 (KATOH & STANDLEY, 2013). A análise de Máxima Verossimilhança foi realizada utilizando o portal CIPRES Science Gateway v.3.3 (MILLER et al., 2012), usando Garli v.2.0 (ZWICKL, 2006). O modelo evolutivo foi definido pelo jModelTest v.2.1.6 (GUINDON & GASCUEL, 2003; DARRIBA et al, 2012) e o modelo ideal de substituição de nucleotídeos foi baseado no critério de Informação de Akaike sendo utilizado o Modelo TN93 + I (mosca-branca) e T92+G (*Crinivirus*). Foram utilizados 1000 bootstraps para geral suporte estatístico. A árvore consenso resultante foi gerada utilizando o programa Sumtrees v.4.3.0 do pacote Dendropy v.4.3.0 (SUKUMARAN & HOLDER, 2010).



### 3.7 DETECÇÃO SOROLÓGICA PELO MÉTODO DOUBLE ANTIBODY SANDWICH ELISA (DAS-ELISA)

Amostras foliares de batata coletadas à campo foram submetidas a testes sorológicos no Centro de Diagnose Marcos Enrieti (CDME), visando confirmar a infecção das plantas por quatro vírus PVX, PVY, PVS e PLRV, utilizando antissoros policlonais (AGDIA), controles positivos e negativos (AGDIA).

#### 3.7.1. Primeira etapa: aderência dos anticorpos específicos dos vírus

A primeira etapa do teste consistiu em aderir aos poços das microplacas os anticorpos (IgG) específicos de PVX, PVY, PVS e PLRV. Inicialmente, os antissoros específicos dos vírus foram diluídos na proporção de 1:1000 em tampão de carbonato (1000 mL de Água destilada (pH 4 a 6); 1,59 gramas de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 2,93 gramas de  $(\text{Na}_2\text{HCO}_3)$  ou adsorção. Em seguida, homogeneizou-se e distribuiu-se alíquotas da diluição preparada, a base de 150  $\mu\text{l}$ , por poço da microplaca; de conformidade com mapeamento de distribuição das amostras previamente elaborado constando inclusive a localização dos controles positivos (com antígenos) e negativos (sadios). Após distribuição dos anticorpos específicos e controles nas respectivas microplacas, estas foram colocadas na estufa por 4 a 6 horas à temperatura de 37°C, em uma bandeja tampada forrada com papel toalha úmido (câmara úmida). Depois de incubadas, os poços foram esvaziados e lavados para retirada dos anticorpos não aderidos ou adsorvidos na placa com PBS-TWEEN 20 (1000 mL PBS-TWEEN-20; 20 gramas de PVP-40 (2%); 10 gramas de Albumina de Ovo ou Leite em pó Desnatado (1%) com uma piseta dirigindo o jato em cada poço, individualmente. A placa foi mantida inclinada, evitando a mistura dos conteúdos dos poços durante a lavagem. Foram realizadas três lavagens em cada placa.

#### 3.7.2. Segunda etapa: aderência dos antígenos

As folhas das plantas de batata coletadas foram maceradas em almofariz, na presença de tampão PBS-TWEEN 20, e transferidas para *ependorfs*. Em

seguida foram distribuídos 100  $\mu$ L de cada amostra por poço, com duas repetições para cada amostra. Como controle negativo foi utilizado folha de batata sadia e como controle positivo folha de batata conhecidamente positiva proveniente do kit (AGDIA). Após esse processo levou-se as placas para geladeira para incubar *over night*.

### 3.7.3. Terceira etapa: adição do anticorpo conjugado específico, ligado a fosfatase alcalina

Na terceira etapa, após 24 horas do início do teste, as microplacas foram retiradas da geladeira, realizando-se a lavagem das mesmas, poço a poço, por três vezes com PBS-TWEEN 20. Em seguida, preparou-se a diluição de cada um dos anticorpos conjugados específicos na proporção (1:1000), utilizando o Tampão PBS-TWEEN em uma bandeja, uma para cada anticorpo, volume suficiente para o número de amostras em análise de 100  $\mu$ L por poço da microplaca, conforme o mapeamento. Em seguida as microplacas foram colocadas em bandeja com tampa e papel úmido (câmara úmida) e mantidas em estufa à temperatura de 37°C para aderência dos conjugados específicos por um período de 4 a 6 horas. Após a incubação, os poços de cada microplaca foram esvaziados e lavados, como na primeira e segunda lavagem, porém, nesta terceira e última lavagem foram feitas 4 vezes cada microplaca.

### 3.7.4. Quarta etapa: adição do substrato e leitura das reações

Após a lavagem, foram adicionadas alíquotas de 100  $\mu$ L de substrato por poço das microplacas na concentração de 1 mg/mL, obtido pela dissolução de pó de p-nitrofenilfosfato em tampão para diluição de substrato (800 mL de Água destilada (pH 4 a 6); 97 mL de Dietalonamina) - (Fosfatase Alcalina – p-Nitrophenil phosphate (PNPP)). Após a distribuição das alíquotas, as microplacas foram armazenadas em local escuro e fechado (gavetas), pois o PNPP é sensível à luz, aguardando-se o período adequado para obtenção das reações indicativas da presença de vírus nas amostras (cor amarela) ou ausência de vírus (sem cor). As leituras foram feitas aos 60 minutos após o período de

incubação, no leitor de microplacas de Elisa, utilizando um filtro de 405 nm de comprimento de onda. Foram realizadas 3 leituras para cada um dos vírus.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DETECÇÃO MOLECULAR BEGOMOVIRUS

A detecção de begomoviroses por PCR demonstrou que nenhuma das 215 plantas de tomateiro provenientes dos municípios amostrados estavam infectadas pelo gênero *Begomovirus*. As moscas-brancas analisadas pela mesma técnica coletadas em campos de tomate dos municípios de Araucária, Campo do Tenente, Contenda e Lapa também apresentaram resultado negativo para begomovírus (Tabela 1). As 243 plantas de batata de todos os municípios amostrados e as populações de moscas-brancas coletadas nos municípios de Araucária, Campo do Tenente, Contenda e Palmeira, também não apresentaram amplificação do fragmento esperado de 1200 pares de base para o gênero *Begomovirus* por PCR (Figura 3 e Tabela 2).

### 4.2 DETECÇÃO MOLECULAR CRINIVIRUS

A detecção de crinivirose por RT-PCR na cultura do tomate demonstrou que das 215 plantas testadas, 14 estavam infectadas com *Crinivirus*, o que corresponde a 6,5% do total das amostras analisadas (Figura 4 e Tabela 1). Todas as plantas de tomate positivas para o gênero foram oriundas do município de Faxinal, que ocupa a terceira posição no ranking de produção da hortaliça no estado do Paraná. Na análise das populações de mosca-branca coletadas em 2018 nos campos de tomate dos municípios de Araucária, Campo do Tenente, Contenda e Lapa, observou-se a presença do ToCV em uma amostra proveniente do município da Lapa (Figura 5 e Tabela 1).

A comparação das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos do fragmento de 587 pb do gene HSP 70h dos dois isolados de crinivírus provenientes da planta de tomate de Faxinal (ToCV Tomate Faxinal) e da mosca-branca coletada em campo de tomate no município da Lapa (ToCV Mosca-

branca Lapa) apresentaram 100% de identidade com os isolados de ToCV disponíveis no GenBank (MN172420, LC342730, MG813910, MF278017, KY679885, KY679890), demonstrando que ambos são da espécie *Tomato chlorotic virus*. Além disso, o estudo filogenético demonstrou que os isolados de ToCV de Faxinal e da Lapa agruparam-se somente com isolados pertencentes à espécie ToCV do Brasil e de outras regiões do mundo, formando um grupo monofilético com 77% de probabilidade, confirmando que ambos pertencem a única espécie de *Crinivirus* relatada até o momento em cultivos de tomate no Brasil (Figura 6). O resultado se confirma, quando é possível observar outro agrupamento monofilético formado somente por isolados de *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV), com 48% de probabilidade, espécie do mesmo gênero que também infecta tomateiro, porém, ainda não relatada no país.

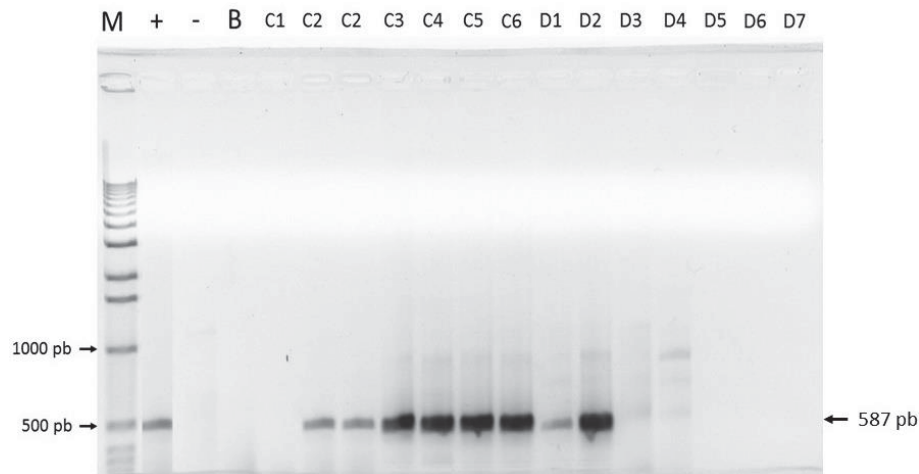
FIGURA 3 - PADRÃO ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE (1%) DE PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE *BEGOMOVIRUS* EM PLANTAS DE BATATA COLETADAS NOS CAMPOS DE PRODUÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ



**M**, Marcador molecular 1 kb DNA ladder (Invitrogen); **+**, Planta de batata infectada com *Begomovirus*; **-**, planta de batata sadia; B, branco; **AR1-AR15**; Plantas de batata testadas.

FONTE: O autor (2020).

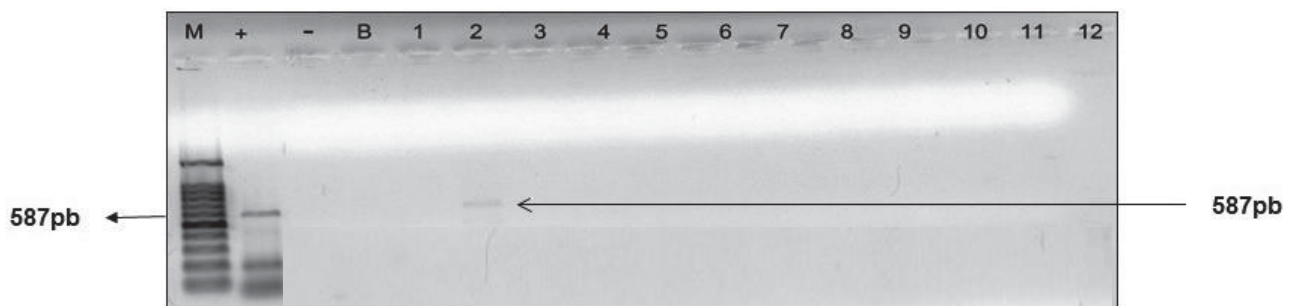
FIGURA 4 - PADRÃO ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE (1%) DE RT-PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE *CRINIVIRUS* EM PLANTAS DE TOMATE COLETADAS NOS CAMPOS DE PRODUÇÃO DO ESTADO PARANÁ



**M**, Marcador molecular ("1 kb DNA ladder" INVITROGEN); **+**, planta de tomate com a presença de ToCV; **-**, planta de tomate sadia; **B**, branco; **C1-D7**; plantas de tomate testadas. As amostras **C2 a C6** e **D1 e D2** amplificaram fragmento 587pb.

FONTE: O autor (2020).

FIGURA 5 - PADRÃO ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE (1%) DE PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE *CRINIVIRUS* EM MOSCAS-BRANCAS COLETADAS NOS CAMPOS DE PRODUÇÃO DE TOMATE E BATATA DO ESTADO DO PARANA



**M**, Marcador molecular 100pb (Sinapse); **+**, planta de tomate infectada com *Crinivirus*; **-**, planta de tomate sadia; **B**, branco: controle de contaminação; **1 a 12**, moscas-brancas analisadas; **2**, amostra de mosca-branca do município da Lapa apresentando fragmento de 587pb indicando a presença de ToCV.

TABELA 1. DETECÇÃO DE BEGOMOVÍRUS E CRINIVÍRUS EM TOMATEIRO E IDENTIFICAÇÃO DE MOSCA-BRANCA COLETADAS EM MUNICÍPIOS DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.

Ano	Município	Tomate		Mosca-branca		
		Begomovirus <sup>a</sup>	Crinivirus <sup>a</sup>	Espécie de mosca-branca	Begomovirus <sup>a</sup>	Crinivirus <sup>a</sup>
15/05/18	Araucária	0/8	0/8	<i>B. tabaci</i> MEAM 1	0/1	0/1
30/03/18	Campo do Tenente	0/20	0/20	<i>B. tabaci</i> MEAM 1	0/1	0/1
11/11/15	Campo Largo	0/16	0/16	-	-	-
31/10/18	Contenda	0/6	0/6	<i>B. tabaci</i> MEAM 1	0/1	0/1
16/10/15	Faxinal – Campo 1	0/37	0/37	-	-	-
	Faxinal – Campo 2	0/40	2/40	-	-	-
	Faxinal – Campo 3	0/15	6/15	-	-	-
	Faxinal – Campo 4	0/22	6/22	-	-	-
02/07/17	Morretes	0/3	0/3	-	-	-
30/09/15	Lapa	0/4	0/4	-	-	-
09/11/18	Lapa	0/31	0/31	<i>B. tabaci</i> MEAM 1	0/1	1/1
15/10/15	Reserva	0/9	0/13	-	-	-
15/10/15	Reserva	0/5	0/13	-	-	-
		<b>0/215</b>	<b>14/215</b>			<b>1/4</b>

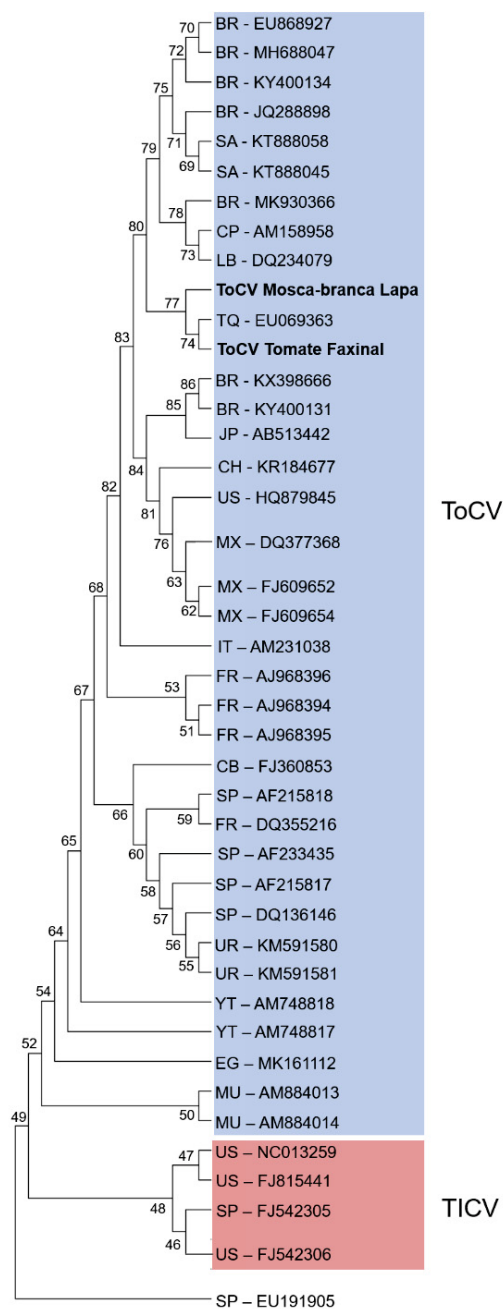
<sup>a</sup> Número de amostras positivas / número de amostras coletadas

TABELA 2. DETECÇÃO DE BEGOMOVÍRUS, CRINIVÍRUS, PVX, PVS, PVY E PLRV EM PLANTAS DE BATATA E IDENTIFICAÇÃO DE MOSCA BRANCA COLETADAS EM MUNICÍPIOS DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.

Ano	Município	Cultivar	Batata						Mosca-branca		
			Begomovirus <sup>a</sup>	Crinivirus <sup>a</sup>	PVX / PVS <sup>a</sup>	PVY <sup>a</sup>	PLRV <sup>a</sup>	PVY + PLRV <sup>a</sup>	Espécie de mosca-branca	Begomovirus <sup>a</sup>	Crinivirus <sup>a</sup>
15/05/15	Araucária - Campo 1	Ágata	0/10	0/10	0/10	0/5	0/5	0/5	-	-	-
13/11/17	Araucária – Campo 2	Delta	0/25	0/25	0/5	0/5	0/5	0/5	-	-	-
	Araucária – Campo 3	Asterix	0/12	0/12	0/3	0/3	0/3	0/3	-	-	-
15/05/18	Araucária – Campo 4	Ágata	0/25	0/25	0/10	0/10	0/10	0/10	-	-	-
15/05/18	Araucária – Campo 5	ni	0/16	0/16	0/16	3/16	0/16	0/16	-	-	-
15/05/18	Araucária – Campo 6	Ágata	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	-	-	-
30/03/18	Campo do Tenente	Ágata	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	-	-	-
11/11/15	Campo Largo – Campo 1	Panda	0/15	0/15	0/6	0/6	0/6	0/6	-	-	-
	Campo Largo – Campo 2	Ágata	0/22	0/22	0/12	2/12	3/12	1/12	-	-	-
13/11/15	Castro	Atlantic	0/16	0/16	0/0	0/0	0/0	0/0	-	-	-
06/11/15	Contenda – Campo 1	Ágata	0/37	0/37	0/12	0/12	0/12	0/12	-	-	-
31/10/18	Contenda – Campo 2	Panda	0/13	0/13	0/13	2/13	4/13	2/13	-	-	-
30/09/15	Lapa	Ágata	0/25	0/25	0/25	1/25	4/25	1/25	-	-	-
30/09/15	São Mateus do Sul	ni	0/5	0/5	-	-	-	-	-	-	-
22/03/18	Palmeira*	Ágata	0/13	0/13	0/0	0/0	0/0	0/0	B. tabaci MEAM 1	0/1	0/1
			<b>0/243</b>	<b>0/243</b>	<b>0/111</b>	<b>8/111</b>	<b>12/111</b>	<b>4/111</b>		<b>0/1</b>	<b>0/1</b>

<sup>a</sup> Número de amostras positivas / número de amostras coletadas

FIGURA 6 - ÁRVORE DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA DE UM ALINHAMENTO DE DUAS SEQUÊNCIAS PARCIAIS DA REGIÃO GENE *HEAT SHOCK PROTEIN* (HSP 70H) DE TOMATO CHLOROSIS VIRUS DO PARANÁ, BRASIL, CONSTRUÍDAS COM O MODELO EVOLUTIVO T92+I E BOOTSTRAP DE 1000 REPETIÇÕES. O GRUPO EXTERNO É O *BEAN YELLOW DISORDER VIRUS* (BNYDV). AS LETRAS QUE ANTECEDEM O CÓDIGO DO GENBANK SÃO REFERENTES AOS PAÍSES ONDE OS ACESSOS FORAM IDENTIFICADOS. BR, BRASIL; SA, ARÁBIA SAUDITA; CP, CHIPRE; LB, LÍBANO; TQ, TURQUIA; JP, JAPÃO; CH, CHINA; US, ESTADOS UNIDOS; MX, MÉXICO; IT, ITÁLIA; FR, FRANÇA; CB, CUBA; SP, ESPANHA; UR, URUGUAI; YT, MAYOTTE; EG, EGITO; MU, ILHA MAURÍCIO.



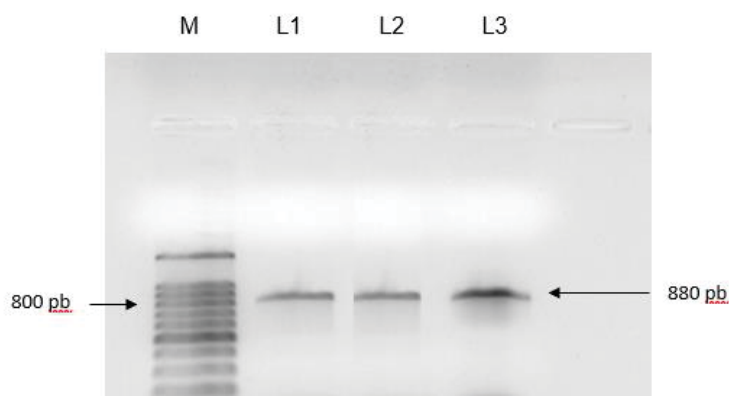


#### 4.3 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIE DE MOSCA-BRANCA

A identificação molecular de moscas-brancas por PCR demonstrou que a espécie presente nos campos de tomate dos municípios de Araucária, Campo do Tenente, Contenda e Lapa em 2018 foi *B. tabaci*, sendo possível observar amplificação do fragmento 820 pb referente ao gene *mtCOI* em todas as amostras (Figura 7). *B. tabaci* também foi a espécie identificada de mosca-branca nos campos de batata do município de Palmeira em 2018.

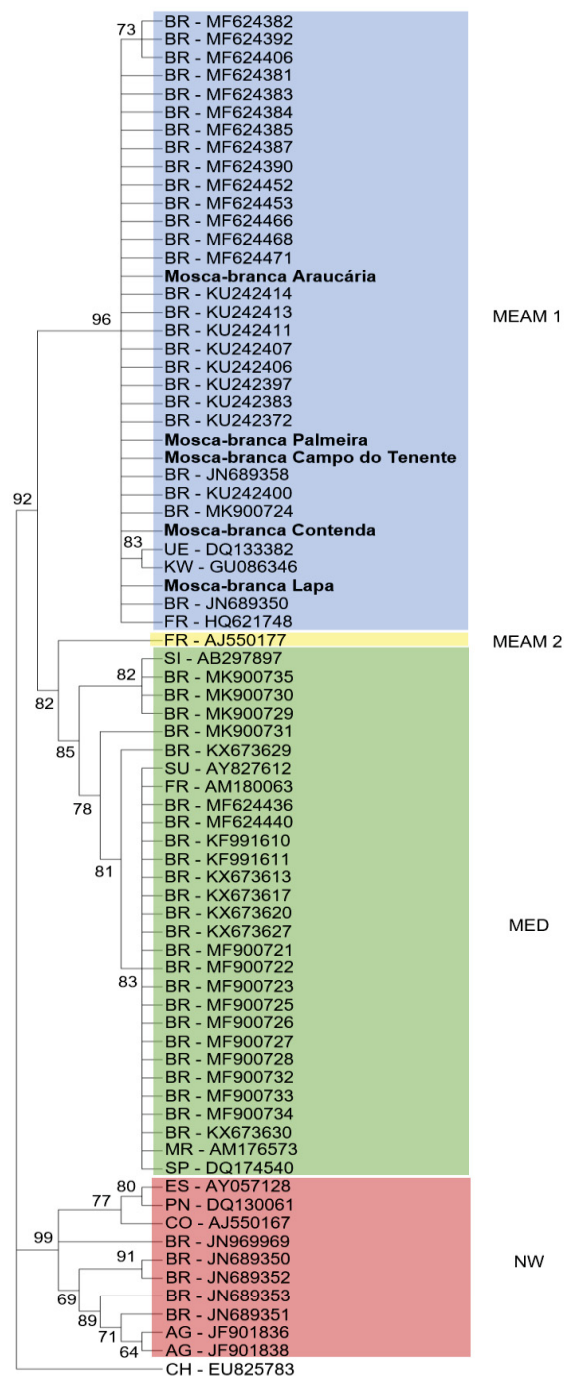
A comparação das sequências de nucleotídeos obtidas a partir dos fragmentos amplificados do gene *mtCOI* das moscas-brancas apresentaram 100% de identidade com sequências de *B. tabaci* disponíveis no GenBank (MN809809, MN809653, MN952582, KR559508, MK908132 e MH613866), confirmando ser essa a espécie presente nos campos de tomate e batata avaliados no estado do Paraná. Pela análise filogenética foi possível observar que as cinco populações provenientes de Araucária (áreas 1 e 2), Palmeira, Campo do Tenente, Lapa e Contenda, formaram um grupo monofilético com *B. tabaci* Middle East-Asia Minor (MEAM 1, antigo biótipo B), com probabilidade de 96% para a formação desse clado, demonstrando ser a espécie que ocorre nas regiões estudadas (Figura 8).

FIFURA 7 - PADRÃO ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE (1%) DE PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE DAS MOSCAS-BRANCAS COLETADAS NOS CAMPOS DE PRODUÇÃO DE TOMATE E BATATA DO ESTADO DO PARANA



**M**, Marcador molecular 100 pb Sinapse; **L1**, **L2** e **L3**; amostras testadas: notar amostras apresentam fragmento de 820 pares de base (pb) indicando a espécie *Bemisia tabaci*.

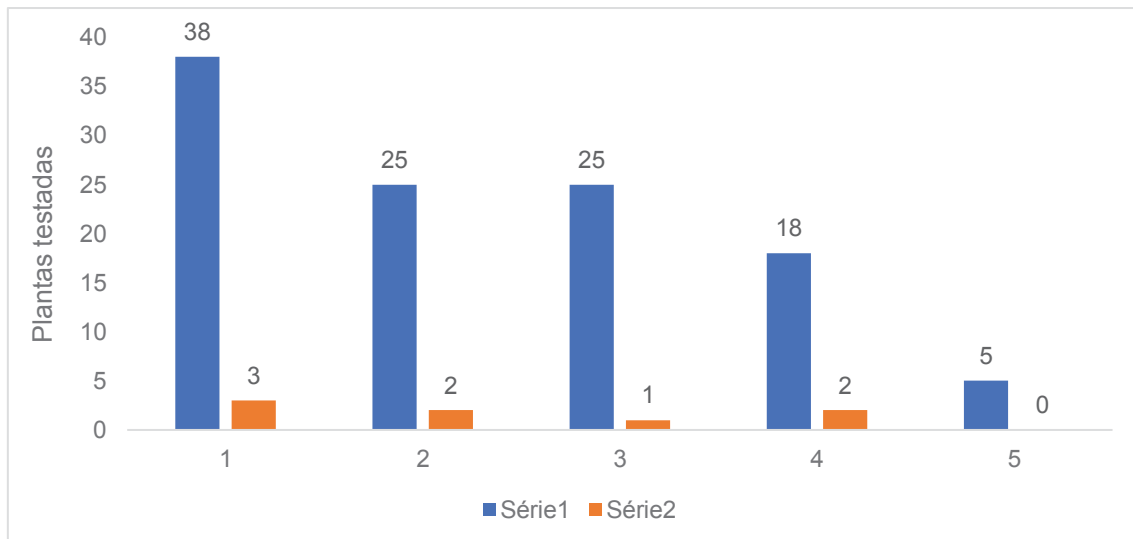
FIGURA 8 - ÁVORE DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA DE UM ALINHAMENTO DE CINCO SEQUÊNCIAS DA REGIÃO GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE I (MTCOI) DE MOSCAS-BRANCAS DE 5 MUNICÍPIOS DO PARANÁ, CONSTRUÍDA COM O MODELO EVOLUTIVO TN93+G E BOOTSTRAP DE 1000 REPETIÇÕES. O GRUPO EXTERNO É A *BEMISIA AFER*. AS LETRAS QUE ANTECEDEM O CÓDIGO DO GENBANK SÃO REFERENTES AOS PAÍSES ONDE OS ACESSOS FORAM IDENTIFICADOS. BR, BRASIL; UE, EMIRADOS ÁRABES; KW, KUWAIT; FR, FRANÇA; SI, SÍRIA; SU, SUDÃO; MR, MARROCOS; SP, ESPANHA; ES, EL SALVADOR; PN, PANAMÁ; CO, COLÔMBIA; AG, ARGENTINA; CH, CHINA.



#### 4.4 TESTES SOROLÓGICOS

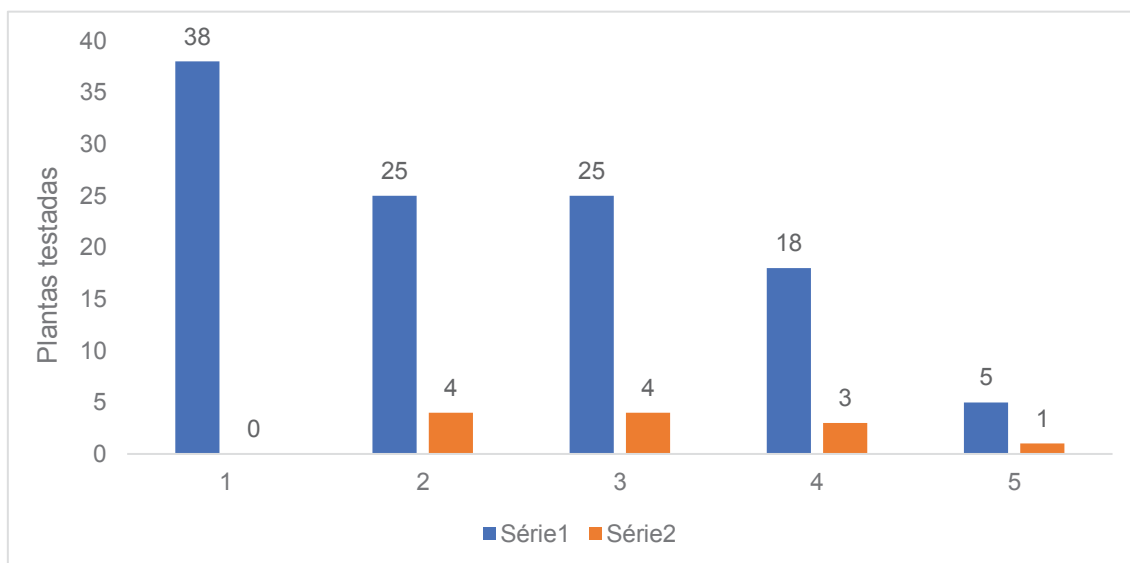
Como complemento ao trabalho, análises sorológicas foram realizadas a fim de diagnosticar a presença de outros vírus endêmicos na cultura da batata como PLRV e PVY, e outros que ocorrem de forma esporádica como PVX e PVS, já que nenhuma planta apresentou reação positiva para *Begomovirus* e *Crinivirus*. A detecção de PVX, PVS, PVY e PLRV por DAS-ELISA em parte das plantas de batata demonstrou que das 111 amostras analisadas, 8 apresentaram reação positiva para PVY, correspondendo a 7,2% das plantas (Figura 9), e 12 apresentaram reação positiva para PLRV, o que representa 10,5% das plantas analisadas (Figura 10). Tanto o PVY quanto o PLRV estavam presentes nos municípios de Campo Largo, Contenda e Lapa. De fato, a infecção mista por ambos os vírus foi detectada em quatro plantas, correspondendo a 3,6%. Nenhuma amostra apresentou reação positiva para PVX e PVS.

FIGURA 9 - DAS-ELISA DE PLANTAS DE BATATA UTILIZANDO ANTISSORO PARA DETECÇÃO DE *POTATO VIRUS Y* (PVY), DILUIÇÃO (1:200).



FONTE: O autor

FIGURA 10 - DAS-ELISA DE PLANTAS DE BATATA UTILIZANDO ANTISSORO PARA DETECÇÃO DE *POTATO LEAFROLL VIRUS* (PLRV), DILUIÇÃO (1:200).



FONTE: O autor (2020)

## 5 DISCUSSÃO

Nesse estudo a ocorrência de *Begomovirus* e *Crinivirus* na cultura da batata foi zero, mesmo em anos em que se observou alta infestação da mosca-branca. Resultado semelhante foi relatado em um levantamento de realizado nas regiões sudeste e centro-oeste do Brasil, onde não foi detectada presença de quatro espécies de begomovírus que ocorrem no país ToSRV, ToCmMV, ToMoLCV e ToYVV, e nem do crinivírus ToCV em amostra de batata proveniente do Estado do Paraná (MITUTI et al. 2019). De fato, a ocorrência de begomovírus em batateira tem se mostrado baixa sendo, até o momento, somente duas espécies relatadas na cultura, o ToSRV e o *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (FILHO; LIMA, 2016; KREUZE et al. 2020). Como ambas espécies infectam primariamente o tomateiro, acredita-se que ciclos de cultivo sobrepostos de tomate e batata, combinados com condições climáticas favoráveis e a proximidade frequente entre as áreas de plantio, fizeram com que os vírus de tomate migrassem para a cultura da batata (INOUE-NAGATA et al. 2016; KREUZE et al. 2020). Considerando que os begomovírus e o ToCV são vírus

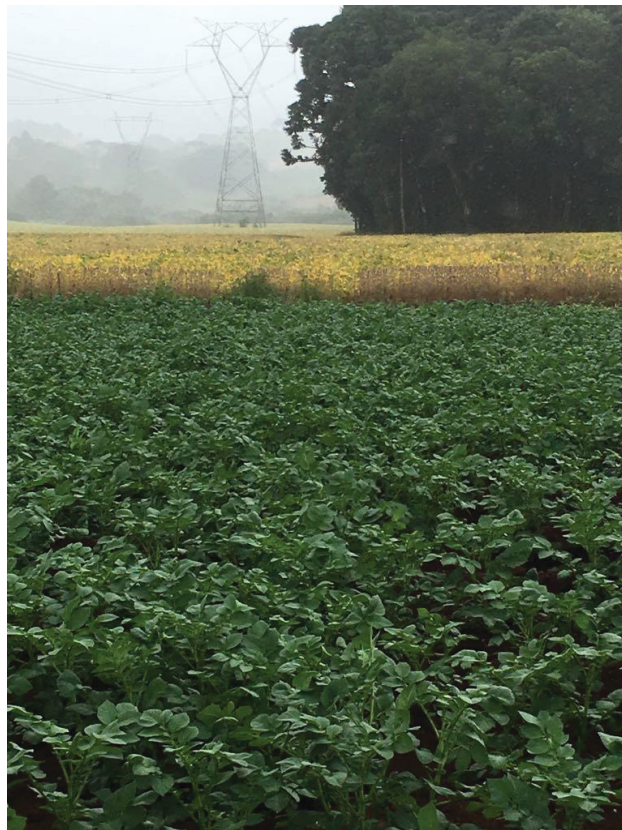
transmitidos por mosca-branca e que altas populações do inseto vetor tem sido observada com frequência na cultura da batata (FILHO; LIMA, 2016), levantamentos periódicos desses vírus são indicados para que se monitore a ocorrência nos campos de produção. Além disso, como se trata de uma cultura propagada vegetativamente, deve-se haver atenção para produção de batata semente livre de vírus, já que tanto os begomovírus como o ToCV podem transcolar para os tubérculos ocorrendo assim disseminação dos patógenos para novas áreas (FILHO; LIMA 2016; FORTES & NAVAS-CASTILLO, 2012).

A não constatação do begomovírus nas regiões avaliadas pode estar ligada à ausência do vetor (*Bemisia tabaci*) na maioria das áreas visitadas no primeiro ano e ao uso de batata-semente de boa qualidade. Um estudo sobre a transmissão do begomovírus por batata-semente mostrou que mais de 80% das plantas oriundas de tubérculos de plantas com mosaico, apresentaram sintomas de 30 a 40 dias após o plantio, sendo a presença do vírus constatada por PCR, (FILHO; LIMA, 2016). Portanto, quando os produtores utilizam batata-semente de boa qualidade, as infecções no campo ocorrem devido à presença do inseto vetor, sendo este responsável pela disseminação do patógeno no campo.

Os campos de tomate localizados próximos à região metropolitana de Curitiba dos municípios de Araucária, Campo do Tenente, Campo Largo, Contenda, Morretes e Lapa caracterizavam-se por serem pequenas áreas, pouco tecnificadas, com até 4 mil plantas e cultivadas a céu aberto. Em Araucária, apesar da alta infestação por mosca-branca, poucas plantas de tomate apresentavam sintomas. Na mesma área havia cultivos de batata, soja e feijão implantados ao lado do campo de tomate que podem ter favorecido o aumento populacional do vetor por serem plantas hospedeiras da mosca-branca (Figura 11). Além disso, a soja e o feijoeiro comum também podem atuar como potenciais hospedeiros amplificadores assintomáticos do ToSRV para tomateiro no campo, favorecendo tanto o aumento do vírus quanto do vetor (BERGAMIN FILHO et al. 2020), no entanto, nesse estudo, nenhuma planta de tomate e mosca-branca coletadas apresentaram resultados positivos para *Begomovirus*. De fato, atualmente, o controle de begomovirose em tomatario é baseado na utilização de cultivares resistentes e em aplicações frequentes de inseticida para o controle do vetor (INOUE-NAGATA et al. 2016), uma vez que o mecanismo de disseminação do vírus é através da dispersão primária, sendo o influxo de

moscas-brancas virulíferas vindas de fontes de inóculo externas a principal causa da epidemia (MACEDO et al. 2019). Portanto, o uso de inseticida pelos produtores das áreas visitadas como uma prática frequente, associado ao fato de uma provável ausência de fontes de inóculos externos do vírus aos campos de produção (hospedeiros alternativos) podem ter levado a ausência de *Begomovirus* nos campos de tomate visitados nesse estudo. É importante ressaltar que a cultura da batata é acometida por diversos gêneros virais, dentre eles os *Potyvirus*, *Polerovirus*, entre outros, sendo muitas vezes os sintomas exibidos pelas plantas confundidos com os causados por outras espécies virais, como pode ter sido o caso dos sintomas apresentados pelas amostras de batata coletadas nos campos visitados neste trabalho.

FIGURA 11 - CULTIVO DE BATATA AO LADO DE PLANTIO DE SOJA FAVORECENDO A MANUTENÇÃO DA MOSCA-BRANCA NO CAMPO - ARAUCÁRIA/PR



FONTE: Renata Faier Calegario (2017).

Em Faxinal as propriedades caracterizavam-se por apresentarem áreas maiores e alto grau de tecnificação, elevado número de plantas, estufas do tipo Londrina, relevo predominantemente plano e temperatura média de 30°C. Foi constatada elevada infestação por moscas-brancas e presença de plantas tomate com sintomas de clorose internerval nas folhas baixas, constatando-se 14 amostras positivas por RT-PCR para crinivírus, confirmando a presença do ToCV. Nessa região, além da presença do inseto vetor nas áreas, observou-se a prática de escalonamento de plantio com plantas em diferentes estágios de desenvolvimento, o que favorece a manutenção tanto do inóculo quanto do vetor no campo, sendo uma prática de cultivo inadequada para o manejo adequado da doença.

A presença do vírus nessa importante região produtora do país já era esperada, visto que a virose está se disseminando rapidamente por diversos estados brasileiros. O ToCV já foi constatado em plantios nos Estados do Rio de Janeiro, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Distrito Federal, (BARBOSA et al., 2011; MACEDO et al., 2014). Em um levantamento realizado 2008 até 2011, amostras de tomate provenientes de vários estados brasileiros, incluindo o Paraná foram analisadas para a presença de doenças virais (QUEZADO-DUVAL et al., 2013). Nesse estudo, três lavouras de tomate do segmento mesa do município de Faxinal e uma em Marilândia do Sul apresentaram alto nível de infecção por *Begomovirus*, com predominância da espécie TSRV, e crescente incidência de plantas infectadas por *Crinivirus* da espécie *Tomato chlorosis virus*. Outro levantamento de viroses em tomateiro realizado em 2017 no Brasil, 380 plantas de tomate foram testadas para o ToCV e 66 amostras apresentaram reação positiva para a doença, sendo 28 oriundas do Estado do Paraná (RIZO et al., 2017).

Uma hipótese para a presença do ToCV na mosca-branca coletada em tomateiro na região da Lapa e ausência nas plantas de tomate nessa região é devido ao tipo de relacionamento semi-persistente entre crinivírus-vetor aliada ao manejo de pulverização de inseticida realizado pelo produtor da área estudada. Na transmissão de crinivírus, a mosca-branca pode transmitir o vírus após um curto período de alimentação. O período de aquisição do vírus é curto e logo após a aquisição a mosca-branca já pode transmitir o vírus ao se alimentar de uma planta sadia. Na transmissão do tipo semi-persistente, a picada de prova

não é suficiente para a mosca-branca adquirir o vírus e nem para transmitir o mesmo. Além disso, o inseto pode perder a capacidade de transmitir o ToCV se não se alimentar novamente em uma planta infectada (FILHO; LIMA, 2016). É importante ressaltar que no dia da coleta o produtor havia realizado pulverização de inseticida e, provavelmente, o vetor não teve tempo suficiente para realizar a picada de alimentação para realizar a transmissão do vírus para as plantas saudáveis, não conseguindo torná-las virulíferas. Outra hipótese é a disseminação da mosca-branca. As moscas-brancas se deslocam por longas distâncias carregadas por correntes de vento, realizando voos altos durante a colonização de novas áreas e voos baixos dentro dos cultivos, se deslocando entre áreas em revoadas oriundas de cultivos vizinhos (FILHO; INOUE-NAGATA, 2015). Pode ser que essa população virulífera tenha vindo de algum outro cultivo ou de plantas daninhas que estejam mantendo o vírus no campo, assim como ocorre com os begomovírus.

A mosca-branca identificada nas regiões estudadas foi do tipo Middle East-Asia Minor (MEAM 1, biótipo B), com uma probabilidade de 96% para a formação desse clado. Esse resultado corrobora com outros dados obtidos em trabalhos semelhantes que indicam a predominância desse biótipo no Estado do Paraná (QUEZADO-DUVAL et al., 2013).

As análises sorológicas realizadas para diagnosticar outros vírus causadores de sintomas semelhantes na cultura da batata, já que nenhuma planta apresentou reação positiva para *Begomovirus* e *Crinivirus*, mostraram presença de PVY e PLRV. Souza em 2012 ao analisar por PCR 273 amostras de batata coletadas em campos de produção no Rio Grande do Sul para presença de begomovírus, também obteve reação negativa para todas as amostras. Baseado nesse resultado, a autora realizou análises sorológicas para as quatro viroses da cultura que ocorrem com mais frequência no Brasil, PVS, PVX, PLRV e PVY, sendo as duas últimas as que predominam nos campos de produção. Os resultados obtidos corroboram com a literatura que cita PLRV e PVY como as mais frequentes da cultura. Estudos recentes mostram que ocorreu uma inversão, onde o PVY superou o PLRV em relevância na cultura da batata e que as perdas causadas por essas viroses podem chegar a 80%. Essa mudança de PLRV para PVY se deve a conscientização dos produtores no reconhecimento da virose no campo, bem como a introdução de batata semente



importada que fez com que o PVY fosse o grande responsável pela degenerescência clonal dos tubérculos (KREUZE; JEEVALATHA; FIGUEIRA, 2020).

Diante desses resultados podemos afirmar a forte necessidade do manejo adequado da mosca-branca, devido ao seu alto potencial de transmissão de viroses que podem causar prejuízos enormes aos produtores. A utilização de sementes e materiais propagativos de boa qualidade, proporcionam a garantia de um bom estabelecimento da cultura no campo, seguido pelo manejo adequado do inseto vetor, bem como introduzir no sistema a rotação de cultivos não hospedeiros da praga e das viroses.

## 6 CONCLUSÕES

Não foi encontrada a presença de *Begomovirus* nas amostras de batata, tomate e moscas-brancas coletadas nos municípios de Araucária, Campo Largo, Campo do Tenente, Contenda, Lapa, Castro, Palmeira, Reserva e Faxinal. A provável explicação é que as moscas-brancas não estavam virulífera nas áreas visitadas, uso de batata-semente e tomate de boa qualidade por parte dos produtores e falta de hospedeiros virulíferos.

A presença de *Crinivirus* em amostras de plantas de tomate de Faxinal e de mosca-branca na Lapa, mostram o potencial dessa virose em ser disseminada à cultura.

Os isolados do ToCV Faxinal e ToCV Mosca-branca Lapa apresentaram 100% de identidade de sequências de nucleotídeos com os isolados de ToCV disponíveis no GenBank (MN172420, LC342730, MG813910, MF278017, KY679885, KY679890);

As viroses observadas nos municípios de Araucária, Campo Largo, Contenda, Lapa e Campo do Tenente foram predominantemente a ocorrência endêmica na cultura da batata, PVY e PLRV, ocorrendo inclusive em infecções mistas;

A espécie de mosca-branca que ocorre nas regiões estudadas de Palmeira, Araucária, Campo do Tenente, Lapa e Contenda é *Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor (MEAM 1, biótipo B).

## REFERÊNCIAS

ALBERGARIA, N. M. M. S.; CIVIDANES, F. J. ECOLOGY , BEHAVIOR AND BIONOMICS Exigências Térmicas de Bemisia tabaci ( Genn .) Biótipo B ( Hemiptera : Aleyrodidae ). **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 3, p. 359–363, 2002.

ALBUQUERQUE, L. C.; MARTIN, D. P. Characterization of tomato yellow vein streak virus , a begomovirus from Brazil. **Virus Genes**, p. 140–147, 2010.

AVILA, A. C.; DE MELO, P. E.; LEITE, L. R.; INOUE-NAGATA, A. K. Ocorrência de vírus em batata em sete estados do Brasil. **Horticultura Brasileira.**, Brasília , v. 27, n. 4, p. 490-497, 2009 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-05362009000400015&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362009000400015&lng=pt&nrm=iso)>.

BARBOSA, J. C.: TEIXEIRA, A.: MOREIRA, A. G.: CAMARGO, L.: FILHO, A. B.: KITAJIMA, E. W.: & REZENDE, J. First Report of Tomato chlorosis virus Infecting Tomato Crops in Brazil. **Plant disease**, v. 92, n. 12, p. 1709, 2008.

BARBOSA, J. C.; COSTA, H.; GIORIA, R.; REZENDE, J. A. M. Occurrence of Tomato chlorosis virus in tomato crops in five Brazilian states. **Tropical Plant Pathology.**, Brasília , v. 36, n. 4, p. 256-258, 2011.

BARBOSA, L. DA F. et al. Indigenous American species of the *Bemisia tabaci* complex are still widespread in the Americas. **Pest Management Science**, v. 70, n. 10, p. 1440–1445, 2014.

BROWN, J.K.: ZERBINI, F.M.: NAVAS-CASTILLO, J. et al. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. **Arch Virol** 160, p. 1593–1619, 2015.

DA FONSECA BARBOSA, L.: YUKI, V. A.: MARUBAYASHI, J. M.: DE MARCHI, B. R.: PERINI, F. L.: PAVAN, M. A.: DE BARROS, D. R.: GHANIM, M.:

MORIONES, E.: NAVAS-CASTILLO, J.: & KRAUSE-SAKATE, R. First report of *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. **Pest management science**, 71(4), 501-504, 2017.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*. 9(8):772.

DE MORAES, L. A., MARUBAYASHI, J. M.: YUKY, V. A.: GHANIM, M.: BELLO, V. H.: DE MARCHI, B. R.: DA FONSECA BARBOSA, L.: BOYKIN, L. M.: KRAUSE-SAKATE, R.: PAVAN, M. A. New invasion of *Bemisia tabaci* Mediterranean species in Brazil associated to ornamental plants. **Phytoparasitica**, v. 45, n. 4, p. 517–525, 2017.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 1, 13-15, 1991.

DOVAS, C. I.; KATIS, N. I.; AVGELIS, A. D. Multiplex Detection of Criniviruses Associated with Epidemics of a Yellowing Disease of Tomato in Greece. **Plant Disease**, v. 86, n. 12, p. 1345–1349, 2002.

FIALLO-OLIVÉ, E., PAN, LL., LIU, SS.. Transmission of begomoviruses and other whitefly-borne viruses : **Phytopathology**, p. 1–35, 2019.

FILHO, M. M.; INOUE-NAGATA, A. K. Guia para o Reconhecimento e Manejo da Mosca-branca, da Geminivirose e da Crinivirose na Cultura do Tomateiro. **Circular Técnica** v. 142, p. 1-15, , Embrapa Brasília, 2015.

FILHO, M. M.; LIMA, M. F. Manejo da mosca-branca, de geminivírus e crinivírus na cultura da batata. **Comunicado Técnico**, v. 113, p. 1–12, ISSN 1414-9850, Embrapa Brasília, 2016.

FREITAS, D. M. S. Tomato severe rugose virus (ToSRV) e Tomato chlorosis virus (ToCV): relações com a *Bemisia tabaci* biótipo B e eficiência de um inseticida no controle da transmissão do ToSRV p. 87–95, 2012. Tese

(Doutorado em Fitopatologia) - Setor de Ciências Agrárias, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba (SP), 2012. Disponível em: <https://DOI10.11606/T.11.2012.tde-25102012-083603>.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biol.** v. 52:696–704.

GOFFAU, M. DE; HILMI, M.; DAM, B. VAN. A cultura do tomate. **Fundação Agromisa e CTA, Wageningen**, v. 10, p.10-11, 2006.

HALL, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

INOUE-NAGATA, A. K.; LIMA, M. F.; GILBERTSON, R. L. A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 8–18, 2016.

JAVIER, F. et al. Cultura da Batata : Pragas e Doenças. **Instituto Biológico**, São Paulo, p.95-114, 2017.

KATOH, K. and STANDLEY, D.M. MAFFT- Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 772-780, 2013.

KREUZE, J.F.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; JEEVALATHA, A.; FIGUEIRA, A.R.; VALKONEN, J.P.T.; JONES, R.A.C. 2020. Viral diseases in potato. In: Campos H., Ortiz O. (eds) *The Potato Crop. Its agricultural, nutritional and social contribution to humankind*. Cham (Switzerland). **Springer, Cham**. pp. 389-430.

LOPES, C. A.; BUSO, J. A.A cultura da batata. **Embrapa Brasília**, p. 9-56, 1999.

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. Doenças do tomateiro. **Embrapa Hortaliças**. Brasília, 2005.

LOURENÇÃO, A. L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de Bemisia tabaci no estado de São Paulo. **Bragantia**, v. 53, n. 1, p. 53–59, 1994.

MACEDO, Mônica A. et al . 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**, Brasília , v. 39, n. 6, p. 449-452, 2014 .

MACEDO, M.A.: ALBUQUERQUE, L.C.: MALIANO, M,R,: et al. Characterization of Tomato leaf curl purple vein virus, a new monopartite New World begomovirus infecting tomato in Northeast Brazil. **Arch Virol** 163, 737–743, 2018.

MACEDO, M.A., INOUE-NAGATA, A.K., SILVA, T.N.Z., FREITAS, D.M.S., REZENDE, J.A.M., MICHEREFF FILHO, M., NASCIMENTO, A.R., LOURENÇÃO, A.L. AND BERGAMIN FILHO, A. Temporal and spatial progress of the diseases caused by the crinivirus Tomato chlorosis virus and the begomovirus Tomato severe rugose virus in tomatoes in Brazil. *Plant Pathol.* 68, 72– 84. 2019.

MILLER, D., HANNON, C., GANETZKY, B. A mutation in Drosophila Aldolase Causes Temperature-Sensitive Paralysis, Shortened Lifespan, and Neurodegeneration. **J. Neurogenet.** 26(3-4): 317--327 2012.

MITUTI, Tatiana; MOURA, Mônica F; MACEDO, Mônica Alves de; et al. Survey of begomoviruses and the crinivirus, tomato chlorosis virus, in solanaceous in Southeast/Midwest of Brazil. *Tropical Plant Pathology*, Heidelberg, **Springer Nature**, v. 44, n. 5, p. 468-472, 2019.

NAVAS-CASTILLO, J., FIALLO-OLIVÉ, E., SÁNCHEZ-CAMPOS, S. Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 219-248, 2011.

ORFANIDOU, C. G., PAPPIS, P. G.: EFTHIMIOU, K. E.: KATIS, N. I.: MALIOGKA. Transmission of Tomato chlorosis virus (ToCV) by Bemisia tabaci biotype Q and evaluation of four weed species as viral sources. **Plant Disease**, Greece, v. 100, p. 2043–2049, 2016.

QUEZADO-DUVAL, A.M., INOUE-NAGATA, A.K., REIS, A., PINHEIRO, J.B., LOPES, C.A., ARAÚJO, E.R., FONTENELLE, M.R.; COSTA, J.R., GUIMARÃES, C.M.N., ROSSATO, M., BECKER, W.F., COSTA, H., FERREIRA, M.A.S.V. & DESTÉFANO, S.A.L. 2013. Levantamento de doenças e mosca-branca em tomateiro em regiões produtoras no Brasil. Concórdia: **Embrapa Hortaliças**, Brasília – DF, 36 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 100).

RIZO, A. A. I., COELHO, L. M.: FREITAS, D. D.: MOTA, H. B.: ALBUQUERQUE, L. C.. Detecção de viroses e diversidade genética de Tomato chlorosis virus em tomateiro do Brasil. Congresso Estadual de Iniciação Científica e Tecnológica do IF Goiano, 6., 2017, Uruaçu, GO.

ROJAS, M. Use of Degenerate Primers in the Polymerase Chain Reaction to Detect Whitefly-Transmitted Geminiviruses. **Plant Disease**. 77. 340. 10.1094/PD-77-0340 1993.

ROJAS, M. R., MACEDO, M. A., MALIANO, M. R., SOTO-AGUILAR, M., SOUZA, J. O., BRIDDON, R. W., et al. World management of geminiviruses. **Annual Review Phytopathology**. 56, 637–677, 2018.

ROSEN, R.; KANAKALA, S.; KLIOT, A.; PAKKIANATHAN, B. C.; FARICH, B. A.; SANTANA-MAGAL, N.; ELIMELECH, M.; KONTSEDALOV, S.; LEBEDEV, G.; CILIA, M.;GHANIM, M. Persistent, circulative transmission of begomoviruses by whitefly vectors. **Current Opinion in Virology**. v. 15, p. 1-8, 2015.

SEAB – SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. Olericultura - Análise da Conjuntura Agropecuária. DERAL – Departamento de Economia Rural, 2018.

SIMON, C., FRATI, F., BECKENBACH A., CRESPI B., LIU H., FLOOK , P. Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n. 6, p. 651–701, 1994.

SUKUMARAN, JEET & HOLDER, MARK. (2010). DendroPy: A Python Library for Phylogenetic Computing. *Bioinformatics* (Oxford, England). 26. 1569-71. 10.1093/bioinformatics/btq228.

SOUZA-DIAS JAC; SAWAZAKI HE; PERNAMBUCO-Fo PCA.; ELIAS LM; MALUF H. (2008). Tomato severe rugose virus: Another Begomovirus Causing Leaf Deformation and Mosaic Symptoms on Potato in Brazil. **Plant Disease** 92:487.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A. AND KUMAR, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729.

VAGHI MEDINA, C. G.: TEPPA, E.: BORNANCINI, V. A.: FLORES, C. R.: MARINO-BUSLJE, C.: LAMBERTINI, P. M. L. Tomato apical leaf curl virus: A novel, monopartite geminivirus detected in tomatoes in Argentina. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, , p. 1–11, 2018.

VILLAS BÔAS, G. L.; FRANÇA, F. H.; MACEDO, N. Potencial biótico da mosca-branca *Bemisia argentifolii* a diferentes plantas hospedeiras. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 71–79, 2002.

WINTERMANTEL, W. M.; WISLER, G. C. Vector specificity, host range, and genetic diversity of Tomato chlorosis virus. **Plant Disease**, v. 90, n. 6, p. 814–819, 2006.

WISLER, G.C.: Li, R.H.: Liu, H.Y.: Lowry, D.S.: Duffus, J.E.: Tomato chlorosis virus: a new whitefly-transmitted, Phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. **Phytopathology**. v 88, n. 5, p. 402-409, May, 1998.

ZWICKL, D. Genetic Algorithm Approaches for the Phylogenetic Analysis of Large Biological Sequence Datasets Under the Maximum Likelihood Criterion, 2006.