**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

***Tomato chlorosis virus*: purificação, produção de antissoro, reação
de genótipos e avaliação de danos em batateira**

Luiz Rafael Pinto

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2017**

Luiz Rafael Pinto
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

***Tomato chlorosis virus*: purificação, produção de antissoro, reação de
genótipos e avaliação de danos em batateira**

Orientador:
Prof. Dr. **ARMANDO BERGAMIN FILHO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Pinto, Luiz Rafael

Tomato chlorosis virus: purificação, produção de antissoro, reação de genótipos e avaliação de danos em batateira / Luiz Rafael Pinto. - - Piracicaba, 2017.

68 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Solanum tuberosum* 2. Crinivirus 3. Antissoro policlonal 4. Dot-blot I.
Título

“Aos meus pais Otavio Carlos Pinto e Sonia Maria Brandolise Pinto e aos meus avós Octavio de Lezier Brandolise (*in memorian*) e Hedwiges Pietrobon Brandolise, pelo amor, carinho, confiança e incentivo”

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Armando Bergamin Filho pela oportunidade e orientação.

Ao Prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende e à Dra. Daiana Bampi pela colaboração.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia pelos ensinamentos.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da qual tanto gosto, pela oportunidade de me graduar e cursar a pós-graduação.

Ao Eng. Agr. Pedro Hayashi pelo fornecimento dos tubérculos sementes de batata.

Aos amigos Ana Laura Rodrigues Silva, Andressa Monteiro Venturini e Jaime Passarini Junior pela amizade desde o período de graduação.

Aos amigos do Laboratório de Epidemiologia Alice Landim, André Bueno Gama, Antônio Fernandes Nogueira, Bárbara Navarro, Bruna Momesso, Evelyn Yumi Shirado, Gabriel Chitolina, Guilherme Frare, Isabela Primiano, Josi Hüffner Arruda, Juan Edwards Molina, Juliana Baggio, Kelly Pazolini, Meiriele Pires de Camargo, Rafaela Zázera, Renan Fernandes e Ricardo Feliciano dos Santos pelo convívio, ajuda, amizade e churrascos.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Arnaldo Esquivel Fariña, Daiana Bampi, David Spadotti, Gabriel Favara, Heron Kraide, Rodrigo Toloy, Talita Zocca Silva, Tatiana Mituti, Vanessa Cícera e Viviana Camelo Garcia pela amizade, ajuda e churrascos.

Aos demais colegas do Departamento pela amizade.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

À FAPESP pela ajuda financeira ao projeto temático ao qual o meu está incluso.

Aos funcionários do Departamento Fabiana Nunes Wolak, Iraides Soares, José Rodolfo Groppo, Liliane de Diana Teixeira, Maria Heloisa Duarte de Moraes, Pedro Arthuso, Renato Barbosa Salaroli e Silvia de Afonseca Lourenço.

E finalmente à minha família, meus pais, minha avó, tios Luís Tarciso, Rose, Celso, Sérgio, Simone e meus primos Vinicius, Ana Flávia, Stella e Pedro.

"Uma pessoa que nunca cometeu um erro nunca tentou nada de novo."

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 A batateira	13
2.2 O <i>Tomato chlorosis virus</i>	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Purificação do vírus	19
3.2 Produção do antissoro	20
3.3 Teste do antissoro	20
3.3.1 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	20
3.3.2 Dot-blot.....	21
3.4 Inoculação de plantas de batateira com o ToCV	22
3.5 Detecção do ToCV	23
3.5.1 Extração de RNA total	23
3.5.2 RT-PCR.....	23
3.5.3 Purificação de amplicons e sequenciamento de nucleotídeos	24
3.6 qRT-PCR.....	24
3.7 Reação de genótipos de batateira ao ToCV	25
3.8 Medidas de trocas gasosas	26
3.9 Avaliação de danos provocados pelo ToCV em batateira	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Purificação e produção antissoro	29
4.2 Teste do antissoro	30
4.2.1 PTA-ELISA	30
4.2.2 Dot-blot.....	31
4.3 Reação de genótipos de batateira à infecção com o ToCV	37
4.4 Medidas de trocas gasosas	42
4.5 Danos provocados pelo ToCV em batateira	45
4.5.1 Primeiro experimento	45
4.5.2 Segundo experimento	48
4.6 Identidade do isolado do <i>Tomato chlorosis virus</i>	53

5 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE	65

RESUMO

***Tomato chlorosis virus*: purificação, produção de antissoro, reação de genótipos e avaliação de danos em batateira**

O *Tomato chlorosis virus* (ToCV) é uma espécie do gênero *Crinivirus* que causa danos, principalmente na cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum*). Foi primeiramente isolado e descrito em 1998, nos Estados Unidos, e em seguida foi reportado em doze países. No Brasil, foi constatado primeiramente no Estado de São Paulo, na região de Sumaré, em 2008, e posteriormente nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Há evidência da sua presença também nos Estados do Paraná e Santa Catarina. O ToCV pode infectar outras solanáceas além do tomateiro e, recentemente, foi observado infectando plantas de batata (*Solanum tuberosum*) no Brasil. Esse crinivirus é transmitido no Brasil principalmente pelo aleirodídeo (mosca branca) *Bemisia tabaci* MEAM1. Considerando o patossistema batateira/ToCV, não há estudos sobre a ocorrência, sintomatologia em diferentes variedades e danos provocados por esse crinivirus. Também não há antissoro policlonal para o isolado brasileiro do ToCV para uso na diagnose da doença em solanáceas. Esse trabalho teve por objetivos: purificar o ToCV e produzir antissoro policlonal; avaliar a reação de genótipos de batateira à infecção com o ToCV; avaliar o dano provocado por esse vírus em duas variedades de batateira. A purificação do vírus a partir de folhas de tomateiro e a produção de antissoro policlonal em coelho foram satisfatórias. No entanto, o antissoro não foi eficiente em ELISA, mas sim em dot-blot e somente na diluição de 1:20. Foi avaliada a reação de 21 genótipos de batateira à infecção com o ToCV, por meio da inoculação com *B. tabaci* MEAM1, com chance de escolha do vetor. Nenhum genótipo exibiu resistência à infecção; enquanto a variedade Camila foi assintomática e não apresentou alteração na fotossíntese. Plantas de batateira das variedades Ágata e Asterix sadias foram inoculadas com o ToCV, por meio da *B. tabaci* MEAM1 e ao final foram avaliadas a massa fresca da parte aérea, peso e número dos tubérculos colhidos. Em dois experimentos independentes, as reduções médias no peso fresco da parte aérea foram de 60,1% para Ágata e 46% para Asterix. Porém, as reduções nas produções dessas variedades, no primeiro experimento foram de 99,5% e 98,1%, respectivamente; enquanto no segundo os valores foram de 82,3% e 56,2%, respectivamente.

Palavras-chave: *Solanum tuberosum*; Crinivirus; Antissoro policlonal; Dot-blot

ABSTRACT

***Tomato chlorosis virus*: purification, antiserum production, genotypes reaction and yield loss on potato plants**

Tomato chlorosis virus (ToCV) is a species of the genus *Crinivirus*, which is causing considerable losses mainly on tomato crop (*Solanum lycopersicum*). It was first isolated and described on 1998 in the United States and subsequently reported in twelve countries. In Brazil, it was first reported in São Paulo State, in Sumaré region in 2008, and after that on the states of Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais and Rio de Janeiro. There is evidence of the presence of ToCV on the states of Paraná and Santa Catarina. ToCV can also infect other solanaceae and more recently, it was reported infecting potato plants (*Solanum tuberosum*) in Brazil. This crinivirus is transmitted by *Bemisia tabaci* MEAM1. Considering the patosystem potato/ToCV, there are no studies on the occurrence, symptomatology in different varieties, and damages caused by this crinivirus. In addition, there is no polyclonal antiserum for the Brazilian isolate of ToCV for use in diagnosis. The objectives of the present work were: to purify the virus and produce a polyclonal antiserum; to evaluate the reaction of potato genotypes to ToCV infection; to evaluate the yield loss caused by this crinivirus on two potato cultivars. The virus purification from tomato leaves and the production of polyclonal antiserum in rabbit were satisfactorily accomplished. However, the antiserum was not efficient on ELISA test, but in dot-blot, only when diluted 1:20. The reaction of 21 potato genotypes to infection with ToCV was evaluated by inoculation with *B. tabaci* MEAM1, with chance of choice for the vector. All genotypes were infected with ToCV and Camila was the only one asymptomatic. Plants of cultivars Ágata and Asterix were inoculated with ToCV, by means of viruliferous vector, and at the end were evaluated for the fresh mass of the aerial part, weight and number of harvested tubers. In two independent experiments, average reductions in aerial fresh weight were 60.1% for Ágata and 46% for Asterix. However, reductions in yield of these varieties in the first experiment were 99.5% and 98.1%, respectively; while in the second the values were 82.3% and 56.2%, respectively.

Keywords: *Solanum tuberosum*; Crinivirus; Polyclonal antiserum; Dot-blot

1 INTRODUÇÃO

A batateira (*Solanum tuberosum* L.) é uma das mais importantes espécies da família Solanaceae, a qual inclui o tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e o fumo (*Nicotiana tabacum*) entre outras espécies. É considerada a quarta fonte alimentar da humanidade, situando-se logo após o trigo (*Triticum* spp.), o milho (*Zea mays*) e o arroz (*Oryza* spp.) (Hawkes, 1993). No aspecto nutricional possui 54% e 78% mais proteína por unidade de tempo e área que lavouras de trigo e arroz, respectivamente (STEVENSON *et al.*, 2001). O consumo anual médio de batata por pessoa em alguns países europeus é superior a 100 kg, enquanto no Brasil é de 18 kg (FAO, 2013). Por essas razões, a bataticultura tem grande importância econômica mundial.

Em 2014, a produção mundial de batata foi superior a 382 milhões de toneladas. No Brasil, a produção em 2016 foi 3,9 milhões de toneladas, cerca de 1% da produção mundial. A produtividade média brasileira é de aproximadamente 29 toneladas por ha (IBGE, 2017). No ano de 2016, o valor movimentado pela cadeia brasileira produtora de batata foi de aproximadamente 5,9 bilhões de reais (IBGE, 2017) e estima-se que são gerados 40.000 empregos diretos, 120.000 indiretos e 80.000 empregados durante a comercialização (CAMARGO, 2001; CHOER, 2003).

No Brasil, 85% da produção de batata se concentra nas Regiões Sul e Sudeste (IBGE, 2017), enquanto o restante está nas Regiões Centro-Oeste e Nordeste em áreas com altitude superior a 900 m, como o município de Cristalina, em Goiás e a Chapada da Diamantina, na Bahia (LEGNARO & SÁBIO, 2007). As condições climáticas encontradas na Bahia são excepcionais para o cultivo da batateira, contribuindo para produtividade superior à média brasileira, atingindo 44 toneladas por ha (ÁVILA *et al.*, 2009; IBGE, 2017).

A propagação da batateira é comumente realizada através de tubérculos. Por essa razão o insumo tubérculos-sementes deve ser de alta qualidade, caso contrário implica em queda na produtividade da lavoura devido principalmente a problemas fitossanitários (ÁVILA *et al.*, 2009).

Impactos negativos na sanidade da bataticultura são atribuídos a alguns fungos, bactérias e vírus (GIUSTO, 2006). A cultura é afetada por mais de 40 viroses, relatadas em várias localidades produtoras do mundo (BERGER & GERMAN, 2001; JEFFRIES, 1998), sendo as causadas pelo *Potato leafroll virus* (PLRV), *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus X* (PVX) e *Potato virus S* (PVS) consideradas as mais importantes (GIUSTO, 2006).

No Brasil, os principais vírus relatados na batateira são: PLRV, *Potato virus A* (PVA), PVY, PVX, *Potato virus S* (PVS), *Tobacco rattle virus* (TRV), *Alfalfa mosaic virus* (AIMV) (SOUZA DIAS *et al.*, 2016). Em 2012, o *Tomato chlorosis virus* (ToCV) foi detectado pela primeira vez infectando batateira no Brasil (FREITAS *et al.*, 2012). Essa espécie do gênero *Crinivirus*, transmitida pelo aleirodídeo *Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor 1 - MEAM1 (anteriormente biótipo B), de ocorrência em vários países (NAVAS-CASTILLO *et al.*, 2011), já havia sido anteriormente relatada infectando tomateiro (BARBOSA *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2011; MARCHI, 2014) e pimentão no Brasil (BARBOSA *et al.*, 2010). Mais recentemente foi encontrada infectando naturalmente duas outras solanáceas, berinjela (*Solanum melongena*) e o jiló (*S. gilo*) (FONSECA *et al.*, 2016). Pouco se sabe, no entanto, sobre danos na produção ocasionados por esse vírus nos países onde ocorre. Na Espanha, Fortes *et al.* (2012) relataram danos de 45% a 75% na produtividade de diferentes variedades de pimentão infectadas com o ToCV. No Brasil, Mansila Córdova *et al.* (2017) avaliou a reação de diferentes genótipos de tomateiro e constatou que plantas infectadas ainda jovens apresentaram uma redução na produção de frutos que variou de 21% a 52%, quando comparada com a aquela de tomateiros sadios.

A recente constatação do ToCV em batateira no Brasil (FREITAS *et al.*, 2012) tem causado preocupação entre os produtores desta solanácea, principalmente entre aqueles que produzem o insumo tubérculo-semente, uma vez que a perpetuação de vírus na semente pode causar degenerescência dos tubérculos-sementes. Não há relatos sobre a ocorrência, incidência e principalmente danos causados pelo ToCV nessa cultura.

Desse modo, o presente trabalho tem como objetivos: a) purificação de um isolado do ToCV de tomateiro e posterior produção de antissoro policlonal para uso na diagnose; b) avaliação da reação de genótipos de batateira à infecção com o crinivirus e c) avaliação de danos causado pelo ToCV em batateira.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A batateira

A batateira (*Solanum tuberosum* L.) é originária das regiões andinas da América do Sul (FILGUEIRA, 2008). No século XVI, foi levada para a Europa pelos espanhóis e posteriormente foi introduzida na América do Norte. A difusão da cultura da batateira para outros continentes se deu pela colonização desses países pelos europeus (LOPES, 1997).

A batata é um alimento rico em carboidratos, contendo proteínas, minerais e vitaminas (A, B1, B2, C e niacina). De acordo com FILGUEIRA (2008), o sistema radicular da batata é superficial, com as raízes se concentrando em até 50 cm de profundidade. Os estolões são ramificações originadas de gemas situadas nas axilas de folhas rudimentares, na parte subterrânea do caule. Ao final dos estolões se encontram os tubérculos, que são caules adaptados para reserva de alimentos e reprodução (LOPES, 1997).

Os tubérculos apresentam olhos e lenticelas em sua superfície, sendo que em cada olho está presente uma gema, de onde se originam brotações; já as lenticelas são os sistemas de comunicação entre a parte interna do tubérculo e seu exterior, sendo a respiração sua principal função. As folhas são compostas, com um pecíolo com folíolo terminal e por folíolos laterais arredondados; características como pilosidade, coloração e tamanho variam de acordo com a cultivar. As flores da batateira são hermafroditas, sendo que o androceu e o gineceu amadurecem ao mesmo tempo, facilitando assim a predominância da autopolinização, e dando origem a um fruto verde medindo de 2 a 3 cm de diâmetro, com 40 a 240 minúsculas sementes (LOPES, 1997; FILGUEIRA, 2008).

O ciclo vegetativo da cultura pode ser precoce (<90 dias), médio (90-110 dias) ou tardio (>110 dias), sendo que este período varia entre cultivares (PEREIRA & FORTES, 2004). FILGUEIRA (2008) descreveu quatro estádios de desenvolvimento da cultura da batateira após avaliar os cultivares Bintje, de ciclo precoce e Aracy, de ciclo tardio. O estágio I é o mais curto, com duração de uma a duas semanas após o plantio. Nessa fase, que abrange desde a batata semente brotada até a emergência das hastes, a planta utiliza as reservas da batata-mãe havendo pouca exigência de água. O estágio II ocorre entre a quarta e quinta semana após o plantio, compreendendo o intervalo entre emergência e o início da tuberização; nesse

estádio há um aumento da exigência de água e nutrientes com o desenvolvimento radicular da planta. O estágio III ocorre a partir da oitava semana. Nesse período o desenvolvimento vegetativo e a absorção de nutrientes são elevados. Também ocorre a formação de flores, se as condições agroclimáticas forem adequadas. O estágio IV é o mais longo, e perdura até a senescência da planta. O incremento no peso dos tubérculos ocorre enquanto a parte aérea estiver viva. Desse modo o ciclo completo da batateira tem duração de cerca de 14 a 16 semanas desde o plantio da batata-semente até a secagem da parte aérea.

O cultivo da batateira no Brasil é feito em três safras. A primeira (plantio das águas), ocorre entre setembro-novembro com colheita de janeiro em diante. Nessa safra, a irrigação é dispensável, contudo a umidade e temperatura elevadas provocam aumento da parte vegetativa o que pode ocasionar o acamamento da planta. Isso torna os folíolos menores, retardando o processo de tuberização. O plantio das águas representa 55% da produção de batata nacional. A segunda safra (plantio da seca), ocorre de fevereiro a abril com a colheita realizada no período da seca. No início do plantio a pluviosidade geralmente supre a demanda, porém pode ocorrer a necessidade de suplementação posteriormente. Nessa safra as condições da época de plantio com dias longos e quentes possibilitam a rápida emergência e bom crescimento vegetativo. Em seguida a temperatura cai e os dias tornam-se mais curtos o que estimula a tuberização e o crescimento dos tubérculos. O plantio da seca representa 32% da produção de batata. A terceira (plantio de inverno), ocorre de maio a julho e colheita em setembro. Nessa safra o uso da irrigação é indispensável, contudo o fotoperíodo é favorável durante todo o ciclo (FILGUEIRA, 2008).

2.2 O *Tomato chlorosis virus*

O ToCV é uma espécie do gênero *Crinivirus*, família *Closteroviridae* com partículas alongadas e flexuosas, com comprimentos que variam de 800-850 nm e se encontram limitadas ao floema da planta infectada. O genoma é bipartido, de RNA de fita simples, senso positivo (WISLER *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2000).

A transmissão do ToCV ocorre de maneira semi-persistente através de três espécies de aleyrodídeos: *Bemisia tabaci* New World 1- NW1 (anteriormente biótipo A), Middle East–Asia Minor 1 - MEAM1 (anteriormente biótipo B) e Mediterranean - MED (anteriormente biótipo Q), *Trialeurodes abutilonea* e *T. vaporariorum* (WISLER

et al., 1998, WINTERMANTEL *et al.*, 2001, ORFANIDOU *et al.*, 2016). No Brasil, não há relatos da presença de *T. abutilonea*. *T. abutilonea* e *B. tabaci* MEAM1 apresentam eficiências de transmissão semelhantes, porém períodos de retenção do vírus diferentes, sendo cinco dias para *T. abutilonea* e três dias para *B. tabaci* MEAM1 (WINTERMANTEL & WISLER, 2006). Em 2003 foi constatada a presença de *T. vaporariorum* em plantas de tomate, feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris*), couve e aboboreiras em campos de produção na região de Itatiba, Estado de São Paulo (LOURENÇÃO *et al.*, 2008). Um isolado brasileiro de ToCV, originário de tomateiro, foi transmitido experimentalmente por adultos de *T. vaporariorum* coletados em aboboreiras no campo em Itatiba, SP (FREITAS *et al.*, 2011). Marchi (2014) constatou que a infecção de tomateiros com o ToCV, em plantios protegidos em Santa Maria, RS, estava associada com a transmissão por *T. vaporariorum*, por ser esta a única espécie identificada na plantação. O ToCV não é transmitido mecanicamente ou por meio de sementes verdadeiras.

Além do tomateiro (WISLER *et al.*, 1998), já foram relatadas 74 espécies de plantas hospedeiras do ToCV pertencentes a 23 famílias, sendo elas Aizoaceae, Amaranthaceae, Apiaceae, Apocynaceae, Asteraceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Malvaceae, Oxalidaceae, Phytolaccaceae, Plantaginaceae, Plumbaginaceae, Polygonaceae, Portulacaceae, Primulaceae, Rutaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae (ESQUIVEL FARIÑA, 2015; ALVAREZ-RUIZ *et al.*, 2007; WINTERMANTEL *et al.*, 2006; LOZANO *et al.*, 2003; FORTES & NAVAS-CASTILLO, 2012; FONSECA *et al.*, 2013; FONSECA *et al.*, 2015; SOLÓRZANO-MORALES *et al.*, 2011; ESQUIVEL & REZENDE, 2015; BARBOSA *et al.*, 2013a; KIL *et al.*, 2015; BOITEUX *et al.*, 2015; FIALLO-OLÍVÉ *et al.*, 2014; KARWITHA *et al.*, 2013; MORRIS *et al.*, 2006; ARRUABARRENA *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2013b; SOUZA, 2016).

Esse vírus foi constatado e isolado primeiramente nos Estados Unidos em 1998, na cultura do tomateiro (WISLER *et al.*, 1998), e em seguida foi reportado na mesma cultura em Portugal (LOURO *et al.*, 2000), Espanha (NAVAS-CASTILLO, *et al.*, 2000), Porto Rico (WINTERMANTEL *et al.*, 2001), Itália (ACCOTTO *et al.*, 2001), Grécia (DOVAS *et al.*, 2002), Taiwan (TSAI *et al.*, 2004), Israel (SEGEV *et al.*, 2004), México (ALVAREZ-RUIZ *et al.*, 2007), Cuba (MARTÍNEZ- ZUBIAUR *et al.*, 2008), Brasil (BARBOSA *et al.*, 2008), Costa Rica (CASTRO *et al.*, 2009) e Hungria (BESE

et al., 2011) e mais recentemente na Nigéria (MOHAMMED *et al.*, 2017). Também já havia sido relatado infectando batateira no campo na Espanha (FORTES & NAVAS-CASTILLO 2008, citado por FORTES & NAVAS-CASTILLO, 2012)

Em território brasileiro, o ToCV foi primeiramente detectado em tomateiro em 2008 na região de Sumaré, São Paulo (BARBOSA *et al.*, 2008). É possível, no entanto, que o closterovírus encontrado em tomateiros na região de Campinas, SP, em 1998, causando sintomas semelhantes aos descritos para o ToCV e transmitido pela *B. tabaci*, já fosse o próprio ToCV (PAVAN *et al.*, 1999). Posteriormente, o ToCV foi constatado também em tomateiros nos estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro (BARBOSA *et al.*, 2011) e Rio Grande do Sul (MARCHI, 2014). Em plantas de pimentão esse vírus foi detectado em 2010, também no Estado de São Paulo (BARBOSA *et al.*, 2010), enquanto que em batateira foi encontrado posteriormente em amostras provenientes do Estado de Goiás (FREITAS *et al.*, 2012).

Em plantas de batata o ToCV induz sintoma foliar de enrolamento e clorose internerval, especialmente em folhas mais velhas. Os sintomas são muito parecidos com aqueles ocasionados pelo vírus do enrolamento das folhas da batata (*Potato leaf roll virus*-PLRV) (WISLER *et al.*, 1998). Em plantas de tomate o ToCV causa no início da infecção sintoma de clorose internerval em folhas baixas, que mais tardiamente evolui para toda a planta. As folhas do tomateiro também podem desenvolver pontos avermelhados e necróticos, e enrolamento das folhas (WISLER *et al.*, 1998).

Por apresentar sintomas semelhantes aos do vírus do enrolamento da folha da batata (*Potato leafroll virus*), a detecção do ToCV nessas plantas baseada em sintomatologia não é eficiente. O mesmo ocorre em plantas de tomate, quando se trata da detecção do ToCV e do *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV), crinivírus ainda não relatado no Brasil, por meio de sintomas, uma vez que ambos induzem sintomas semelhantes. Por essa razão, técnicas de detecção específicas para o ToCV foram desenvolvidas, como DAS-ELISA com antissoro policlonal produzido com a proteína capsial do vírus expressa e purificada a partir de *Escherichia coli* (JACQUEMOND *et al.*, 2009), RT-PCR, multiplex e nested PCR, com oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região homóloga à "heat shock protein" (HSP70) (DOVAS *et al.*, 2002) e sondas de ácido nucleicos para hibridização (WISLER *et al.*, 1998; LOURO *et al.*, 2000). Plantas indicadoras como

Nicotiana benthamiana e *N. clevelandii* também podem ser usadas (WISLER *et al.*, 1998) para diferenciar ToCV de TICV através de sintomas. Plantas de *D. stramonium* podem ser usadas para comprovar a presença do ToCV em campos produtores de batata, pois apresentam sintomas característicos de infecção com esse vírus (SOUZA-DIAS *et al.*, 2012). Antissoro policlonal preparado a partir do vírus purificado de plantas de tomate infectadas com o TICV foi capaz de detectar, em ELISA indireto, quatro diferentes isolados de TICV e tiveram uma reação fraca com o ToCV, e não reagiu com outros closterovírus (LI *et al.*, 1998). O LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) é uma técnica barata e não necessita de termociclador por se tratar de uma reação isotérmica constituindo-se em uma alternativa eficaz para a detecção do ToCV. Segundo Karwitha *et al.* (2015) a técnica de RT-LAMP é de 100 a 1000 vezes mais eficiente que a RT-PCR convencional.

Há poucas informações disponíveis na literatura sobre incidência e danos causados pelo ToCV. Surto de ToCV têm sido associados às altas populações de *B. tabaci* e são considerados epidêmicos quando a incidência é superior a 30% de plantas sintomáticas em campos de produções de tomates (NAVAS-CASTILLO *et al.*, 2000). No Brasil, foram relatadas incidências de 0,25% a 3,42% de ToCV em plantio de tomateiro na região de Sumaré, Estado de São Paulo (BARBOSA *et al.*, 2008; CALAÇA, 2008.). Em um estudo epidemiológico do ToCV no estado de Goiás, no qual foram analisadas quatro áreas, a região de Taquara foi a que apresentou a maior incidência de plantas infectadas com esse vírus (76%), enquanto nas regiões de Goianópolis, Boa Esperança e DAIA (Distrito Agro-Industrial de Anápolis) foram constatadas 57,8%, 25,3% e 1,6% de plantas infectadas, respectivamente (MACEDO, 2016). Quanto aos danos, Hanafi (2002) relatou que o ToCV já causou danos significativos em tomateiros cultivados em estufas em 2002 e a gravidade dos sintomas e danos variaram de acordo com a cultivar. Fortes *et al.* (2012) estudaram os danos provocados pelo ToCV em cinco cultivares de pimentão e constataram danos da ordem de 45% para a cultivar Spadî a 75% para a cultivar Pescara. A redução na produção decorreu da diminuição do número e do tamanho dos frutos. Mansilla Córdova *et al.* (2017), no Brasil, comparou a produção de diferentes genótipos de tomateiro, quando as plantas foram inoculadas ainda jovens e constatou danos que variaram de 31,5% (Sahel) a 51,8% (Saturno). Não há dados sobre danos provocados por esse crinivírus em batateira.

Analisando-se a dinâmica espacial e temporal do ToCV foi observado um forte efeito de borda. Isso confirma a hipótese de que as fontes externas de inóculo têm grande importância no desenvolvimento da doença (CALAÇA, 2011). Segundo o padrão espacial da doença o principal componente para a disseminação é o primário, visto que existem altos níveis de aleatoriedade na distribuição das plantas sintomáticas, como demonstrado por Macedo (2016), por meio de análise empregando índice de dispersão (D), lei de Taylor modificada e análise de dinâmica de focos da doença.

Quando o ToCV é identificado em uma nova área, há dificuldade em estabelecer um controle ou erradicação devido a sua ampla gama de hospedeiros e alta eficiência de transmissão através de aleirodídeos, que são polípagos (WINTERMANTEL & WISLER, 2006). Uma vez introduzido, o ToCV pode estabelecer-se em hospedeiros como plantas daninhas, espécies cultivadas e plantas ornamentais, como já destacado anteriormente, e pode mover-se para novas áreas por meio principalmente da *B. tabaci* MEAM1, que é uma praga cosmopolita. A *B. tabaci* MED foi recentemente relatada no Brasil e, além de ser vetora do ToCV, possui maior capacidade de invasão e de sobrevivência em altas e baixas temperaturas em comparação a *B. tabaci* MEAM1 (BARBOSA *et al.*, 2015; BONATO *et al.*, 2007). Outra preocupação em relação a *B. tabaci* MED é sua capacidade de desenvolver resistência aos ingredientes ativos de inseticidas utilizados atualmente (HOROWITS *et al.*, 2005).

O controle da doença no campo baseia-se no uso de mudas e material propagativo sadios e, principalmente no controle químico do vetor, que muitas vezes não promove controle eficaz da doença (TZANETAKIS *et al.*, 2013). Além disso, o controle químico da *B. tabaci* induz o aparecimento de insetos resistentes aos grupos de inseticidas. Quando utilizado esse método é recomendada a rotação de inseticidas, o que gera altos custos de produção (MAFF, 2000). Uma alternativa eficiente para o controle dessa doença seria o uso de variedades resistentes. Garcia-Cano *et al.* (2010) e Mansilla Córdova *et al.* (2017) identificaram fontes de resistência à infecção com o ToCV em tomateiros, porém ainda não há variedades ou híbridos resistentes disponíveis para o produtor. Não são conhecidas variedades de batata resistentes ou tolerantes a esse crinivírus.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Purificação do vírus

Para a purificação do ToCV foi adotado o protocolo de Duffus *et al.* (1986), usado para a purificação do crinivirus *Lettuce infectious yellows virus*, com modificações. Para tanto, 100 g de folhas de tomateiros sabidamente infectados com o ToCV foram coletadas e homogeneizadas em liquidificador na presença de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 (Na_2HPO_4 0,1 M e KH_2PO_4 0,1 M, acrescido de EDTA 5 mM, Na_2SO_4 20 mM e DIECA 10 mM). Logo em seguida foi adicionado Triton-100 na concentração de 4% e a mistura foi agitada durante a noite a 4°C. A solução foi centrifugada a 5.000 rpm, seguida de uma centrifugação a 8.000 rpm, em um rotor Sorval GSA. O sobrenadante foi coletado e colocado sobre 5 mL de sacarose 30% diluída em tampão de extração gelado e centrifugado por 4 horas a 29.500 rpm em um rotor Beckman T30. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado gentilmente com água destilada. Após a lavagem o precipitado foi dissolvido em tampão de extração sob agitação durante toda a noite. Em seguida foi centrifugado a 8.000 rpm em um rotor Sorval SS-34. O sobrenadante foi colocado novamente sobre 5 mL de sacarose 30%, diluída em tampão de extração fosfato sendo centrifugado por 2,5 horas a 28.000 rpm em um rotor Beckman T30. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado gentilmente com água destilada. O precipitado foi dissolvido em 2 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 acrescido de EDTA 2 mM e agitado durante cerca de 5 horas, a 4°C. A suspensão foi centrifugada a 8.000 rpm em um rotor Sorval SS-34. O sobrenadante foi coletado em microtubo e centrifugado a 10.000 rpm (Micro Centrifuga Refrigerada Nova Técnica NT-805). O precipitado foi descartado e o sobrenadante acondicionado em novo microtubo e armazenado a -20°C. Antes do armazenamento, uma alíquota foi retirada para análise em microscópio eletrônico de transmissão, através da técnica de contrastação negativa, para verificar a presença de partículas do ToCV.

A etapa final da purificação foi feita juntando-se 10 purificados parciais armazenados a -20°C. A mistura dos purificados foi submetida a um gradiente de sulfato de cério, com centrifugação por 18 h a 22.500 rpm em um rotor Beckman SW39. Como não houve a formação de banda viral após a centrifugação, o volume foi cuidadosamente fracionado, de cima para baixo do tubo, em alíquotas de 500 µL.

Estas foram individualmente analisadas em espectrofotômetro nos comprimentos de ondas de 260 e 280 nm (ácido nucleico e proteína). Para as alíquotas que apresentaram altos valores de absorbância foram feitas telinhas com a técnica de contrastação negativa e observado em microscopia eletrônica de transmissão para verificar a presença de partículas virais. A fração que apresentou partículas do ToCV foi dividida em quatro alíquotas de 500 µL cada uma, sem estimativa da concentração viral e utilizadas para a produção de antissoro.

3.2 Produção do antissoro

Para a produção de antissoro contra o ToCV foi utilizado um coelho, raça Nova Zelândia, com aproximadamente quatro meses de idade, cedido pela UNESP. O procedimento de imunização foi o mesmo usado por Camelo García (2014) para a produção de antissoro contra o potyvirus *Johnsongrass mosaic virus*. Cada alíquota de 500 µL da suspensão viral foi emulsionada com adjuvante completo de Freud na proporção de 1:1. Um mL dessa emulsão foi injetado no coelho via intramuscular. As injeções foram semanais, totalizando 4 imunizações. Uma semana após a última injeção o sangue foi coletado através de cortes feitos na veia marginal da orelha do coelho. O sangue foi coagulado a 4°C por 12 horas e em seguida centrifugado a 3.000 g por 10 minutos, para obtenção do soro sanguíneo. O soro coletado foi centrifugado a 5.000 g (Micro Centrifuga Refrigerada Nova Técnica NT-805) por 10 minutos e transferido para microtubos. O antissoro foi armazenado a -20° C.

3.3 Teste do antissoro

3.3.1 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

A reação do antissoro para a detecção do ToCV foi analisada por meio do teste de PTA-ELISA (Plate Trapped Antigen - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), com pequenas modificações do protocolo descrito por Mowat & Dawson (1987). Extrato foliar de plantas de tomate e de tubérculos de batatas, sadias e infectadas com o ToCV, foram preparados em tampão PBS (0,0015 M KH₂PO₄, 0,14 M NaCl, 0,004 M Na₂HPO₄, 0,003 M KCl, pH 7,4), nas diluições de 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80 (p/v). O vírus purificado foi diluído nas proporções de 1:10 e 1:100. Cem

microlitros de cada amostra foram colocados nas cavidades de placa de ELISA, em duplicata e, posteriormente, incubadas por 2 horas, a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes consecutivas com PBS-Tween (1L PBS + 0,5 ml Tween). Na etapa seguinte, foram colocados em cada célula 100 µL do antissoro diluído em tampão Tris-HCl. Foram analisadas as seguintes diluições do antissoro: 1:250 e 1:500 (v/v). As placas foram incubadas por 1:30 h, a 37°C, sendo posteriormente lavadas como no passo anterior. Em seguida, foram colocados 100 µL do conjugado enzimático (SIGMA Anti Rabbit IgG, A-8025) diluído 1:34.000 (v/v) em tampão Tris-HCl, e incubado novamente por 1:30 h a 37°C. As placas foram lavadas novamente e a seguir foi adicionado o substrato (100 µL/célula) *p*-fosfato de nitrofenil (SIGMA, S0942), diluído em tampão de dietanolamina pH 9,8. As placas foram incubadas por até 60 minutos à temperatura ambiente, no escuro, onde ocorreu a reação enzimática. A absorbância de cada uma das células foi medida em leitor de ELISA, utilizando-se um filtro de 405 nm. Uma amostra foi considerada positiva quando o valor médio de absorbância for superior a três vezes a média de absorbância do extrato do tecido sadio.

3.3.2 Dot-blot

Folhas de tomateiros foram maceradas individualmente na presença de um mL do tampão PBS (0,0015 M KH₂PO₄, 0,14 M NaCl, 0,004 M Na₂HPO₄, 0,003 M KCl, pH 7,4). Em seguida, foi adicionado o mesmo volume do tampão de dissociação (Tris HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 3,8%, β-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,1 %, glicerol 19%). Em seguida, metade das amostras foram aquecidas a 100°C, durante 5 minutos e centrifugadas durante 10 min a 5.000 g (Micro Centrifuga Refrigerada Nova Técnica NT-805). A outra metade não foi aquecida, mas somente centrifugada. Dez µL de cada amostra foram aplicados em membrana de nitrocelulose e deixados secar ao ar por 10 minutos. A membrana foi incubada por 60 minutos em PBS (0,0015 M KH₂PO₄, 0,14 M NaCl, 0,004 M Na₂HPO₄, 0,003 M KCl, pH 7,4) + 1,0 % de BSA sob agitação lenta para o bloqueio. A membrana foi lavada 3 vezes com PBS-Tween (PBS acrescido de 0,05% de Tween 20). Cada lavagem foi feita sob agitação durante 3 minutos. A membrana foi então incubada durante a noite, à 4°C, com o antissoro contra o ToCV, preparado em tampão PBS + 1 % BSA, na diluição de 1/20. A membrana foi lavada 3 vezes

com tampão PBS Tween. E cada lavagem foi feita sob agitação durante 3 minutos. A imunoglobulina G conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA Anti Rabbit IgG, A-8025) foi diluída 1/34.000, conforme recomendação da SIGMA, em tampão PBS. A membrana foi então incubada durante a noite a 4°C. A membrana foi lavada como descrito anteriormente e em seguida os substratos BCIP (25 µL/10 mL) e NBT (50 µL/10 mL) foram adicionados ao tampão substrato (Tris 0,1 M, NaCl 0,01 M, MgCl₂ 0,001 M, pH 9,5). A membrana foi incubada a temperatura ambiente sob agitação para ocorrer a reação enzimática. A membrana foi lavada com água destilada para parar a reação. Em seguida foi feita avaliação visual.

A validação da eficiência do antissoro para a detecção do ToCV em dot-blot foi feita analisando-se extratos de tomateiros inoculados com esse crinivirus, que foram previamente analisados por RT-PCR pela Eng. Agr. Talita Nicola Zocca Silva. Foram realizados três ensaios independentes. Cada ensaio constou de 25 amostras de folhas de tomateiros inoculados com o ToCV por meio da *B. tabaci* e amostras de tomateiros sabidamente infectados com o vírus (controle positivo) e sadio (controle negativo). Os ensaios foram realizados sem o prévio conhecimento do resultado da RT-PCR para a detecção do crinivirus nas amostras. Foi feito também um ensaio com extrato de tecido de batateiras que foram previamente analisados por RT-PCR. O ensaio consistiu de sete amostras de batateira inoculadas com o ToCV por meio de *B. tabaci* MEAM1, uma de batateira sabidamente infectada com o vírus (controle positivo) e outra sadia (controle negativo). Como controle da reação foram incluídos tomateiros infectados com o ToCV e sadio.

3.4 Inoculação de plantas de batateira com o ToCV

A transmissão do vírus foi feita por meio do vetor *B. tabaci* MEAM1 conforme procedimento adotado por Gouvêa *et al.* (2017). Os insetos livres de vírus foram inicialmente colocados sobre folhas destacadas de tomateiro comprovadamente infectadas com o ToCV, acondicionadas em tubos de polipropileno de 50 mL (do tipo Falcon). Para manter a aeração no ambiente de aquisição do vírus os tubos foram recobertos por tecido *voil*. O período de acesso à aquisição do vírus (PAA) foi de 24 h. Após esse período eles foram transferidos para as plantas-testes de batata, acondicionadas em gaiolas recobertas por tecido *voil*. O período de acesso à inoculação (PAI) foi de 24 h. Depois disso os insetos foram eliminados com

inseticida e as plantas mantidas na estufa plástica para as avaliações de acordo com a finalidade do ensaio.

3.5 Detecção do ToCV

3.5.1 Extração de RNA total

Inicialmente foi utilizado o protocolo padrão descrito por Dovas *et al.* (2002) e usado por Barbosa *et al.* (2008; 2010) para a detecção desse vírus em tomateiros e pimentão, respectivamente. A extração do RNA total foi realizada utilizando Trizol® LS (Invitrogen) de acordo com protocolo do fabricante. Discos foliares de batateira foram acondicionados no interior de tubos de micro centrifuga de 1,5 mL e macerados com auxílio de pistilos plásticos, na presença de nitrogênio líquido. Para 50-100 mg de tecido foi adicionado 1 mL de Trizol®. Após agitação vigorosa a mistura foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Duzentos microlitros de clorofórmio foram adicionados em cada tubo, seguido de agitação manual por 15 segundos e incubação sob temperatura ambiente por 5 minutos. A suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm (Micro Centrifuga Refrigerada Nova Técnica NT-805) por 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa foi transferida para novo tubo, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol, seguida de agitação lenta e incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente. Para precipitação do RNA a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm (Micro Centrifuga Refrigerada Nova Técnica NT-805) por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75%, e centrifugado a 7.500 rpm (Micro Centrifuga Refrigerada Nova Técnica NT-805) por 5 minutos a 4°C. O etanol foi descartado cuidadosamente e após a secagem do precipitado foram adicionados 30 µL de água livre de RNase ou água “DEPC”, para dissolver o RNA. RNA total extraído de plantas sabidamente infectadas com o ToCV e de plantas sadias foram usados nas reações de RT-PCR como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.5.2 RT-PCR

A detecção do ToCV foi feita por meio de RT-PCR a partir do RNA total extraído. A fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada utilizando 3 µL de RNA

total misturados a 7 µL de água DEPC, 1 µL de dNTP's (10 mM), 1 µL do oligonucleotídeo iniciador específico HS-12 (5' – CC(G/T)CCACCAAA(A/G)TCGTA – 3') a 20 mM (Dovas *et al.*, 2002). A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos e 2°C por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 5 µL de buffer M-MLV, 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL da enzima transcriptase reversa M-MLV. A mistura foi incubada a 37°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos, e depois mantida a 4°C.

A reação de PCR foi realizada com a mesma quantidade de reagentes, mas utilizando os oligonucleotídeos específicos ToC-5 (5'-GGTTTGGATTTTGGTACTACA TTCAGT - 3') e ToC-6 (5' -AAACTGCCTGCATGAAA AGTCTC - 3') a 20 mM (Dovas *et al.*, 2002), e 3 µL do produto da primeira reação de PCR. O regime do termociclador foi 95°C por 1 minuto, com 40 ciclos de 95°C por 20 segundos, 60°C por 15 segundos, 72°C por 10 segundos e extensão final de 72°C por 10 minutos.

O DNA foi corado com SYBR® Safe DNA gel Stain e separado por eletroforese em gel de agarose a 1% por aproximadamente 40 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados (462 pb) foram visualizados após eletroforese em transiluminador de luz UV.

3.5.3 Purificação de amplicons e sequenciamento de nucleotídeos

Alguns amplicons foram selecionados para sequenciamento de nucleotídeos para confirmação da espécie viral. Os fragmentos amplificados foram purificados a partir do gel de agarose, utilizando o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), e posteriormente quantificados em espectrofotômetro Nanodrop utilizando 1,5 µL do produto purificado.

As amostras foram enviadas à Empresa Macrogen (Seul, Coreia). As sequências obtidas foram analisadas utilizando-se o programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e CLUSTAL Interative W (Thompson *et al.*, 1994).

3.6 qRT-PCR

A extração de RNA total foi realizada com o mini kit PureLink® Viral RNA/DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Para o

estabelecimento das curvas padrão de concentração viral, o RNA extraído foi amplificado com os primers ToC5 e ToC6 como descrito por Dovas *et al.* (2002). O fragmento de 480 pares de base foi clonado no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega) usando as recomendações do fabricante. Os plasmídeos foram extraídos de colônias selecionadas usando o kit Qiagen Plasmid Miniprep. Três clones foram mandados para sequenciamento de nucleotídeos a Macrogen (Seul, Coreia). Análise das sequências foi feita usando o programa BLAST para confirmar a identidade viral. Os DNAs plasmidiais foram quantificados em Nanodrop e um foi selecionado para criar a curva padrão de concentração viral. A diluição em série foi feita por número de cópias (100 a 10^7 cópias/ μ L), seguindo a metodologia recomendada pela Applied Biosystems (https://isu.technion.ac.il/wp-content/uploads/2016/10/Creating_Standard_Curves.pdf).

Os primers utilizados foram os descritos por Mansilla Córdova *et al.* (2017) desenhados a partir do gene da proteína HSP70h (ToCV-F 5'-GACCGAAGTGACACCAACCC-3' e ToCV-R 5'-TGGGACCGAGTACATTCCAAC-3') que amplifica um fragmento de 140 pares de base. A qRT-PCR foi feita em um equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com o seguinte protocolo: 37°C por 15 min, 95°C por 10 min seguido de 35 ciclos a 95°C por 10 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s. As reações foram feitas com 12,5 μ L incluindo 1,25 μ L do RNA extraído, 6,25 μ L de GoTaq qPCR Master Mix 2X (Promega), 0,62 μ L de cada primer a uma concentração de 10 μ M, 0,19 μ L de CXR reference dye, 0,25 μ L de GoScript RT mix para one step RT-qPCR e 3,32 μ L de água livre de nuclease. RNA de batateira sadia e água foram incluídas como controle negativo e branco, respectivamente. Cada reação de qPCR foi feita em duplicata. A amplificação foi feita analisado a curva de desnaturação (melt-curve). Os resultados foram analisados pelo teste não paramétrico de comparação de médias de Mann-Whitney no software R Studio.

3.7 Reação de genótipos de batateira ao ToCV

Tubérculos-sementes de batatas sadias, de mesma dimensão, de 21 genótipos (Tabela 1) foram cedidos pelo Eng. Agr. Pedro Hayashi (Soleil Papa Tecnologia, Vargem Grande do Sul, SP). Cinco tubérculos pré-germinados por genótipo foram semeados ao acaso em bandejas de polipropileno, contendo

substrato, acondicionadas em gaiola coberta com *voil*. Após 14 dias do plantio, as plantas de batata foram inoculadas com o ToCV, por meio de adultos virulíferos de *B. tabaci* MEAM1, com chance de escolha do inseto para transmissão do vírus. Foram liberados 1000 insetos virulíferos por dia, durante 5 dias consecutivos. No sexto dia os insetos foram eliminados e as plantas transplantadas para vasos de 2L contendo substrato e mantidas em estufa até o aparecimento dos sintomas. Foram transplantadas uma planta por vaso. Também foram feitas pulverizações para o controle de pragas, ácaros e outras doenças de acordo com a necessidade. Após 45 dias foram feitas avaliações de sintomas e coleta de amostras foliares para extração de RNA total e posterior quantificação viral por meio de qRT-PCR.

Tabela 1: Relação de variedades, espécies e híbridos de *Solanum* spp avaliados para resistência ao *Tomato chlorosis virus*.

<i>S. calvesscens</i> – SL00-10S
<i>S. chacoense</i> – CH1-A
<i>S. chacoense</i> – SL95
<i>S. phureja</i> – PH11
<i>S. tuberosum</i> cv. Ágata
<i>S. tuberosum</i> cv. Asterix
<i>S. tuberosum</i> cv. Atlantic
<i>S. tuberosum</i> cv. Camila (Embrapa)
<i>S. tuberosum</i> cv. Cupido
<i>S. tuberosum</i> cv. Markies
<i>S. tuberosum</i> cv. Sai 24
<i>S. tuberosum</i> cv. Sanglier
<i>S. tuberosum</i> cv. Santé
<i>S. tuberosum</i> cv. Yagana
<i>S. tuberosum</i> – Camp (Mutaç�o de Atlantic)
<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> – Cancham
<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> – Orus
<i>S. phureja</i> X <i>S. chacoense</i> – GA 18
<i>S. phureja</i> X <i>S. chacoense</i> – HPC 7B
<i>S. tuberosum</i> X <i>S. chacoense</i> – Bach 4
<i>S. tuberosum</i> X <i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> – BB 16

3.8 Medidas de trocas gasosas

A taxa fotossinttica lquida, a condutncia estomtica (g_s) e a transpirao (E) foram estimadas em uma folha baixeira de plantas doentes e sdrias em casa de vegetao no perodo das 9 s 11 horas, utilizando um analisador porttil de gases por infravermelho (Li-6400 XT, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA). Previamente a cada

avaliação, o fluxímetro do Li-6400 XT foi checado e o CO₂ e vapor d'água retirados do ar circulante no aparelho, com auxílio dos químicos soda calcária e drierite, para calibração e averiguação do funcionamento do sistema. A pressão parcial de CO₂ no ar (Ca) durante as medidas foi 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ e as trocas gasosas foram avaliadas sob densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.9 Avaliação de danos provocados pelo ToCV em batateira

Tubérculos-sementes de batatas sadias, de mesma dimensão, pré-germinados, das variedades Asterix e Ágata foram semeados em 48 vasos de 25 L contendo substrato (24 vasos por variedade). Os vasos foram dispostos em dois compartimentos separados de uma mesma estufa plástica. Doze plantas de cada variedade, em um dos compartimentos, foram inoculadas com ToCV, 10 dias após o transplante, através da transmissão por *B. tabaci* MEAM1 como descrito anteriormente. Foram usados 30 insetos por planta. No outro compartimento da estufa foram mantidas 12 plantas sadias de cada variedade (controle). A irrigação foi por gotejamento e as plantas foram adubadas periodicamente. Também foram feitas pulverizações para o controle de pragas, ácaros e outras doenças de acordo com a necessidade. Quarenta dias após a inoculação foram coletadas folhas de todas as plantas, as quais foram analisadas através de RT-PCR para confirmar a infecção do ToCV nas plantas inoculadas e ausência de vírus nas plantas controles.

Após 100 dias da inoculação foram cortadas as partes aéreas de todas as plantas. Estas foram pesadas individualmente para obtenção da massa fresca. Quinze dias após a remoção da parte aérea os tubérculos foram colhidos. Estes foram contados e pesados. Os dados foram submetidos a análise estatística e as médias comparadas pelo teste Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação e produção antissoro

A purificação do vírus foi de grande dificuldade, por este ser restrito ao floema e consequentemente difícil de ser extraído em quantidade e pureza suficientes para a produção de antissoro, conforme apontado anteriormente por Jacquemond *et al.* (2009). Mesmo assim, após 10 purificações parciais, seguidas de uma purificação final em gradiente de sulfato de cézio, foi possível obter uma suspensão purificada que, após análise em microscópio eletrônico de transmissão, confirmou a presença de poucas partículas do ToCV, como ilustrado nas Figuras 1 A e B. Não foi possível efetuar a quantificação do vírus purificado. Após quatro injeções em coelho foram produzidos 5 mL de antissoro policlonal contra o ToCV, que foram armazenados à -20°C.

Figura 1: Visualização ao microscópio eletrônico de transmissão do purificado do ToCV. A) purificação parcial individual. B) purificação após a junção de 10 purificações individuais e passagem por gradiente de sulfato de cézio.

4.2 Teste do antissoro

4.2.1 PTA-ELISA

Foi realizado um teste de PTA-ELISA para avaliar a eficiência do antissoro policlonal produzido na detecção do ToCV em extratos de folhas de tomateiro e tubérculos de batata. Os resultados estão na Tabela 2. Os valores de absorbância mostram que não foi possível distinguir de maneira clara as reações entre os extratos sadios (controles) daqueles infectados com o ToCV. Isso se deve, provavelmente à dificuldade para obter suspensão viral sem impurezas para a produção de antissoro. Antissoro policlonal obtido com essas preparações geralmente produzem reações inespecíficas com o extrato de plantas sadias (controles) e precisam ser pré-adsorvidos para uma melhor utilização (Jacquemon *et al.*, 2009). Apesar da dificuldade encontrada para a purificação do ToCV, Duffus *et al.* (1996) tiveram sucesso na purificação de outra espécie de crinivirus, também restrito ao floema, *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) e posterior produção de antissoro policlonal. Esse antissoro foi utilizado por Li *et al.* (1998) em testes sorológicos (ELISA indireto e Western blot) para avaliar a eficiência na detecção do TICV, determinar sua distribuição em plantas infectadas, estudar relações entre isolados deste vírus e detectá-lo em amostras de campo. A detecção sorológica foi comparada com a detecção por RT-PCR e hibridização de ácido nucleico. O vírus foi detectado por ELISA indireto, Western blot, hibridização de ácido nucleico e RT-PCR em ensaios com extratos de tomateiro, tomatilo, batateira e *Nicotiana clevelandii* experimentalmente infectados com o TICV e de plantas de tomate, petúnia e *Ranunculus* sp. naturalmente infectadas no campo. O estudo comparativo dessas técnicas indicou que a RT-PCR foi 100 vezes mais sensível do que os demais testes para a detecção do TICV. Não foram encontradas diferenças serológicas entre quatro isolados do TICV avaliados. Anteriormente, Duffus *et al.* (1986) já haviam purificado o crinivirus *Lettuce infectious chlorosis virus* (LICV) e produzido antissoro policlonal capaz de detectar o vírus de maneira eficiente em extrato de plantas infectadas em teste de ELISA. Jacquemon *et al.* (2009) produziram antissoros policlonais utilizando proteínas capsidiais do ToCV e TICV, purificadas após a expressão em *Escherichia coli*. Ensaios DAS-ELISA foram desenvolvidos para o diagnóstico de rotina e as condições para a preparação das amostras foram determinadas para uma detecção otimizada. Não foram observadas reações

cruzadas entre os antissoros e os respectivos antígenos. No entanto, alguns problemas foram encontrados: ambas as proteínas capsidiais foram pouco imunogênicas; os antígenos ToCV e TICV foram termo sensíveis; e os resultados falso-negativos foram regularmente detectados, particularmente para o ToCV (aproximadamente 5% das amostras). Este último problema, principalmente, fez com que o teste não fosse totalmente confiável para diagnose de rotina. Gugerli (1979) purificou o *Potato leafroll virus* (PLRV) a partir de folhas de batata infectadas. A purificação foi de grande dificuldade, porque esse vírus é restrito ao floema. No final obteve baixas concentrações do vírus purificado. Para melhorar as concentrações foi necessário aumentar a quantidade de material vegetal no início da purificação. No mesmo trabalho foi purificado o *Potato virus A* (PVA), a partir de uma quantidade inicial de 200 g de folhas de batata infectada. Para o PLRV foi necessário utilizar 1000g de folhas. Além disso o material vegetal foi duplamente extraído com tampão de extração. Ao final antissoros foram produzidos com sucesso para ambos os vírus.

Tabela 2: Valores médios de absorbância obtidos em teste de PTA-ELISA para a detecção do *Tomato chlorosis virus* em suspensão purificada e extratos de tecidos foliares de tomateiro e tubérculos de batateira infectados.

Diluição antissoro	Purificado 1/10	Tomateiro		Batateira	
		Infectado	Sadio	Infectado	Sadio
1/250	0,834	0,609	0,513	0,577	0,788
1/500	0,444	0,359	0,285	0,409	0,550

4.2.2 Dot-blot

Inicialmente foram realizados três testes independentes para analisar a possibilidade de detecção do ToCV, com o antissoro produzido, em teste de dot-blot. Os resultados obtidos indicaram que o aquecimento das amostras, na presença do tampão de dissociação, foi fundamental para eliminar a reação inespecífica do antissoro com proteínas do tecido vegetal sadio e permitir a detecção do vírus, como ilustrado na Figura 2.

Figura 2: Reação sorológica de extratos foliares de tomateiros infectados com o *Tomato chlorosis virus*, sadios (controle) e o purificado viral com o antissoro policlonal em teste de dot-blot. a), c) extratos foliares infectado e sadio, respectivamente, sem aquecimento; b), e) e f) extrato foliar sadio com aquecimento; d) extrato foliar infectado com aquecimento; g), h) purificado viral sem aquecimento

Posteriormente, três ensaios independentes foram realizados para a validação da eficiência do antissoro policlonal para a detecção do ToCV em amostras de tecido de tomateiro previamente analisadas por RT-PCR para a detecção desse vírus. Os testes foram conduzidos sem o conhecimento dos resultados da RT-PCR. Os resultados desses ensaios estão na Tabela 3 e ilustrados nas figuras 3 e 4. No primeiro ensaio, o ToCV não foi detectado somente nas amostras 3 e 8, as quais deram reações positivas na RT-PCR. No segundo ensaio o crinivirus foi detectado por reação sorológica de dot-blot em todas as amostras que também deram reações positivas na RT-PCR. No terceiro ensaio, somente a amostra 8 foi negativa no teste sorológico e positiva na RT-PCR. Além dos ensaios com tomateiro foi realizado um ensaio com batateira. No ensaio realizado com a batateira todas as plantas avaliadas tiveram os mesmos resultados apresentados pela RT-PCR (Figuras 5 e 6). Em conjunto, de um total de 81 plantas de tomate e batata analisadas por RT-PCR e dot-blot, somente em três amostras houve divergência nos resultados, mostrando uma eficiência de 96,3% para o teste de dot-blot. A discrepância dos resultados em três amostras pode estar associada à menor concentração do vírus no tecido foliar, visto que a RT-PCR é um método mais sensível do que métodos serológicos.

Mais uma vez nota-se que o preparo das amostras em tampão de dissociação, seguida de aquecimento, foi eficiente para a eliminação de reações

inespecíficas entre o antissoro e proteínas da planta nos controles sadios (Figuras 3 e 4)

Tabela 3: Ensaios comparativos para a detecção do *Tomato chlorosis virus* por meio da RT-PCR e reação sorológica de dot-blot com antissoro policlonal.

Tomateiro	Ensaio I		Ensaio II		Ensaio III	
	RT-PCR	Dot-blot	RT-PCR	Dot-blot	RT-PCR	Dot-blot
1	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	-	-
3	+	-	+	+	-	-
4	+	+	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	-	-
8	+	-	+	+	+	-
9	+	+	+	+	-	-
10	+	+	+	+	+	+
11	+	+	-	-	+	+
12	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+
20	+	+	-	-	+	+
21	-	-	+	+	+	+
22	-	-	-	-	+	+
23	-	-	+	+	-	-
24	+	+	+	+	-	-
25	+	+	-	-	nt	nt
+s/aq	+	+	+	+	+	+
+c/aq	nt	+	nt	+	nt	+
-s/aq	-	+	-	+	-	+
-c/aq	nt	-	nt	-	nt	-

nt: não testado;

+s/aq: controle positivo sem aquecimento;

+c/aq: controle positivo com aquecimento;

-s/aq: controle negativo sem aquecimento;

-c/aq: controle negativo com aquecimento.

Figura 3: Reação de extratos foliares de tomateiros com o antissoro policlonal contra o *Tomato chlorosis virus* em teste de dot-blot, do terceiro ensaio. 1 a 25: amostras de tomateiros analisadas; a) extrato foliar infectado com o ToCV (controle positivo) sem aquecimento; b) extrato foliar sadio (controle negativo) sem aquecimento; c) extrato foliar infectado com o ToCV (controle positivo, com aquecimento; d) extrato foliar sadios (controle negativo) com aquecimento.

Figura 4: Gel de agarose mostrando o resultado de detecção do *Tomato chlorosis virus* por meio da RT-PCR em amostras de tomateiros do terceiro ensaio. +: controle infectado com o ToCV, -: controle sadio.

O uso de testes sorológicos, tais como PTA-ELISA, dot-blot, entre outros, para a detecção e diagnose de doenças de vírus de plantas é bastante antigo e baseia-se na eficiência do anticorpo, produzido contra um antígeno, de reconhecer e aderir aos epítopos, ou determinantes antigênicos, deste. Os epítopos são geralmente divididos em duas categorias: lineares e conformacionais. Epítopos lineares são aqueles formados por resíduos de aminoácidos dispostos sequencialmente de maneira linear num antígeno protéico. Esse tipo de epítopo não é afetado por tratamentos que alteram a estrutura tridimensional da molécula. Epítopos conformacionais são formados pela reunião de aminoácidos específicos em estruturas secundárias, terciárias ou quaternárias da molécula protéica. Diferente dos epítopos lineares, eles perdem as funções caso desnaturados. Diante desse conhecimento, sugere-se que os anticorpos policlonais produzidos contra a proteína capsidial do ToCV devem reagir majoritariamente com epítopos lineares da molécula, enquanto aqueles anticorpos produzidos contra proteínas da planta (contaminantes), que não foram suficientemente eliminadas durante o processo de purificação do vírus, reagem principalmente com epítopos conformacionais. Dessa maneira, o aquecimento das amostras altera os epítopos das proteínas vegetais, reduzindo significativamente as reações serológicas inespecíficas com o extrato da planta sadia usado como controle negativo no teste de dot-blot. Os epítopos da proteína capsidial do vírus, por não terem sido alterados, reagem com os anticorpos específicos. Forsström *et al.* (2015) estudaram as quantidades relativas de anticorpos produzidos contra epítopos lineares e conformacionais em antissoros policlonais, bem como a capacidade de cada fração de anticorpos para detectar as proteínas alvos (epítopos) em ensaios sorológico de Western blot. Verificaram que a maioria dos antissoros policlonais analisados possuía grande parte dos anticorpos específicos dirigidos aos epítopos lineares e estes, em muitos casos, proporcionaram a detecção do antígeno de peso molecular correto em Western blot. Em contraste, muitos dos anticorpos para epítopos conformacionais não reagiram com suas proteínas alvos nos mesmos ensaios, pois aparentemente os epítopos foram desnaturados no processamento das amostras.

Apesar de o antissoro policlonal produzido contra um isolado brasileiro do ToCV ter sido eficiente para a sua detecção em dot-blot, sua aplicação prática está comprometida por dois aspectos; não ser eficaz em teste sorológico ELISA e ser funcional apenas em alta concentração (diluição 1:20). Diante disso, há necessidade

de novas investigações para obter um purificado de melhor qualidade, para posterior produção de um antissoro policlonal econômico e eficiente em teste de ELISA.

Figura 5: Reação de extratos foliares de batateiras e tomateiros com o antissoro policlonal contra o *Tomato chlorosis virus* em teste de dot-blot. 1 a 7: amostras de batateira analisadas; 8) amostra de batateira sadia; 9) amostra de batateira infectada com o ToCV (controle positivo); Os extratos de 1 a 9 foram aquecidos; 10) amostra de batateira sadia (sem aquecimento) a) extrato foliar de tomateiro infectado com o ToCV (controle positivo) sem aquecimento; b) extrato foliar de tomateiro sadio (controle negativo) sem aquecimento; c) extrato foliar de tomateiro infectado com o ToCV (controle positivo, com aquecimento; d) extrato foliar de tomateiro sadio (controle negativo) com aquecimento.

Figura 6: Gel de agarose mostrando o resultado de detecção do *Tomato chlorosis virus* por meio da RT-PCR em amostras de batateiras. +: controle infectado com o ToCV, -: controle sadio.

4.3 Reação de genótipos de batateira à infecção com o ToCV

Todos os genótipos de batateira inoculados com o ToCV por meio da *B. tabaci* foram suscetíveis à infecção, incluindo as variedades mais cultivadas no Brasil como Ágata, Asterix e Atlantic (Tabela 4). A expressão de sintomas foi variável entre os genótipos infectados. Nenhuma planta infectada da variedade Camila exibiu sintomas. Na Figura 7 são ilustrados os sintomas induzidos pelo crinivírus em alguns genótipos de batateira.

Figura 7: Sintomas do *Tomato chlorosis virus* em alguns genótipos de batateira. a) e b) Ágata, c) e d) Asterix, e) Atlantic, f) Cupido, g) Markies, h) Camila (assintomática).

Tabela 4: Reação de genótipos de batateira inoculados com o *Tomato chlorosis virus* com *Bemisia tabaci* MEAM1 e analisados com base nos sintomas.

Genótipos	Nº plantas infectadas/ Nº plantas inoculadas	Nº plantas sintomáticas
<i>S. calvesscens</i> – SL00-10S	3/5	2
<i>S. chacoense</i> – CH1-A	3/3	3
<i>S. chacoense</i> – SL95	3/5	3
<i>S. phureja</i> – PH11	5/5	1
<i>S. tuberosum</i> cv. Ágata	5/5	5
<i>S. tuberosum</i> cv. Asterix	5/5	3
<i>S. tuberosum</i> cv. Atlantic	5/5	5
<i>S. tuberosum</i> cv. Camila (Embrapa)	2/4	0
<i>S. tuberosum</i> cv. Cupido	5/5	5
<i>S. tuberosum</i> cv. Markies	4/5	2
<i>S. tuberosum</i> cv. Sai 24	5/5	5
<i>S. tuberosum</i> cv. Sanglier	5/5	3
<i>S. tuberosum</i> cv. Santé	4/5	2
<i>S. tuberosum</i> cv. Yagana	5/5	5
<i>S. tuberosum</i> – Camp (Mutação de Atlantic)	3/5	3
<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> – Cancham	5/5	5
<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> – Orus	5/5	5
<i>S. phureja</i> X <i>S. chacoense</i> – GA 18	5/5	5
<i>S. phureja</i> X <i>S. chacoense</i> – HPC 7B	5/5	5
<i>S. tuberosum</i> X <i>S. chacoense</i> – Bach 4	5/5	5
<i>S. tuberosum</i> X <i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> – BB 16	5/5	4

Os resultados da quantificação do ToCV nos diferentes genótipos de batateira por qRT-PCR estão apresentados na figura 8. As plantas infectadas da variedade Camila, assintomáticas, foram as que apresentaram a menor concentração de vírus. A ausência de sintomas e o título viral baixo da variedade Camila podem ser decorrência de resistência à multiplicação do vírus, o que deve ser motivo de futuros estudos. As variedades Orus e Cupido foram as que apresentaram maiores valores médios de concentração viral.

Figura 8: Quantificação do título do ToCV nas variedades de batateira através de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR). As linhas em negrito dentro das caixas representam as medianas e os pontos representam os valores atípicos (“outliers”). Letras diferentes indicam que houve diferença estatística pelo teste não paramétrico de comparação de médias de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Não parece haver relatos de avaliações de resistência/tolerância de genótipos de batateira à infecção com o ToCV, visto que a constatação desse crinivirus infectando essa solanácea é relativamente recente no Brasil. Também não há dados que informem os danos quantitativos e qualitativos associados a esse crinivirus. Há, por outro lado, relatos sobre o comportamento de genótipos de batateira em relação

ao vetor do crinivirus, a *B. tabaci*. Rocha *et al.* (2012) avaliaram 30 genótipos de batateira para resistência a *B. tabaci* MEAM1 e os genótipos que tiveram menor atratividade em teste com chance de escolha após 48 h foram BACH 4 (1,4 adultos/10 cm²) e HPC 5B (2,0 adultos/10 cm²). Quanto à oviposição, em teste sem chance de escolha, os genótipos que apresentaram os menores valores foram BACH 4 (2,5 ovos/cm²), HPC 9B (3,0 ovos/cm²), Baraka (4,2 ovos/cm²) e Achat (5,3 ovos/cm²). O genótipo BACH 4, que obteve os melhores resultados para atratividade e oviposição, também foi avaliado no presente estudo, porém não apresentou resistência ao ToCV, pois todas as plantas testadas foram infectadas. Pereira (2016) avaliou as cultivares Ágata e BACH 4 infectadas ou não com o ToCV e observou os adultos de *B. tabaci* MEAM1 que se alimentaram em plantas infectadas apresentaram um ciclo completo (ovo, 1º instar, 2º instar, 3º instar e 4º instar) mais curto em relação às que se alimentaram em plantas saudáveis. Quando as fases foram avaliadas separadamente somente o 4º instar apresentou diferença.

Informações sobre resistência ao ToCV são encontradas para o tomateiro (*S. lycopersicum*). Aparentemente, o primeiro estudo de avaliação de resistência de genótipos de tomateiro ao ToCV foi desenvolvido por Garcia-Cano *et al.* (2010), que identificaram duas fontes de resistência: a linhagem 802-11-1, 23, derivada de dois ciclos de autopolinização da linhagem IAC CN RT e a linhagem 821-13-1, obtida depois de dois ciclos de autopolinização do acesso LA 1028 (*S. chmielewskii*). Mais recentemente, Mansilla-Córdova *et al.* (2017) avaliaram a reação de 56 genótipos de tomateiro à infecção com o ToCV e identificaram a mesma linhagem IAC CN RT (*S. lycopersicum* cv. Angela Gigante x *S. peruvianum* LA 444-1) como altamente resistente ao isolado brasileiro do ToCV. Alguns desses genótipos também foram avaliados por Mansilla Cordova *et al.* (2017) quanto à tolerância à doença e exibiram respostas bastante variáveis. Apesar da existência de fontes de resistência ao ToCV em tomateiro, até o momento não há variedades ou híbridos comerciais resistentes a esse crinivirus disponíveis aos produtores.

Diante do número pequeno de genótipos de batateira analisados neste trabalho para reação ao ToCV, sugere-se que novos estudos sejam desenvolvidos para melhor explorar a variabilidade genética de espécies/variedades de batateira, em uma base genética mais ampla.

4.4 Medidas de trocas gasosas

Os resultados das análises de taxa fotossintética líquida, transpiração e condutância estomática de plantas de batata sadias e infectadas com o ToCV estão apresentados nas figuras 9, 10 e 11, respectivamente. A fotossíntese foi significativamente reduzida nas plantas infectadas dos genótipos SL95, Sante, Sanglier, HPC7B, GA18, CH1-A, BB16, Atlantic e Asterix (Figura 9). Essa variável, no entanto, não foi afetada nas plantas infectadas da variedade Camila, que foi assintomática e, como apontado anteriormente, apresentou a menor concentração média de vírus nos tecidos (Figura 8). As análises da transpiração (E) e condutância estomática (gs) não mostraram diferenças significativas entre as plantas sadias e doentes para nenhum genótipo avaliado (Figuras 10 e 11).

Sampol *et al.* (2003) relataram diferenças fotossintéticas entre plantas de uva malvasia infectadas com *Grapevine fan leaf virus* (GFLV), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e *Grapevine leaf roll-associated virus* (GLRaV) e plantas sadias. A queda na fotossíntese pode ser em parte causada pela inibição do fotossistema 2 (PS2), pois as proteínas virais são frequentemente propostas como inibidoras do transporte fotossintético de elétrons. Em espinafre, por exemplo, a proteína da capa proteica do *Tobacco mosaic virus* (TMV) foi essencialmente ligada ao complexo PS2 e considerada responsável pelo decréscimo do transporte de elétrons do PS2 (HODGSON *et al.*, 1989; BANERJEE *et al.* 1995).

Como não houve diferença entre os valores de gs e E entre plantas doentes e sadias, para os genótipos de batateira que apresentaram diferenças significativas em valores de taxa fotossintética líquida, sugere-se que o dano causado pelo vírus não tem relação com a difusão de CO₂ e água na planta. A redução da taxa fotossintética líquida pode estar associada ao dano na parte fotoquímica de forma similar ao apresentado pelo TMV em espinafre (HODGSON *et al.*, 1989; BANERJEE *et al.* 1995).

Figura 9: Representações das medidas de fotossíntese dos genótipos de batateira infectados com o *Tomato chlorosis virus* e sadias. As linhas em negrito dentro das caixas representam as medianas. Os asteriscos indicam que houve diferença estatística pelo teste não paramétrico de comparação de médias de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Figura 10: Representações das medidas de condutância estomática (gs) dos genótipos de batateira infectados com o *Tomato chlorosis virus* e sadias. As linhas em negrito dentro das caixas representam as medianas. Não houve diferença estatística pelo teste não paramétrico de comparação de médias de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Figura 11: Representação das medidas de transpiração (E) dos genótipos de batateira infectados com o *Tomato chlorosis virus* e sadias. As linhas em negrito dentro das caixas representam as medianas. Não houve diferença estatística pelo teste não paramétrico de comparação de médias de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

4.5 Danos provocados pelo ToCV em batateira

4.5.1 Primeiro experimento

A infecção com o ToCV afetou todas as variáveis analisadas: peso fresco da parte aérea, peso e número de tubérculos e peso médio dos tubérculos. No caso do

peso fresco da parte aérea (Figura 12) houve redução de 55% para a variedade Ágata e 47% para a variedade Asterix.

Figura 12: Representação das medidas de massa fresca da parte aérea das plantas de batata das variedades Ágata e Asterix sadias e infectadas com o *Tomato chlorosis virus*. As linhas em negrito representam as medianas. Os losangos representam as médias. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A produção de tubérculos por planta foi significativamente menor para aquelas infectadas de ambas as variedades (Figura 13). Plantas da variedade Ágata sadias produziram uma média de 103 g de tubérculos, enquanto as infectadas produziram 0,46 g. No caso da variedade Asterix, as plantas sadias produziram em média 311,5 g de tubérculo, enquanto as infectadas produziram 5,75 g. Também houve redução do número de tubérculos produzidos por planta (Figura 14) e peso médio dos tubérculos (Figura 15). Com relação ao número de tubérculos, as plantas sadias da variedade Ágata produziram cerca de 11 tubérculos, enquanto as doentes não produziram tubérculos. Para a variedade Asterix, as plantas sadias produziram cerca de 23 tubérculos e as plantas doentes cerca de 2 tubérculos.

Figura 13: Representação das medidas de peso dos tubérculos de batata das variedades Ágata e Asterix sadias e infectadas com o *Tomato chlorosis virus*. As linhas em negrito representam as medianas os pontos representam os valores atípicos (“outliers”). Os losangos representam as médias. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Figura 14: Representação do número de tubérculos produzidos pelas plantas de batata das variedades Ágata e Asterix sadias e infectadas com o *Tomato chlorosis virus*. As linhas em negrito representam as medianas os pontos representam os valores atípicos (“outliers”). Os losangos representam as médias. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Figura 15: Representação do peso médio dos tubérculos produzidos pelas plantas de batateira das variedades Ágata e Asterix sadias e infectadas com o *Tomato chlorosis virus*. As linhas em negrito representam as medianas. Os losangos representam as médias. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.5.2 Segundo experimento

Mais uma vez constatou-se que o ToCV reduziu a massa fresca da parte aérea (Figura 16) da batateira, para ambas as variedades estudadas. Para a variedade Ágata ocorreu uma redução de 65,3% e para Asterix houve uma redução de 45,1%.

Figura 16: Representação das medidas de massa fresca da parte aérea das plantas de batata das variedades Ágata e Asterix sadias e infectadas com o *Tomato chlorosis virus*. As linhas em negrito representam as medianas. Os losangos representam as médias. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Em relação ao peso dos tubérculos produzidos por planta (Figura 17) obteve-se redução de 82,3% para a variedade Ágata e de 56,2% para Asterix. Para o peso médio dos tubérculos houve uma redução de 67,5% para a variedade Ágata e 69,4% para a variedade Asterix (Figura 18). Em relação ao número de tubérculos (Figura 19), a variedade Ágata doente produziu menos tubérculos do que as plantas sadias. Para a variedade Asterix ocorreu o inverso, o número de tubérculos das plantas doentes foi maior. Apesar do maior número de tubérculos colhidos, eles eram menores. A Figura 20 ilustra o número e tamanho de tubérculos de batata colhidos de plantas sadias e infectadas com o ToCV, para as duas variedades.

A infecção no início da cultura da batateira por PVY resulta em danos de até 33% (NOLTE *et al.*, 2003) e quando são utilizados tubérculos infectados para o plantio os danos podem chegar a 80% (BANTARRI *et al.*, 1993). O PLRV pode causar danos similares em batateira, além de causar mais perdas econômicas aos produtores devido à necrose dos tubérculos, que muitas vezes podem não ser vista na colheita, mas se desenvolvem durante o armazenamento (NOVY *et al.*, 2007). Não há estudos de quantificação de danos causados pelo ToCV em batateira.. Há, como apontado anteriormente, relatos de danos causados pelo ToCV em pimentão e tomateiro. Em pimentão os danos foram da ordem de 45% para o cultivar Spadi e 75% para a cultivar Pescara. Para o tomateiro os danos variaram de 31,5 % para a

cultivar Sahel a 51,8% para a cultivar Saturno (Mansilla Córdova *et al.*, 2017). Para a batateira os danos da produção foram ligeiramente maiores aos obtidos para as outras solanáceas indicando o grande prejuízo que o ToCV pode causar à cultura, quando as plantas são infectadas bem jovens. Resta avaliar os danos que advêm do plantio de tubérculos já infectados com o ToCV. Por isso a descoberta de genótipos resistentes de batata é de grande importância visto que é uma doença de difícil controle ou erradicação devido à ampla gama de hospedeiros e alta eficiência de transmissão pela mosca branca (WINTERMANTEL & WISLER, 2006). É difícil saber a(s) causa(s) da discrepância acentuada nas produções de batata das variedades Ágata e Asterix encontrada entre os dois ensaios. Parte pode ser atribuído à infecção com o ToCV, enquanto o restante pode ser de natureza ambiental. O primeiro ensaio foi conduzido no período de 21/09 a 17/12/2015, com temperaturas máxima e mínima foram 31,7°C e 19,8°C, respectivamente, com média de 25,7°C. Nesse período houve uma média diária de insolação de 6,7 h (Apêndice 1). O segundo ensaio foi realizado no período de 12/06 a 11/09/2017. Nesse período as temperaturas máxima e mínima foram 26,3°C e 11,1°C, com média de 18,7°C. A insolação diária foi de 8h (Apêndice 2). De acordo com Menzer (1985) a temperatura e a insolação influenciam diretamente o desenvolvimento da parte aérea da batateira e a produção. Temperaturas na faixa de 26°C a 30°C contribuem para redução na produção. Jackson (1999) apontou que baixos níveis de luminosidade causam atraso na tuberização. Pode-se supor, portanto, que temperatura média alta e menor luminosidade durante a realização do primeiro ensaio explicam, em parte, principalmente a redução da produção, ocasionando a discrepância encontrada entre dois ensaios.

Há um intenso programa mundial de certificação de batata-semente em decorrência da perpetuação dos vírus no tubérculo. Essa característica causa a degenerescência dos tubérculos, pois a cada ciclo da batateira ocorre aumento da incidência dos vírus na cultura, pois o agricultor se utiliza dos tubérculos colhidos como batata-semente. Por isso, para evitar a degenerescência da batata-semente é necessário tomar algumas medidas, como uso de tubérculos certificados, escolha de locais isolados de plantas que possam servir de fonte de inóculo de viroses e escolha de variedades resistentes. O ToCV não está na lista de viroses do Ministério da Agricultura testadas para certificação. Considerando-se o dano potencial que o ToCV pode provocar no cultivo da batateira, é oportuno analisar a inclusão desse

patógeno em programas de certificação de batata-semente, conforme sugerido por Souza Dias *et al.* (2016), e já ocorre para o PVX, PVY, PLRV e PVS.

Figura 17: Representação das medidas de peso dos tubérculos de batata das variedades Ágata e Asterix sadias e infectadas com o *Tomato chlorosis virus*. As linhas em negrito representam as medianas os pontos representam os valores atípicos (“outliers”). Os losangos representam as médias. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Figura 18: Representação do peso médio dos tubérculos produzidos pelas plantas de batateira das variedades Ágata e Asterix sadias e infectadas com o *Tomato chlorosis virus*. As linhas em negrito representam as medianas, os pontos representam os valores atípicos (“outliers”). Os losangos representam as médias. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Figura 19: Representação do número de tubérculos produzidos pelas plantas de batata das variedades Ágata e Asterix sadias e infectadas com o *Tomato chlorosis virus*. As linhas em negrito representam as medianas os pontos representam os valores atípicos (“outliers”). Os losangos representam as médias. Letras diferentes indicam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Figura 20: Tubérculos de batata produzidos por plantas das variedades Ágata e Asterix de plantas saudáveis e infectadas com o ToCV. a) Ágata saudável; b) Ágata doente; c) Asterix saudável; d) Asterix doente.

4.6 Identidade do isolado do *Tomato chlorosis virus*

Os resultados da comparação das sequências de nucleotídeos dos amplicons obtidos do isolado viral usado neste trabalho com as sequências correspondentes disponíveis no NCBI GenBank acessos FJ609652 (México), AY903448 (Estados Unidos), KP713349 (Jordânia), KR150985 (China), JQ288897 (Brasil) foram de 99-100% de identidade.

5 CONCLUSÕES

O antissoro policlonal produzido foi eficiente para a detecção do ToCV somente em dot-blot.

A variedade Camila foi a que apresentou o menor título viral e foi a única assintomática.

O ToCV causou reduções no desenvolvimento e na produção de batata das variedades Ágata e Asterix.

REFERÊNCIAS

- ACCOTTO, G. P.; VAIRA, A. M.; VECCHIATI, M.; FINETTI SIALER, M. M.; GALLITELLI, D.; DAVINO, M. First report of *Tomato chlorosis virus* in Italy. **Plant Disease** 85:1208, 2001.
- ALVAREZ-RUIZ, P.; JIMENEZ, C.G.; LEYVA-LÓPEZ, N. E.; MÉNDEZ-LOZANO, J. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Sinaloa, Mexico. **Plant Pathology** 56:1043, 2007
- ANDREATTA, A. Uma perspectiva do que ocorreu no setor nos últimos dez anos. **Batata Show** 16: 25-27, 2006.
- ÁVILA, A. C.; MELO, P. E.; LEITE, L. R.; INOUE-NAGATA, A. K. Ocorrência de vírus em batata em sete estados do Brasil. **Horticultura Brasileira** 27: 490-497, 2009.
- ARRUABARRENA, A., RUBIO, L., GONZÁLEZ-ARCOS, M., MAESO, D., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., FONSECA, M.E.N., BOITEUX, L.S. First report of *Solanum sisymbriifolium* and *S. americanum* as natural weed hosts of *Tomato chlorosis virus* (Genus *Crinivirus*) in South America. **Plant Disease**. 99(6): 895, 2015.
- BANERJEE, N.; WANG, J.Y.; ZAITLIN, M. A single nucleotide change in the coat protein gene of tobacco mosaic virus is involved in the induction of severe chlorosis. **Virology** 207: 234-239, 1995.
- BANTARRI, E.E.; ELLIS, P.J.; KHURANA, S.M.P. Management of diseases caused by viruses and virus-like pathogens. In: Rowe RC (ed) **Potato health management**. American Phytopathological Society (APS) Press, St. Paul, Minnesota, p. 127–133, 1993
- BARBOSA, L. F., YUKI, V. A., MARUBAYASHI, J. M.; DE MARCHI, B. R.; PERINI, F. L.; PAVAN, M. A.; BARROS, D. R.; GHANIM, M.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; RENATE KRAUSE-SAKATE, R. First report of *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. **Pest Management Science** 71: 501–504, 2015.
- BARBOSA, J. C.; COSTA, H.; GIORIA, R.; REZENDE, J. A. M. Occurrence of *Tomato chlorosis virus* in tomato crops in five Brazilian states. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, 4, 256-258, 2011.
- BARBOSA, J.C., REZENDE, J.A.M., COSTA, H. Algumas espécies vegetais suscetíveis ao *Tomato chlorosis virus*. In: **Anais XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. Ouro Preto, MG, 20 a 25 de Outubro de 2013. Sociedade Brasileira de Fitopatologia. Ouro Preto. 2013a.
- BARBOSA, J.C., REZENDE, J.A.M.M., FILHO, A.B. Low genetic diversity suggests a single introduction and recent spread of *Tomato chlorosis virus* in Brazil. **Journal of Phytopathology** 161:884-886. 2013b.

- BARBOSA, J. C.; TEIXEIRA, A. P. M.; MOREIRA, A. G.; CAMARGO, L. E. A.; BERGAMIN FILHO, A.; KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A. M. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Brazil. **Plant Disease** 92:1709, 2008.
- BARBOSA, J.C.; TEIXEIRA, L.D.D.; REZENDE, J.A.M. First report on the susceptibility of sweet pepper crops to *Tomato chlorosis virus* in Brazil. **Plant Disease**, 94(3): 374, 2010.
- BESE, G.; BÓKA, K.; KRIZBAI, L.; TAKÁS, A. First report of *Tomato chlorosis virus* in tomato from Hungary. **Plant Disease** 95:363, 2011.
- BERGER, P.& GERMAN, T. Biotechnology and resistance to potato viruses. In: LOEBENSTEIN, G.; BERGER, P.H.; BRUNT, A.A.; LAWSON, R.H. (eds). **Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes**. Dordrecht, Klumer Academic Publishers, p. 341 – 363, 2001.
- BOITEUX, L.S., FONSECA, M.E.N., REIS, A., COSTA, A.F., FONTES, M.G., GONZÁLES-ACOS, M. Wild radish (*Raphanus* species) and Garden Rocket (*Eruca sativa*) as new Brassicaceae host of *Tomato chlorosis virus* in South américa. **Plant Disease**. 2015. [Online]. Disponível em: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-09-15-1069-PDN>. Consultado em 12/09/2017.
- BONATO O., LURETTE A., VIDAL C., FARGUES J. Modelling temperature dependent bionomics of *Bemisia tabaci* (Q-biotype). **Physiological Entomology** 32:50–55, 2007.
- CALAÇA, H.A. Dinâmica temporal e espacial da virose causa por *Tomato chlorosis virus* (ToCV) em tomateiro. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, 2011.
- CAMARGO FILHO, W.P. Produto interno bruto (PIB) da cadeia produtiva da batata. **Batata Show**, v. 1, n. 2, p. 22, 2001.
- CAMELO GARCIA, V.M. Caracterização biológica e molecular de um isolado do *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) de *Panicum maximum* em São Paulo. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, 2014.
- CASTRO, R. M., HERNANDEZ, E., MORA, F., RAMIREZ, P., HAMMOND, R. W. First report of *Tomato chlorosis virus* in tomato in Costa Rica. **Plant Disease** 93:970, 2009
- CHOER, E. Origem e evolução. In: PEREIRA, A.S., DANIELS, J. (eds). O cultivo da batata na região sul do Brasil. **Embrapa Informação Tecnológica**. p. 57 – 68, 2003.
- DE BARRO P. J., SCOTT K. D. , GRAHAM G. C., LANGE C., SCHUTZE M. K. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bemisia tabaci*. **Molecular Ecology Notes** 3:40-43. 2003.

- DOVAS, C. I., KATIAS, N. I., AVGELIS, A. D. Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of yellowing disease of tomato in Greece. **Plant Disease** 86:1345-1349, 2002
- DUFFUS, J.E.; LARSEN, R.C; LIU, H. Y. Lettuce Infectious Yellows Virus - A new Type of Whitefly-Transmitted Virus. **Phytopathology** 76:97-100, 1986.
- DUFFUS, J.E.; LIU, H.-Y.; WISLER, C.G. Tomato infectious chlorosis virus – a new clostero-like virus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. **European Journal of Plant Pathology** 102: 219-226, 1996.
- ESQUIVEL FARIÑA, A. Identificação de hospedeiros alternativos do Tomato chlorosis virus - Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2015.
- ESQUIVEL, F.A. REZENDE, J.A.M. Identificação de outros hospedeiros alternativos do *Tomato chlorosis virus* (ToCV) no Brasil. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, In: **Anais: 48o Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. São Pedro, SP, Agosto de 2015. Sociedade Brasileira de Fitopatologia. São Pedro, SP. 2015.
- FAO. FAOSTAT. 2013. <http://faostat.fao.org>. Consultado em 30/10/2017.
- FIALLO-OLIVÉ, E., SPINO, A.I., BOTELLA-GUILLÉN, M., GÓMEZ-GONZÁLES, E., NAVAS-CASTILLO, J. Tobacco: a new natural host of *Tomato chlorosis virus* in Spain. **Plant Disease** 98(8): 1162, 2014.
- FIGUEIRA, A. R. Credenciamento do CIV-MG no Renascer abre novas perspectivas para a melhoria da qualidade da batata-semente produzida no Brasil. **Batata Show** 16: 28, 2006.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna para a produção de hortaliças. Viçosa-MG: UFV, 2008. 421 p.
- FONSECA, M.E.N., BOITEUX, M.F., LIMA, M.F., MENDONÇA, J.L., COSTA, A.F., FONTES, M.G., COSTA, H. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting eggplant and Scarlet eggplant in Brazil. **Plant Disease** [Online]. 2016. Disponível em <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-09-15-1087-PDN> Consultado em 12/09/2017.
- FONSECA, M.E.N., BOITEUX, L.S., ABREU, H., PEREIRA-CARVALHO, R.C.. *Physalis angulata*: A new natural host of *Tomato chlorosis virus* in Brazil. **Plant Disease**. 97(5):692, 2013.
- FORSSTRÖM, B., AXNÄS, B.B., ROCKBERG, J., DANIELSSON, H., BOHLIN, A. Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. **PLOS ONE** DOI:10.1371/journal.pone.0121673, 2015.
- FORTES, I.M.; NAVAS-CASTILLO, J. Potato (*Solanum tuberosum*) is an experimental and natural host of *Tomato chlorosis virus*. **3rd Conference of the International Working Group on Legume and Vegetable Viruses**. Ljubljana, Slovenia, 56. 2008.

- FORTES, I.M., NAVAS-CASTILLO, J. Potato, an experimental and natural host of the crinivirus *Tomato chlorosis virus*. **European Journal of Plant Pathology** 134:81-86, 2012.
- FORTES, I. M., MARIONES, E., NAVAS-CASTILLO, J. *Tomato chlorosis virus* in pepper: prevalence in commercial crops in southeastern Spain and symptomatology under experimental conditions. **Plant Pathology**. doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02584.x, 2012.
- FREITAS, D. M. S., NARDIN, I., SHIMOYAMA, N., SOUZA-DIAS, J. A. C., REZENDE, J. A. M. First report of *Tomato chlorosis virus* in potato in Brazil. **Plant Disease**, 96, 593, 2012
- FREITAS, D. M. S., REZENDE, J. A. M., LOURENÇÃO, A. L., MATOS, E. S. Transmissão do *Tomato chlorosis virus* (ToCV) por *Trialeurodes vaporariorum* no Brasil. **Summa Phytopatologica** 37:15. (Suplemento), 2011
- GARCÍA-CANO, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. Resistance to *Tomato chlorosis virus* in Wild Tomato Species that Impair Virus Accumulation and Disease Symptom Expression **Phytopathology**.100(6) 582-592, 2010
- GIUSTO, A. B. Dissertação. Tecnologia do broto como propágulo na produção de minitubérculos de batata-semente: avaliação do ELISA na detecção de quatro vírus regulamentados. Dissertação (Mestrado em Tecnologia da Produção agrícola), Pós-Graduação – IAC, Campinas, SP, 2006.
- GOUVÊA, M.M.; FREITAS, D.M.S; REZENDE, J.A.M; WATANABE, L.F.M.; LOURENÇÃO, A.L. Bioassay of insecticides on mortality of Bemisia tabaci biotype B and transmission of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) on tomates. **Phytoparasitica** 45(1) 95-101. 2017.
- GUGERLI, P. *Potato virus A* and *Potato leafroll virus*: Purification, Antiserum Production and Serological Detection in Potato and Test Plants by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Phytopathology** 96: 97-107, 1979.
- HANAFI, A. Invasive species: a real challenge to IPM in the Mediterranean region? **European Whitefly Studies Network Newsletter**. n13, p.14. John Innes Centre, Norwich (GB), 2002.
- HAWKES, J. G., FRANCISCO-ORTEGA, J. The early history of the potato in Europe. **Euphytica**. V 70, N 1-2, 1-7, DOI: 10.1007/BF00029633, 1993.
- HODGSON, R.A.J.; BEACHY, R.N.; PAKRASI, H.B. Selective inhibition of photosystem II in spinach by tobacco mosaic virus: an effect of the viral coat protein. **FEBS Letters**, V (1–2)245: 267-270, 1989.
- HOROWITZ A.; KONTSEDALOV S.; KHASDAN V.; ISHAAYA I. Biotypes B and Q of Bemisia tabaci and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 58:216–225, 2005.

- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. [online] Disponível na internet via [www](http://www.ibge.gov.br) url: <http://www.ibge.gov.br> Arquivo consultado em 12 de outubro de 2017.
- JACKSON, S.D. Multiple Signaling Pathways Control Tuber Induction in Potato. **Plant Physiology** 119: 1-8, 1999
- JACQUEMOND, M., VERDIN, E., DALMON, A., GUILBAUD, L., GOGNALONS, P. Serological and molecular detection of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus*. **Plant Pathology** 58:210-220, 2009.
- JEFFRIES, C.S. FAO/IPGRI **Technical guidelines for the safe movement of germplasm**. n. 19. Potato. Food and agriculture organization of the united nations, Rome/International Plant Genetics Resources Institute, Rome. 177 p. 1998.
- KARWITHA, M., FENG, Z., YAO, M., CHEN, X., ZHANG, W., LIU, X., TAO, X. The complete nucleotide sequence of the RNA1 of a chinese isolate of *Tomato chlorosis virus*. **Journal of Phytopathology** 162:411-415, 2013.
- KARWITHA, M.; FENG, Z.-K., SHEN, Y.; ESSENDI, W.; ZHANG; J-Y LI, W.-N.; TAO, X.-R. Rapid Detection of *Tomato chlorosis virus* from Infected Plant and Whitefly by One-step Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification. **Journal of Phytopathology** 164(4): 255-263, 2015.
- KIL, E-J., LEE, E-J., CHO, S., AUH, C-K., KIM, D., LEE, K-Y., CHOI, H-S., KIM, C-S, LEE, S. Identification of natural weed hosts of *Tomato chlorosis virus* in Korea by RT-PCR with root tissues. **European Journal of Plant Pathology** 142:419-426. 2015.
- LEGNARO, A.; SÁBIO, R. P. Batata 2007: resultados positivos a partir de março. **Hortifruti Brasil** 64: 12-15, 2007.
- LI, R.H; WISLER, G.C.; LIU, H.Y. ; DUFFUS, J. E. Comparison of Diagnostic Techniques for Detecting *Tomato infectious chlorosis virus*. **Plant Disease** 82(1) 84-88, 1998.
- LIU, H. Y.; DUFFUS, J. E. Beet pseudo-yellows virus: purification and serology. **Phytopathology** v.80 (9): 866-869, 1990.
- LIU, H.Y; WISLER, G; DUFFUS, JE LIU, H-Y. Particle lengths of whitefly-transmitted crinivirus. **Plant Disease**, Vol.84 (7), pp.803-805, 2000.
- LOPES, C.A. In: LOPES, C.A.; BUSO, J.A. Cultivo da Batata (*Solanum tuberosum* L.) Brasília: **Embrapa/CNPq, Boletim Técnico**, 8:35, 1997.
- LOURENÇÃO, A. L., ALVES, A. C., FUGI, C. G. O., MATOS, E. S. Outbreaks of *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Hemiptera: Aleyrodidae) under field conditions in the State of São Paulo, Brazil. **Neotropical Entomology** 37:89-91, 2008.

- LOURO, D., ACCOTTO, G. P., VAIRA, A. M. Occurrence and diagnosis of *Tomato chlorosis virus* in Portugal. **European Journal Plant Pathology** 106:589-592, 2000.
- LOZANO, G., MORIONES, E., NAVAS-CASTILLO, L. First report of sweet pepper (*Capsicum annuum*) as a natural host plant for Tomato chlorosis virus. **Plant Disease**. 88:224, 2003.
- MACEDO, M.A. Progresso temporal e espacial de begomovirose e crinivirose em tomateiro. Tese de doutorado. Universidade de Brasília. 2016
- MAFF. Current recommendations for eradication and containment. PHSI **Handbook of Instructions**. MAFF, London (GB). 2000.
- MANSILLA-CÓRDOVA, PJ, BAMPI, D., RONDINEL-MENDOZA, N.V., MELLO, P.C.T., LOURENÇÃO, A.L., REZENDE, J.A.M. Screening tomato genotypes for resistance and tolerance to Tomato chlorosis virus. **Plant Pathology** 2017 (no prelo).
- MARCHI, B.R. de. Associação de begomovírus e crinivírus com bemisia tabaci espécie new world 2 e Trialeurodes vaporariorum. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2014.
- MARTELLI, G.P., AGRANOVSKY, A.A., BAR-JOSEPH, M., BOSCIA, D., CANDRESSE, T., COUTTS, R.H.A., DOLJA, V.V., HU, J.S., JELKMANN, W., KARASEV, A.V., MARTIN, R.R., MINAFRA, A., NAMBA, S, VETTEN, H.J. IN: KING A.M.Q., ADAMS, M.J. CARSTENS, E.B., LEFKOWITZ, E.J. Eds. **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier Academic Press, San Diego. 2012.
- MARTÍNEZ-ZUBIAUR, Y., FIALLO-OLIVÉ, E., CARRILLO-TRIPP, J., RIVERA-BUSTAMANTE, R. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato in single and mixed infections with *Tomato yellow curl virus* in Cuba. **Plant Disease** 92:836, 2008.
- MENZEL, C.M. Tuberization in Potato at High Temperatures: Interaction between Temperature and Irradiance. **Annals of Botany** 55: 35-39, 1985.
- MOHAMMED, I. U.; YAKUB, A. M.; YUSUF, I.; MUHAMMAD, A. First Report of *Tomato chlorosis virus* Infecting Tomato in Nigeria. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1099-PDN>. **Plant Disease**, 2017
- MORRIS, J., STEEL, E., SMITH, P., BOONHAM, N., SPENCE, N., BARKER, I. Host range studies for *Tomato chlorosis virus*, and *Cucumber vein yellowing virus* transmitted by *Bemisia tabaci* (Gennadius). **European Journal of Plant Pathology** 114:265-273, 2006.

- MOWAT, W.P.; DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts unfractionated antisera. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 15, n.3, p. 233-247, Feb. 1987.
- NAVAS-CASTILLO, J., CAMERO, R., BUENO, M., MORIONES, E. Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain associated with infections of *Tomato chlorosis virus*. **Plant Disease** 84:835-837, 2000.
- NAVAS-CASTILLO, J.; OLIVÉ, E.F.; CAMPOS, S.C. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, 49: 219-248, 2011.
- NOLTE, P.; MILLER, J.S.; GEARY, B.D.; CORSINI D.L. Disease management. In: Stark JC, Love SL (eds) Potato production systems. University of Idaho Extension, USA, p. 153–183, 2003.
- NOVY, R.G.; GILLEN, A.M.; WHITWORTH, J. L. Characterization of the expression and inheritance of potato leafroll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY) resistance in three generations of germplasm derived from *Solanum tuberosum*. **Theor Appl Genet.** 114:1161–1172, 2007.
- ORFANIDOU, C.G.; PAPPI, P.G.; EFTHIMIOU, K.E.; KATIS, N.I.; MALIOGKA, V.I. Transmission of *Tomato chlorosis virus* (ToCV) by *Bemisia tabaci* Biotype Q and Evaluation of Four Weed Species as Viral Sources. **Plant Disease** 100(10): 2043-2049, 2016.
- PAVAN, M.; MELLO, P.; SITOLIN, I. Caracterização parcial de um closterovirus infectando tomateiro na região de Campinas, SP. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, p. 25–37, 1999, Suplemento.
- PEREIRA, L.S. Interações *Bemisia tabaci* biótipo B e *Tomato chlorosis virus* em clones de batata. Tese de doutorado. Instituto Agrônomo, Campinas, SP. 2016
- PEREIRA, J.E.S & FORTES, G.R.L. Organogênese de ápices meristemáticos de batata em meios de isolamento e multiplicação in vitro. **Horticultura Brasileira**, 22(2):197-201, 2004.
- ROCHA, A.B.; LOURENÇÃO, A.L.; MIRANDA FILHO, H.S; HAYASHI, P.C.R; RAMOS, V. J. Resistência de clones de batata a *Bemisia tabaci* biótipo B. **Horticultura Brasileira** 30(1): 32-38, 2012,
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- SAMPOL, B.; BOTA, J.; RIERA, D.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. **New Phytologist**, 160: 403-412, 2003.
- SEGEV, L., WINTERMANTEL, W. M., POLSTON, J. E., LAPIDOT, M. First report of *Tomato chlorosis virus* in Israel. **Plant Disease** 88:1160, 2004.

- SOLÓRZANO-MORALES, A., BARBOZA, N. HERNÁNDEZ, E., MORA-UMANÃ, F., RAMÍREZ, P. New discovered natural host of *Tomato chlorosis virus* in Costa Rica. **Plant Disease**. 95(4): 497, 2011.
- SOUZA, T. A. Tomato chlorosis virus, hospedeiras alternativas e interação com tospovírus em tomateiro - Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília 2016.
- SOUZA DIAS, J.A.C.; IMAUTI, M.T.; FISCHER, I.H. Doenças da batateira. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia Vol 2: Doenças das plantas cultivadas**. 5 ed. Ouro Fino -MG: Ceres, 2016. cap. 16, p. 125-147.
- SOUZA-DIAS, J.A.C., TIBO, L.H.S., MAURO, A.R., FÁVARO, C.P., SAWASAKI, H.E., NOGUEIRA, L.A.S., REZENDE, J.A.M., BARBOSA, J.C. Potential contribution of *Datura stramonium* on bio-monitoring Crinivirus (*Tomato chlorosis virus* – ToCV) and Luteovirus (*Potato leafroll virus* – PLRV) in seed-potato production. **Summa Phytopathologica** 38: supplement, 2012.
- STEVENSON, R.; LORIA, R., FRANC, G. D., WEINGARTNER, D. P. Compendium of Potato Diseases. St. Paul: **The American Phytopathological Society**. 134p. 2001.
- THOMPSON J.D; HIGGINS D.G.; GIBSON T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** Oxford 22: 4673-4680.1994.
- TSAI, W. S., SHIH, S. L., GREEN, S. K., HANSON, P., LIU, H. Y. First report of the occurrence of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in Taiwan. **Plant Disease** 88:311, 2004.
- Tzanetakis, I.E.; Martin, R.R.; Wintermantel, W.M. Epidemiology of criniviruses: an emerging problem in world agriculture. **Frontiers in Microbiology** 4, 119. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00119>, 2013.
- WINTERMANTEL, W.M., POLSTON, J.E., ESCUDERO, J., PAOLI, E.R. First report of *Tomato chlorosis virus* in Puerto Rico. **Plant Disease** 85:228, 2001.
- WINTERMANTEL, W.M., WISLER, G.C. Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus*. **Plant Disease** 90:814-819, 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** 88:402-409, 1998.

APÊNDICE

Apêndice 1: Série de Dados Climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba, SP Departamento de Engenharia de Biossistemas Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo LEB - ESALQ – USP. Período de 21/09 a 17/12/2015.

Dia	Mês	R.Global cal/cm.d	Insolação h/d	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Temperatura Média (°C)
21	SET	612	10,4	34,7	17,3	26,0
22	SET	525	10,5	34,6	16,4	25,5
23	SET	531	10,5	35,0	16,8	25,9
24	SET	520	9,8	36,4	17,1	26,8
25	SET	451	7,6	33,0	18,2	25,6
26	SET	322	3,7	31,7	20,5	26,1
27	SET	548	10,6	35,9	21,4	28,7
28	SET	216	2,2	25,8	20,3	23,1
29	SET	383	4,4	27,9	18,2	23,1
30	SET	371	5,9	30,2	17,8	24,0
1	OUT	456	7,4	30,5	18,8	24,7
2	OUT	619	10,6	33,8	17,8	25,8
3	OUT	330	2,7	30,7	21,6	26,2
4	OUT	317	2,3	28,8	19,6	24,2
5	OUT	611	10,7	27,8	17,2	22,5
6	OUT	578	10,4	31,5	14,6	23,1
7	OUT	552	10,8	34,0	15,0	24,5
8	OUT	548	9,8	35,3	19,0	27,2
9	OUT	617	10,6	33,1	19,6	26,4
10	OUT	434	5,5	30,2	19,1	24,7
11	OUT	441	5,7	32,3	21,1	26,7
12	OUT	559	9,0	29,8	19,3	24,6
13	OUT	489	8,9	31,0	17,5	24,3
14	OUT	557	10,6	36,0	17,2	26,6
15	OUT	696	12,0	36,8	19,8	28,3
16	OUT	622	10,7	37,6	19,4	28,5
17	OUT	674	12,0	35,5	18,6	27,1
18	OUT	669	12,0	27,1	16,5	21,8
19	OUT	571	10,8	33,8	15,8	24,8
20	OUT	531	9,7	37,6	17,9	27,8
21	OUT	458	7,6	34,0	23,2	28,6
22	OUT	329	2,6	32,6	20,6	26,6
23	OUT	423	5,2	28,9	17,8	23,4
24	OUT	718	12,0	30,9	18,0	24,5
25	OUT	718	12,0	32,1	17,7	24,9
26	OUT	559	6,8	30,0	17,8	23,9
27	OUT	416	3,6	30,7	20,4	25,6
28	OUT	247	2,5	27,6	20,8	24,2
29	OUT	715	12,0	31,9	18,6	25,3
30	OUT	718	12,0	34,1	18,4	26,3
31	OUT	303	1,9	29,2	19,6	24,4
1	NOV	183	0,0	26,6	21,2	23,9
2	NOV	393	3,8	33,4	22,8	28,1
3	NOV	237	0,2	27,1	23,2	25,2
4	NOV	117	0,3	29,8	21,8	25,8
5	NOV	339	0,2	27,7	19,6	23,7
6	NOV	398	3,9	31,6	21,6	26,6
7	NOV	265	0,4	28,1	19,3	23,7

8	NOV	230	0,0	27,3	19,4	23,4
9	NOV	485	4,0	31,9	21,2	26,6
10	NOV	510	8,3	34,8	19,6	27,2
11	NOV	498	5,6	33,9	21,2	27,6
12	NOV	531	8,7	34,3	21,0	27,7
13	NOV	525	7,3	33,4	20,9	27,2
14	NOV	648	10,6	36,6	21,0	28,8
15	NOV	650	10,7	34,2	21,3	27,8
16	NOV	334	4,8	30,3	21,9	26,1
17	NOV	421	4,0	32,0	20,0	26,0
18	NOV	560	10,1	32,3	18,8	25,6
19	NOV	570	8,5	32,2	22,8	27,5
20	NOV	377	3,4	28,1	18,8	23,5
21	NOV	480	6,1	28,9	21,3	25,1
22	NOV	665	11,1	31,5	17,8	24,7
23	NOV	144	1,3	26,8	20,4	23,6
24	NOV	136	0,0	23,7	19,7	21,7
25	NOV	209	0,0	24,9	19,6	22,3
26	NOV	480	5,9	30,1	21,0	25,6
27	NOV	709	12,0	32,9	18,2	25,6
28	NOV	636	10,3	32,2	19,9	26,1
29	NOV	377	3,4	31,6	22,2	26,9
30	NOV	500	3,9	28,1	23,0	25,6
1	DEZ	524	3,3	29,8	18,1	24,0
2	DEZ	718	8,9	32,0	19,2	25,6
3	DEZ	607	5,7	30,8	20,8	25,8
4	DEZ	611	9,2	34,3	21,2	27,8
5	DEZ	430	4,5	31,9	22,2	27,1
6	DEZ	490	6,0	32,1	21,7	26,9
7	DEZ	479	5,8	33,8	21,7	27,8
8	DEZ	686	11,2	36,1	21,7	28,9
9	DEZ	462	2,7	29,9	23,0	26,5
10	DEZ	402	0,7	27,7	22,6	25,2
11	DEZ	639	10,0	34,5	19,8	27,2
12	DEZ	528	7,1	35,2	20,5	27,9
13	DEZ	603	9,0	35,7	22,9	29,3
14	DEZ	635	5,9	33,6	23,1	28,4
15	DEZ	440	4,7	32,0	21,2	26,6
16	DEZ	411	0,6	28,3	21,1	24,7
17	DEZ	717	11,1	33,4	19,6	26,5
Média		488,0	6,7	31,7	19,8	25,7

Apêndice 2: Série de Dados Climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba, SP Departamento de Engenharia de Biossistemas Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo LEB - ESALQ – USP. Período de 12/06 a 11/09/2017.

Dia	Mês	R.Global cal/cm.d	Insolação h/d	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Temperatura Média (°C)
12	JUN	204	2,5	20,7	9,3	15,0
13	JUN	101	0,0	18,9	11,2	15,1
14	JUN	330	7,5	23,9	13,1	18,5
15	JUN	396	10,1	25,1	10,6	17,9
16	JUN	381	9,5	25,7	9,5	17,6
17	JUN	384	9,6	27,2	11,0	19,1
18	JUN	229	3,5	26,0	11,8	18,9
19	JUN	311	8,1	27,8	13,7	20,8
20	JUN	164	0,0	21,3	15,8	18,6
21	JUN	327	8,0	24,6	10,6	17,6
22	JUN	318	9,4	26,4	10,8	18,6
23	JUN	414	10,8	25,8	10,6	18,2
24	JUN	401	10,3	25,6	9,6	17,6
25	JUN	413	10,8	25,0	10,9	18,0
26	JUN	315	8,1	26,1	8,8	17,5
27	JUN	325	7,5	25,3	10,3	17,8
28	JUN	301	8,4	26,5	9,6	18,1
29	JUN	322	9,3	27,9	11,5	19,7
30	JUN	302	6,4	27,2	11,0	19,1
1	JUL	364	8,2	24,1	12,3	18,2
2	JUL	344	7,4	20,3	11,4	15,9
3	JUL	353	9,1	21,3	10,7	16,0
4	JUL	336	8,4	21,4	6,4	13,9
5	JUL	362	9,3	22,6	6,4	14,5
6	JUL	292	8,2	23,4	6,8	15,1
7	JUL	250	3,9	23,8	8,7	16,3
8	JUL	328	6,8	24,8	11,2	18,0
9	JUL	401	9,6	25,2	10,0	17,6
10	JUL	331	7,6	26,9	9,0	18,0
11	JUL	325	9,1	27,1	9,7	18,4
12	JUL	318	8,8	27,2	9,4	18,3
13	JUL	319	8,3	26,7	8,4	17,6
14	JUL	426	10,5	26,5	9,6	18,1
15	JUL	415	10,1	26,6	9,9	18,3
16	JUL	363	8,1	27,1	13,0	20,1
17	JUL	334	9,6	29,7	11,8	20,8
18	JUL	89	0,0	16,8	14,2	15,5
19	JUL	291	6,8	20,3	8,8	14,6
20	JUL	298	7,0	26,4	7,6	17,0
21	JUL	412	10,0	26,9	10,8	18,9
22	JUL	427	10,6	26,6	8,5	17,6
23	JUL	433	10,8	28,1	8,7	18,4
24	JUL	348	9,5	26,7	8,3	17,5
25	JUL	338	9,4	27,7	8,4	18,1
26	JUL	336	9,5	28,0	9,4	18,7
27	JUL	339	9,5	26,9	9,5	18,2
28	JUL	442	11,1	26,2	7,5	16,9
29	JUL	449	11,4	26,5	8,8	17,7
30	JUL	442	11,1	26,5	11,0	18,8
31	JUL	285	7,8	25,1	8,6	16,9
1	AGO	183	1,1	24,4	8,5	16,5
2	AGO	285	5,4	28,5	11,8	20,2

3	AGO	240	5,6	23,2	15,2	19,2
4	AGO	403	7,9	23,4	10,2	16,8
5	AGO	386	7,3	22,7	12,2	17,5
6	AGO	476	10,3	24,7	9,5	17,1
7	AGO	339	9,3	29,0	7,9	18,5
8	AGO	310	7,6	31,0	11,2	21,1
9	AGO	357	9,5	32,1	12,7	22,4
10	AGO	369	9,8	29,5	13,7	21,6
11	AGO	452	9,5	28,3	11,2	19,8
12	AGO	435	9,0	31,8	11,2	21,5
13	AGO	406	8,0	32,9	13,3	23,1
14	AGO	291	3,5	28,2	17,1	22,7
15	AGO	153	1,4	18,9	12,8	15,9
16	AGO	42	1,0	18,8	13,6	16,2
17	AGO	33	0,0	18,3	13,8	16,1
18	AGO	50	0,0	19,4	14,8	17,1
19	AGO	10	0,0	18,7	15,4	17,1
20	AGO	140	0,0	26,3	15,6	21,0
21	AGO	240	4,5	19,4	11,8	15,6
22	AGO	435	10,0	24,9	10,6	17,8
23	AGO	374	9,6	28,5	11,8	20,2
24	AGO	428	9,7	27,5	12,2	19,9
25	AGO	519	11,8	29,5	10,2	19,9
26	AGO	525	12,0	29,6	11,6	20,6
27	AGO	543	12,0	21,4	12,1	16,8
28	AGO	430	10,3	30,9	12,9	21,9
29	AGO	433	10,3	31,7	11,3	21,5
30	AGO	444	9,8	33,1	10,6	21,9
31	AGO	447	10,0	27,6	15,8	21,7
1	SET	506	9,3	29,6	14,2	21,9
2	SET	547	10,5	29,2	13,5	21,4
3	SET	543	10,4	29,5	10,1	19,8
4	SET	461	10,5	30,0	10,8	20,4
5	SET	456	10,6	30,8	9,3	20,1
6	SET	554	10,7	31,2	12,2	21,7
7	SET	552	10,7	32,0	12,5	22,3
8	SET	541	10,4	32,8	11,9	22,4
9	SET	544	10,4	33,0	13,5	23,3
10	SET	578	11,5	32,2	12,9	22,6
11	SET	452	10,4	33,7	14,1	23,9
Média		354,8	8,0	26,3	11,1	18,7