

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

Prevalência de espécies de orthospovirus infectando tomateiros portadores do gene Sw-5 e efeito do crinivirus *Tomato chlorosis virus* na infecção com orthospovirus

Jorge Massaki Hasegawa

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

Piracicaba
2022

Jorge Massaki Hasegawa
Engenheiro Agrônomo

Prevalência de espécies de orthospovirus infectando tomateiros portadores do gene
Sw-5 e efeito do crinivirus *Tomato chlorosis virus* na infecção com orthospovirus
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2022

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

Hasegawa, Jorge Massaki

Prevalência de espécies de orthospovirus infectando tomateiros portadores do gene *Sw-5* e efeito do crinivirus *Tomato chlorosis virus* na infecção com orthospovirus / Jorge Massaki Hasegawa. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - -, Piracicaba, 2022.

58 p.

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

1. Complexo do vira-cabeça 2. Resistência genética 3. GRSV 4. TCSV
I. Título

DEDICATÓRIA

Dedicado aos meus pais, Yaeko Hasegawa e Shunji Hasegawa, pela fé alicerçada no cultivo cuidadoso da terra.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento especial é para a Engenheira Agrônoma Doutora Viviana Marcela Camelo García, minha tutora, cujo brilhantismo me fez contemplar um mundo mais amplo, perfeitamente imperfeito, embora em escalas nanométricas.

Ao Professor Doutor Jorge Alberto Marques Rezende, pelo direcionamento deste trabalho diante de tantas possibilidades e tão poucas certezas.

Ao meu orientador Professor Doutor Armando Bergamin Filho, que é indubitavelmente o professor de todos os engenheiros agrônomos do Brasil. Bergamin Filho transcende a história da Fitopatologia e sempre estará no exercício da nossa razão como uma gigantesca inspiração.

Não houve para mim honra maior. “- Pensem!”, exige com austeridade e leveza o grande mestre. Aquiescemos com humilde para nos tornarmos grandes.

A todos os funcionários da gloriosa Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em especial à Fabiana Nunes Wolak, que é certamente algum tipo de anjo, e a todos os companheiros do Laboratório de Virologia da ESALQ nesta claudicante busca do que acreditamos que seja a verdade, que não é - senão - a ciência.

Ao meu companheiro de jornada Flavio Marcelo Lourenço Leal, porque jamais prescindiremos de inspirações e de grandes conquistas na vida, pela simplicidade de suas motivações, seu caráter inexpugnável e pela liderança genuína em sua mais eloquente expressão; ao meu amigo Vicente Pascual Ibiza Gimeno, pela genialidade e pela loucura – algo como um Jekyll e Hyde moderno, ainda que iridescente; à Thaisa Wendhausen Ramos da Silva, que é para mim um relacionamento alélico perfeito, embora tenha a indelével impressão de que se assemelhe a transposons que permitem a expressão entre fúria e doçura; ao meu irmão André Hideyuki Hirano, pelo equilíbrio nas horas incertas; à doce Francine de Souza Galatti, que

é um sonho - pela presença apaixonante e sempre constante nesta linda e árdua caminhada. “–

Foi lindo!”, devo reconhecer, especialmente neste final.

À Rosimeire Ferreira, pelo gigantesco sonho que ousei sonhar. Parte da jornada é o final e parte da busca é também o encontro, mas é a sempiterna busca do imortal diante da efemeridade da vida que sempre nos fará singrar pelo incognoscível. A isso chamamos de fé.

Fica aqui o meu amor incondicional.

A todos os tomaticultores do Brasil, especialmente ao Sr. Lauro de Andrade, que representa uma inequívoca vanguarda tecnológica do setor. Lauro é, acima de tudo, um bom

homem, imprescindível nestes nossos tempos confusos.

“The trouble with the world is that the stupid are cocksure and the intelligent are full of
doubt.”

Bertrand Russell

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 O gênero <i>Orthospovirus</i>	14
2.2 Resistência conferida pelo gene <i>Sw-5</i>	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Amostragem de tomateiros com sintomas de orthospovirus em plantações comerciais.....	19
3.2 Detecção de orthospovirus.....	21
3.2.1 PTA-ELISA.....	21
3.2.2 Kit Immunostrip® (Agdia).....	22
3.2.3 RT-PCR.....	22
3.3 Detecção do gene <i>Sw-5</i>	23
3.4. Detecção do ToCV.....	24
3.5 Purificação de amplicons de orthospovirus e sequenciamento de nucleotídeos.....	25
3.6 Reação de tomateiros homozigotos e heterozigotos para o gene <i>Sw-5</i> ao Groundnut ringspot virus e o Tomato chlorotic spot virus.....	26
3.7 Microscopia eletrônica de transmissão.....	27
4 RESULTADOS.....	29
4.1. Incidência de tomateiros com sintomas de orthospovirus em plantios comerciais.....	29
4.2 Detecção de orthospovirus, crinivirus e gene <i>Sw-5</i> em tomateiros com sintomas de “vira-cabeça”.....	30
4.3 Identidade dos isolados de orthospovirus.....	31
4.4 Reação de tomateiros homozigotos e heterozigotos para o gene <i>Sw-5</i> ao Groundnut ringspot virus e ao Tomato chlorotic spot virus.....	33
4.5 Microscopia eletrônica de transmissão.....	33
5 DISCUSSÃO.....	35
5.1 Considerações sobre a baixa incidência de orthospovirose no campo e a detecção das espécies virais.....	35
5.2 Considerações a funcionalidade do gene <i>Sw-5</i>	40

5. 3 Considerações sobre o manejo de orthospoviroses no tomate.....	41
6 CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS.....	47
APÊNDICE.....	55

RESUMO

Prevalência de espécies de orthospovirus infectando tomateiros portadores do gene *S_w-5* e efeito do crinivírus *Tomato chlorosis virus* na infecção com orthospovirus

Dentre as principais doenças do tomateiro, as de etiologia viral apresentam um papel central no manejo fitossanitário da cultura, principalmente os chamados orthospovirus, que são coloquialmente conhecidos no Brasil como “vira-cabeça”, que incluem quatro diferentes espécies de vírus do gênero *Orthospovirus*, denominadas de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV). Este assim denominado “complexo do vira-cabeça” é transmitido de maneira persistente propagativa por diferentes espécies de *Thysanoptera*, sendo particularmente importante por apresentar um modelo epidemiológico de doença policíclica com disseminação primária contínua, em que o vetor e as hospedeiras alternativas dos vírus conferem uma relevância mais ampla, exigindo, mais do que um manejo local, um manejo regional. Para contornar essa particularidade, a resistência genética se mostra primordial para um manejo sustentável. No caso do tomate, a utilização de cultivares que carregam o gene *S_w-5*, que confere resistência de amplo espectro às principais espécies de orthospovirus, é bastante utilizada, constituindo-se uma característica básica na tomaticultura moderna. Todavia, é cada vez mais comum a ocorrência de sintomas de orthospovirose em campos comerciais de tomates portadores do gene *S_w-5*. O presente trabalho teve por objetivo estudar a prevalência das diferentes espécies de orthospovirus em campos comerciais de tomate de mesa em diferentes regiões produtoras, a partir de levantamentos em parcelas demarcadas de 1 mil plantas. Adicionalmente, estudou-se o efeito da coinfeção com o crinivírus ToCV e o efeito do híbrido em homozigose na infectividade das espécies encontradas. Concluiu-se que a incidência de viroses em campos comerciais de cultivo de tomate portadores do gene *S_w-5* nas safras de 2017 e 2018 com sintomas associados ao complexo do “vira-cabeça” foram baixas, variando entre 0,1 a 3,6%. Das amostras sintomáticas coletadas no campo, 71,5% foram positivas a orthospovirus. Resultados de sequenciamento de isolados selecionados destas amostras sintomáticas mostraram que 70,5% pertenciam à espécie GRSV e 29,5% à TCSV ao analisar a identidade dos segmentos L e S do mesmo isolado. No caso do segmento M destes mesmos isolados, o alinhamento de todas as sequências mostrou identidade com o acesso HQ644141.1 de orthospovirus do GeneBank, que apresenta rearranjo de genoma. As espécies CSNV e TSWV não foram detectadas. Os resultados positivos para o crinivírus ToCV corresponderam a uma incidência baixa de apenas 5,0 %, de maneira que o presente trabalho não possibilitou avaliar o efeito do crinivírus na infecção com orthospovirose em cultivares que carregam o gene *S_w-5*, evidenciando, todavia, que a suscetibilidade ao GRSV e/ou ao TCSV das cultivares que carregam o gene *S_w-5* não está necessariamente relacionada com coinfeções com o ToCV. Quando transmitidos por inoculação mecânica, isolados de GRSV e TCSV provenientes de plantas resistentes sintomáticas no campo manifestaram incidência de plantas infectadas semelhantes nos genótipos homozigóticos e heterozigóticos ao gene de resistência e no controle suscetível, demonstrando que condição *S_w5/S_w5* não se mostra vantajosa.

Palavras-chave: Complexo do vira-cabeça, Resistência genética, GRSV, TCSV, TSWV, CSNV, Infecção primária, Infecção secundária, Manejo regional

ABSTRACT

Prevalence of orthotospovirus infecting *Sw-5* carrying tomato hybrids and the effect of the crinivirus *Tomato chlorosis virus* on the infection of orthotospovirus

The spotted wilt complex is one of the most important virus diseases in tomatoes, consisting in Brazil of four species belonging to the genus *Orthotospovirus*, designated as *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), and *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV). Transmission occurs in a persistent-propagative manner by thrips. This pathosystem is an example of a polycyclic disease in which the primary inoculum has a continuous and dynamic role, and where virus transmitting insects and alternative hosts play a key function, requiring a more complex area-wide disease management. To overcome such singularity, genetic resistance is the foundation stone for a sustainable management in commercial fields, providing a broad-spectrum resistance to the orthotospovirus species in Brazil. However, spotted wilt symptoms on resistant varieties carrying the resistance gene *Sw-5* are more and more frequent in the field. The aim of this work was to study the prevalence of the different species of orthotospovirus in commercial fields of fresh-market tomatoes from surveys on delimited plots of a thousand plants in a number of tomato growing regions. Additionally, the coinfection with the crinivirus ToCV was studied. The incidence of orthotospovirus-like symptoms on *Sw-5* resistant varieties in 2017/ 2018 was low, ranging from 0.1 to 3.6%. 71.5% of the symptomatic samples were orthotospovirus positive. Nucleotide sequencing of selected positive isolates resulted in 70.5% of the isolates identified as GRSV and 29.5% as TCSV after alignment of the L and S RNA segments in GenBank. For the M RNA segment, all the isolates showed identity to the GenBank orthotospovirus reassortant accession HQ644141.1. The other two orthotospovirus reported in Brazil - CSNV e TSWV - were not detected. Positive coinfection with crinivirus ToCV corresponded to a low 5.0 % incidence, lacking conclusive results that could support the relation of the incidence of the crinivirus to the occurrence of orthotospovirus on *Sw-5* resistant varieties, showing, however, that the susceptibility to the GRSV or to the TCSV of the *Sw-5* carrying varieties is not related to coinfection with ToCV. When mechanically transmitted, GRSV e TCSV originated from *Sw-5* resistant varieties in the field revealed incidence of infected plants similar in both homozygous and heterozygous varieties, as well as the non-resistant check, suggesting that the *Sw5/ Sw5* homozygous condition is not an advantage.

Keywords: Spotted wilt complex, Genetic resistance, GRSV, TCSV, TSWV, CNSV, Primary infection, Secondary infection, Wide-area management

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das mais importantes espécies olerícolas cultivadas no Brasil, que se posiciona como um dos dez maiores produtores mundiais, com área colhida estimada de 55.545 ha e uma produção anual estimada de 3.956.559 toneladas de frutos para o ano de 2020 (IBGE, 2021). O cultivo desta solanácea tem elevada importância socioeconômica na geração de empregos e renda por envolver um número estimado de mais de 157 mil tomaticultores (ANUÁRIO, 2019), movimentar anualmente R\$ 4,2 bilhões e gerar mais de 650 mil empregos somente no setor de produção (REVISTA CAMPO & NEGÓCIOS, 2014). Esporadicamente, figura no cenário macroeconômico como um dos vilões da inflação (VEJA DIGITAL, 2019). No agronegócio do tomateiro, contudo, a rentabilidade e a sustentabilidade da cadeia produtiva são constantemente ameaçadas - em parte pelos custos de produção exorbitantes, que ultrapassam o valor de R\$ 100 mil por ha para o tomate de mesa (MOLENA; GUERREIRO, 2019), sendo, portanto, uma das culturas agrícolas de maior investimento por área – sofrendo, fundamentalmente, por fatores bióticos e abióticos intrínsecos ao sistema produtivo, que podem causar danos irreversíveis na quantidade e na qualidade dos frutos. Neste aspecto, os produtores de tomate procuram por cultivares que proporcionem maior produtividade, apresentem maior grau de resistência às doenças e forneçam produtos comerciais com alto padrão de qualidade e maior sanidade. Basicamente, estas cultivares ou híbridos devem incorporar resistência genética aos principais problemas fitossanitários - que se constituem como sérias ameaças ao sucesso produtivo e ao retorno financeiro no agronegócio da tomaticultura. Destaca-se o caso da resistência genética conferida pelo gene *Sw-5*, que originalmente foi identificado por oferecer resistência ao Tomato spotted wilt virus (TSWV), historicamente o principal causador da doença vira-cabeça do tomateiro. Esse gene passou a ser adotado pela grande maioria das empresas de melhoramento e produção de sementes de tomate na forma de híbridos heterozigóticos a este *locus*, e que se caracteriza como uma exigência básica do agricultor para o segmento de tomate de mesa (CORREA; MANTOAN, 2018).

Recentemente, todavia, cultivares de tomate que possuem o gene *Sw-5* têm apresentado certa ocorrência de plantas com sintomas de “vira-cabeça” nas

principais regiões produtoras de tomate, caracterizando uma possível quebra de resistência ao TSWV, ou a outros orthospovirus (Tomato chlorotic spot virus – TCSV e Groundnut ringspot virus – GRSV) para as quais o gene *Sw-5* se mostra possivelmente menos eficiente. A prevalência de determinado orthospovirus nas diferentes regiões produtoras de tomate é variável (INOUE-NAGATA et al., 2016). Embora pouco frequente em campos comerciais de tomateiro, a ocorrência do Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV) foi relatada por Colariccio et al. (2000) em crisântemo no estado de São Paulo e em tomateiros nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, constatando que linhagens de tomateiro com bons níveis de resistência ao TSWV, TCSV e GRSV mostraram-se suscetíveis ao CSNV.

Diante do exposto, o presente trabalho teve os objetivos de identificar os orthospovirus prevalentes capazes de infectar tomateiros portadoras do gene *Sw-5* e avaliar a ocorrência da doença em plantas de cultivares com resistência ao TSWV em plantações comerciais em diferentes regiões produtoras do Brasil. Analisou-se também se a infecção prévia de tomateiros portadores do gene *Sw-5* com o crinivirus Tomato chlorosis virus (ToCV), transmitido por *Bemisia tabaci* MEAM1, favorece a subsequente infecção com orthospovirus, conforme relatado por García-Cano et al. (2006), para a interação entre o ToCV e o TSWV.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Dentre as principais doenças do tomateiro, as de etiologia viral apresentam um papel central no manejo fitossanitário da cultura, particularmente os chamados orthospovirus, que são coloquialmente conhecidos no Brasil como causadores da doença do “vira-cabeça”. Esta enfermidade tem grande importância na cultura do tomateiro desde a década de 40, quando esteve presente em todas as regiões produtoras de tomate do estado de São Paulo, com incidências no campo que chegavam a 100% (COSTA, 1944). A doença pode ser causada por quatro diferentes orthospovirus: TSWV, TCSV, GRSV e CSNV. O nome vira-cabeça” advém da curvatura que ocorre no ponteiro das plantas infectadas. Além deste, plantas infectadas ainda exibem sintomas de bronzeamento nas folhas do ápice, redução do tamanho das folhas, presença de anéis cloróticos e/ ou necróticos e arroxamento das folhas (INOUE-NAGATA et al., 2016). Pavan et al. (1996) também relataram um padrão sintomatológico distinto ao verificarem que o TCSV estaria causando sintomas apenas nos frutos do tomateiro devido à inoculação direta do vírus nas flores por tripses (*Thysanoptera*) virulíferos da espécie *Frankliniella schultzei* Trybom. Esses autores também constataram a predominância do TCSV em plantas de tomate no estado de São Paulo em 1996.

A transmissão do vírus ocorre em qualquer estágio de desenvolvimento da planta de tomate por diferentes espécies de tripses, baseada na relação vírus-vetor do tipo persistente propagativa, em que a aquisição ocorre apenas por larvas e ninfas; há replicação do vírus no corpo dos insetos e a transmissão ocorre apenas pelos adultos (REZENDE; KITAJIMA, 2018). As principais espécies de tripses envolvidas na associação tripses-orthospovirus são *Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*, *F. schultzei*, *F. fusca*, *T. palmi*, *Scirtothrips dorsalis*, *F. intonsa*, *F. bispinosa*, *T. setosus*, *Ceratothripoides claratris*, *F. zucchini*, *F. gemina*, *F. cephalica* e *Dictyothrips betae* (RILEY et al., 2011). No Brasil, as espécies mais importantes vetoras de orthospovirose na cultura do tomateiro são *F. schultzei*, *F. occidentalis*, *T. tabaci* e *T. palmi*, sendo *F. schultzei* a espécie mais comum nos cultivos e a principal transmissora de orthospovirus, muito embora *F. occidentalis* também deva ser considerada como importante devido a sua ampla distribuição geográfica no Brasil, além de sua capacidade de transmitir a maioria dos orthospovirus (LIMA; MICHEREFF FILHO, 2015).

Os sintomas causados pelos orthospovirus são extremamente severos, com possibilidade de danos totais na produção e na qualidade dos frutos. Infecções precoces são especialmente danosas ao tomateiro e inviabilizam a condução da cultura, ao passo que infecções tardias reduzem a área fotossintética das plantas e causam sintomas nos frutos, que se tornam inadequados para a comercialização (INOUE-NAGATA, 2012). Sevik e Arli-Sokmen (2011) estimaram os efeitos do TSWV em alguns componentes produtivos do tomate e verificaram reduções de 42,1% na produtividade e perdas de 95,5% por frutos não adequados à comercialização, mostrando prejuízos devastadores ao negócio da tomaticultura. Em 2014, ocorrências extremamente severas foram reportadas em tomateiro e alface no Brasil, com prejuízos de até 100% no campo (REVISTA CAMPO & NEGÓCIOS, 2014). Além dos danos visíveis nas plantas, os orthospovirus são também responsáveis por danos irreversíveis na qualidade dos frutos. Além da necrose evidente na superfície dos frutos, Nogueira (1971) observou que, em plantas da cultivar Santa Cruz (IAC 2731), em que o gene *Sw-5* está ausente, a presença do TSWV provocou redução geral dos aminoácidos e amidas livres, em especial a lisina e a fenilalanina, com exceção da treonina, cisteína, ácido aspártico e asparagina.

2.1 O gênero *Orthospovirus*

O primeiro orthospovirus foi relatado por Brittlebank (1919) em 1915 na Austrália, sendo que a identificação do agente etiológico como TSWV foi realizada por Samuel et al. (1930). No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez por Bitancourt (1936) no estado de São Paulo, em frutos de tomate comerciais exibindo manchas concêntricas, sendo denominada de murcha maculada na ocasião. O TSWV pertence ao gênero *Orthospovirus*, família *Bunyaviridae*. É o único gênero dentro dessa família que possui vírus que infectam plantas, uma vez que os vírus pertencentes aos outros quatro gêneros - *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus* - não são fitoparasitas (KING et al., 2011). A transmissão entre plantas é realizada por diferentes espécies de tripes, de maneira persistente propagativa, e a gama de hospedeiras do TSWV é ampla, com mais de 925 espécies de plantas pertencentes a 70 famílias botânicas (HULL, 2004). A partícula dos orthospovirus é pleomórfica, com 80 a 120 nm de diâmetro, envolta por um envelope glicoproteico,

oriundo de membranas celulares dos hospedeiros, com projeções na sua superfície constituídas pelas glicoproteínas virais Gn e Gc (KIKKERT et al., 1999).

O genoma é composto por três moléculas de RNA de fita simples, denominadas de RNA L, RNA M e RNA S, sendo as letras correspondentes a large, medium e small, respectivamente (KORMELINK et al., 1992). O RNA L codifica para a enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp); o RNA M codifica para a proteína NSm, relacionada ao movimento célula a célula e para os precursores das glicoproteínas da superfície do envelope da partícula viral, a Gn e a Gc, envolvidas na transmissão por tripes (SIN et al., 2005); o RNA S codifica uma proteína não-estrutural, supressora de silenciamento gênico, denominada NSs, e a nucleoproteína N (DE HAAN et al., 1991; TAKEDA et al., 2002).

O Brasil é um centro de diversidade para o gênero *Orthotospovirus*, constituído pelos vírus já reportados CSNV, Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV), TSWV, GRSV, TCSV, Iris yellow spot virus (IYSV) (BEZERRA et al., 1999) e Bean necrotic mosaic virus (BeNMV) (OLIVEIRA et al., 2011).

A classificação de populações de orthotospovirus é baseada na similaridade da sequência dos genes do nucleocapsídeo, de maneira que isolados de orthotospovirus com mais de 90% de similaridade na sequência de nucleotídeos do gene do nucleocapsídeo são classificados como pertencentes ao mesmo orthotospovirus (TSOMPANA; MOYER, 2008).

2.2 Resistência conferida pelo gene *Sw-5*

Os alelos já identificados que promovem resistência às orthotospovirose em tomateiro são denominados *Sw1a*, *Sw1b*, *sw2*, *sw3*, *sw4*, *Sw-5*, *Sw-6* e o *Sw-7*. São encontrados em espécies silvestres relacionadas do gênero *Solanum* (NICK; SILVA, 2016). O principal gene de resistência ao TSWV é o *Sw-5*, dominante, incorporado ao tomateiro a partir de acessos de *S. peruvianum*, conferindo resistência não-específica contra diferentes orthotospovirus que infectam o tomateiro (STEVENS et al., 1992). Essa resistência, caracterizada pela ausência de sintomas ou reações locais necróticas nos tecidos infectados, é desencadeada pela proteína de movimento célula-a-célula NSm do TSWV (HALLWASS et al., 2014), caracterizando-se como o determinante de avirulência para a resistência (PEIRÓ et al., 2014).

Brommonschenkel et al. (2000), baseados em características estruturais, verificaram que o gene *Sw-5*, que confere resistência ao TSWV, pertence à classe de genes de resistência do tipo NBS-LRR, em que estão incluídos também os genes *Mi*, *I2* e *Prf*. A similaridade entre as proteínas *Sw-5* e *Mi* de tomateiro sugere uma via de transdução de sinais compartilhada que leva tanto à resistência ao vírus quanto a determinados nematoides formadores de galhas do gênero *Meloidogyne*.

Cultivares comerciais de tomateiro que expressam o gene *Sw-5* são o foco de todas as empresas produtoras de sementes de tomate que atuam no País e constituem condição *sine qua non* para o sucesso produtivo da tomaticultura. Entretanto, em cultivares consideradas resistentes, que carregam o alelo de resistência *Sw-5*, tripes virulíferos podem inocular o vírus a partir do processo natural de alimentação em flores e frutos e, a partir daí, a planta pode exibir sintoma de infecção sistêmica (HOULE, J.L.; KENNEDY, 2017). A eficácia do gene *Sw-5* é objeto de especulação quando se sugere que cultivares de tomate heterozigóticas (*Sw-5/ sw-5*) mostram resistência tipicamente intermediária, enquanto as homozigóticas (*Sw-5/ Sw-5*) tendem a exibir níveis significativamente maiores de resistência (LOURENÇÃO et al., 1999).

Isolados de TSWV que superam a resistência de cultivares de tomate que possuem o gene *Sw-5* são bastante comuns, ocorrendo em países como a Espanha (ARAMBURU; MARTÍ, 2003), Itália (CIUFFO, M. et al., 2005), Austrália (LATHAM; JONES, 1998) e Estados Unidos (BATUMAN et al., 2017), entre outros.

A ocorrência de infecções virais mistas relacionadas à quebra de resistência do gene *Sw-5* é também um assunto que necessita ser investigado. García-Cano et al. (2006) observaram reações sinérgicas em plantas de tomate afetadas pela infecção mista com o crinivirus ToCV e o orthospovirus TSWV, que resultaram em rápida morte das plantas afetadas. Em cultivares de tomate que carregam o gene de resistência *Sw-5*, resistentes ao TSWV, a pré-infecção com o ToCV resultou na suscetibilidade destas ao TSWV, sugerindo que o ToCV pode interferir ou regular a resposta de defesa das cultivares resistentes ao TSWV. Este fato é particularmente importante devido à ocorrência bastante comum de ToCV nas principais regiões produtoras de tomate no Brasil. O ToCV foi reportado pela primeira vez no Brasil e na América do Sul por Barbosa et al. (2008) a partir de amostras de campos comerciais de tomate na região de Sumaré, estado de São Paulo, nos anos de 2006 e 2007, exibindo sintomas de clorose internerval e necrose nas folhas basais de

plantas infectadas. Desde então, a manifestação de surtos não parece se expressar de maneira cíclica, mas constitui-se um problema potencial em importantes regiões produtoras de tomate sob o ponto de vista epidemiológico, por ocorrer nas principais localidades da tomaticultura nacional, abrangendo os estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais, Goiás, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Pernambuco e Distrito Federal (BELLO et al, 2019). O ToCV é transmitido por diferentes espécies de mosca-branca, em especial a *Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1, conhecida como biótipo B), que é a espécie prevalente no Brasil (MARUBAYASHI et al., 2013) e possui ampla gama de espécies de plantas hospedeiras que ocorrem naturalmente em campos comerciais de tomate, como o joá-de-capote (*Physalis angulata*), a maria-pretinha (*S. americanum*) e a figueira-brava (*Datura stramonium*) e espécies de importância econômica como a berinjela (*S. melongena*), a batateira (*S. tuberosum*) e o pimentão (*Capsicum annuum*) (ESQUIVEL FARIÑA, 2020). Não há cultivares de tomateiro resistentes ou comercialmente tolerantes ao crinivirus (MANSILLA CÓRDOVA, 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostragem de tomateiros com sintomas de orthospovírus em plantações comerciais

Parcelas experimentais de 1.000 plantas, conforme ilustrado na Figura 1, foram demarcadas aleatoriamente em sete plantações comerciais de tomateiros cultivar 'Compack', portador do gene *Sw-5*, com resistência ao TSWV, na macrorregião de Campinas durante a safra de inverno de 2017. Todas as plantas das parcelas foram avaliadas visualmente para a presença de sintomas característicos de orthospoviroses, como necrose no ponteiro, lesões necróticas e cloróticas nos folíolos e manchas necróticas concêntricas nos frutos (Figura 2). Todas as plantas sintomáticas foram contadas em intervalos mensais de abril a junho de 2017 para acompanhamento da progressão da incidência da doença no campo.

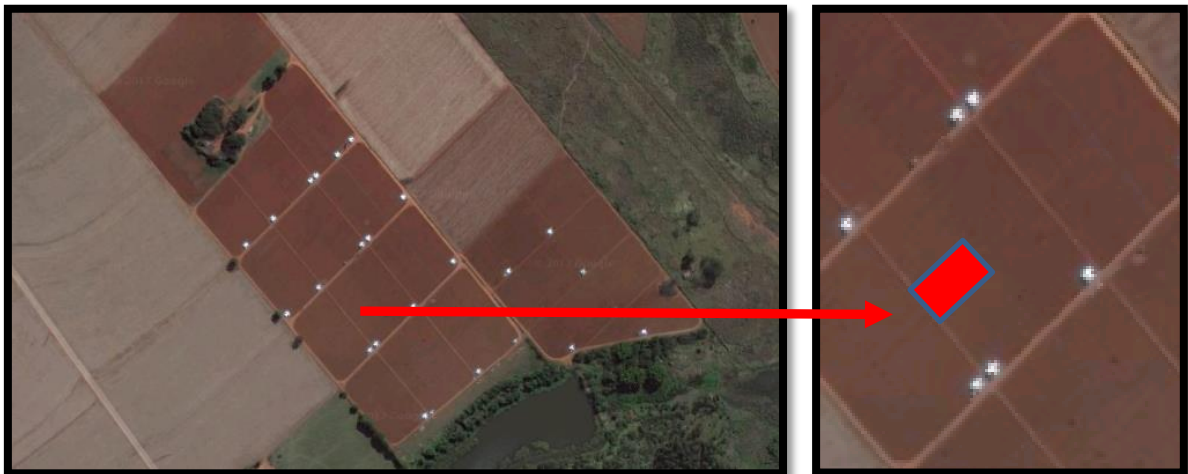


Figura 1 – Ilustração da parcela experimental demarcada em plantação comercial de tomateiro. A marcação em vermelho à direita representa uma parcela com 1.000 plantas.



Figura 2 – Sintoma de uma planta da parcela experimental expressando necrose vascular (esquerda), lesões cloróticas e necróticas nas folhas novas (centro) e anéis necróticos nos frutos (direita).

Adicionalmente, foram demarcadas sete parcelas ao acaso, de 1.000 plantas, em plantações de tomateiros nos polos produtores de Leopoldo de Bulhões e Corumbá de Goiás, no estado de Goiás; Araguari e Ingaí, no estado de Minas Gerais; Capão Bonito, no estado de São Paulo; Caxias do Sul, no estado do Rio Grande do Sul e Reserva, no estado do Paraná, para a avaliação final da incidência de orthospovirose, durante a safra de verão de 2017/ 2018.

Amostras de folhas dos ponteiros das plantas sintomáticas supostamente infectadas com orthospovirus, provenientes das diferentes plantações, foram coletadas e armazenadas sob temperatura de -20°C no Laboratório de Virologia do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (LFN) da ESALQ/USP para posterior detecção do agente etiológico. Essas amostras foram enumeradas sequencialmente de 1 a 143, de acordo com as regiões visitadas, conforme Tabela 1. Deste total de 143 amostras de trabalho, 138 foram amostras coletadas de plantas com sintomas característicos de orthospovirus e 5 foram amostras compostas para detecção do crinivirus ToCV, assim constituídas: T1 = amostras correspondentes à sequência de 1 a 45; T2 = amostras 46 a 60; T3 = amostras 61 a 70; T4 = amostras 71 a 90 e T5 = amostras 91 a 105, embora nenhuma delas apresentasse sintomas de crinivirus. As amostras T1 a T5 foram provenientes de 5 campos comerciais distintos: T1, Monte Mor (SP); T2, Sumaré (SP); T3, Monte Mor (SP); T4, Sumaré (SP) e T5, Mogi-Guaçu (SP).

Tabela 1 – Origem e número das amostras de folhas sintomáticas de tomateiros para detecção de orthospovirus.

Localidade	Número de amostras
Monte Mor - SP	66
Sumaré - SP	40
Mogi-Guaçu - SP	15
Elias Fausto - SP	1
Capão Bonito - SP	1
Corumbá de Goiás - GO	1
Leopoldo de Bulhões - GO	6
Araguari - MG	3
Ingaí - MG	1
Reserva - PR	3
Caxias do Sul - RS	1
Amostras compostas T1 a T5	5

3.2 Detecção de orthospovirus.

3.2.1 PTA-ELISA

Amostras de 105 plantas sintomáticas, provenientes das regiões de Monte Mor, Sumaré e Mogi-Guaçu (Tabela 1) foram analisadas para a presença de orthospovirus por plate-trapped antigen ELISA (PTA-ELISA), com antissoro policlonal, gentilmente cedido pela Dra. Alice K. I. Nagata do CNPH (Embrapa/ DF), produzido contra a proteína capsidial (CP) de orthospovirus, que apresenta reação cruzada, seguindo o protocolo descrito por Mowat e Dawson (1987) com algumas modificações. Extrato de folha de alface infectada com o GRSV foi usado como controle positivo, enquanto extrato de folha de planta sadia serviu de controle negativo. Cada amostra de tecido foi macerada em 2,0 ml de tampão carbonato (Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_3 35 mM e NaN_3 3 mM, pH 9.6) na diluição de 1:50, dos quais 100 μl foram transferidos para cada cavidade da placa de ELISA com duas repetições por amostra. A placa foi incubada a 37°C por 15 minutos. Em seguida, a placa foi lavada por 3 vezes com PBS-Tween (KH_2PO_4 1,5 mM, NaCl 140 mM, Na_2HPO_4 4 mM e KCl 3 mM, pH 7,4, acrescido de 0,5 ml de Tween 20). A seguir, foram pipetados 100 μl de antissoro diluído a 1:1000 em PBS-TPB em cada cavidade, seguido por incubação por 2 horas a 37°C. A placa foi novamente lavada por 3 vezes com PBS-Tween. Depois, foram colocados em cada cavidade 100 μl de IgG conjugada com fosfatase alcalina diluída em PBS-TBP. A placa foi incubada por

2 horas a 37°C e mais uma vez lavada por 3 vezes com PBS-Tween. Finalmente, foram colocados em cada cavidade 100 µl do substrato de p-fosfato de nitrofenil diluído em dietanolamina a 0,6 mg/ml, seguido de incubação em temperatura ambiente na ausência de luz. Os valores de absorbâncias a 405 nm foram obtidos no leitor Metertech modelo 960. Considerou-se a reação como positiva quando o valor médio da absorbância da amostra foi maior do que o triplo da média do controle negativo.

3.2.2 Kit ImmunoStrip® (Agdia)

Nos testes de inoculação de isolados de GRSV e TCSV em cultivares de tomateiro, a confirmação da infecção das plantas-teste foi realizada com o kit de detecção rápida ImmunoStrip® (Agdia) para o TSWV, que também detecta o GRSV e o TCSV, de acordo com o fabricante (disponível em <https://orders.agdia.com/agdia-immunostrip-for-tswv-isk-39300>).

3.2.3 RT-PCR

A extração de RNA total de folhas de tomateiros sintomáticos para orthospovirus foi realizada com o Purelink® Viral RNA/DNA Mini kit. Cerca de 0,1 grama de tecido com sintomas foi macerado em 500 µl de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e retirados 200 µl do tecido macerado, ao qual foram adicionados 25 µl de proteinase K (20 mg/ml). Em seguida, foram adicionados 200 µl de Lysis buffer por tubo (contendo 5,88 µl do Carrier RNA) e incubados por 15 minutos a 56°C. A seguir, foram adicionados 250 µl de etanol 100% por tubo, agitando-se bem e incubando à temperatura ambiente por 5 minutos, quando, então, a mistura foi transferida para a coluna Viral Spin Column, oriunda do kit, sendo centrifugada a 6.800 g por 1 minuto à temperatura ambiente. A coluna, então, foi transferida para um novo microtubo de 1,5 ml, recebendo 500 µl de tampão de lavagem (Washer buffer, contida no kit) com etanol 100% e novamente centrifugada à temperatura ambiente por 1 minuto. Foram realizadas duas lavagens com o Wash buffer II. Para remover o resíduo do Wash buffer, a coluna foi transferida para um novo tubo, sendo centrifugada a 12.000 g por 1 minuto à temperatura ambiente. A coluna foi

novamente transferida para um novo tubo em que foram adicionados 50 µl de água livre de RNases e incubada por 1 minuto à temperatura ambiente, seguido de uma nova centrifugação por 1 minuto. Seguiu-se a RT-PCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores denominados BR60 (5´ AGAGCAATGTCA 3´, 10 ng/ml), que anela na região não traduzida do terminal 3´ do S RNA, e BR65 (5´ATCAAGCCTTCTGAAAGTCAT 3´, 10 ng/ml), que anela no gene que codifica para a proteína N, amplificando fragmentos de 453 pares de bases (EIRAS, 2002). Para cada reação de one-step RT-PCR foram utilizados 12,5 µl PCR Master Mix, 0,3 µl de cada primer, 0,1 µl de AMV, 6,8 µl de água e 5 µl de RNA. Controles positivos (constituídos por amostras de chicória e de alface infectadas e identificadas com *Orthospovirus*) e negativo (tomateiro sadio) foram incluídos na extração e nas reações de RT-PCR a fim de validar e confirmar a especificidade do método utilizado. Para a PCR, as condições do termociclador foram de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguida por 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 48°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e um ciclo com extensão final de 72°C por 10 min. Dezessete amostras também foram analisadas para porções dos segmentos L e M do RNA, utilizando os pares de primers TospoL F (5´ CWGARGATRTDATWATAAATAAYAATGC 3´) e TospoL R (5´ GCATCNACAGAWATYTTCCA 3´) e TospoM F (5´ AGAGCAATCAGTGCATC 3´) e TospoM R (5´ CTTRCAGGCTTCATRAAKGC 3´), que amplificam fragmentos de 450 bp e 849 bp, respectivamente (BATUMAN et al, 2014). Todos os produtos das ampliações foram corados com SYBR safe DNA gel stain e separados por eletroforese em gel de agarose a 1% por 40 minutos juntamente com o marcador molecular 1kb Ladder (Invitrogen) e visualizados em transiluminador de luz UV.

3.3 Detecção do gene *Sw-5*

Todas as amostras de plantas supostamente sintomáticas devido à infecção com *Orthospovirus*, das quais se extraíram os ácidos nucleicos com o kit Purelink® Viral RNA/DNA conforme já descrito, foram submetidas a PCR para confirmação da presença do gene de resistência *Sw-5* nos diferentes genótipos. Os primers utilizados na PCR para detecção do gene de resistência, desenhados por Shi e Vierling (2011) a partir do acesso AY 007366 do GenBank, foram o Sw5-f2 (5´

CGGAACCTGTAACCTTGACTG 3') e o Sw5-r2 (5' GAGCTCTCATCCATTTTCCG 3'), que produzem um fragmento de 541 pares de bases (bp). Também detectam especificamente o homólogo funcional do gene, chamado de *Sw-5b*. O regime do termociclador foi o seguinte: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, 36 ciclos de 15 segundos a 94°C, 15 segundos a 56°C e 45 segundos a 72°C, seguido por uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos das amplificações foram corados com SYBR safe DNA gel stain e separados por eletroforese em gel de agarose a 1% por 40 minutos juntamente com o marcador molecular 1kb Ladder (Invitrogen) e visualizados em transiluminador de luz UV.

3.4. Detecção do ToCV

A detecção do ToCV nas mesmas amostras foi realizada a partir do RNA total extraído com o Purelink® Viral RNA/DNA Mini kit. Inicialmente, a fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada sendo utilizados por amostra 3 µl de RNA; 0,25 µl de dNTPs (desoxinucleotídeos fosfatados) a 10 mM; 1 µl do primer antissenso HS-12 (5'-CC(G/T)CCACCAAA(A/G)TCGTA-3') a 20 mM (DOVAS et al., 2002), adicionados a 9,75 µl de água livre de RNases, A mistura foi então colocada em termociclador por 5 min a 65°C e resfriada a 4 °C por 5 min. Em seguida, foram adicionados 5 µl do AMV Reverse Transcriptase 5 X Reaction Buffer e 0,2 µl da enzima AMV Reverse Transcriptase (15 U/ µL). A incubação da mistura ocorreu por 50 min a 37 °C e por 15 min a 65 °C, mantendo-se a 4 °C, seguido de PCR com o kit PCR Master Mix (Promega) utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores senso Toc-5 (5' GGGTTGGATTTTGGTACTACCTTCAGT 3'), e antissenso Toc-6 (5' AAAGTGCCTGCATGAAAAGTCTC 3'), que amplificam segmentos de 463 bp (DOVAS et al., 2002). O regime do termociclador foi o seguinte: 95°C por 1 minuto, com 40 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C, 10 segundos a 72°C e ciclo final de 2 minutos a 72°C, seguindo a metodologia adotada por Esquivel-Fariña et al. (2019). Uma vez detectado o ToCV nas amostras compostas, foram realizadas novas reações nas amostras individuais para identificar aquela(s) infectada(s) com o crinivirus. Os produtos das amplificações foram corados com SYBR safe DNA gel stain e separados por eletroforese em gel de agarose a 1% por 40 minutos

juntamente com o marcador molecular 1kb Ladder (Invitrogen) e visualizados em transiluminador de luz UV.

3.5 Purificação de amplicons de orthospovirus e sequenciamento de nucleotídeos

Produtos de PCR que correspondem a amplicons obtidos com os primers para orthospovirus para os segmentos RNA S, RNA M e RNA L de 17 amostras foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), em conformidade com o protocolo do fabricante. 50 µl de “Membrane Binding Solution” foram adicionados em 50 µl de cada produto da PCR em tubos de micro centrífuga de 1,5 ml e incubados por 1 minuto à temperatura ambiente, seguido de micro centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 700 µl de solução de lavagem da membrana (Membrane Wash Solution) adicionado de etanol, seguido de nova micro centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto. Mais uma vez o sobrenadante foi descartado e a minicoluna foi transferida para novo tubo coletor, repetindo-se o último passo com 500 µl de solução de lavagem da membrana (Membrane Wash Solution) e centrifugando-se a 14.000 rpm por 5 minutos. A seguir, realizou-se o descarte do sobrenadante e microcentrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto com a tampa do micro tubo aberta para evaporação do etanol. Transferiu-se cuidadosamente a minicoluna para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpo. Adicionaram-se 50 µl de água sem nuclease à minicoluna. Incubou-se em temperatura ambiente por 1 minuto, seguido de centrifugação a 16.000 × g por 1 minuto. Descartou-se a minicoluna e armazenou-se o DNA a -20°C, após quantificação em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000C (Thermo Scientific), para ajuste da concentração de ácido nucleico ao redor de 50 ng/ µl. Posteriormente foram enviados, juntamente com os iniciadores específicos, para a empresa Macrogen, da Coreia do Sul, para sequenciamento direto de nucleotídeos em ambas as direções. As sequências de nucleotídeos obtidas foram editadas e alinhadas no programa Electropherogram Quality Analysis, da Cenargen, Embrapa (disponível em <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>), e a identidade das sequências, analisadas pelo programa BLASTn da National Center for Biotechnology Information (disponível em https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)

quando comparadas com sequências de nucleotídeos existentes no banco de dados GenBank.

3.6 Reação de tomateiros homozigotos e heterozigotos para o gene *Sw-5* ao Groundnut ringspot virus e o Tomato chlorotic spot virus

Neste ensaio, conduzido em casa de vegetação, foram utilizadas plantas de tomateiros do híbrido SVTH3910, homozigótico ao locus *Sw-5* (*Sw-5/ Sw-5*), juntamente com o controle Olympo (*sw-5/ sw-5*) e o híbrido Compack (*Sw-5/ sw-5*), heterozigótico para o gene de resistência, todos da Bayer Vegetable Seeds. Estas cultivares foram selecionadas baseadas em três critérios: expressão diferencial do gene de resistência do supostamente mais resistente (*Sw-5/ Sw-5*) ao mais suscetível (*sw-5/ sw-5*).

Foram utilizados isolados do GRSV e TCSV. Os isolados selecionados para o bioensaio foram recuperados a partir das amostras originais conservadas em freezer -20°C e inoculados mecanicamente em plantas da cultivar Olympo, suscetível a orthospovirose. Para a inoculação mecânica, as folhas das plantas cultivadas em vasos de 430 ml foram previamente polvilhadas com carborundum (400 mesh). As plantas foram inoculadas aos 28 dias após o transplante para os vasos. Os inóculos foram preparados em tampão fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$) 0,01 M e aplicados nas folhas contendo o abrasivo com o indicador. Foram inoculadas 10 plantas com cada um dos isolados para manutenção destes.

A avaliação da reação das plantas dos híbridos/variedades aos isolados de GRSV e TCSV foi realizada em casa de vegetação com telado antiafídeo, na Estação Experimental da Bayer Crop Science em Paulínia, estado de São Paulo (Figura 3), durante os meses de setembro a novembro de 2019. Os inóculos dos isolados de orthospovirus foram preparados com tecido foliar infectado de plantas de Olympo, colhido aos 10 dias após a inoculação nas plantas, época de pico na concentração viral (DUVAL et al., 1993). A inoculação mecânica das plantas foi realizada conforme descrito acima. Cada um dos orthospovirus foi inoculado mecanicamente em cinco plantas de cada híbrido/cultivar. Nova inoculação foi realizada quatro dias depois. Plantas do híbrido Compack foram inoculadas apenas com água como controle. A avaliação baseou-se na sintomatologia nos folíolos das

plantas e a confirmação da infecção das plantas-teste foi realizada com o kit de detecção rápida Immunostrip® (Agdia).



Figura 3 – Vista do ensaio de avaliação da reação de tomateiros homozigotos e heterozigotos para o gene *Sw-5* ao Groundnut ringspot virus e o Tomato chlorotic spot virus. Estação Experimental de Paulínia da Bayer Cropscience. Novembro de 2019.

3.7 Microscopia eletrônica de transmissão

Estudos citopatológicos em microscópio eletrônico de transmissão foram realizados com tecidos foliares de tomateiros das amostras 93 e 131 (Apêndice A), com sintomas característicos de infecção com orthospovirus (Figura 2). Pequenos pedaços de folhas sintomáticos foram fixados em uma mistura de glutaraldeído e paraformaldeído em tampão cacodilato, pós-fixados com 1% OsO₄, desidratado, incorporado em resina epóxi de Spurr, seccionado com um ultramicrotomo Leica UCT (Viena, Áustria) equipado com faca de diamante Diatome e corada com acetato de uranila e citrato de chumbo, conforme descrito por Kitajima (2001). As secções foram observadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1010 (Akishima, Japão), laboratório de Microscopia Eletrônica, ESALQ/USP. Concomitantemente, tecidos de folhas de planta assintomática foram processados e analisados como controle.

4 RESULTADOS

4.1. Incidência de tomateiros com sintomas de orthotospovirus em plantios comerciais

A incidência de plantas sintomáticas, como necrose do ponteiro, manchas cloróticas nas folhas e manchas necróticas nos frutos, identificadas visualmente em plantações comerciais nas regiões de Elias Fausto, Mogi-Guaçu, Monte Mor e Sumaré, SP, estão na Tabela 2. De maneira geral as incidências foram baixas e variaram entre 0,1 e 3,6%.

Tabela 2 – Incidência acumulativa de tomateiros com sintomas característicos de infecção com orthotospovirus, em parcelas de mil plantas em plantações comerciais de tomateiros. Foram realizadas três avaliações. Safra de inverno de 2017.

Parcela	Localidade	Datas de avaliações			Incidência (%)
		12/4/2017	12/5/2017	12/6/2017	
SQ	Monte Mor - SP	16	28	36	3,6
GS	Sumaré - SP	8	17	18	1,8
LA - D	Monte Mor - SP	2	12	15	1,5
LA - V	Monte Mor - SP	1	2	3	0,3
VG	Elias Fausto - SP	0	0	1	0,1
BT	Sumaré - SP	11	25	26	2,6
TS	Mogi-Guaçu - SP	6	10	10	1,0

A incidência de tomateiros com sintomas característicos de infecção com orthotospovirus em plantações comerciais de municípios de São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Goiás estão na Tabela 3. As incidências foram baixas e variaram entre 0,1 e 2,1%%.

Tabela 3 - Incidência de tomateiros com sintomas característicos de infecção com orthotospovirus, em parcelas de mil plantas em plantações comerciais de tomateiros. Foi realizada apenas uma avaliação. Safra de verão 2017/2018 e inverno de 2018.

Parcela	Localidade	Incidência	Data da contagem final
NF	Corumbá de Goiás - GO	0,4%	26/07/2018
GO	Leopoldo de Bulhões - GO	2,1%	26/07/2018
ARAG	Araguari - MG	1,6%	21/06/2018
RES	Reserva - PR	1,2%	02/02/2018
6340	Ingaí - MG	0,1%	28/05/2018
ALA	Capão Bonito - SP	0,1%	26/02/2018
SM16	Caxias do Sul - RS	0,1%	01/04/2018

4.2 Detecção de orthotospovirus, crinivirus e gene Sw-5 em tomateiros com sintomas de “vira-cabeça”

Os resultados das análises de 137 amostras de tomateiros sintomáticos para a detecção de orthotospovirus, do crinivirus ToCV e do gene de resistência Sw-5 estão resumidos na Tabela 4 e apresentados individualmente no Apêndice A. As amostras iniciais correspondiam inicialmente a 138, mas uma se perdeu, correspondente à amostra 26. A análise de PTA-ELISA, realizada com antissoro contra a proteína capsidial do GRSV, detectou orthotospovirus em 54 de 105 amostras analisadas (Apêndice A). Quando todas as 137 amostras foram analisadas por RT-PCR, constatou-se a presença de orthotospovirus em 98 delas, totalizando 71,5% de resultados positivos. O crinivirus ToCV foi detectado por RT-PCR em apenas 7 plantas de tomateiros, dentre as quais 5 estavam coinfetadas com orthotospovirus.

Das 128 amostras de tomateiros descritos como resistentes a orthotospovirus, o gene Sw-5 foi detectado em 114, isto é 89,1% delas. Com efeito, esse gene não foi detectado em 9 amostras de plantas suscetíveis a orthotospovirus utilizadas como controles (Alambra, desenvolvida pela Harris-Moran-Clause, Dominador, desenvolvido pela Agristar/Zeraim Gedera, Vento, desenvolvido pela Agristar/Enza Zaden e SM-16, desenvolvida pela Bayer).

Tabela 4 - Relação de amostras de tomateiros, coletadas em cinco estados brasileiros, infectados com orthotospovirus e o crinivirus Tomato chlorosis virus (ToCV) e presença do gene de resistência a orthotospovirus.

Localidade	Nº. de amostras	Orthotospovirus RT-PCR	ToCV	Sw-5
Monte Mor - SP	65	56	7	60
Sumaré - SP	40	26	-	36
Mogi-Guaçu - SP	15	10	-	7
Elias Fausto - SP	1	-*	-	1
Capão Bonito - SP	1	1	-	-
Corumbá de Goiás - GO	1	1	-	1
Leopoldo de Bulhões - GO	6	1	-	5
Araguari - MG	3	2	-	2
Ingaí - MG	1	-	-	1
Reserva - PR	3	1	-	1
Caxias do Sul - RS	1	-	-	-
Total	137	98	7	114

* - Ausência de amplificação por RT-PCR/ PCR.

4.3 Identidade dos isolados de orthotospovirus

As sequências de nucleotídeos dos segmentos L, M e S das 17 amostras selecionadas para sequenciamento, quando comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank utilizando-se o programa BLASTn, indicaram a presença de GRSV (70,5%) e TCSV (29,5%) com base nos segmentos L e S, enquanto o alinhamento das sequências do segmento M mostrou identidade superior a 91% com o acesso HQ644141.1 do GenBank, que apresenta rearranjo de genoma entre o TCSV e o GRSV (Tabela 5). A espécie CSNV, que pode infectar tomateiros portadores do gene *Sw-5*, não foi identificada em nenhuma das amostras analisadas, o mesmo ocorrendo com a espécie TSWV.

Tabela 5 - Identidade dos isolados de orthospovirus encontrados em 17 amostras de tomateiros sintomáticos, escolhidas ao acaso, representando diferentes localidades. Identidade baseada na sequência parcial de nucleotídeos do RNA-S, RNA M e RNA-L.

*: sequências de baixa qualidade.

-: amostras perdidas durante sequenciamento.

Amostra	Espécie e identidade de orthospovirus			Acessos comparados do GenBank		
	RNA-S	RNA-M	RNA-L	RNA-S	RNA-M	RNA-L
5	GRSV (100%)	GRSV+TCSV (91,04%)	GRSV (96,03%)	KY400110.1	HQ644141.1	KY350136.1
30	GRSV (99,73%)	*	GRSV (93,58%)	KY400110.1	*	HQ634678.1
44	GRSV (100%)	GRSV+TCSV (94,60%)	GRSV (95,00%)	MF990013.1	HQ644141.1	HQ634678.1
45	TCSV (99,20%)	GRSV+TCSV (96,17%)	TCSV (98,89%)	AF521103.1	HQ644141.1	HQ700667.1
48	GRSV (99,74%)	GRSV+TCSV (97,64%)	GRSV (99,15%)	MK820666.1	HQ644141.1	KY350136.1
66	GRSV (99,74%)	GRSV+TCSV (97,09%)	GRSV (91,81%)	KY400110.1	HQ644141.1	KY350136.1
76	GRSV (99,20%)	GRSV+TCSV (92,25%)	GRSV (97,87%)	KY400110.1	HQ644141.1	HQ644142.1
93	TCSV (99,73%)	GRSV+TCSV (96,17%)	TCSV (98,69%)	MH427863.1	HQ644141.1	HQ700667.1
102	TCSV (99,74%)	GRSV+TCSV (99,52%)	TCSV (97,50%)	AF521103.1	HQ644141.1	HQ700667.1
112	GRSV (100%)	GRSV+TCSV (98,87%)	GRSV (99,38%)	KY400110.1	HQ644141.1	KY350136.1
116	GRSV (99,15%)	GRSV+TCSV (96,97%)	GRSV (95,98%)	MK820666.1	HQ644141.1	NC_043503.1
119	GRSV (99,74%)	GRSV+TCSV (98,53%)	GRSV (99,15%)	MK820666.1	HQ644141.1	KY350136.1
131	TCSV (99,49%)	GRSV+TCSV (96,73%)	TCSV (95,00%)	AF521102.1	HQ644141.1	HQ634680.1
132	TCSV (100%)	*	TCSV (99,33%)	AF521102.1	*	MH427861.1
140	GRSV (99,20%)	*	GRSV (96,67%)	MF990010.1	*	KY350136.1
141	GRSV (100%)	GRSV+TCSV (94,65%)	GRSV (95,45%)	MF990013.1	HQ644141.1	HQ634679.1
142	GRSV (100%)	-	-	MF990010.1	-	-

4.4 Reação de tomateiros homozigotos e heterozigotos para o gene *Sw-5* ao Groundnut ringspot virus e ao Tomato chlorotic spot virus

A proporção de plantas de tomateiros cvs. Olympo, Compack e SVTH3910 infectadas com os isolados de GRSV e TCSV, após inoculação mecânica, está na Tabela 6. As taxas de infecção das plantas das cvs. Olympo, Compack e SVTH3910 com o GRSV, 30 dias após a inoculação, foram de 40%, 20% e 40%, respectivamente. Para as plantas inoculadas com o TCSV, as respectivas taxas de infecção foram 20%, 40% e 20%. Nenhuma das plantas inoculadas com tampão (controle) foi infectada.

Tabela 6 – Reação de tomateiros cultivares Olympo (sw-5/ sw-5), Compack (Sw-5/ sw-5) e SVTH3910 (Sw-5/ Sw-5) inoculados mecanicamente com o Groundnut ringspot virus (GRSV) e Tomato chlorotic spot virus (TCSV). Controle: plantas da cultivar Olympo inoculadas com tampão.

* dai: dias após a inoculação. ** plantas sintomáticas/ plantas inoculadas.

Genótipo	7 dai*		10 dai		14 dai		20 dai		30 dai	
	GRSV	TCSV	GRSV	TCSV	GRSV	TCSV	GRSV	TCSV	GRSV	TCSV
Controle	0/ 5**	0/ 5	0/ 5	0/ 5	0/ 5	0/ 5	0/ 5	0/ 5	0/ 5	0/ 5
Olympo	0/ 5	0/ 5	1/5	0/5	2/5	1/5	2/5	1/5	2/5	1/5
Compack	0/ 5	0/ 5	1/5	1/5	1/5	2/5	1/5	2/5	1/5	2/5
SVTH3910	0/ 5	0/ 5	0/5	1/5	1/5	1/5	2/5	1/5	2/5	1/5

4.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Partículas virais de perfil circular com diâmetro aproximado de 70 a 90 nm (Figura 4) foram encontradas nas amostras sintomáticas 93 (proveniente de Mogi-Guaçu, SP) e 131 (proveniente de Araguari, MG). As partículas estavam presentes em cavidades do retículo endoplasmático, isoladamente ou em grupos. Nenhuma partícula foi observada em corte ultrafino do tecido foliar sadio (Figura 5).

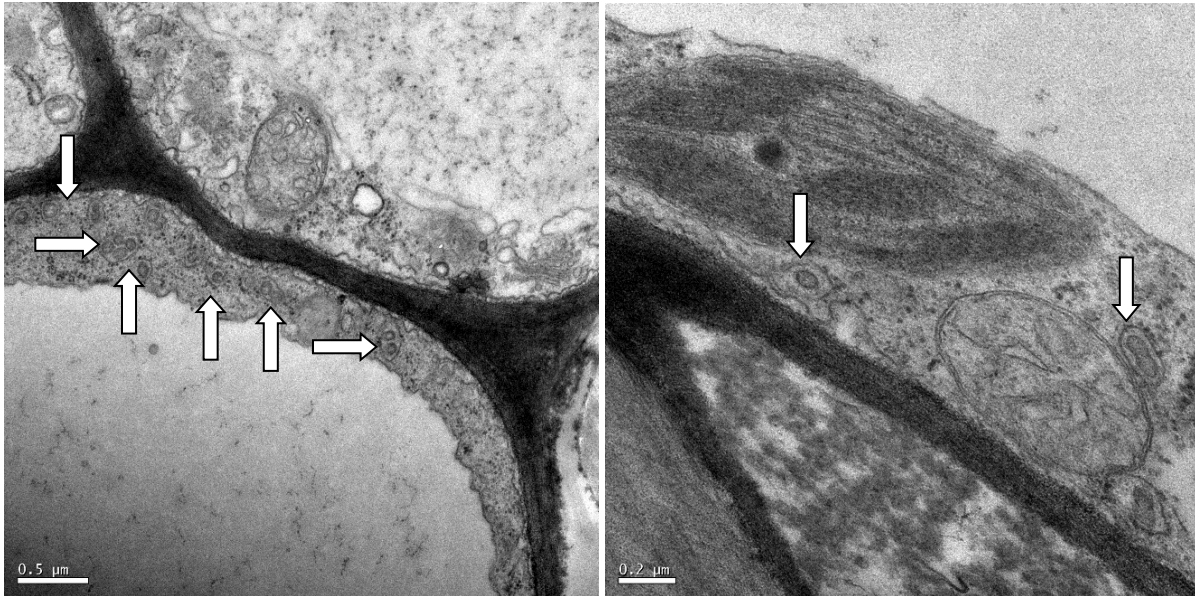


Figura 4 - Micrografias eletrônicas de seções ultrafinas de tecidos de folhas de tomateiros infectados por orthospovirus. Setas: partículas virais em cavidades do retículo endoplasmático. Foto esquerda: amostra 93. Direita: amostra 131.

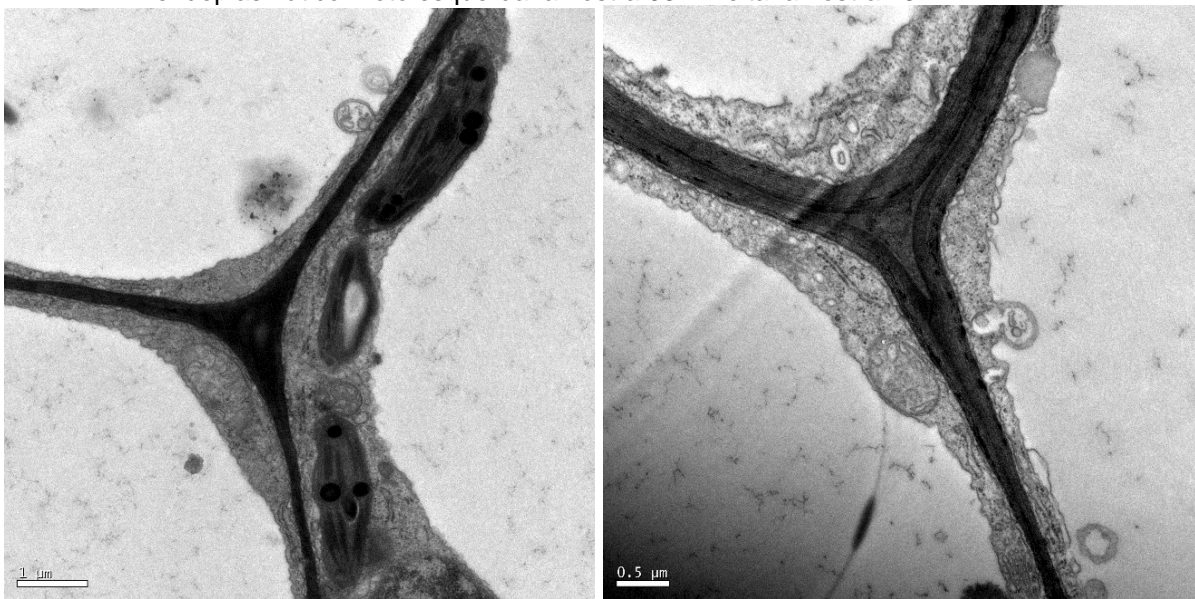


Figura 5 - Micrografias eletrônicas de seções ultrafinas de tecido de folha de tomateiro assintomático. Controle negativo.

5 DISCUSSÃO

5.1 Considerações sobre a baixa incidência de orthospoviroses no campo e a detecção das espécies virais

A baixa incidência de orthospoviroses observada nas parcelas demarcadas pode ser explicada pela aplicação constante e frequente de inseticidas desde a fase de muda até a colheita. Vale ressaltar que, na maioria das regiões produtoras de tomate, os insetos fitófagos que causam maior dano econômico e que prevalecem sobre os tripses em importância são a mosca-branca (*Bemisia tabaci*), a mosca-minadora (*Liriomyza* spp.) e a traça do tomateiro (*Tuta absoluta*), contra as quais doses maciças e frequentes de produtos fitossanitários inseticidas são utilizados, alguns com alta eficácia contra o tripses.

Viroses de plantas cuja transmissão depende de um vetor fazem parte de um grupo epidemiológico distinto, referido como doenças policíclicas de disseminação primária contínua, que combina um processo policíclico, em que há vários ciclos superpostos de infecção como o motor da epidemia, e uma fonte de inóculo contínua, que contribui para o seu progresso (BERGAMIN FILHO et al., 2018). Quando o processo policíclico é bem controlado, a infecção primária desempenha uma função chave, de maneira que as melhores estratégias de controle da doença envolvem a diminuição do influxo de insetos virulíferos originados de fontes de inóculo externas, como outros campos de tomate, outras culturas hospedeiras ou plantas hospedeiras infestantes (BERGAMIN FILHO et al., 2016). No conceito de epidemiologia tropical, introduzido por Bergamin Filho e Amorim (1996), em que há a ausência da descontinuidade de inóculo entre as estações de cultivo, e no caso específico de patossistemas com intenso controle químico do vetor, uma epidemia de grandes proporções nos trópicos e subtropicais ocorreria quando o inóculo nas proximidades da planta-alvo estivesse excepcionalmente elevado. Esse, aparentemente, não foi o caso nos campos amostrados neste trabalho.

Em campos comerciais de tomate, a utilização de inseticidas é extremamente intensa e frequente, chegando-se a aplicações constantes dos mais variados princípios ativos a cada 3 dias. Ingredientes ativos como o imidacloprid e o thiamethoxam, que são adotados massivamente nos cultivos comerciais atuais no Brasil, são utilizados desde a fase de muda até a fase final do ciclo da cultura, mostrando resultados satisfatórios, como os reportados por Groves et al. (2001), que

constataram queda na transmissão por *Frankliniella fusca* de 80,0% de plantas infectadas por TSWV no controle sem tratamento para 14,7% nas plantas tratadas com imidacloprid na dosagem de 9,9 g de princípio ativo para cada 1 mil plantas. Nesse mesmo sentido, Raetano et. al. (2003) verificaram uma eficácia de 93 a 95% no controle de *Frankliniella schultzei* no tomateiro para o thiamethoxam.

A disseminação secundária pode ter sido limitada neste patossistema também por uma particularidade da relação vírus-vetor, em que adultos de tripes, embora possam adquirir o vírus em plantas doentes pelo processo natural de alimentação, são inaptos a transmiti-lo (RILEY et al., 2011). Somente quando o vírus é adquirido no estágio larval é que ocorre a transmissão nos estágios larvais seguintes e nos adultos originados destes (COSTA; FORSTER, 1941).

É plausível supor que o progresso temporal e a distribuição espacial de plantas sintomáticas de viroses dependentes de um vetor exibam padrões diferentes dos resultados deste trabalho quando não se utilizam cultivares geneticamente resistentes e/ou não se adota um controle rigoroso do inseto vetor. Quartezani et al. (2018) analisaram a evolução da doença “vira-cabeça” na cultura do tomateiro no espaço e ao longo do tempo em tais condições, utilizando a cultivar Santa Clara, suscetível a orthospovirus, e sem a rigorosa observância ao controle do vetor, constatando que houve elevada taxa de progresso da doença e capacidade de disseminação do patógeno a partir dos focos iniciais. Suas conclusões apontam que, aos 57 dias após o plantio (DAP), foi detectada a doença em 16% das plantas, distribuídas na forma de focos aleatórios; a taxa de progresso variou de 4,7 a 6,0 plantas doentes/dia, com 100% das plantas apresentando sintomas aos 20 dias após a primeira detecção da doença; houve forte dependência espacial da distribuição das plantas de tomateiro com sintomas de “vira-cabeça” em todas as avaliações; ao longo do tempo surgiram focos secundários da doença, expansão lateral e coalescência desses, caracterizando dispersão por ação do agente vetor associado às fontes de inóculo iniciais e, finalmente, evolução do padrão aleatório de distribuição da doença para agregado e, posteriormente, regular - algo já relatado para diversas doenças viróticas em culturas agrícolas cujos agentes etiológicos são transmitidos por vetores.

Muito embora não se tenha detectada a presença do TSWV como agente causal dos sintomas de orthospovirus nas parcelas delimitadas das quais foram obtidas as amostras deste trabalho, é prematuro afirmar que a incidência do TSWV

tenha se tornado irrelevante. É possível que a eficácia do gene *Sw-5* contra a espécie TSWV esteja efetivamente restringindo drasticamente o processo infeccioso. Em uma época em que a disponibilidade de cultivares com o gene *Sw-5* era nula, Resende et. al. (1996) conduziram levantamento das espécies prevalentes em 6 estados brasileiros e constataram que 46% dos isolados pertenciam à espécie TSWV, 36% à espécie TCSV e 8% à espécie GRSV, restando ainda 10% de isolados não identificados. A introdução e a adoção em grande escala de genótipos com o alelo de resistência *Sw-5* podem ter alterado a frequência e a distribuição das diferentes espécies de orthospovirus neste patossistema ao longo dos anos, de maneira que epidemias relacionadas ao TSWV tenham se restringido por causa da eficiência do gene. Isso pode ser válido para condições de cultivo de tomate para mercado fresco em campo aberto do tipo tutorado, de maior investimento, que já adotaram a tecnologia, mas não é o caso para condições de cultivo de tomate para processamento industrial que, em sua vasta maioria, não utilizam híbridos de tomate que carregam o gene *Sw-5* de resistência a orthospovirus. Em outros patossistemas, por exemplo, a ocorrência dos diferentes orthospovirus tem se mostrado um pouco mais equitativa. Em pimenteiros, Lima et al. (2014) conduziram trabalhos de detecção de vírus durante os anos de 2009 a 2013 nos estados de GO, MG e no DF, constatando que o GRSV foi o mais prevalente, encontrado em 17 das 19 áreas de coleta, com infecção de até 80% na cultivar Habanero (*Capsicum chinense*), seguido por TSWV, encontrado em 10 de 19 áreas, com infecção de até 27,2 % na variedade Biquinho (*Capsicum chinense*) e pelo TCSV, encontrado em 9 de 19 áreas, com infecção de até 31,8 % na variedade Cumari (*C. baccatum* var. *praetermissum*).

Outra hipótese que pode ser averiguada é a de que a eficiência da transmissão e a sua especificidade podem variar de acordo com isolados diferentes de TSWV e a espécie do vetor, como comprovado por Nagata et al. (2007), que observaram 0% de transmissão de um isolado do Distrito Federal e 44,7% de transmissão de um isolado do estado de São Paulo por uma mesma população de *Frankliniella schultzei*. Nagata et al. (2004) avaliaram a eficiência de transmissão das 4 espécies de orthospovirus associados ao tomateiro pelas 4 espécies de tripes mais importantes no Brasil e obtiveram resultados de infecção de 0% para um isolado de TSWV; 69,6% para um isolado de TCSV; 93,1% para um isolado de GRSV e 66,1% para um isolado de CSNV. Wijkamp et al. (1995) observaram que *F.*

occidentalis era a espécie mais eficiente na transmissão do TSWV, com 66% de eficiência, enquanto a forma enegrecida de *F. schultzei* apresentava eficiência de transmissão de 13,7% para este mesmo vírus, sendo, entretanto, mais eficiente para o TCSV, com 37,5%. Assim, a espécie vetora desempenha um papel diferencial importante na epidemiologia da doença, em íntima relação com os diferentes isolados existentes dentro das diferentes espécies de orthospovirus. É possível que, por um complexo e concatenado concurso de circunstâncias, embora improvável, a espécie predominante de *Thysanoptera* tenha sido *F. schultzei*, com isolados de baixa ou nula transmissibilidade de TSWV no presente trabalho. A espécie predominante no estado de São Paulo parece ser a *F. schultzei*, que é altamente eficiente na transmissão das duas espécies virais identificadas neste trabalho. Leão (2015) coletou amostras de adultos e larvas de tripes naturalmente presentes em campos de melancia, abóbora, tomate, pimentão, alface e sobre as espécies infestantes falsa-serralha (*Emilia sonchifolia*) e erva de touro (*Tridax procumbens*), ambas da família *Asteraceae*, que foram submetidas a identificação molecular por PCR a partir do gene citocromo oxidase I mitocondrial (mtCOI) e sequenciamento. Constatou-se que todas as amostras eram de *F. schultzei*, não se detectando outras espécies de importância, como a *F. occidentalis*, *F. intonsa* e *Thrips tabaci*.

Uma constatação, no mínimo curiosa, é a de que todas as plantas sintomáticas no campo, agora identificadas como pertencentes à espécie GRSV e TCSV, exibiram sintomas intensos de anéis necróticos nos frutos em qualquer de seus estágios de desenvolvimento e maturação, associados obrigatoriamente a necrose vascular no ponteiro das plantas e manchas cloróticas e necróticas nas folhas mais jovens (Figura 6).



Figura 6 – Sintomas de anéis necróticos pronunciados em frutos de tomate e manchas necróticas nas folhas mais jovens em plantas provenientes de cultivares que carregam o gene *Sw-5*.

Os sintomas tradicionalmente reportados para a sintomatologia do complexo do “vira-cabeça”, com anéis cloróticos e manchas amarelas nos frutos (Figura 7) e padrões bronzeados nos folíolos das folhas mais novas com minúsculas lesões amarronzadas (BLANCARD, 2018) e arroxejamento dos folíolos (LOPES; ÁVILA, 2005) não foram encontrados em nenhuma das plantas sintomáticas a orthospovirus nos campos demarcados.



Figura 7 – Sintomas de manchas amarelas em frutos de tomate. Fotos da autoria do Dr. Álvaro Santos Costa, de julho de 1971. Gentileza: Prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende.

A ausência de coinfecção com o ToCV em 93 amostras positivas a orthospovirus mostra claramente que a ocorrência de orthospovirose em cultivares resistentes portadoras do gene de resistência *Sw-5* não está necessariamente condicionada à coinfecção com o ToCV. Este resultado corrobora os estudos de Souza (2016), que concluiu que a prévia inoculação de um isolado de

ToCV não alterou a condição de resistência das cultivares de tomateiro Viradoro e Predador para a infecção por orthotospovirus (TCSV+GRSV), obtendo resultados semelhantes também em plantas de *Nicotiana benthamiana* transgênicas transformadas com o gene *Sw-5*.

5.2 Considerações sobre a funcionalidade do gene *Sw-5*

A ocorrência de infecções elevadas de até 40% para o GRSV e o TCSV nos genótipos portadores do gene *Sw-5*, especialmente quando comprovada a presença do homólogo funcional *Sw-5b*, como no presente trabalho, mostra que a designação “resistente” é inadequada, tanto para os genótipos homozigóticos ao gene *Sw-5* como para os heterozigóticos, exigindo estudos adicionais. A incidência de orthotospovirose foi baixa, de até 3,6% (ver item 4.1), porque as amostras foram coletadas em condições de campos de cultivo comerciais de tomate, em que a aplicação de inseticidas é intensa.

É sabido que a troca de materiais genéticos entre diferentes vírus pode ocorrer na natureza entre duas ou mais linhagens, tanto por recombinação ou pelo rearranjo, que é o intercâmbio de segmentos inteiros do genoma de vírus multissegmentados, e que podem alterar a transmissibilidade pelo vetor ou a agressividade ou atenuação na patogenicidade do vírus. Webster et al. (2011), no entanto, inocularam genótipos de tomate portadores do gene *Sw-5* com um isolado de ocorrência natural constituído de rearranjos dos segmentos L e S de GRSV e M de TCSV e comprovaram que não houve contorno da resistência conferida pelo alelo *Sw-5*, de maneira que a ocorrência de isolados com rearranjo de segmentos e a quebra da resistência não são mutuamente exclusivos. Todavia, fundamentado no fato de que a evolução dentro de orthotospovirus parece estar baseada em rearranjos intra e interespecíficos, possibilitando a formação e a ascensão de novos isolados, tais mudanças no genoma do vírus podem levar um determinado isolado a ser mais competitivo ao permitir um ganho de *fitness* (ALMEIDA, 2016).

5.3 Considerações sobre o manejo de orthospoviroses no tomate

A situação dos orthospovirus no Brasil, que é um centro de diversidade para orthospovirus, parece ser mais complexa do que em outras regiões do mundo, sendo relatadas as espécies TSWV, TCSV, GRSV, CSNV, ZLCV, IYSV e BeNMV, das quais as quatro primeiras, coletivamente associadas ao “complexo do vira-cabeça”, ocorrem na cultura do tomateiro e apresentam um círculo de hospedeiros extremamente extenso. Em um sentido amplo, o manejo de orthospovirus deste “complexo do vira-cabeça” implica em evitar o plantio de espécies suscetíveis ao lado de outras suscetíveis, adoção de mudas saudáveis, roguing das plantas doentes, monitoramento e diminuição populacional das espécies de tripes (AGRIOS, 2005) e adoção de cultivares comerciais com resistência a este espectro do vírus (GIORDANO et al., 1999). Zhang et al. (2019) desenvolveram um programa de manejo integrado do TCSV em campos de produção de tomate da Flórida que consiste em 7 componentes: utilização de cultivares tolerantes; mudas saudáveis; eliminação de hospedeiras voluntárias do vírus dentro e ao redor das áreas de cultivo de tomate; controle químico do vetor; utilização de coberturas refletoras de UV nos canteiros para repelir o trips; rotação de culturas por espécies não hospedeiras de orthospovirus e isolamento de culturas suscetíveis com barreiras formadas por espécies de plantas não hospedeiras.

Todavia, as medidas de controle anteriormente mencionadas serão eficientes apenas quando empregadas de forma conjunta com os produtores vizinhos, em escala de microrregião (LIMA; MICHEREFF FILHO, 2015), dada a característica do patossistema, em que o modelo epidemiológico - que implica em vários ciclos da doença e transmissão primária contínua - depende também de componentes externos à plantação de tomate, como a presença de hospedeiras alternativas nas circunvizinhanças, tiguerras de cultivos anteriores, a identidade e a população de espécies com elevada carga viral e a prevalência da espécie viral. Um manejo regional, baseado na redução do inóculo e no controle do vetor, que considere a amplitude geográfica do patossistema, é condição fundamental para o manejo de doenças e exige colaboração entre os agricultores inseridos no conceito de “area-wide management” ou manejo regional (BASSANEZI et al., 2013; BERGAMIN FILHO et al., 2016).

No caso específico de orthospovirus, contudo, a ampla gama de hospedeiros é um fator que dificulta consideravelmente o manejo da doença. Em relação ao GRSV, por exemplo, frequentemente são reportadas ocorrências em novas hospedeiras, como o cubiu (*S. sessiliflorum*) (BOARI et al, 2002), e em espécies de elevada importância econômica, social e territorial, como a soja (FONTES et al., 2019). Vários são os exemplos, como as constatações de Spadotti et al. (2014), que confirmaram a espécie GRSV como causadora de sintomas de anéis necróticos concêntricos em pepino e pimentão cultivados em ambiente protegido no estado de São Paulo, sendo também o primeiro relato de ocorrência da virose em pepino no Brasil. Em melancia, Leão et al. (2014) também reportaram a primeira ocorrência do GRSV em campos comerciais naturalmente infectados das regiões produtoras de melancia de Presidente Prudente e Marília, no estado de São Paulo, que exibiam sintomas de mosaico e lesões necróticas nas folhas, deformação do limbo foliar e manchas necróticas nos frutos.

Outro fator complicador no manejo regional de orthospovirus é de que o GRSV também foi detectado ocorrendo naturalmente em espécies arbóreas típicas do bioma Cerrado, como plantas de baru (*Dipteryx alata*, da família *Fabaceae*), carambola (*Averrhoa carambola*, *Oxalidaceae*), ipê amarelo (*Handroanthus albus*, *Bignoniaceae*), ipê branco (*Handroanthus roseoalba*, *Bignoniaceae*), ipê caraíba (*Tabebuia aurea*, *Bignoniaceae*), jenipapo (*Genipa americana*, *Rubiaceae*), mutamba (*Guazuma ulmifolia*, *Sterculiaceae*), copaíba (*Copaifera langsdorffii*, *Fabaceae*), quaresmeira (*Tibouchina granulosa*, *Melastomataceae*) e sucupira branca (*Pterodon emarginatus*, *Fabaceae*) (BATISTA, 2014). Por motivos óbvios, a eliminação destas plantas hospedeiras é impraticável.

Assim, o controle do vetor se posiciona como fundamental no patossistema orthospovirus-tomate, em virtude de particularidades na relação vírus-vetor, como é o caso da incapacidade de adultos que adquiriram o vírus de transmiti-lo. Como a grande maioria dos tomaticultores tem adotado pulverizações preventivas e frequentes, muitas vezes em doses desmesuradas, o desafio reside na busca do equilíbrio necessário dentro de um manejo integrado de pragas eficiente e factível. O atual pacote tecnológico de controle de insetos fitófagos e ácaros na cultura do tomate parece, em um primeiro momento, restringir o progresso da doença, cujos sintomas podem ocorrer inclusive em cultivares portadoras do gene *Sw-5* quando a inoculação ocorre nas flores e frutos em início de formação (HOULE, 2017).

Especificamente no que diz respeito à resistência genética conferida pelo gene *Sw-5*, há a necessidade de estudos adicionais para se comprovar a efetividade sobre isolados brasileiros do TSWV e a penetrância do gene contra isolados de GRSV e TCSV, predominantes no Brasil, sob condições de ausência de controle químico do vetor. Para 5 isolados diferentes de TSWV do Arkansas, Stevens (1992) observou uma penetrância de 98,7% do gene de resistência. Uma estratégia interessante para os próximos ciclos de hibridação de cultivares de tomate, ainda passível de validação, é a piramidização do alelo *Sw-5* com o alelo *Sw-7* em híbridos de tomate, visto que o primeiro, originado de *Solanum peruvianum*, localiza-se no cromossomo 9 (BROMMONSCHENKEL et al., 2000), e o segundo, originado de *Solanum chilense*, localiza-se no cromossomo 12 e é um locus alternativo que confere resistência de amplo espectro (PADMANABHAN et al., 2019). Dianese et al. (2011) corroboram também com essa estratégia ao sugerir que a introdução de diferentes fatores de resistência em cultivares comerciais permitiria uma resistência baseada na rotação com diferentes loci de resistência descritos em tomate até agora, como o *Sw-5*, *Sw-6* e o *Sw-7*, contribuindo na diminuição da pressão de seleção que poderia estabelecer novos isolados de orthospovirus com maior espectro de virulência.

6 CONCLUSÕES

Levantamentos realizados em campos de cultivo comercial de tomate nos estados de São Paulo, Goiás, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul detectaram a presença de GRSV (70,5%) e TCSV (29,5%) em cultivares que mostravam sintomas de infecção natural de *Orthospovirus*. Do total das amostras analisadas, incluindo em sua grande maioria cultivares que carregam o gene de resistência *Sw-5*, 71% se mostraram infectadas com orthospovirus.

TSWV e CSNV não foram detectados.

O presente trabalho não possibilitou avaliar o efeito do crinivírus na infecção com orthospovirose em cultivares que carregam o gene *Sw-5*, devido à baixa ocorrência de ToCV no campo em infecções naturais, evidenciando, todavia, que a suscetibilidade ao GRSV e/ou ao TCSV das cultivares que carregam o gene *Sw-5* não está necessariamente relacionada com coinfeções com o ToCV.

As incidências de plantas com sintomas de tospovirus foram baixas em todas as regiões e safras amostradas, variando de 0,1 a 3,6%.

A homozigose em relação ao gene *Sw-5* não conferiu maior resistência ao híbrido quando comparada à heterozigose.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5 ed. Burlington: Academic Press, 2005. 948 p.
- ALMEIDA, Mariana Martins Severo de. **Filogeografia, epidemiologia viral e capacidade evolutiva via rearranjo genético de Tospovirus**. 2016. xi, 128 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) — Universidade de Brasília, Brasília, 2016.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI&FRUTI 2019, Santa Cruz do Sul, p. 16, 2018.
- ARAMBURU J.; MARTÍ, M. The occurrence in northeast Spain of a variant of Tomato spotted wilt virus (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the Sw-5 gene. **Plant Pathology**, v. 52, n. 3, p. 407, jun. 2003.
- 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**, v. 92, n.12, dez. 2008. Disponível em: < https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-92-12-1709C?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed>. Acesso em: 15 set. 2019.
- BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; GIMENES-FERNANDES, N.; YAMAMOTO, P.T.; GOTTWALD, T.R.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of Huanglongbing in young sweet orange plantings. **Plant disease**, v. 97, n. 6, p. 789-796, jun. 2013.
- BATISTA, J.G. **Ocorrência natural de espécies virais e avaliação de potenciais hospedeiras experimentais de begomovírus, potyvírus e tospovírus em plantas arbóreas e berinjela (*Solanum melongena*)**. 2014, 183p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2014. Disponível em: < https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/17174/1/2014_JosianeGoulartBatista.pdf>. Acesso em: 18 abr. 2018.
- BATUMAN, O.; ROJAS, M.R.; ALMANZAR, A.; GILBERTSON, R. L. First report of *Tomato chlorotic spot virus* in processing tomatoes in the Dominican Republic. **Plant Disease**, v. 98, n. 2, p. 286, fev. 2014. Disponível em: < https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-07-13-0685-PDN?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed>. Acesso em: 18 abr. 2018.
- BATUMAN, O.; TURINI, T.A.; OLIVEIRA, P.V.; ROJAS, M.R.; MACEDO, M.; MELLINGER, H. C.; ADKINS, S.; GILBERTSON, R.L. First report of a resistance-breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* infecting tomatoes with the Sw-5 tospovirus-resistance gene in California. **Plant disease**, v. 101, n. 4, abr. 2017. Disponível em: < <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-09-16-1371-PDN>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

BELLO, V.H.; WATANABE, L.F.M.; SILVA, F.B.; VICENTIN, E.; GORAYEB, E.; PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R. Sinal amarelo. **Cultivar hortaliças e frutas**, ano XVII, n. 115, p. 18-20, abr-maio 2019.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais**: epidemiologia e controle econômico, São Paulo, Ceres, 289 p., jun. 1996.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; WILLOCQUET, L.; SAVARY, S. Epidemiologia de doenças de plantas. In: AMORIM L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (ed). **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos, v. 1, 5 ed., São Paulo, Ceres, cap. 5, p. 71 - 84, 2018.

BERGAMIN FILHO, A.; NAGATA, A.K.I.; BASSANEZI, R.B.; BELASQUE JUNIOR, J.; AMORIM, L.; MACEDO, M.A.; BARBOSA, J.C.; WILLOCQUET, L.; SAVARY, S. The importance of primary inoculum and area-wide disease management to crop health and food security. **Food security**, v. 8, p. 228-231, 2016. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1063045/1/FoodSecv8p2212382016NAGATA.pdf>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

BEZERRA, I.C., RESENDE, R.O., POZZER, L., NAGATA, T., KORMELINK, R.; ÁVILA, A.C. de. Increase of tospoviral diversity in Brazil, with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and another from zucchini. **Phytopathology**, v. 89, n. 9, p. 823-830, 1999.

BITANCOURT, A.A.A mancha anular do tomate. **O Biológico**, São Paulo, n. 2, p. 98-100, 1936.

BLANCARD, D. **Tomato diseases**: identification, biology and control. London: Manson Publishing, 2012, 688 p.

BOARI, A.J., MACIEL-ZAMBOLIM, E., LAU, D.D., LIMA, G.S.A, KITAJIMA, E.W., BROMMONSCHENKEL, S.H. & ZERBINI, F.M. Detection and partial characterization of an isolate of *Groundnut ringspot virus* in *Solanum sessiliflorum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 3, p.249-253, maio – jun. 2002.

BRITTLEBANK, C.C. Tomato diseases. **Journal of the Department of Agriculture in Victoria**, Victoria, v. 17, p. 1348-1352, 1919.

BROMMONSCHENKEL, S. H.; FRARY, AMY; FRARY, ANNE; TANKSLEY, S.D. The Broad-Spectrum Orthotospovirus Resistance Gene Sw-5 of Tomato Is a Homolog of the Root-Knot Nematode Resistance Gene Mi. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 10, p.1348–1352, 2000.

CIUFFO, M.; FINETTI-SIALER, M.M.; GALLITELL D.; TURINA, M. First report in Italy of a resistance-breaking strain of Tomato spotted wilt virus infecting tomato cultivars carrying the Sw5 resistance gene. **Plant Pathology**, v. 54, n. 4, p. 564, ago. 2005.

COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A.L.R.; SIQUEIRA, W.J. Detecção do *Chrysanthemum stem necrosis virus* em tomateiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, vol. 26, nº 2, 2000

CORREA, C.V.; MANTOAN, L.P.B. Resistência ao vira-cabeça é exigência no plantio de tomate. **Revista Campo & Negócios Online**. Uberlândia: Agrocomunicação, jun. 2018. Disponível em: <<https://revistacampoenegocios.com.br/resistencia-ao-vira-cabeca-e-exigencia-no-plantio-de-tomate/>>. Acesso em: 11 jul. 2021.

COSTA, A.S. Observações sobre vira-cabeça em tomateiros. **Bragantia**, Campinas, v. 4, n. 8, p. 489-507, 1944.

COSTA, A.S.; FORSTER, R. Identidade do vírus de vira-cabeça e sua inclusão no grupo do vírus do "spotted wilt". **Bragantia**, Campinas, v. 1, n. 7, p. 491-516, jul. 1941. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0006-87051941000700001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 18 abr. 2018.

DE HAAN, P.; KORMELINK, R.; RESENDE, R.O.; VAN POELWIJK, F.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. **Journal of General Virology**, London, v. 72, n. 9, p. 2207-2216, 1991.

DIANESE, E.C.; FONSECA, M.E.N.; INOUE-NAGATA, A.K.; RESENDE, R.O.; BOITEUX, L. S. Search in Solanum (section Lycopersicon) germoplasm for sources of broad-spectrum resistance to four Tospovirus species. **Euphytica**, n.180, p. 307-319, 2011.

DOVAS, C.I.; KATIS, N.I.; AVGELIS, N.I. Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. **Plant Disease**, v. 86, n. 12, p. 1345-1349, dez. 2002. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2002.86.12.1345>>. Acesso em: 15 set. 2019.

DUVAL, C.M.; CUPERTINO, F.P.; LUIZ, A.B.P.; GIORDANO, B.P. Metodologia de inoculação de Orthotospovirus visando avaliação de germoplasma de tomate. **Fitopatologia brasileira**, v. 18, n. 4, dez. 1993.

EIRAS, M.; CHAVES, A.L.R.; COLARICCIO, A.; HARAKAVA, R.; ARAUJO, J.; CHAGAS, C. M. Caracterização do Tomato chlorotic spot virus isolado de jiló no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. **Fitopatologia brasileira**, v. 27, n. 3, maio-jun 2002.

ESQUIVEL FARIÑA, A; REZENDE, J.A.M.; WINTERMANTEL, W. Expanding knowledge of the host range of *Tomato chlorosis virus* and host plant preference of *Bemisia tabaci* MEAM1. **Plant Disease**, v. 103, n. 6, abril 2019. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/330713948_Expanding_Knowledge_of_the_Host_Range_of_Tomato_chlorosis_virus_and_Host_Plant_Preference_of_Bemisia_tabaci_MEAM1/stats#>. Acesso em: 21 out. 2020.

FONTES, M.G.; SILVA, G.F.A.; LIMA, M.F.; FONSECA, M.E.N.; COSTA, A.F.; SILVA FILHO, J.G.; BOITEUX, L.S. First report of Groundnut ringspot Orthotospovirus infecting soybeans in Brazil. **Plant disease**, v. 103, n. 4, abr. 2019.

GARCÍA-CANO, E., RESENDE, R.O., FERNANDEZ, MUÑOS, R., MORIONES, E. Synergistic interaction between Tomato chlorosis virus and Tomato spotted wilt virus results in breakdown of resistance in tomato. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 1263-1269, 2006.

GIORDANO, L.B., BEZERRA, I.C.; FERRAZ, E.; ÁVILA, A.C.; LIMA, M. F.; RESENDE, L.V.; SOUZA, A.J. Desenvolvimento de linhagens e cultivares de tomateiro para o Nordeste do Brasil com resistência a tospovirose e geminivirose. In: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S.R.R. (ed). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 1999. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/104260/1/Giordano.pdf>> Acesso em: 15 set. 2019.

GROVES, R.L.; SORENSON, C.E.; WALGENBACH, J.F.; KENNEDY, G.G. Effects of imidacloprid on transmission of *Tomato spotted wilt tospovirus* to pepper, tomato and tobacco by *Frankliniella fusca* Hinds (Thysanoptera: Thripidae). **Crop protection**, v. 20, n. 5, p. 439-445, 2001.

HALLWASS, M.; OLIVEIRA, A.S., DIANESE, E.C., LOHUIS, D.; BOITEUX, L.S.; INOUE-NAGATA A.K.; RESENDE, R.O.; KORMELINK, R. The Tomato spotted wilt virus cell-to-cell movement protein (NSM) triggers a hypersensitive response in Sw-5-containing resistant tomato lines and in *Nicotiana benthamiana* transformed with the functional Sw-5b resistance gene copy. **Molecular plant pathology**, v. 15, n. 9, p. 871-880, 2014.

HOULE, J.L.; KENNEDY, G.G. *Tomato spotted wilt virus* can infect resistant tomato when western flower thrips inoculate blossoms. **Plant disease**, v. 101, n. 9, p. 1666-1670, set. 2017. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30677325/>> Acesso em: 15 set. 2019.

HULL, R. **Matthew's Plant Virology**. San Diego: Elsevier, 2004. 1002 p.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE**: Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro: IBGE, jan. 2021. Disponível em: < https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2021_jan.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2021.

INOUE-NAGATA, A.K. Doenças causadas por vírus. In: CLEMENTE, F.M.V. ; BOITEUX, L. S. (ed). **Produção de tomate para processamento industrial**, Brasília, DF: EMBRAPA, cap. 10, p. 225 - 239, 2012.

INOUE-NAGATA, A.K.; LOPES, C.A.; REIS, A.; PEREIRA, R.B.; QUEZADO-DUVAL, A.M.; PINHEIRO, J. B.; LIMA, M. F. Doenças do tomateiro. In: AMORIM L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (ed). **Manual de Fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas, v. 2, 5 ed., São Paulo, Ceres, cap. 70, p. 697 - 731, 2016.

KIKKERT, M.; VAN LENT, J.; STORMS, M.; BODEGOM, P.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R. Tomato spotted wilt virus particles morphogenesis in plant cells. **Journal of Virology**, Washington, v. 73, n. 3, p. 2288-2297, 1999.

KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. (ed). **Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Elsevier, 2011. 1338 p.

KITAJIMA, E.W. Uso do microscópio eletrônico na diagnose de viroses de plantas. In: ALMEIDA, M.R.A.; ALBÉRSIO, A.L.J. **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**, Fortaleza-CE, Gráfica Nacional, cap. 7, p. 141- 150, 2001.

KORMELINK, R.; DE HAAN, P.; MEURS, C.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. The nucleotide sequence of the M RNA segment of Tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. **Journal of General Virology**, London, v. 73, n. 11, p. 2795-2804, 1992.

LATHAM, L.J.; JONES, R.A.C. Selection of resistance breaking strains of Tomato spotted wilt Orthotospovirus. **Annals of Applied Biology**, v.133, n. 3, p. 385–402, dez. 1998.

LEÃO, E.U. **Caracterização do Groundnut ringspot virus (GRSV) e seu vetor (Frankliniella schultzei) em melancia**. 2015. xi, 58 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2015.

LEÃO, E.U.; SPADOTTI, D.M.A.; ROCHA, K.C.G.; PANTOJA, F.C.; REZENDE, J.A.M.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R. *Citrullus lanatus* is a new natural host of *Groundnut ringspot virus* in Brazil. **Journal of Phytopathology**, n. 163, p. 1014-1018, out. 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/275465211_Citrullus_lanatus_is_a_New_Natural_Host_of_Groundnut_ringspot_virus_in_Brazil#fullTextFileContent>. Acesso em: 15 set. 2019.

LIMA, M.F.; MICHEREFF FILHO, M. Vira-cabeça do tomateiro: sintomas, epidemiologia, transmissão e medidas de manejo. **Comunicado técnico 110**, Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 16 p., maio 2015.

LIMA, M.F.; RIBEIRO, C. da S.C.; OLIVEIRA, D.V.V.; COELHO, L.G.F.; GOMES, L.M.; BRITO, S.M.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Panorama de viroses em pimenteiras no Brasil Central. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 2, jul. 2014. Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/EventosX/Trabalhos/EV_7/A6323_T9947_Comp.pdf>. Acesso em: 18 abr. 2018.

LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. de. **Doenças do tomateiro**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2005. 151 p. il.; color.

LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H; SIQUEIRA, W.J.; MELO, A.M.T. de; USBERTI FILHO, J.A.; FONTE, L.C. da; MELO, P.C.T. de. Resistência de linhagens avançadas de tomateiro a tospovírus. **Bragantia**, vol. 58, n. 2, p. 293-303, 1999.

MANSILLA CÓRDOVA, P.J.M. **Resistência de genótipos de tomateiro à infecção com o *Tomato chlorosis virus* e tolerância à doença**. 2015. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

MARUBAYASHI, J.M.; YUKI, V.A.; ROCHA, K.C.G.; MITUTI, T.; PELEGRINOTTI, F.M.; FERREIRA, F.Z.; MOURA, M.F.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R. At least two indigenous species of the *Bemisia tabaci* complex are present in Brazil. **Journal of applied entomology**, n. 137, p. 113-121, 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0418.2012.01714.x>>. Acesso em: 15 set. 2019.

MOLENA, L.A.; GUERREIRO, L.M.M. Anuário 2018 – 2019. **Hortifruti Brasil**, ano 17, n. 185, p. 30, dez. 2018-jan.2019.

MOWAT, W.P.; DAWSON, S. Detection and identification of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. **Journal of Virological Methods**, v. 15, n. 3, p. 233–247, 1987. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166093487901017?via%3Dihub>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

NAGATA, T., ALMEIDA, A.C.L., RESENDE, R.O.; INOUE-NAGATA, A.K.; ÁVILA, A.C. de. The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. **Plant Pathology**, v. 53, p. 136-140, 2004.

NAGATA, T., RESENDE, R.O.; ALMEIDA, A.C.L.; ÁVILA, A.C. de. The fluctuation of transmission specificity and efficacy of *Tomato spotted wilt virus* by *Frankliniella schultzei*. **Fitopatologia brasileira**, v. 32, n. 5, p. 439, out. 2007.

NICK, C; SILVA, D.J.H. Melhoramento de Tomate. In: NICK, C; BORÉM, A. (ed). **Melhoramento de Hortaliças**, Viçosa – MG, editora UFV, cap. 13, p. 396 - 431, 2016.

NOGUEIRA, N.L. **Efeito do vírus “Vira-cabeça” sobre os teores de aminoácidos e amidas livres do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) em diferentes estados nutricionais**. 1971. 61 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1971.

OLIVEIRA, A.S. de; BERTRAN, A.G.; INOUE-NAGATA, A.K.; NAGATA, T.; KITAJIMA, E.W.; RESENDE, R.O. An RNA-dependent RNA polymerase gene of a distinct Brazilian tospovirus. **Virus Genes**, v. 43, n. 3, p. 385-389, dez. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21720732/>>. Acesso em: 21 out. 2020.

PADMANABHAN, C.; MA, Q.; SHEKASTEBAND, R.; STEWART, K.S.; HUTTON, S.F.; SCOTT, J. W.; FEI, Z.; LING, K. Comprehensive transcriptome analysis and functional characterization of PR-5 for its involvement in tomato Sw-7 resistance to *Tomato spotted wilt virus*. **Scientific reports**, v. 9, maio 2019.

PAVAN, M. A.; COSTA, A. S.; KUROZAWA, C.; SOLER, J. M. P. Infecção localizada em frutos de tomateiro causada por tospovírus. **Summa Phytopathologica**, vol. 22, nº 1, 1996.

PEIRÓ, A.; CAÑIZARES, M.C.; RUBIO, L.; LÓPEZ, C.; MORIONES, E.; ARAMBURU, J.; SÁNCHEZ-NAVARRO, J. The movement protein (NSm) of Tomato spotted wilt virus is the avirulence determinant in the tomato Sw-5 gene-based resistance. **Molecular plant pathology**, v. 15, n. 8, p. 802-813, out. 2014.

QUARTEZANI, W.Z.; HELL, L.R.; CUNHA JUNIOR, J. de O.; MORAES, W. B.; BELAN, L. L.; MORAES, S. de P. C. B.; JESUS JUNIOR, W.C. de; FURTADO, E.L. Análise geoestatística do “vira-cabeça” na cultura do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 51-55, jan-mar. 2018.

RAETANO, C.G.; KOBAYASHI, M.R.; KUWAHARA, W.R.; VINCHI, R.R. Application methods and dosages of thiamethoxam in thrips control on tomato plants. **Horticultura brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 430-432, set. 2003.

REVISTA CAMPO & NEGÓCIOS. **Anuário Hortifruti 2014 Campo & Negócios**. Uberlândia: Agrocomunicação, 2014. 114 p.

REVISTA CAMPO & NEGÓCIOS. **Surto mundial de vira-cabeça deixa setor em alerta**. Disponível em: <<http://www.revistacampoenegocios.com.br/surto-mundial-de-vira-cabeça-deixa-setor-em-alerta>>. Acesso em: 25 out. 2016.

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

REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W. Vírus e viroides. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (ed). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**, v. 1, 5 ed., São Paulo, Ceres, cap. 10, p. 161 - 180, 2018.

RILEY, D.G.; JOSEPH, S.V.; RAJAGOPALBABU, S.; STANLEY, D. Thrips vectors of tospoviruses. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 1, n. 2, abr. 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jipm/article/2/1/11/2194119?login=true>>. Acesso em: 25 out. 2016.

SEVIK, M.A.; ARLI-SOKMEN, M. Estimation of the effect of Tomato spotted wilt virus (TSWV) infection on some yield components of tomato. **Phytoparasitica**, n. 40, p. 87–93, 2011.

SHI, A; VIERLING, R. Identification of molecular markers for Sw-5 gene of *Tomato spotted wilt virus* resistance. **American journal of biotechnology and molecular science**, v. 1, n. 1, p. 8-16, abr. 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/228487822_Identification_of_molecular_markers_for_Sw-5_gene_of_tomato_spotted_wilt_virus_resistance>. Acesso em: 25 maio 2019.

SIN, S.H.; MCNULTY, B.C.; KENNEDY, G.G.; MOYER, J.W. Viral genetic determinants for thrips transmission of Tomato spotted wilt virus. **Proc. Natl. Acad. Sci.** n. 102, p. 5168-5173, 2005.

SOUZA, T.A. **Tomato chlorosis virus, hospedeiras alternativas e interação com tospovírus em tomateiro.** 2016. viii, 91 f., il. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

SPADOTTI, D.M.A.; LEÃO, E.U.; ROCHA, K.C.G.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R. First report of Groundnut ringspot virus in cucumber fruits in Brazil. **New Disease Reports**, v. 29, n. 25, jun. 2014. Disponível em: <https://www.ndrs.org.uk/pdfs/029/NDR_029025.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2018.

STEVENS, M. R.; SCOTT, S. J.; GERGERICH, R. C. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. **Euphytica**, Wageningen, v. 59, p. 9-17, 1992.

TAKEDA, A.; SUGIYAMA, K.; NAGANO, H.; MORI, M.; KAIDO, M.; MISE, K.; TSUDA, S.; OKUNO, T. Identification of a novel RNA silencing supressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 532, n. 1, p. 75-79, 2002.

TSOMPANA, M.; MOYER, W. Tospovirus. In: MAHY, B.W.J.; VAN REGENMORTEL, M H.V. (ed). **Encyclopedia of Virology**, Elsevier, p. 157 - 163, 2008. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/289121855_Tospovirus>. Acesso em 25 maio 2020.

VEJA DIGITAL. **Vilões da inflação: tomate e tangerina subiram mais de 70% em 2018.** Disponível em: <<https://veja.abril.com.br/viloes-da-inflacao-tomate-e-tangerina-subiram-mais-de-70-em-2018>>. Acesso em: 25 maio 2019.

WEBSTER, C.G.; REITZ, S.R.; PERRY, K.L.; ADKINS, S. A natural M RNA reassortant arising from two species of plant- and insect-infecting bunyaviruses and comparison of its sequence and biological properties to parental species. **Virology**, v. 413, n. 2, p. 216-225, maio 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21382631/>>. Acesso em 25 maio 2019.

WIJKAMP, I.; ALMARZA, N.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. **Phytopathology**, v. 85, n. 10, p. 1069-1074.

ZHANG, S.; FAN, X.; FU, Y.; WANG, Q.; MCAVOY, E.; SEAL, D.R. Field evaluation of tomato cultivars for tolerance to *Tomato chlorotic spot tospovirus*. **Plant health progress**, v. 20, n. 2, 2019.

APÊNDICE

Apêndice A. Relação de amostras de tomateiros infectados com os orthotospovirus Groundnut ringspot virus (GRSV) e Tomato chlorotic spot virus (TCSV) e o crinivirus Tomato chlorosis virus (ToCV) e presença do gene de resistência *Sw-5* a orthotospovirus.

Amostra	Código	PTA-ELISA	Orthotospovirus	Crinivirus	(continua)
					<i>Sw-5</i>
1	SQ1	+	+	-	+
2	SQ2	-	+	-	+
3	SQ3	+	+	-	+
4	SQ4	-	+	-	+
5	SQ5	+	+	-	+
6	SQ6	-	+	-	+
7	SQ7	+	+	-	+
8	SQ8	-	+	-	+
9	SQ9	+	+	-	-
10	SQ10	+	+	-	+
11	SQ11	+	+	-	+
12	SQ12	+	+	-	+
13	SQ13	+	+	-	+
14	SQ14	+	+	-	+
15	SQ15	+	+	-	+
16	SQ16	-	+	-	+
17	SQ17	-	+	-	+
18	SQ18	+	+	-	+
19	SQ19	+	+	-	+
20	SQ20	+	+	-	+
21	SQ21	+	+	-	+
22	SQ22	++	+	-	+
23	SQ23	+	+	-	+
24	SQ24	+	+	-	+
25	SQ25	+	+	-	+
26	SQ26	+	NA	NA	NA
27	SQ27	-	+	-	+
28	SQ28	++	+	-	+
29	SQ29	+	+	-	+
30	SQ30	-	+	+	+
31	SQ31	+	+	-	+
32	SQ32	-	+	-	+
33	SQ33	+	+	-	+
34	SQ34	-	+	-	+
35	SQ35	-	+	-	+
36	SQ36	-	+	-	+
37	SQ37	+	+	-	+
38	SQ38	-	+	-	+
39	SQ39	-	+	-	+

Apêndice A. Relação de amostras de tomateiros infectados com os orthotospovirus Groundnut ringspot virus (GRSV) e Tomato chlorotic spot virus (TCSV) e o crinivirus Tomato chlorosis virus (ToCV) e presença do gene de resistência Sw-5 a orthotospovirus.

(continuação)

Amostra	Código	PTA- ELISA	Orthotospovirus	Crinivirus	Sw-5
40	SQ40	-	+	+	+
41	SQ41	+	+	-	+
42	SQ42	-	-	-	+
43	VA1	-	-	-	+
44	ALA1	+	+	-	-
45	DOM1	+	+	-	-
46	GS1	-	-	-	+
47	GS2	-	+	-	+
48	GS3	+	+	-	+
49	GS4	-	+	-	+
50	GS5	+	+	-	+
51	GS6	+	+	-	+
52	GS7	+	+	-	+
53	GS8	+	+	-	+
54	GS9	-	+	-	+
55	GS10	+	+	-	+
56	GS11	+	+	-	+
57	GS12	-	+	-	+
58	GS13	+	+	-	+
59	GS14	+	+	-	+
60	GS15	+	+	-	+
61	LA1	-	+	-	-
62	LA2	-	+	-	+
63	LA3	-	+	-	+
64	LA4	-	+	-	+
65	LA5	-	+	-	+
66	LA6	+	+	-	+
67	LA7	+	+	-	+
68	LA8	-	-	-	+
69	LA9	-	+	-	+
70	LA10	-	+	-	+
71	BT1	-	-	-	+
72	BT2	-	+	-	+
73	BT3	-	-	-	+
74	BT4	+	-	-	+
75	BT5	-	-	-	+
76	BT6	-	+	-	+
77	BT7	-	+	-	+
78	BT8	-	-	-	-
79	BT9	-	+	-	+
80	BT10	-	+	-	+

Apêndice A. Relação de amostras de tomates infectados com os orthospovirus Groundnut ringspot virus (GRSV) e Tomato chlorotic spot virus (TCSV) e o crinivirus Tomato chlorosis virus (ToCV) e presença do gene de resistência Sw-5 a orthospovirus.

(continuação)

Amostra	Código	PTA- ELISA	Orthospovirus	Crinivirus	Sw-5
81	BT11	-	-	-	+
82	BT12	-	-	-	+
83	BT13	+	+	-	+
84	BT14	+	+	-	+
85	BT15	+	-	-	+
86	BT16	+	+	-	+
87	BT17	+	-	-	-
88	BT18	-	-	-	-
89	BT19	-	-	-	-
90	BT20	-	+	-	+
91	TS1	-	+	-	+
92	TS2	-	-	-	+
93	TS3	+	+	-	+
94	TS4	+	+	-	+
95	TS5	-	+	-	+
96	TS6	-	-	-	-
97	TS7	+	-	-	-
98	TS8	-	+	-	+
99	TS9	+	+	-	+
100	TS10	-	+	-	+
101	RAV1	-	-	-	-
102	ALA2	+	+	-	-
103	ALA3	+	-	-	-
104	ALA4	+	+	-	-
105	ALA5	+	+	-	-
106	T1	-	-	-	+
107	T2	-	-	-	+
108	T3	-	-	-	+
109	T4	-	-	-	+
110	T5	-	-	-	+
111	VG - CAMPO	NA	-	-	+
112	1 GS 17	NA	+	-	+
113	2 GS 17	NA	-	-	+
114	3 GS 17	NA	-	-	+
115	04-LA-17	NA	-	-	+
116	05-NF-17	NA	+	-	+
117	06-GO-17	NA	-	-	-
118	07-GO-17	NA	-	-	+
119	08-GO-17	NA	+	-	+
120	09-GO-17	NA	-	-	+
121	10-GO-17	NA	-	-	+

Apêndice A. Relação de amostras de tomateiros infectados com os orthotospovirus Groundnut ringspot virus (GRSV) e Tomato chlorotic spot virus (TCSV) e o crinivirus Tomato chlorosis virus (ToCV) e presença do gene de resistência *Sw-5* a orthotospovirus.

Amostra	Código	PTA- ELISA	(conclusão)		
			Orthotospovirus	Crinivirus	<i>Sw-5</i>
122	11-GO-17	NA	-	-	+
123	12-BT-17	NA	+	-	+
124	13-BT-17	NA	+	-	+
125	14-ALA-17	NA	+	-	-
126	15-SQ-17	NA	-	+	+
127	16-SQ-17	NA	-	-	+
128	17-BA-17	NA	-	+	+
129	18-BA-17	NA	+	+	+
130	01-ARAG-18	NA	-	-	-
131	02-ARAG-18	NA	+	-	+
132	03-ARAG-18	NA	+	-	+
133	19-LA-17	NA	+	-	+
134	20-LA-17	NA	+	-	+
135	21-LA-17	NA	+	+	+
136	22-LA-17	NA	-	-	-
137	23-LA-17	NA	+	+	+
138	24-LA-17	NA	-	-	-
139	0361A	NA	-	-	-
140	0361B	NA	-	-	+
141	VENTO	NA	+	-	-
142	01-6340-MG	NA	-	-	+
143	SM16-RS2	NA	-	-	-