

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

ALBA NISE MERÍCIA ROCHA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE BEGOMOVIROSES E DA MOSCA BRANCA EM
TOMATE E PLANTAS DANINHAS ASSOCIADAS E CARACTERIZAÇÃO DE
VIROSES EM *Allium ampeloprasum* L. NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

LAGES

2022

ALBA NISE MERÍCIA ROCHA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE BEGOMOVIROSES E DA MOSCA BRANCA EM
TOMATE E PLANTAS DANINHAS ASSOCIADAS E CARACTERIZAÇÃO DE
VIROSES EM *Allium ampeloprasum* L. NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Nascimento da Silva.

LAGES

2022

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Rocha Santos, Alba Nise Merícia
CARACTERIZAÇÃO DE BEGOMOVÍROSES E DA MOSCA
BRANCA EM TOMATE E PLANTAS DANINHAS
ASSOCIADAS E CARACTERIZAÇÃO DE VIROSES EM *Allium
ampeloprasum* L. NO ESTADO DE SANTA CATARINA / Alba
Nise Merícia Rocha Santos. -- 2022.
97 p.

Orientador: Fábio Nascimento da Silva
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2022.

1. *Solanum lycopersicum*. 2. Pseudorrecombinação. 3. *Bemisia
tabaci*. 4. *Allium ampeloprasum*. 5. Polerovirus. I. Silva, Fábio
Nascimento da. II. Universidade do Estado de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação
em Produção Vegetal. III. Título.

ALBA NISE MERÍCIA ROCHA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE BEGOMOVIROSE DA MOSCA BRANCA EM
TOMATE E PLANTAS DANINHAS ASSOCIADAS E CARACTERIZAÇÃO DE
VIROSES EM *Allium ampeloprasum* L. NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Nascimento da Silva.

BANCA EXAMINADORA

Orientador:

Prof. Dr. Fábio Nascimento da Silva
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membros:

Prof. Dr. Leandro Luiz Marcuzzo
Instituto Federal Catarinense *campus* Rio do Sul

Prof. PhD. Amauri Bogo
Universidade do Estado de Santa Catarina

Lages, 25 de fevereiro de 2022.

Aos meus pais Angela Maria da Rocha e José
Matozinhos dos Santos;
A minha irmã Mariele Rocha Santos;
Aos matrilinares que me apoiaram nessa luta
Dedico e ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por todas as graças recebidas, discernimento, proteção ao longo dessa caminhada e pela concessão de mais uma conquista.

A minha família pela educação, pelo suporte, paciência, incentivo e amor durante toda a minha vida, e em especial, nesses dois últimos anos. Obrigada por permitirem essa existência em conjunto.

Ao orientador, Dr. Fábio Nascimento da Silva, pela orientação, ensinamentos, confiança, paciência e otimismo ao longo desses dois anos de crescimento profissional, intelectual e pessoal.

À minha querida amiga Dahise Brilinger, de maneira particular, pelo suporte, carinho, risadas, companheirismo e em especial nas tardes de sábado e domingo com “cafezinho Árábica” que tanto apreciamos. Também agradeço pelos conselhos e por me ouvir em diversos momentos em que eu não sabia para onde ir e como dar continuidade em minha caminhada. Você é uma das peças-chave que me ajudaram a chegar onde estou.

Aos meus queridos amigos Ânderson Sommer, Matheus Albuquerque, Samara Nascimento, que me acompanharam nesses anos, me ajudando nos trabalhos, sem nunca se negarem e muitas vezes construindo momentos de descontração. Vocês são algumas das pessoas que admiro imensamente. Obrigada por estarem sempre dispostos a me ouvir.

Aos meus amigos Jéssica Stringari, Laísa Maindra, Maria Isabel, Gabriela Carolina, Gustavo Theiss, pelo carinho, companhia, auxílio e suporte em diversos momentos. Foi muito gratificante ter conhecido vocês.

Aos meus amados amigos Andrea Pires, Cleicimar Gomes, Kátia Cristina, Leandra Cardoso, Cleyton Oliveira, Etiene Nunes, Lucas Maia, Aderlan Silva, Maria Thereza, Rafael Ruy, Lucas Corrêa, pela amizade e carinho. Eu sei que a distância é um fator limitante, mas saibam que o carinho de vocês é imprescindível. Vocês sempre estarão nas minhas orações. Agradeço por sempre me ouvirem, me aconselharem e me acolherem.

Ao Dr. Eduardo Gorayeb, agradeço a disponibilidade, paciência, conselhos, contribuições, esclarecimentos de diversas dúvidas sobre Virologia, Biologia Molecular e Bioinformática.

A Universidade do Estado de Santa Catarina, ao Programa de Pós Graduação PPGPV do Centro de Ciências Agroveterinárias, pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação; e a CAPES pelo fornecimento da bolsa de estudos. A todo corpo docente do PPGPV pelos ensinamentos repassados, e aos demais colegas que conviveram comigo durante este

período.

Aos produtores de tomates pela disponibilidade e atenção durante as vistorias e coletas de plantas sintomáticas e mosca-branca.

Ao Dr. Leandro Marcuzzo pela contribuição para concretização do segundo capítulo dessa dissertação.

Por fim, agradeço sem exceção a todos que de certa forma contribuíram direta ou indiretamente com o desenvolvimento deste trabalho.

Muito Obrigada!

Concedei-nos, Senhor, serenidade necessária,
para aceitar as coisas que não podemos
modificar, coragem para modificar aquelas que
podemos e sabedoria para distinguirmos umas
das outras.

(Reinhold Niebuhr)

RESUMO

O tomate é uma das hortaliças mais cultivadas e consumidas no mundo e no Brasil, sendo o Estado de Santa Catarina um dos principais produtores da cultura, ocupando o sexto lugar em produção nacional. O tomateiro apresenta vulnerabilidade significativa à atividade de pragas e agentes patogênicos. Dentre os agentes virais, isolados de espécies do gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) são responsáveis por danos consideráveis a cultura. Além disso, neste estudo foi realizada a diagnose de doenças de etiologia viral em *Allium ampeloprasum* L., conhecido com alho-elefante, uma hortaliça monocotiledônea condimentar, coletada na cidade de Rio de Sul. Desse modo, os objetivos dessa dissertação foram: (i) caracterizar as begomoviroses ocorrentes em cultivos de tomate em Santa Catarina; (ii) caracterizar begomoviroses em plantas daninhas associadas aos cultivos de tomate; (iii) caracterizar as espécies crípticas de *Bemisia tabaci* vetoras de begomoviroses; (iv) identificar as espécies de moscas-branca infestando tomateiros em Santa Catarina; (v) caracterizar três viroses encontradas em plantas de alho-elefante (*A. ampeloprasum*) advindas de áreas experimentais do município de Rio do Sul, região do Vale do Itajaí, Santa Catarina. Para atingir o objetivo estabelecido para a cultura do tomate foi realizada a extração de DNA total das plantas e das moscas-branca individuais, amplificação de DNA pela técnica de PCR convencional e submissão dos produtos de PCR à eletroforese em gel de agarose (1%), onde as amostras positivas para begomovírus foram submetidas ao sequenciamento convencional. Para o alho-elefante, as amostras de plantas sintomáticas foram coletada e foi realizada a extração de ácidos nucleicos totais, síntese de DNA complementar, amplificação por RT-PCR e separação dos fragmentos utilizando eletroforese em gel de agarose (1%), onde os fragmentos obtidos foram purificados e sequenciados. Adicionalmente, para a caracterização das espécie virais presentes nas amostras de alho-elefante, foi utilizado o sequenciamento de nova geração (*Next generation sequencing* – NGS) a partir de amostras de RNA total. Das 33 amostras totais, 21 amostras de tomate e 12 amostras de plantas daninhas, 4 amostras apresentaram resultado positivo nos testes moleculares, sendo 3 amostras de tomate e 1 amostra de planta daninha e as análises de sequências demonstraram a ocorrência de um possível pseudorecombinante. Tomato severe rugose virus (ToSRV) foi a espécie dominante nos cultivos do litoral catarinense, inclusive infectando a planta daninha Mari Pretinha cuja ocorrência não havia sido relada até o presente momento. Moscas brancas foram encontradas somente no município de Santo Amaro da Imperatriz/SC, onde se idenficou a ocorrência inédita da espécie Mediterranean (MED), com predomínio da espécie Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1). Os testes moleculares para alho-

elefante revelaram a presença de espécies do gênero *Potyvirus*, ainda não relatadas em alho-elefante, além de um provável novo isolado de *allium* polerovirus A, denominado de LAGbr, anteriormente relado somente no sudeste asiático.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*. Pseudorrecombinação. *Bemisia tabaci*. *Allium ampeloprasum*. *Polerovirus*.

ABSTRACT

Tomato is one of the most cultivated and consumed vegetables in the world and in Brazil, with the Santa Catarina State being one of the main producers of the culture, occupying the sixth place in national production. Tomato shows significant vulnerability to the activity of pests and pathogens. Among the viral agents, isolates from species of the genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*) are responsible for considerable damage to the culture. In addition, this study aimed the diagnosis of viral diseases in *Allium ampeloprasum* L., a monocotyledonous spice vegetable, collected in the Rio de Sul, Santa Catarina State. This study aimed: (i) to characterize begomoviruses occurring in tomato crops in Santa Catarina; (ii) to characterize begomoviruses in weeds associated with tomato crops; (iii) to characterize the cryptic species of *Bemisia tabaci* vectors of begomoviruses; (iv) identify the whitefly species infesting tomato plants in Santa Catarina; (v) to characterize three viruses found in elephant garlic plants (*A. ampeloprasum*) from experimental areas in the municipality of Rio do Sul, region of Vale do Itajaí, Santa Catarina. To achieve the objective established for the tomato crop, total DNA extraction from plants and individual whiteflies was performed, DNA amplification by the conventional PCR technique and submission of the PCR products to agarose gel electrophoresis (1%), were samples positive for begomovirus were subjected to conventional sequencing. For elephant-garlic, samples of symptomatic plants were collected, extraction of total nucleic acids, synthesis of complementary DNA, amplification by RT-PCR and separation of the fragments using agarose gel electrophoresis (1%) were performed; the fragments obtained were purified and sequenced. Additionally, for the characterization of the viral species present in the elephant-garlic samples, Next Generation Sequencing (NGS) was used from total RNA samples. Of the 33 total samples, 21 tomato samples and 12 weed samples, 4 samples showed a positive result in the molecular tests, being 3 tomato samples and 1 weed sample and the sequence analyzes demonstrated the occurrence of a possible pseudorecombinant. Tomato severe rugose virus (ToSRV) was the dominant species in crops along the coast of Santa Catarina, including infecting a weed Maria Pretinha whose occurrence had not been reported so far. Whiteflies were found only in the municipality of Santo Amaro da Imperatriz/SC, where the unprecedented occurrence of the Mediterranean species (MED) was identified, with a predominance of the Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1) species. Molecular tests for elephant-garlic revealed the presence of species of the genus *Potyvirus*, not yet reported in elephant-garlic, in addition to a probable new isolate of *allium* polerovirus A, called LAGbr, previously reported only in Southeast Asia.

Keywords: *Solanum lycopersicum*. Pseudorecombination. *Bemisia tabaci*. *Allium ampeloprasum*. *Polyerovirus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Organização genômica das espécies Tomato yellow leaf curl virus (monopartido) e Bean golden mosaic virus (bipartido). CR: “common region” do componente A (CRA) e B (CRB); ORF’s do componente A: AV1 (capsídeo), AC1 (replicação), AC2 (Transcrição), AC3 (amplificação da replicação viral) e AC4(supressão do silenciamento gênico); componente B: BV1 (movimento intracelular) e BC1 (movimento extracelular). Para os vírus monopartidos, pode-se indicar as ORFs C1 (replicação viral), C2 (ativação da transcrição), C3 (potencialização da replicação) e C4 (sintomas), V1 (capsídeo) e V2 (movimento).27
- Figura 2 - Organização do genoma de um membro típico do gênero *Potyvirus*. VPg, ligado ao genoma da proteína viral; P1-Pro, protease da proteína 1; HC-Pro, componente de protease auxiliar; P3, proteína 3; PIPO, ORF Potyviridae; 6K, péptido de seis quilodaltons; CI, inclusão citoplasmática; NIa-Pro, protease de inclusão nuclear A; NIb, RNA polimerase dependente de RNA; CP, proteína de revestimento. Os locais de clivagem de P1-Pro (O), HC-Pro (◆) e NIa-Pro (↓) são indicados..... 38
- Figura 3 - Organização genômica do *Potato leafroll virus* gênero *Polerovirus*. Os marcadores vermelhos indicam a proteína do vírus ligada covalentemente ao genoma (VPg) na extremidade 5' dos RNAs. Os quadros de leitura (ORFs) são indicados por sua posição acima e abaixo do genoma na ordem -1, 0 e +1 e codificam a poliproteína composta pelo domínio transmembrana, VPg, serina protease e proteína(s) C-terminal (vermelho), RdRP (amarelo). ORFs 3'-proximais codificam a proteína de revestimento (CP, verde) e a proteína de domínio de leitura relacionada às propriedades de transmissão por pulgões (azul). ORF0 codifica supressor de silenciamento de RNA viral; e ORF3a é necessária para infecção sistêmica; ORF4 codifica a proteína de movimento; ORF’s 6 e 7 codificam proteínas responsáveis pela transcrição e replicação do vírus; ORF8 codifica uma proteína associada à replicação exclusiva de potato leafroll virus (PLRV). A área com hachuras indica sobreposição entre ORF’s no mesmo quadro de leitura. 39
- Figura 4 - Mapa do estado de Santa Catarina indicando locais de coletas das amostras com marcações em vermelho (Lages, SC, 2022).....44
- Figura 5 - Plantas com sintomas de begomovirose oriundas de Santo Amaro da Imperatriz: A) Tomate manifestando bolhosidades, nanismo, enrolamento e amarelecimento foliar; B) Maria pretinha (*Solanum americanum* Mill.) manifestando sintomas de

deformações foliares, mosaico e manchas púrpuras; C) Infestação de mosca-branca em lavoura de pepino adjacente a uma lavoura de tomate. 50

Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da PCR para a detecção de espécies do gênero *Begomovirus*, utilizando os oligonucleotídeos PAL1v1978 e PAR1C496. Geis (A) e (B) representam amostras de tomate 1 – 21. MM: Marcador molecular 1kb (Promega); Br: Branco (PCR realizada com água); C+: Controle positivo (planta infectada por begomovírus); C-: Controle negativo (PCR realizada com uma planta sadia). 51

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da PCR para a detecção de espécies do gênero *Begomovirus*, utilizando os oligonucleotídeos PBL1v2040 e PCRC1. Geis (A) e (B) representam amostras de tomate 1 – 21. MM: Marcador molecular 1kb (Promega); Br: Branco (PCR realizada com água); C+: Controle positivo (realizada com planta infectada por begomovírus); C-: Controle negativo (PCR realizada com planta sadia). 51

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da PCR para a detecção de espécies do gênero *Begomovirus*, utilizando os oligonucleotídeos PAL1v1978/PAR1C496 (A) e PBL1v2040/PCRC1 (B). - MM: Marcador molecular 1kb (Promega); Br: Branco (PCR realizada com água); C+: Controle positivo (realizada com planta infectada por begomovírus); C-: Controle negativo (PCR realizada com planta sadia); Amostras de plantas daninhas 22 – 33. 52

Figura 9 - Sintomas típicos de mosaico em folhas de alho-elefante (*Allium ampeloprasum*) coletadas em Rio do Sul no estado de Santa Catarina. A, B, C, D, E e F – Planta de alho-elefante 1,2,3,4,5 e 6, respectivamente. 60

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da RT-PCR para a detecção de espécies do gênero *Tobamovirus*, utilizando os oligonucleotídeos TobamodF e TobamodR. MM: marcador molecular 1kb (Promega); C+: controle positivo (cDNA obtido a partir de RNA total de planta sabidamente infectada por tobamovírus); C-: controle negativo (planta sadia, sem sintomas); Br: branco; 1 – 6: plantas de alho-elefante sintomáticas oriundas de Rio do Sul, SC. 66

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da RT-PCR para a detecção de espécies do gênero *Orthospovirus*, utilizando os oligonucleotídeos BR60 e BR65. MM: marcador molecular 1kb (Promega); C+: controle positivo (cDNA obtido a partir de RNA total de planta sabidamente infectada por orthospovírus); C-: controle negativo (planta sadia, sem sintomas); Br: branco; 1 – 6: plantas de alho-

- elefante sintomáticas oriundas de Rio do Sul, SC.67
- Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da RT-PCR para a detecção de espécies do gênero *Crinivirus*, utilizando os oligonucleotídeos CriniRdRp 251F e CriniRdRp 995R. MM: marcador molecular 1kb (Promega); C+: controle positivo (cDNA obtido a partir de RNA total de planta sabidamente infectada por crinivírus; C-: controle negativo (planta sadia, sem sintomas); Br: branco; 1 – 6: plantas de alho-elefante sintomáticas oriundas de Rio do Sul, SC..... 67
- Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da RT-PCR para a detecção de espécies do gênero *Potyvirus*, utilizando os oligonucleotídeos NIB2F e NIB2R. MM: marcador molecular 1kb (Promega); C+: controle positivo (cDNA obtido a partir de RNA total de planta sabidamente infectada por potivírus; C-: controle negativo (planta sadia, sem sintomas); Br: branco; 1 – 6: plantas de alho-elefante sintomáticas oriundas de Rio do Sul, SC..... 68
- Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da RT-PCR para a detecção de espécies do gênero *Polerovirus*, utilizando os oligonucleotídeos Pol-G-F e Pol-G-R. MM: marcador molecular 1kb (Promega); C+: controle positivo (cDNA obtido a partir de RNA total de planta sabidamente infectada por polerovírus; C-: controle negativo (planta sadia, sem sintomas); Br: branco; 1 – 6: plantas de alho-elefante sintomáticas oriundas de Rio do Sul, SC..... 68
- Figura 15 - Organização genômica do isolado de allium polerovirus A descrito nesse estudo. As ORFs estão demonstradas pelos retângulos e as proteínas traduzidas pelas linhas sólidas, com suas respectivas massas moleculares (kDa)..... 71
- Figura 16 - Relacionamento filogenético baseado no alinhamento das sequências de aminoácidos da capa proteica de membros da família Solemoviridae. A árvore filogenética foi construída com o método de máxima verossimilhança implementado no programa MEGA 11 (TAMURA et al., 2021) com o modelo Le Gascuel 2008(LE; GASCUEL, 2008). Os números nos ramos indicam os valores de bootstrap. Os alinhamentos foram realizados com a ferramenta MUSCLE.Fonte: Elaborada pela autora, 2022. 72
- Figura 17 - Sintomas observados no teste de gama de hospedeiros. A) Sintomas de mosaico e deformação foliar em *Vigna unguiculata*; B) Sintoma de mosqueado em *Phaseolus vulgaris*. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coletas de plantas de tomate, município de coleta, código amostral, variedade, grupo, data de coleta, local de produção das mudas e posicionamento geográfico (DMS). (Lages, SC, 2022).	45
Tabela 2 - Coletas de plantas daninhas, município de coleta, número da amostra, variedade, grupo, data de coleta, local de produção das mudas e posicionamento geográfico (DMS). (Lages, SC, 2022).	46
Tabela 3 - Informações sobre coletas de moscas-branca, incluindo o município de coleta, código amostral, hospedeiro, data de coleta, grupo, variedade, e posicionamento geográfico das amostras.	47
Tabela 4 - Porcentagem de similaridade entre sequências nucleotídicas de parte do genoma do fragmento de vírus obtido do gênero <i>Begomovirus</i> depositados no GenBank.	53
Tabela 5 - Espécies de moscas-branca <i>Bemisia tabaci Middle East-Asia Minor 1</i> (MEAM1) e <i>Mediterranean</i> (MED) coletadas em Santa Amaro da Imperatriz-SC, em 2021.	55
Tabela 6 - Iniciadores utilizados e tamanho dos fragmentos obtidos para os diferentes gêneros ou espécie viral testados em alho-elefante H = A+C+T, I=deoxyinosine, N=A+C+G+T, R= A+G, V= A+C+G, Y=C+T, K=G+T.	62
Tabela 7 - Porcentagem de identidade entre sequências de nucleotídeos dos fragmentos de vírus obtidos dos gêneros <i>Potyvirus</i> e <i>Polerovirus</i> depositados no GenBank.	Erro!
Indicador não definido.	
Tabela 8 - Descrição dos sintomas induzidos pelos vírus leek yellow stripe virus (LYSV), onion yellow dwarf virus (OYDV) e allium polerovirus A, em diferentes plantas indicadoras. AM: Amarelecimento; CLR: Clareamento de nervura; DF: Deformação foliar; MSQ: Mosqueado; EF: enrolamento foliar; -- :Ausência de sintomas; +: RT-PCR positiva; -: RT-PCR negativa.	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	A CULTURA DO TOMATE.....	24
2.2	PRODUÇÃO DE TOMATE.....	24
2.3	A FAMÍLIA GEMINIVIRIDAE	26
2.3.1	Begomoviroses	27
2.3.2	Vetores de begomoviroses em tomate.....	30
2.4	mecanismos de geração de variabilidade genética.....	32
2.5	A CULTURA DO ALHO	35
2.6	Viroses na cultura do alho.....	37
2.6.1	O gênero <i>Potyvirus</i>	37
2.6.2	O gênero <i>Polerovirus</i>	39
3	Capítulo I – LEVANTAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VIROSES E DA MOSCA BRANCA EM TOMATE E PLANTAS DANINHAS ASSOCIADAS	42
3.1	RESUMO	42
3.2	Introdução	43
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	44
3.3.1	Obtenção das amostras.....	44
3.3.2	Extração de ácidos nucleicos.....	48
3.3.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	48
3.3.4	Sequenciamento Sanger.....	49
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
3.5	CONCLUSÕES.....	57
4	CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO DE VIROSES EM <i>Allium ampeloprasum</i> L.	58

4.1	RESUMO	58
4.2	INTRODUÇÃO	58
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	60
4.3.1	Obtenção das amostras	60
4.3.2	Extração de ácidos nucleicos	61
4.3.3	Síntese do DNA complementar (cDNA)	61
4.3.4	Reação da Transcriptase Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)	62
4.3.5	Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e análises de bioinformática	63
4.3.6	Filogenia	64
4.3.7	Teste biológico – Gama de hospedeiros	65
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.5	CONCLUSÕES.....	79
5	Considerações finais.....	80
	Referências.....	81

1 INTRODUÇÃO

Devido ao crescimento populacional mundial, são frequentes as constatações de problemas referentes à demanda de produção de alimentos, portanto, a importância da agricultura para garantia da segurança alimentar da população é inegável. Os sistemas agrícolas mundiais produzem aproximadamente 11 bilhões de toneladas de alimentos (FAO, 2021), sendo que a maior parte dessa produção é advindo da agricultura familiar. No Brasil 77% dos estabelecimentos rurais são classificados como agricultura familiar, correspondendo a 23% da área dos estabelecimentos rurais no país, gerando R\$107 bilhões, o que equivale a 23% da produção agropecuária brasileira (IBGE, 2017).

Com intuito de acompanhar o crescimento populacional constante, busca-se a melhoria no sistema agrícola, com base no melhoramento genético e suas aplicações, bem como, melhoria das práticas agrícolas, visando assim um modelo de produção agrícola seguro e eficaz. O aumento gradual dos efeitos negativos ocasionados pelas mudanças extremas dos eventos climáticos, que incidem no aumento da temperatura e na diminuição dos níveis de pluviosidade, compromete a produtividade agrícola, afetando a economia do setor (MACHILI, 2020).

A produção agrícola é alvo de um alto índice de incertezas, pois possui forte influência por diversos fatores de ordem biótico e abiótico. Em qualquer ecossistema agrícola existem fatores que contribuem para o estabelecimento e desenvolvimento de doenças, desde o inóculo, condições ambientais favoráveis, ao uso demasiado de agrotóxicos que podem resultar no desequilíbrio ecológico (CONAB, 2019). Vários patógenos estão relacionados a doenças, entre eles: fungos, bactérias, nematoides e vírus (LOPES; ÁVILA, 2005). Destacam-se os vírus, os quais são nucleoproteínas com tamanhos extremamente reduzidos, podendo ser vistos somente com o auxílio de microscópio eletrônico, e caracterizam-se por apresentarem um único tipo de ácido nucléico (RNA ou DNA) revestido por uma proteína capsial, e se replicam somente em células vivas da planta hospedeira (AGRIOS, 2005).

Os vírus podem induzir alterações nas células, como por exemplo nos cloroplastos e núcleo, ou formar inclusões nas células vegetais (NAGY *et al.*, 2016), e os sintomas mais comuns observados são alterações de cor, deformações morfológicas e necrose. Sua transmissão pode ocorrer via semente, pólen, material propagativo, vetores (fungos, ácaros, nematóides e insetos) e de forma mecânica (OLIVEIRA *et al.*, 2019; FAJARDO; NICKEL, 2019; LEANDRO, 2020).

A maioria dos vírus que infectam plantas apresenta genoma composto por RNA, entretanto, com a evolução das tecnologias de sequenciamento, como *Next Generation*

Sequencing (NGS), houve o aumento da caracterização de patógenos nos últimos anos (BARZON *et al.*, 2011), o que aumentou a proporção de espécies com genoma de DNA, com destaque principalmente para os vírus da família *Geminiviridae* (HULL, 2002; ROJAS *et al.*, 2005; SEAL; VAN DEN BOSCH; JEGER, 2006; ROOSSINCK; MARTIN; ROUMAGNAC, 2015; LAVANYA; ARUN, 2021; LIMA *et al.*, 2021).

Dentre as diversas espécies cultivadas, as pertencentes ao gênero *Solanum* possuem grande importância, por conter espécies amplamente utilizadas na alimentação, dentre as quais, *Solanum lycopersicum* L. (tomate) se destaca como sendo uma das hortaliças mais produzidas no Brasil (IBGE, 2021).

No estado de Santa Catarina, a cultura do tomate tem importância significativa, tanto sob o ponto de vista econômico quanto social, pelo volume da produção, geração de empregos e geração de renda no campo. A produção é destinada principalmente ao consumo *in natura*. Nas regiões do Litoral e Meio-Oeste, o clima permite conduzir as várias etapas de cultivo durante o ano todo e em sequência nas diferentes microrregiões/mesorregiões (BECKER *et al.*, 2016). Segundo dados do IBGE (2021), em 2020 a área de cultivo do tomateiro no estado, foi de aproximadamente 2.479 hectares com uma produção de 166.587 toneladas, posicionando o estado em sexto lugar na produção nacional.

Dentre as viroses que acometem a cultura do tomateiro, destacam-se os begomovírus. O gênero *Begomovirus* é um dos quatorze gêneros aceitos na família *Geminiviridae*, é composto por 445 espécies descritas, apresentando um ou dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) com aproximadamente 2600nt. Esses vírus apresentam partículas icosaédricas geminadas quando vistas em microscópio eletrônico, e infectam plantas dicotiledôneas, conforme o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses* – ICTV, 2022).

Novas espécies de begomovírus comumente emergem por processos de mutação, recombinação ou pseudo-recombinação (SILVA *et al.*, 2014). Begomovirus são transmitidos pela mosca branca *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae), um inseto polífono que se alimenta do floema de mais de 600 hospedeiros (POLSTON; DE BARRO; BOYKIN, 2014; KANAKALA; GHANIM, 2019). A importância desse inseto é devido principalmente à capacidade de transmissão de cerca de 300 espécies de vírus de plantas, incluindo espécies de begomovírus associadas ao tomateiro (GILBERTSON *et al.*, 2015). *B. tabaci* é considerada um complexo de espécies crípticas, sendo composta por grupos distintos geneticamente e ecologicamente. Esses diferentes grupos apresentam capacidades distintas de transmissão de vírus de plantas, de danos à cultura e resposta a inseticidas (BROWN; FROHLICH; ROSELL,

1995).

Dentro das 44 espécies do complexo *B. tabaci*, as espécies MEAM1 (*Middle East-Asia Minor 1*, conhecida como biótipo B) e MED (*Mediterranean*, anteriormente denominada biótipo Q) são consideradas as mais agressivas dentro do complexo (KANAKALA; GHANIM, 2019). No Brasil, a partir da introdução da espécie MEAM1 na década de 1990 foram relatadas 27 espécies de begomovirus infectando o tomateiro, sendo que muitas delas também são relatadas em plantas daninhas (MARTINS, 2021).

A cadeia produtiva do tomate no sul do Brasil enfrenta problemas relacionados à infecções virais, por não se ter uma medida de controle curativa que elimine ou controle parcialmente o patógeno na planta (ANDRADE, 2020). Portanto, se faz necessário um levantamento amplo em áreas de produção de tomate no estado de Santa Catarina, propiciando a identificação precisa de espécies de begomovirus. Com a caracterização das espécies virais prevalentes, e das espécies de plantas daninhas que atuam como reservatório dos vírus pode-se determinar medidas de manejo eficientes na redução da incidência dessas viroses, favorecendo o aumento da produção de tomates no estado de Santa Catarina.

Além da cultura do tomate, a cultura do alho também merece destaque no estado de Santa Catarina. O gênero *Allium* possui mais de 800 espécies que diferem em maturação, cor e sabor (CECCANTI *et al.*, 2020). *Allium ampeloprasum* L. (alho-elefante) é uma planta perene bulbosa pertencente à família Amaryllidaceae (ACHARYA; CHOUBEY; ACHARYA, 2013), possui como região de origem o Mediterrâneo (sul da Europa, norte da África até o oeste da Ásia) (DEY; KHALED, 2015). Essa espécie é cultivada em muitos países e está intimamente associada ao alho (*Allium sativum* L.) e à cebola (*A. Cepa* L.) (RAHIMI-MADISEH *et al.*, 2017; ABBAS, 2019). O alho (*A. Sativum*) possui importância notória, em função de sua ampla utilização na culinária regional e nacional, onde seu sabor e propriedades condimentares são comumente apreciados (BLOCK, 2011). As maiores contribuições para a variação econômica positiva dos principais produtos da atividade agrícola em 2019 no estado de Santa Catarina vieram do alho, do tomate e da batata-inglesa (TORESAN *et al.*, 2021).

O alho-elefante é morfologicamente relacionado com o alho-poró (*A. ampeloprasum* var. *porrum* L.), mas fisiologicamente, pelo processo de bulbificação, é semelhante ao alho (BOHANEK *et al.* , 2005). Geralmente, não é propagado por sementes, no entanto, há evidências de formas com sementes férteis que pode ser utilizado para sua propagação (MAKUCH; CONCI, 1999; VALDEZ, 2003; HIRSCHEGGER; GALMARINI; BOHANEK, 2006). Alho-elefante é rico em compostos organossulfurados, isso lhe confere um cheiro suave e um sabor doce de cebola, quando comparado ao cheiro pungente de alho (CECCANTI *et al.*,

2020). Alho-elefante é caracterizado por hastes ou bulbos brancos e folhas verdes que são repositórios de metabólitos secundários como flavonóides, polifenóis, ácidos fenólicos e saponinas, sendo amplamente utilizado como fitoterápico (LU *et al.*, 2011; DEY *et al.*, 2015).

As principais doenças que acometem *A. ampeloprasum* são de origem fúngica, entretanto, há relatos de ocorrência de espécies virais do gênero *Potyvirus* infectando lavouras comerciais em Israel, tendo como sintomatologia clorose, estrias amareladas, enrolamento e manchas pretas nas folhas das plantas, acompanhando redução de rendimento na colheita (GERA *et al.*, 1997).

Existem poucas informações sobre espécies virais ocorrentes em alho-elefante, no entanto, a cultura do alho (*A. sativum*), cuja importância econômica no Brasil é mais abrangente, pode ser infectada por vírus de diversos gêneros, todavia, as doenças mais comuns são causadas pelos vírus da família *Potyviridae* - onion yellow dwarf virus (OYDV), leek yellow stripe virus (LYSV) e turnip mosaic virus (TuMV) (SALOMON, 2002). A infecção do alho por OYDV e LYSV pode causar redução no rendimento de bulbos na ordem de até 69% e 54%, respectivamente (CANAVELLI; NOME; CONCI, 1998). Infecções mistas podem causar reduções de 30 a 50% no peso e tamanho da planta (WALKEY, 1990). Os sintomas mais comumente observados em folhas de alho são estrias com coloração verde claro e/ou amarelas, sendo incomum a senescência das plantas, pois os vírus convivem com a planta até o final de seu ciclo, perpetuando-se através de distintos ciclos de cultivo, ajudado pela natureza agâmica da espécie (PAVAN, 1998).

Independente de qual espécie viral esteja presente em uma área de cultivo, a propagação vegetativa do alho é a principal via de perpetuação e disseminação dos vírus. Contudo, os vírus ainda podem ser transmitidos por afídeos, como ocorre com os vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus*. Assim como nas demais culturas de interesse agrícola que são acometidas por doenças de etiologia viral, a principal forma de controle é a preventiva, como adequação do manejo da cultura e obtenção de plantas livre de vírus para posterior propagação (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Para adquirir uma perspectiva do cenário de begomoviroses no estado de Santa Catarina, este trabalho foi realizado a partir de DNAs extraídos de amostras coletadas nos anos de 2019, 2020 e 2021. O estudo foi realizado a partir de 21 amostras de tomate, 12 amostras de plantas daninhas e 100 amostras de moscas-branca, coletadas nas principais localidades produtoras da cultura, onde identificou-se a presença de um possível pseudorecombinante na cultura do tomate, infecção de *Solanum americanum* por begomoviroses e de uma espécie críptica de mosca-branca ainda não relatada em áreas de produção em campo aberto no estado de Santa

Catarina. Para o estudo do alho-elefante, 6 plantas sintomáticas provenientes de área experimental do Instituto Federal Catarinense (IFC) Campus Rio do Sul foram analisadas quanto à presença de vírus com genoma composto por RNA, sendo detectado a incidência de duas espécies do gênero *Potyvirus* e uma espécie tentativa ainda não relatada no Brasil e ainda não caracterizada, relacionada com o gênero *Polerovirus*.

Estudos envolvendo a distribuição e os efeitos destes vírus nas plantas infectadas são de extrema importância para o manejo preventivo. Portanto, a realização de um levantamento e caracterização dos vírus que afetam essas culturas no estado de Santa Catarina, é de suma importância para o maior conhecimento sobre a biologia desses grupos, visando à importância destas culturas, consideradas de subsistência em várias regiões, bem como a introdução de medidas de manejo. Os objetivos do presente estudo foram: (i) identificar e caracterizar molecularmente as espécies de begomovirus infectando o tomate e plantas daninhas nas regiões produtoras do estado de Santa Catarina; (ii) Caracterizar as espécies de mosca-branca prevalentes nas regiões produtoras de tomate; e (iii) diagnosticar e identificar os vírus associados ao alho-elefante (*A. ampeloprasum*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO TOMATE

Solanum spp. é o gênero mais variado, em termos de taxonomia, da família Solanaceae, pertencendo à subfamília Solanoideae, tribo Solaneae e subtribo Solaninae (SAMPAIO, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2020). O presente gênero apresenta cerca de 2.000 espécies distribuídas em regiões subtropicais e tropicais da Ásia, Austrália e África, Índia, América Central e do Sul, sendo a América do Sul o centro primário de diversidade e endemismo (NEE, 1999). No Brasil, a diversidade genética do grupo está representada com cerca de 283 espécies aceitas, das quais aproximadamente 138 são endêmicas, sendo a Mata Atlântica um dos biomas de grande diversidade do gênero (BFG, 2018).

Solanum lycopersicum L., é uma espécie natural da região dos Andes (abrangendo partes do Equador, Peru e Chile) e Ilhas Galápagos, sendo posteriormente domesticada no México nas cidades de Puebla e Vera Cruz, facilmente adaptado à rotina alimentar dos povos que ali viviam (CHETELAT *et al.*, 2009). Acredita-se que a planta foi levada para a Europa no século XVI, durante a colonização espanhola na América do Sul, onde era utilizado como parte da ornamentação de ambientes devido à aparência agradável de seus frutos. Seu consumo foi realmente adotado doravante ao plantio na Itália, onde os frutos de tomateiro eram de cor amarela (Pomi d'oro), conhecidos popularmente como maçãs douradas (PERALTA *et al.*, 2006).

No Brasil, a introdução do tomateiro ocorreu no final do século XIX na região Sudeste, por consequência da imigração do povo europeu, desde então sua produção vem sendo adotada em diversas regiões brasileiras, apresentando importância significativa para economia nacional, visto que a hortaliça está compreendida entre as mais consumidas no Brasil e no mundo (FILHO; MARIN; FERNANDES, 2009; ANDRADE, 2020).

2.2 PRODUÇÃO DE TOMATE

O cultivo de tomateiro é intenso em diversas partes do mundo, o que pode ser explicado pelo seu consumo elevado, considerando sua importância para o processamento industrial, o qual movimenta as indústrias paralelas de insumos, embalagens, máquinas agrícolas e equipamentos de irrigação, conforme a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, 2019).

A cultura do tomateiro é anual e de porte médio, podendo atingir altura de mais de dois metros. Filgueira (2013) ressalta que para uma produção elevada e de alta qualidade, a temperatura ideal está situada entre 21 e 28°C, um clima relativamente fresco e árido. Entretanto, adapta-se a uma ampla variação de condições climáticas, variando entre temperada a quente e úmida tropical. O tomate se destaca entre as hortaliças, sendo parte do grupo de maior importância, tanto sob o ponto de vista econômico quanto social, pela geração de empregos, volume da produção, e geração de renda no campo (SOUZA *et al.*, 2019).

As plantas da cultura do tomate são herbáceas, apresentam porte variado e produção de frutos considerada alta, os quais são principalmente destinados ao consumo *in natura* ou processamento. Os hábitos de desenvolvimento determinado e indeterminado são observados nos tomateiros, influenciando diretamente o seu processo de cultivo (CLEMENTE; BOITEAUX, 2012). Os que apresentam crescimento determinado são em suma conduzidos em grandes áreas com irrigação por pivôs centrais e colheitas semimecanizadas, os frutos oriundos das plantações dessas áreas são destinados primariamente para indústrias de processamento. As cultivares que apresentam crescimento indeterminado são cultivadas em áreas menores, como estufas ou campo aberto, colhidas manualmente e direcionadas preferencialmente para o consumo fresco (RODRIGUES, 2021).

A cadeia agroindustrial de tomate tem destaque importante no agronegócio nacional por ser extremamente competitiva, dinâmica e eficiente. No Brasil, a cultura se adaptou bem, principalmente na região centro sul, devido ao clima temperado da região e boa aceitação dos consumidores em função dos preços razoáveis no qual é submetido. De acordo com dados provenientes do Levantamento Sistemático de Produção Agrícola coordenado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2020, a área plantada e colhida em hectares foi de 55.671 e 55.545, respectivamente, com uma produção de 3.956.559 toneladas (IBGE, 2021). A área de cultivo do tomateiro no estado de Santa Catarina foi de aproximadamente 2.479 hectares com uma produção de 166.587 toneladas, posicionando o estado em sexto lugar na produção nacional, representada principalmente na região da Grande Florianópolis (Antônio Carlos e Santo Amaro da Imperatriz) e a região do Vale do Rio do Peixe, sendo o município de Caçador o principal produtor do tomate catarinense (CONAB, 2019). Embora cultivado em todos os estados em maior ou menor escala, os principais produtores são Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Bahia e Santa Catarina (IBGE, 2021). Contudo, a produção agrícola é alvo de um alto índice de incertezas, pois é influenciada por diversos fatores de ordens biótica e abiótica.

No Brasil, a doença de natureza virótica frequentemente observada em tomateiros é o

mosaico dourado associado à espécies de vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*, porém vírus de outros gêneros são também observados (FIALLO-OLIVÉ *et al.*, 2020). Perdas por begomovirose em tomateiros em território nacional podem chegar a 100% a depender da época de infecção da planta, bem como, da cultivar plantada no campo (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016).

2.3 A FAMÍLIA GEMINIVIRIDAE

Os vírus compreendidos na família *Geminiviridae*, apresentam morfologia de partículas icosaédricas geminadas e genoma composto por DNA de fita simples circular, com 2.500 a 5.200 nucleotídeos (nt). *Geminiviridae* é a maior família conhecida de vírus de plantas, formada por quatorze gêneros, *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Citlodavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Maldovirus*, *Mastrevirus*, *Mulcrilevirus*, *Opunvirus*, *Topilevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*, contendo coletivamente 520 espécies (ICTV, 2022). Os geminivírus infectam uma ampla gama de espécies de plantas, com destaque para as culturas do tomate, soja, feijão, batata, milho e mandioca (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016; TORRE *et al.*, 2018; JACOBSON *et al.*, 2018), e são transmitidos por vários insetos em quatro famílias de homópteros (FIALLO-OLIVÉ *et al.*, 2021). Os geminivírus podem apresentar-se como monopartidos, ou seja, quando o genoma possui uma molécula de DNA, ou também podem apresentar-se como bipartidos, apresentando dessa forma duas moléculas de DNA em seu genoma. Uma proteína capsidial (CP) unitária é responsável pela encapsidação viral, onde ocorre a organização do capsídeo na forma de 22 capsômeros, o que resulta em dois icosaédros imperfeitos geminados, com cerca de 18 a 30 nanômetros (nm) de comprimento (ZERBINI *et al.*, 2017).

No gênero *Begomovirus* a identidade de nucleotídeos (ao menos 91% de identidade) do genoma completo (para vírus monopartidos) ou do DNA-A (para vírus bipartidos) é considerada determinante no processo de diferenciação de espécies (BROWN *et al.*, 2015).

Plantas infectadas com geminivírus apresentam sintomas correspondentes a mosaico, enrolamento e deformidade foliar, nanismo e diminuição na quantidade e qualidade de frutos produzidos. Fatores como estágio de desenvolvimento em que a planta se encontra no momento da infecção, adversidades ambientais ou ocorrência de infecções mistas, podem influenciar na severidade dos sintomas manifestados na planta hospedeira (INOUE-NAGATA; ÁVILLA; BÔAS, 2009). Os sintomas podem ainda ocasionar alterações na homeostasia celular, bem como, comprometimento dos microRNAs (miRNAs), intimamente relacionados com a sinalização de

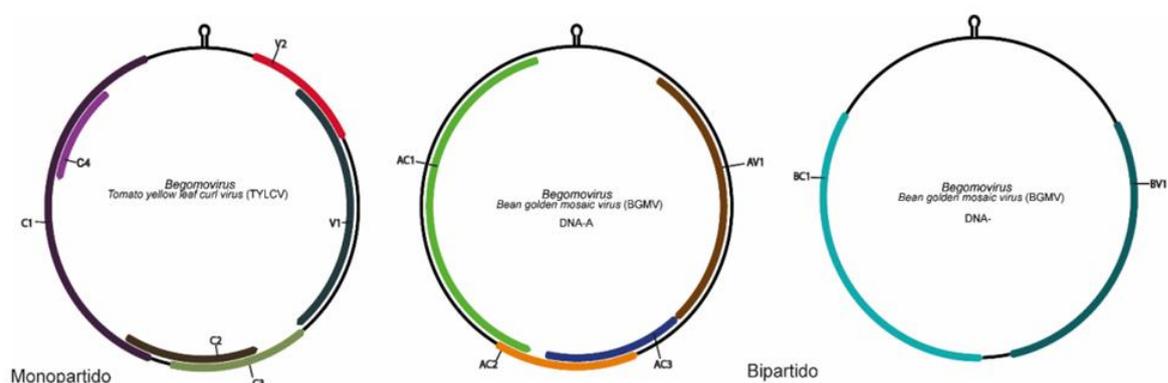
hormônios e mudanças no desenvolvimento da hospedeira (HANLEY–BOWDOIN *et al.*, 2013).

2.3.1 Begomoviroses

Dentro da família *Geminiviridae*, o gênero *Begomovirus* é o que apresenta maior número de espécies, com 445 espécies aceitas (FIALLO-OLIVÉ *et al.*, 2021). As espécies classificadas nesse gênero apresentam um ou dois componentes genômicos (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

A maioria dos begomovírus encontrados nas Américas possuem dois componentes genômicos, denominados DNA-A e DNA-B, entretanto, espécies de begomovírus com genoma monopartido têm sido relatadas no Equador, Peru, Argentina, Venezuela, Cuba, e Brasil (MELGAREJO *et al.*, 2013; VAGHI MEDINA; BORNANCINI; LÓPEZ LAMBERTINI, 2020; ROMAY *et al.*, 2019; FIALLO-OLIVÉ; NAVAS-CASTILLO, 2020; CHAVES *et al.*, 2017; MACEDO *et al.*, 2018). É sabido, que em uma espécie os componentes genômicos não apresentam identidade de sequência, excetuando-se uma região altamente conservada, acima de 90% de identidade, com cerca de 200nt, denominada região comum (RC), trecho no qual se encontra a origem de replicação dos geminivírus (BROWN *et al.*, 2015).

Figura 1- Organização genômica das espécies Tomato yellow leaf curl virus (monopartido) e Bean golden mosaic virus (bipartido). CR: “common region” do componente A (CRA) e B (CRB); ORF's do componente A: AV1 (capsídeo), AC1 (replicação), AC2 (Transcrição), AC3 (amplificação da replicação viral) e AC4(supressão do silenciamento gênico); componente B: BV1 (movimento intracelular) e BC1 (movimento extracelular). Para os vírus monopartidos, pode-se indicar as ORFs C1 (replicação viral), C2 (ativação da transcrição), C3 (potencialização da replicação) e C4 (sintomas), V1 (capsídeo) e V2 (movimento).



Fonte: ANDRADE (2020, p. 32).

Em espécies com genoma monopartido e no componente DNA-A das espécies bipartidas, encontram-se os genes envolvidos na replicação e encapsidação da progênie viral e o DNA-B das espécies bipartidas contém os genes requeridos para o movimento intra- e intercelular na planta (LAZAROWITZ, 1992). Ambos os componentes genômicos são requeridos para a infecção sistêmica do hospedeiro. O DNA-A contém a informação genética requerida para codificação de seis proteínas. Uma proteína relacionada à replicação (REP – “Replication associated protein”) a qual reconhece a origem de replicação liga-se e dá início à síntese de DNA pelo método de círculo rolante (OROZCO *et al.*, 1997); uma proteína transativadora da transcrição dos genes CP e NSP (TrAP – “Trans activating protein”), também atua na supressão do silenciamento gênico; uma proteína relacionada com a replicação (REN – “Replication enhancer protein”), elevando quantitativamente o DNA viral, sendo um fator acessório (não essencial) de amplificação da replicação viral; uma proteína capsidial (CP), que relaciona-se à encapsidação do genoma viral, fator essencial para transmissão pelo inseto vetor. Alguns begomovirus são capazes de codificar a proteína AC4, que também está envolvida na supressão do silenciamento gênico (KING *et al.* 2012; VANITHARANI *et al.*, 2004). Adicionalmente, a ORF AC5/C5 foi encontrada em algumas espécies monopartidas e bipartida. Esta é identificada adjacente a ORF AC3/C3 e sobreposta a um segmento da ORF AV1/V1. Acredita-se que a AC5 atue na supressão do silenciamento de RNA e reforce a patogenicidade viral (LI *et al.*, 2018; RISHISHWAR; DASGUPTA, 2019; GHOSH; MALAVIKA; CHAKRABORTY, 2021). No Brasil, dentre as espécies relatadas, nota-se a presença da AC5 na espécie *Tomato rugose mosaic virus* (FERNANDES *et al.*, 2008), *Tomato chlorotic mottle virus* e *Tomato yellow spot virus* (MACHADO, 2001), *Cnidoscolus mosaic leaf surgery virus* (MENDES *et al.*, 2021).

O DNA-B, por outro lado, possibilita a codificação de duas proteínas. A primeira, responsável pelo movimento célula–a–célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (MP – “Movement protein”), enquanto a segunda, realiza o transporte do DNA do vírus entre o núcleo e o citoplasma celular da planta hospedeira, através dos poros nucleares (NSP – “Nuclear shuttle protein”) (KING *et al.*, 2012; HANLEY-BOWDOIN *et al.*, 2013).

Já em genomas de espécies monopartidas, a proteína relacionada com o capsídeo é codificada pela *open reading frame* (ORF) V1, enquanto a proteína relacionada ao movimento viral na planta hospedeira é codificada pela V2. No sentido complementar as proteínas são codificadas pelas ORFs C1, C2, C3 e C4, as quais relacionam-se à replicação viral (REP), ativação da transcrição (TrAP), replicação viral (REN - “replication-enhancer protein”) e

manifestação dos sintomas associada ao movimento do vírus e também atua na supressão do silenciamento gênico após transcrição, respectivamente (KING *et al.*, 2012).

Os alfassatélites podem estar associados à begomovírus mono- ou bissegmentados no Novo e no Velho Mundo (PAPROTKA; METZLER; JESKE, 2010; ROMAY *et al.*, 2010). Os alfassatélites não apresentam identidade de sequência com o vírus auxiliar, mas necessitam do vírus auxiliar para o movimento e transmissão por *Bemisia tabaci*, porém replicam-se autonomamente (SAUNDERS *et al.*, 2000; IDRIS *et al.*, 2005). Apresentam uma ORF que codifica a REP, seguida de uma região rica em adenina e uma estrutura em *hairpin* a qual engloba a origem de replicação. Estes satélites conseguem se replicar de forma autônoma, entretanto, requerem um vírus auxiliar para infecção sistêmica da planta hospedeira e posterior transmissão por inseto (SAUNDERS *et al.*, 2000).

Os betassatélites (DNA- β) e deltassatélites contêm sequências não homólogas a vírus, exceto por uma sequência 5'-TAATATTAC-3' localizada na alça dentro da região intergênica (FERRO *et al.*, 2021). Necessitam do vírus auxiliar para replicação, encapsidação e movimento na planta hospedeira, e não apresentam identidade de sequência com o vírus auxiliar (BRIDDON *et al.*, 2006). O genoma apresenta uma ORF, denominada β C1, a qual é responsável pela codificação de uma proteína relacionada à indução de sintomas, bem como, a supressão do silenciamento gênico após transcrição (CUI *et al.*, 2005; BRIDDON *et al.*, 2006). Esse DNA satélite atua no aumento da severidade dos sintomas na hospedeira, visto que quadros infecciosos onde apenas o vírus auxiliar está envolvido, são incapazes de reproduzir os sintomas da doença, uma vez que o DNA β codifica a proteína β C1, relacionada à supressão do silenciamento gênico, a qual inviabiliza os mecanismos de defesa da planta (CUI *et al.*, 2005; ZHOU, 2013). Os deltassatélites não codificam nenhuma proteína, mas alguns deles afetam o acúmulo de DNA viral e a sintomatologia (FERRO *et al.*, 2021).

No Brasil, as espécies que infectam o tomateiro pertencem a um grupo distante de outros begomovírus descritos nos demais países. Acredita-se que esses vírus conseguiram evoluir de forma independente e isolada no Brasil. Diversos estudos já demonstraram a alta variabilidade genética dos begomovírus que contribuiu para o crescimento acentuado do gênero, outro fator de destaque é de que *B. tabaci*, biótipo MEAM1, serviu como vetor para a transmissão e posterior adaptação de begomovírus ocorrentes em plantas silvestres ou daninhas para o tomateiro.

Atualmente, no Brasil são relatadas ou descritas 27 espécies nos campos de tomateiro, sendo elas: chilo del tomate Amazonas virus (CdTAV); tomato golden mosaic virus (TGMV), tomato yellow vein streak virus (ToYVSV), tomato rugose mosaic virus (ToRMV), tomato

severe rugose virus (ToSRV), tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV), tomato common mosaic virus (ToCmMV), tomato leaf distortion virus (ToLDV), tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV), tomato mild mosaic virus (ToMIMV) e tomato yellow spot virus (ToYSV), tomato bright yellow mosaic virus (ToBYMV), tomato bright yellow mottle virus (ToBYMoV), tomato golden leaf distortion virus (ToGLDV), tomato golden leaf spot virus (ToGLSV), tomato golden vein virus (ToGVV), tomato interveinal chlorosis virus (ToICV), tomato rugose yellow leaf curl virus (TRYLCV), tomato leaf curl purple vein virus (ToLCPVV), tomato interveinal chlorosis virus-2 (ToICV2), sida micrantha mosaic virus (SiMMV), sida mottle virus (SiMoV), sida yellow net virus (SiYNV), euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), tomato leaf deformation virus (ToLDeV), tomato chlorotic leaf curl virus (ToCLCV), sida common mosaic virus (SiCMV) (HAMILTON *et al.*, 1984; ALBUQUERQUE *et al.*, 2010; MACEDO *et al.*, 2018; QUADROS *et al.*, 2019; DUARTE *et al.*, 2021b; NCBI, 2021).

2.3.2 Vetores de begomoviroses em tomate

A disseminação natural de vírus de plantas ocorre por meio da participação ativa de vetores, na grande maioria insetos homópteros, conforme relata Costa (1998). Dessa forma, em condições naturais, há transmissão de vírus entre plantas daninhas e plantas cultivadas, uma vez que a atividade dos insetos vetores em campo, principalmente sob altas populações, é mais intensa, possibilitando a presença em novos plantios (SILVA *et al.*, 2012; POLSTON *et al.*, 2014; KANAKALA *et al.*, 2019).

Begomovirus são transmitidos pela mosca branca *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae), um inseto polífono que se alimenta do floema de mais de 600 hospedeiros (POLSTON; DE BARRO; BOYKIN, 2014; KANAKALA; GHANIM, 2019). Esse inseto está associado a transmissão de ao menos 300 espécies de vírus de plantas, incluindo espécies de begomovírus associadas ao tomateiro (GILBERTSON *et al.*, 2015). *B. tabaci* é considerada um complexo de pelo menos 44 espécies crípticas, sendo composta por grupos distintos genética e ecologicamente. Esses diferentes grupos apresentam capacidades distintas de transmissão de vírus de plantas, de danos causados a cultura, de atração de inimigos naturais e resposta a inseticidas (BROWN; FROHLICH; ROSELL, 1995). Dentro desse complexo, destacam-se as espécies *Middle East Asia-Minor 1* (MEAM1 ou biótipo B) e *Mediterranean* (MED ou biótipo Q), as quais estão disseminadas mundialmente e são consideradas mais danosas aos cultivos agrícolas (KANAKALA; GHANIM, 2019).

Consoante com Ribeiro *et al.* (1994), a emergência de begomoviroses no Brasil esteve

relacionada com a introdução da espécie críptica Middle East-Asia Minor 1, após entrada no Estado de São Paulo na década de 1990 (LOURENÇÃO; NAGAI, 1994). Devido à sua exímia capacidade de polifagia, esse inseto possibilitou que os begomovírus saíssem das plantas daninhas, consideradas como seus hospedeiros naturais, para plantas economicamente importantes, como o tomateiro e o feijoeiro (CASTILLO-URQUIZA *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2008). Considera-se que antes da entrada e disseminação de MEAM1, eram predominantes as espécies *B. tabaci* New World 1 (NW1) e *B. tabaci* New World 2 (NW2), correspondentes ao biótipo A, as quais tinham pouca eficiência na colonização de tomateiro (BEDFORD *et al.*, 1994). Após a disseminação de MEAM1, as moscas-brancas do grupo NW foram quase extintas, permanecendo, nos dias atuais, restrita a plantas daninhas, em baixas infestações (BARBOSA *et al.*, 2014; GILBERTSON *et al.*, 2015; INOUE-NAGATA *et al.*, 2016).

Mais recentemente, a espécie críptica Mediterranean foi relatada em cultivos no Rio Grande do Sul, em plantas ornamentais do Estado de São Paulo e em Santa Catarina, sendo essa última condição determinante para a sua disseminação, pelo Brasil, seguindo a distribuição de plantas ornamentais (BARBOSA *et al.*, 2016; DE MORAES *et al.*, 2017; DE MORAES *et al.*, 2018; BORGES *et al.*, 2019; BELLO *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2021). Essa espécie apresenta alta resistência a herbicidas, bem como, se adapta bem em estufas e casas de vegetação, e alta eficiência de transmissão de vírus, sendo fonte de geração de preocupações à comunidade científica e aos produtores (HOROWITZ; ISHAAYA, 2014).

Com a introdução e disseminação de MED, assim como foi ocorrido com MEAM1, podem ocorrer mudanças na composição de espécies de begomovírus nas áreas produtoras de tomate. Devido à elevada capacidade de colonização de plantas hospedeiras distintas, ocorre a facilitação da transferência de espécies de uma planta a outra, favorecendo dessa forma a ocorrência de mecanismos de mutação, recombinação e rearranjo (MARTINS, 2021). Portanto, a possibilidade do surgimento de novas variantes capazes de superar os genes de resistência já utilizados na atualidade pode causar prejuízos de importância significativa para o setor produtivo.

O ciclo de vida desses insetos, consiste em seis estádios que incluem ovo, ninfa de primeiro, segundo, terceiro e quarto instares e adulto (WALKER; PERRING; FREEMAN, 2010). Na fase adulta, apresentam comprimento entre 1-2 mm, coloração amarelo clara, com dois pares de asas cobertas por uma cera pulverulenta branca (VILLAS-BÔAS; CASTELO-BRANCO, 2009).

O relacionamento observado entre vírus-vetor é descrito como circulativo não

propagativo (DE BARRO *et al.*, 2011; WHITFIELD; FALK; ROTENBERG, 2015). A mosca-branca ingere partículas virais com o estilete inserido nos tecidos floemáticos da planta infectada, sendo transportadas pelo esôfago até alcançar o intestino. Na câmara de filtro do intestino médio, as partículas são deslocadas para a hemolinfa, alcançando dessa forma as glândulas salivares primárias (GSPs), sendo acumuladas e posteriormente o vírus é transmitido com a saliva ao longo do canal salivar para os vasos floemáticos da planta sadia (MORIN *et al.*, 1999). Os begomovírus são adquiridos em períodos curtos de alimentação, cerca de 10 minutos, entretanto, podem ocorrer variações no período de tempo de latência do vírus no vetor, podendo variar de 4 a 21 horas (COSTA, 1998). Fatores como espécie do inseto, idade, gênero e carga viral na planta, influenciam a cinética do acúmulo viral e capacidade de transmissão dos begomovírus (CZOSNEK *et al.*, 2017).

De acordo com Pakkianathan *et al.* (2015) o begomovírus tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) se replica em insetos submetidos a condições de estresse. Pesquisas posteriores demonstraram que não ocorre replicação do vírus no vetor após sua aquisição (SÁNCHEZ-CAMPOS *et al.*, 2016). A maioria dos begomovírus permanece associada ao intestino e à câmara de filtro na mosca-branca, sendo que, TYLCV pode ser transcrito e replicado nesses tecidos, entretanto há ativação da resposta imune do inseto, o que provoca inibição de replicação e posterior eliminação do vírus (CZOSNEK *et al.*, 2017). Contudo, há evidências de que TYLCV se replica nas células das glândulas salivares primárias da mosca-branca, através da indução e recrutamento do antígeno nuclear celular proliferante da mosca-brancas MEAM1 para apoiar sua replicação (HE *et al.*, 2020; GHOSH; GHANIM, 2021).

2.4 MECANISMOS DE GERAÇÃO DE VARIABILIDADE GENÉTICA

Populações virais são geneticamente diferentes, suas estruturas são passíveis de mudança com o tempo, originando a evolução. Os conhecimentos quanto às mudanças decorrentes das evoluções de partículas virais, são importantes para que se tenha otimização de desenvolvimento de estratégias de manejo adequadas a tais organismos (GARCÍA-ARENAL *et al.*, 2003). O processo de replicação dos genomas virais é propenso a erros, ocasionando variação genética (POIRIER; VIGNUZZI, 2017).

Segundo Lazarowtiz (1992), os iterons são elementos essenciais à especificidade da replicação dos begomovírus, geralmente diferem em suas sequências nucleotídicas em diferentes espécies de begomovírus. Nos begomovírus que possuem dois componentes genômicos, a região comum entre os componentes, contém sequências específicas para que a

proteína REP se ligue, englobando os sítios de ligação de alta afinidade, iterons. Os iterons asseguram a integridade do genoma dividido em dois componentes, proporcionando que a replicação desses seja realizada pela proteína REP codificada pelo componente DNA-A (FONTES *et al.*, 1994). Mesmo com mecanismo de manutenção da integridade do genoma bissegmentado, pode ocorrer a troca de componentes entre diferentes estirpes ou espécies, fenômeno denominado pseudo-recombinação ou rearranjo (ROJAS *et al.*, 2005). A pseudo-recombinação irá ocorrer em infecções mistas, ou seja, envolvendo dois ou mais vírus distintos (ou duas ou mais estirpes do mesmo vírus). É frequente a observação de infecções mistas em condições naturais, em virtude de que todos os begomovírus são transmitidos pelo mesmo inseto vetor e vários deles possuem a mesma espécie de inseto como vetor (SEAL; VANDEN BOSCH; JEGGER, 2006). Em *Nicotiana benthamiana*, um pseudorecombinante formado entre o DNA-A de tomato mottle virus (ToMoV) e o DNA-B de bean dwarf mosaic virus (BDMV) induziu sintomas mais severos quando em comparação com os vírus parentais, além de apresentar um menor acúmulo no DNA-B. Com a realização de cinco inoculações via extrato vegetal tamponado, foi observado um evento de recombinação intermolecular, onde houve transferência da região comum do DNA-A do ToMoV para o DNA-B do BDMV, o vírus originado era capaz de induzir sintomas comparáveis aos parentais e reestabeleceu o acúmulo de DNA-B (HOU; GILBERTSON, 1996).

A pseudo-recombinação entre begomovírus distintos requer alta identidade de sequência na região comum dos dois componentes. A replicação do DNA-B pode ser comprometida pela baixa compatibilidade entre componentes heterólogos, o que resulta em sintomas distintos quando comparados à aqueles induzidos pela combinação dos componentes cognatos (HOU; GILBERTSON, 1996). Quanto maior a discrepância na região comum entre os componentes genômicos, mais oneroso é a formação de um pseudo-recombinante viável (GILBERTSON *et al.*, 1993). Os chamados “specificity determinants” (SPDs), são determinantes de especificidade apresentados pela proteína REP, os quais fornecem especificidade no reconhecimento dos iterons e na replicação de DNAs cognatos. A mutação ou deleção do domínio relacionado aos iterons (“iteron-related domain”, IRD), adjacente ao motivo I (um dos três motivos conservados localizados na região N-terminal da REP), extingue a capacidade da REP de ligação sequência-específica ao DNA (OROZCO *et al.*, 1997). A discrepância na sequência do IRD entre diferentes begomovírus relaciona-se com o reconhecimento de diferentes iterons, visto que, begomovírus com sequência de iterons iguais, codificam proteínas REP com IRDs iguais. Uma segunda região importante para especificidade do reconhecimento da origem de replicação pela proteína REP, esta localizada adjacente ao

motivo II, associada ao reconhecimento de iterons específicos (LONDONO; RIEGO-RUIZ; ARGUELLO-ASTORGA, 2010).

Um segundo componente importante na variabilidade genética dos begomovírus é a recombinação, a qual demonstra grande importância na evolução de vírus de plantas, tal mecanismo caracteriza-se pelas trocas de segmentos genômicos entre duas fitas de DNA (GARCIA-ARENAL *et al.*, 2003). A chamada recombinação homóloga se dá por meio da ocorrência nas sequências relacionadas entre o doador e o receptor, enquanto a recombinação heteróloga engloba a troca de regiões com sequências distintas (LAI, 1992; NAGY; SIMON, 1997). Quando ocorre mudanças genéticas através de recombinação, ocorre a rápida evolução do vírus, dando origem à mudanças na virulência e na gama de hospedeiros. Várias espécies de begomovírus, regularmente infectando uma mesma planta (infecção mista), colaboram para ocorrência de eventos de recombinação ou pseudo-recombinação.

A mutação consiste na incorporação de nucleotídeos na fita de DNA/RNA durante a replicação (ZERBINI *et al.*, 2014), sendo a fonte inicial de variação nas populações. Os begomovírus apresentam elevadas taxas de substituição de nucleotídeos (CLAVERIE *et al.* 2018), podendo ser facilmente comparadas às de vírus de ssDNA que infectam mamíferos e de vírus de RNA que infectam plantas.

A taxa de mutação é o número de erros genéticos que acumulam por um determinado tempo referente à geração ou ciclo de replicação. A frequência de mutantes observável na população é outra variável significativa. As duas variáveis podem diferir, uma vez que uma parte desconhecida dos mutantes gerados é deletéria e serão eliminados da população através de seleção (GARCÍA-ARENAL *et al.*, 2003).

A depender da estratégia de replicação e história de vida do vírus, pode ocorrer divergência da relação entre frequência de mutação e a taxa de mutação (DRAKE *et al.*, 1998). Conforme Domingo e Holland (1997), vírus de DNA possuem menores taxas de substituição quando comparados a vírus de RNA, devido a RNA polimerase não apresentar o mecanismo de correção “proofreading”, entretanto, nos geminivírus as taxas de substituição são superiores a outros vírus de DNA e muito semelhantes a vírus de RNA, contrariando assim a teoria de que apenas a fidelidade da DNA polimerase seja determinante às taxas de substituição (DUFFY; SHACKELTON; HOLMES, 2008), facultando a causa a outros fatores como por exemplo a interação com hospedeiro.

Dois processos evolutivos regem a estrutura da população viral: a deriva genética e a seleção natural, sendo essa, positiva ou negativa (ZERBINI *et al.*, 2014). Diferentes etapas no ciclo de vida do vírus podem acontecer na deriva genética, como o movimento do vírus entre

células vegetais (SACRISTAN *et al.*, 2003), transmissão entre plantas por vetores e interação entre vírus na co-infecção (BETANCOURT *et al.*, 2008). Seleção natural é um processo em que os variantes mais adaptados em um determinado ambiente terão aumento na frequência populacional (seleção positiva), por outro lado, variantes menos adaptados terão sua frequência diminuída (seleção negativa) (RUBIO *et al.*, 2013), sendo que a determinação deste processo ocorre por várias interações específicas de vírus com seus hospedeiros, vetores (CHARE; HOLMES, 2004), assim como por co-infecção de outros vírus na mesma planta (RUBIO *et al.*, 2013).

Várias espécies de begomovírus, regularmente infectando uma mesma planta (infecção mista), colabora para ocorrência de eventos de recombinação e/ou pseudo-recombinação. A disseminação da mosca-branca MEAM1, que coloniza o tomateiro e outras solanáceas com eficácia, colabora com tais eventos, em função da capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros, contribuindo de tal forma para infecções mistas futuras (RIBEIRO *et al.*, 2003).

2.5 A CULTURA DO ALHO

O alho é uma importante hortaliça monocotiledônea cultivada em todo o mundo e é usado tanto na alimentação em função de seu alto teor de amido e substâncias aromáticas, quanto na fitoterapia (WU *et al.*, 2015). É originário do continente asiático, e seu uso ocorre desde o século 30 a.C. por egípcios e indianos (SIMON, 2003).

Allium sativum L. pertence à família Amaryllidaceae, assim como outras hortaliças de consumo comum como cebola (*A. cepa*), cebolinha (*A. schoenoprasum*) e alho-poró (*A. ampeloprasum* var. *porrum* L.) (RAHIMI-MADISEH *et al.*, 2017; ABBAS, 2019). No Brasil, são encontrados dois tipos de alho cultivados: alhos de ciclo curto e alhos nobres (semi-tardios e tardios). A implantação dos tipos ocorreu de forma assíncrona, as cultivares de alho nobre foram introduzidas mais recentemente, sendo cultivadas normalmente na região sul do país. A temperatura e o fotoperíodo da região favorecem o desenvolvimento das cultivares nobres, cuja produção é destinada principalmente ao mercado formal pelo fato de que apresentam características morfológicas mais atrativas, como menor número de bulbilhos por bulbo (cerca de 8 a 12), e alto valor comercial (RESENDE, 2011).

Para que o alho nobre seja cultivado em outras regiões é necessário o processo de vernalização, com objetivo de desenvolvimento do bulbo, por consequência das temperaturas e o fotoperíodo serem diferentes (RESENDE *et al.*, 2011). Entretanto, as primeiras variedades introduzidas no Brasil constam no alho semi-nobre (ciclo médio), que possui formato rústico,

com produção de vários bulbilhos pequenos por bulbo, sendo menos atrativo comercialmente que o alho nobre. Portanto, a produção de alho semi-nobre é efetuada de modo geral pela agricultura familiar, sendo destinada ao mercado informal (LUCINI, 2008; RESENDE *et al.*, 2016).

Bothmer (1970) estudando o gênero *Allium* na Grécia, sugeriu o conceito “complexo *A. ampeloprasum*” a espécies relacionadas entre si, no complexo inclui-se *A. ampeloprasum* L., *A. bourgeaui* Rech. fil., e *A. commutatum* Guss. Posteriormente, Bothmer (1974) também incluiu *A. atroviolaceum* Boiss, conforme Guern, Lecorff e Boscher (1991), *A. polyanthum* é outra espécie que deve ser incluída no complexo.

O complexo *A. ampeloprasum* é composto por quatro grupos, popularmente conhecidos como grupo alho-poró, grupo kurrat, grupo cebola pérola e grupo GEE (JONES; MANN, 1963), bem como, de representantes silvestres. Alho-elefante é extremamente variável, pode ser encontrada como planta selvagem ou planta daninha, em diversas partes do mundo, principalmente no Mediterrâneo (JONES; MANN, 1963).

O alho é uma espécie vegetal que não produz semente botânica verdadeira, portanto sua multiplicação é feita vegetativamente via bulbilhos. O alho-semente é responsável pela maior despesa do custo de produção, respondendo com cerca de 30% dos gastos com a cultura, desse modo, a qualidade fisiológica e sanitária deve ser entendida como de importância significativa para a produção ou aquisição do insumo (CARVALHO *et al.*, 2016).

As maiores contribuições para a variação econômica positiva dos principais produtos da agropecuária em 2019 no estado de Santa Catarina vieram do alho, do tomate e da batata-inglesa; embora em 2020 a produtividade do alho tenha sido melhor, em função de que boa parte da área de cultivo seja conduzida em sistema de irrigação, o que proporciona menores riscos de efeitos por estiagem, a queda estimada nos preços do produto contribuiu para variação negativa do índice de preços do produto (TORESAN *et al.*, 2021).

Dentre as doenças transmitidas pelos bulbilhos durante o processo de multiplicação do alho, destacam-se as viroses. Consoante com Pavan (1998), os sintomas típicos observados em folhas de alho, são as estrias de cor verde claro ou amarela, conhecidas como mosaico do alho. A existência de um complexo viral em uma planta, não ocasiona sua morte, os vírus convivem com a planta de forma crônica, multiplicando-se no decorrer dos ciclos. Entretanto, Mituti (2013), em uma diagnose da presença de vírus em alho, observou que a infecção mista entre duas ou mais espécies de diferentes gêneros de vírus podem ocasionar até 78% de redução da produção.

2.6 VIROSES NA CULTURA DO ALHO

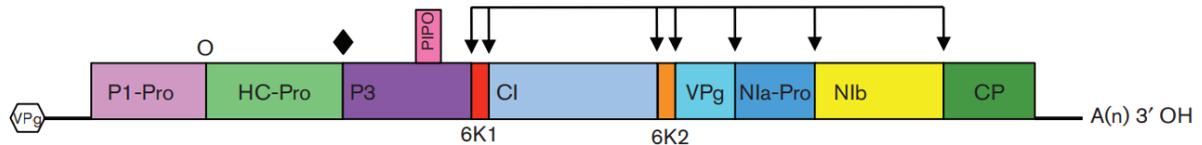
Os vírus reduzem progressivamente o vigor vegetativo e a produtividade, em um processo denominado degenerescência. Os vírus pertencentes aos gêneros *Allexivirus*, *Carlavirus* e *Potyvirus* são os principais responsáveis pela degenerescência do alho-semente, a atividade desses vírus causam queda gradativa do vigor vegetativo, do potencial produtivo e por fim da qualidade dos bulbos ao longo das gerações de cultivo (FERNANDES; DUSI; RESENDE, 2013).

No alho, as infecções de origem virais geralmente são ocasionadas por mais de um complexo de vírus, uma vez que a maioria das cultivares comerciais plantadas em território nacional encontra-se infectada por pelo menos um vírus. De modo habitual e frequente, observa-se a presença dos potyvírus onion yellow dwarf virus (OYDV) e leek yellow stripe virus (LYSV); no grupo dos carlavírus, o garlic common latent virus (GarCLV) e shallot latent virus (SLV); e dos allexivírus, o garlic miteborne filamentous virus (GarMbFV), garlic virus A (GarV-A), garlic virus B (GarV-B), garlic virus C (GarV-C), garlic virus D (GarV-D) e garlic virus X (GarV-X) (CARVALHO *et al.*, 2016).

2.6.1 O gênero *Potyvirus*

Com 190 espécies gênero *Potyvirus* é o mais populoso na família *Potyviridae* (ICTV, 2022). O genoma dos potivirus é composto por uma molécula de RNA fita simples, senso positiva e possuem partículas filamentosas flexuosas com 680 a 900 nm de comprimento e 11 a 13 nm de diâmetro. A organização genômica (Figura 2) dos vírus existentes dentro desse gênero baseia-se em uma única ORF responsável por codificar uma poliproteína de aproximadamente 345 kDa. Apresentam a proteína VPg ligada covalentemente ao terminal 5', com cerca de 9,7 Kb de tamanho do genoma e apresentam uma cauda poli (A) no terminal 3' (ADAMS *et al.*, 2011). Possuem uma pequena ORF incorporada na região codificadora para a proteína P3 ("Pretty Interesting Potyviridae") ORF - PIPO (CHUNG *et al.*, 2008). Uma capa proteica formada por aproximadamente 2.200 cópias da proteína capsidial envolve o RNA genômico. A poliproteína codificada sofre autoproteólise dando origem a cada uma das proteínas virais: P1, HC-Pro, P3, 6KI, CI, 6K2, VPg, NIa, NIb e CP (ADAMS *et al.*, 2011; BAMPI, 2015). A maioria dessas proteínas codificadas apresentam característica multifuncional.

Figura 2 - Organização do genoma de um membro típico do gênero *Potyvirus*. VPg, ligado ao genoma da proteína viral; P1-Pro, protease da proteína 1; HC-Pro, componente de protease auxiliar; P3, proteína 3; PIPO, ORF Potyviridae; 6K, péptido de seis quilodaltons; CI, inclusão citoplasmática; NIa-Pro, protease de inclusão nuclear A; NIb, RNA polimerase dependente de RNA; CP, proteína de revestimento. Os locais de clivagem de P1-Pro (O), HC-Pro (◆) e NIa-Pro (↓) são indicados.



Fonte: (WYLIE *et al.*, 2017, p. 353).

A proteína P1 é a mais variável em tamanho e sequência de nucleotídeos e aminoácidos do genoma dos potyvirus, portanto é considerada a proteína mais apropriada para estudos de relacionamento filogenético e estudos de história evolutiva dos potyvirus (VALLI; LOPEZ-MOYA; GARCIA, 2007), entretanto, não se conhece integralmente o papel dessa proteína no processo infeccioso. Acredita-se que esteja envolvida no aumento da patogenicidade, amplificação do genoma (VERCHOT *et al.*, 1995), acumulação de proteínas (JOHANSEN; CARRINGTON, 2001), autoproteólise (VERCHOT; CARRINGTON, 1991), auxilia a HC-Pro na supressão do silenciamento gênico (RAJAMAKI *et al.*, 2005; VALLI; LOPEZ-MOYA; GARCIA, 2007) e interfere na sintomatologia (RYAN; FLINT, 1997).

A proteína HC-Pro está envolvida na proteinase e autoclivagem do carboxi-terminal, no movimento sistêmico, na supressão do silenciamento gênico, no sinergismo e desenvolvimento de sintomas (MAIA; HAENNI; BERNARDI, 1996). A proteína P3 apresenta função relacionada à patogenicidade, enquanto a proteína 6K1 apresenta função desconhecida. A proteína CI tem função de helicase e movimento célula-a-célula. A proteína 6K2 ancora o complexo replicativo às membranas da célula. A proteína NIa (VPg-Pro) tem função de localização celular, proteinase e interações proteína-proteína. NIb possui função de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e a CP (proteína capsidial) está envolvida na transmissão por afídeos, movimento célula-a-célula e sistêmico e na montagem da partícula viral (WYLEI *et al.*, 2017).

O ICTV utiliza como critérios para demarcação de novas espécies no gênero *Potyvirus* a identidade de aminoácidos inferior a 80% e sequência de nucleotídeos menor que 76% para a proteína capsidial ou o genoma completo (KING *et al.*, 2012; ICTV, 2022). Outros fatores também podem estar associados à demarcação de novas espécies, como diferentes sítios de

clivagem da poliproteína, gama de hospedeiros, ausência de proteção cruzada, transmissão ou não por sementes, reações de hospedeiros, diferenças sorológicas e vetores primários diferentes (BERGER *et al.*, 2005).

A transmissão e disseminação desses vírus nas lavouras de alho se dá por meio de pulgões (Hemiptera: Aphididae) de forma não persistente, onde o inseto quando insere seu estilete em uma planta infectada, adquire o vírus e o transmite a outras plantas em segundos, durante a picada de prova (COSTA, 1998). Logo que infectada, a multiplicação do vírus ocorre no bulbo durante os anos, sendo dessa forma uma fonte permanente de infecção. Os insetos transmissores dos vírus normalmente não colonizam a cultura do alho, e portanto a disseminação das doenças é consequência da migração dos pulgões de fora para dentro da cultura (CARVALHO *et al.*, 2016).

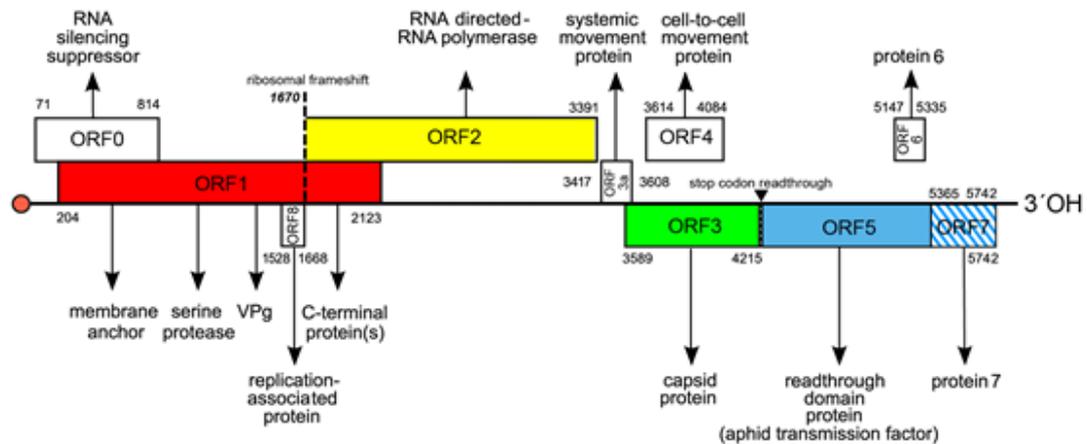
As principais espécies de afídeos que transmitem LYSV são *Myzus persicae*, *Aphis fabae*, *A. gossypii*, *A. nerii*, *Hyperomyzus carduellinus*, *Rhopalosiphum maidis*, *R. padi*, *Schizaphis graminum*, e *Uroleucon sonchi* (LUNELLO *et al.*, 2002). Para OYDV existem mais de 50 espécies descritas como vetoras, porém as mais importantes são *M. ascalonicus*, *M. persicae*, *R. maidis*, e *Acyrtosiphon pisum* (VAN DIJK, 1993).

2.6.2 O gênero *Polerovirus*

A família *Solemoviridae* possui 4 gêneros, sendo o gênero *Polerovirus* o mais populoso com 26 espécies aceitas pelo ICTV (2022). Conforme Sõmera *et al.* (2021), os polerovírus possuem genoma de RNA policistrônico, senso positivo, com cerca de 3kb, consistindo em regiões 5' e 3' não codificantes com 7 ORF's, sendo que as ORF3a, ORF4, ORF6, ORF7, são exclusivas do gênero. ORFs 0, 1 e 2 são todas traduzidas do RNA genômico (Figura 3). A tradução da ORF1 ocorre através de um mecanismo de varredura com vazamento. A RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) codificada pela ORF2 é expressa como uma proteína de fusão por meio de um mecanismo de deslocamento de leitura pelos ribossomos (-1). As ORFs 3a, 3, 4 e 5 são traduzidas do RNA1 subgenômico, enquanto ORF6 e ORF7 são traduzidos do RNA2 subgenômico; ORF7 também é traduzido do RNA3 subgenômico. ORF5 é expressa apenas como uma proteína de fusão através de uma leitura do códon de terminação da ORF3. Além disso, o genoma do vírus do potato leafroll virus (PLRV) codifica uma proteína associada à replicação Rep1 de sua ORF8 exclusiva.

Figura 3 - Organização genômica do *Potato leafroll virus* gênero *Polerovirus*. Os marcadores vermelhos indicam a proteína do vírus ligada covalentemente ao genoma (VPg) na

extremidade 5' dos RNAs. Os quadros de leitura (ORFs) são indicados por sua posição acima e abaixo do genoma na ordem -1, 0 e +1 e codificam a poliproteína composta pelo domínio transmembrana, VPg, serina protease e proteína(s) C-terminal (vermelho), RdRP (amarelo). ORFs 3'-proximais codificam a proteína de revestimento (CP, verde) e a proteína de domínio de leitura relacionada às propriedades de transmissão por pulgões (azul). ORF0 codifica supressor de silenciamento de RNA viral; e ORF3a é necessária para infecção sistêmica; ORF4 codifica a proteína de movimento; ORF's 6 e 7 codificam proteínas responsáveis pela transcrição e replicação do vírus; ORF8 codifica uma proteína associada à replicação exclusiva de potato leafroll virus (PLRV). A área com hachuras indica sobreposição entre ORF's no mesmo quadro de leitura.



Fonte: (ICTV, 2022)

Os polerovírus apresentam partícula com simetria de rede ($T=3$), não envelopada, possuindo um diâmetro de 26 a 32nm, constituído por cerca de 180 proteínas capsidiais de 26 a 33 kDa. Possui uma da VPg ligada na sua extremidade 5'.

Como critério de demarcação de espécies dentro desse gênero, emprega-se: (i) diferença de amplitude e especificidade na gama de hospedeiros; (ii) impossibilidade de proteção cruzada em interações unidirecionais e bidirecionais; (iii) especificidade sorológica (anticorpo monoclonal e policlonal); e (iv) diferença superior a 10% de identidade da sequência em aminoácido de qualquer gene (VEERAKONE *et al.*, 2015; ICTV, 2022).

Eventos de recombinação estão constantemente sendo observados dentro do gênero *Polerovirus*, sendo um mecanismo comum dentro da família *Solemoviridae* (PAGÁN; HOLMES, 2010). Murakami *et al.* (2011) acreditam que devido aos eventos de recombinação entre as espécies de polerovírus, tenham por consequência, impulsionado mudanças na capacidade de infecção em plantas hospedeiras. Devido a eventos de recombinação, ocorre a ampliação da gama de hospedeiros que o vírus é capaz de infectar. Ademais, recombinações

nas CPs de polerovírus provocam alterações na especificidade do afídeo transmissor, podendo haver troca de espécie do inseto, como no caso do pepper vein yellows virus (PeVYV) (MURAKAMI *et al.*, 2011).

As partículas de polerovírus são confinadas às células do floema. As partículas são encontradas tanto no núcleo quanto no citoplasma das células infectadas. As espécies desse gênero geralmente infectam os tecidos do floema, gerando, conseqüentemente, sintomas relacionados à inibição da translocação, retardo do crescimento das plantas e indução da perda de clorofila, resultando em amarelecimento e em um nanismo característicos das plantas infectadas (ICTV, 2022).

Conforme Knierim, Tsai e Kenyon (2013), a replicação dos polerovírus ocorre no citoplasma, porém não se sabe se há interação com alguma organela da célula hospedeira. O vírus penetra no interior da célula através do estilete do inseto vetor durante a alimentação. Posteriormente, há a decapsidação da partícula e então liberação do material genético no citoplasma.

Os vírus pertencentes ao gênero *Polerovirus* são transmitidos de forma persistente circulativa por espécies de afídeos. Os vírus são adquiridos pela alimentação dos tecidos floemáticos, entram na hemolinfa do pulgão através do intestino médio posterior, por um processo de transporte mediado por receptor, circulam na hemolinfa e por fim entram na glândula salivar acessória. A inoculação em uma planta resulta da introdução de saliva virulífera nos tecidos do floema através do ducto salivar durante a alimentação do pulgão (ICTV, 2022).

3 CAPÍTULO I – LEVANTAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VIROSES E DA MOSCA BRANCA EM TOMATE E PLANTAS DANINHAS ASSOCIADAS

3.1 RESUMO

O cultivo de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) ocorre em todas as principais regiões tropicais e subtropicais do Brasil e do mundo. O Estado de Santa Catarina é um dos principais produtores da cultura, cuja produção é destinada principalmente ao consumo *in natura* e parte para o processamento. O tomateiro apresenta vulnerabilidade significativa à atividade de pragas e agentes patogênicos. Dentre os agentes virais, espécies do gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) são responsáveis por danos consideráveis, podendo apresentar um (monopartido) ou dois (bipartido) componentes genômicos de DNA circular fita simples, com cerca de 2.600 nucleotídeos. O elevado número de espécies classificadas no gênero *Begomovirus* ocorre por vários fatores, incluindo a atividade polífaga do agente transmissor mosca-branca (*Bemisia tabaci* Gennadius) e a alta capacidade de geração de variabilidade dentro do gênero *Begomovirus*. Em decorrência da importância das doenças causadas por espécies de begomovírus no Brasil, o constante monitoramento da diversidade viral e seu vetor, são ações de pesquisa de suma importância para programas de melhoramento. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar as begomoviroses ocorrentes em cultivos de tomate e plantas daninhas associadas em Santa Catarina, bem como, as espécies crípticas de *B. tabaci* vetoras. O DNA foi extraído de 33 amostras foliares, sendo 21 amostras de tomate e 12 amostras de plantas daninhas, exibindo sintomas típicos de vírus de plantas, os ensaios de PCR foram realizados com os iniciadores universais PAL1v1978/PAR1c496 e PBL1v2040/PCRC1. Moscas-branca individuais, encontradas em Santo Amaro da Imperatriz, foram analisadas por PCR utilizando os iniciadores Bem23F e Bem23R. As análises de sequências demonstraram a ocorrência de um vírus com DNA-A 99% similar com a sequência completa correspondente ao segmento DNA-A de um isolado do vírus euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV) e o DNA-B com 97,49% de similaridade com a sequência completa do DNA-B de tomato severe rugose virus (ToSRV). ToSRV mostrou-se a espécie dominante nos cultivos do litoral catarinense, inclusive infectando a planta daninha maria preta (*Solanum americanum* L.), cuja ocorrência não havia sido relatada até o presente momento. Moscas brancas foram encontradas somente no município de Santo Amaro da Imperatriz, onde foi identificada a ocorrência inédita da espécie Mediterranean (MED), embora a espécie Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1) tenha sido predominante.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* L. *Begomovirus*. Pseudorrecombinação. Diagnose. *Bemisia tabaci*.

3.2 INTRODUÇÃO

O tomate é a segunda hortaliça mais produzida e consumida em todo o mundo, depois da batata, sendo um produto mundialmente em expansão (IBGE, 2021). A crescente demanda por tomate acompanha o aumento populacional e é favorecida pela ampla diversidade de frutos e seus derivados, principalmente pela demanda por tomates para processamento. O Brasil está entre os 10 maiores produtores mundiais em produtividade (FAO, 2021), com uma média de 71 ton/ha e 3,9 milhões de toneladas de produção em 2020 (IBGE, 2021). O Estado de Santa Catarina é o sexto maior produtor de tomate com uma produção de 166.587 toneladas no ano de 2020, conforme IBGE (2021). Contudo, a produção agrícola é alvo de um alto índice de incertezas, pois é influenciada por diversos fatores dentre eles as doenças, destacando-se as viroses, por não haver controle curativo.

As viroses predominantemente observadas sobre os tomateiros são causadas por begomovírus (FIALLO-OLIVÉ *et al.*, 2020). As perdas por begomovirose na cultura no país podem chegar a 100% dependendo da época de infecção da planta e da cultivar (GIORDANO *et al.*, 2005; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). Dentre as várias espécies de begomovírus associadas ao tomateiro no Brasil, temos o tomato severe rugose virus (ToSRV) e tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV), que são as predominantes (FERNANDES *et al.*, 2008; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON 2016; SOUZA *et al.*, 2020; DUARTE *et al.*, 2021a).

Os begomovírus também infectam plantas espontâneas não cultivadas, ou seja, plantas daninhas, que por sua vez desmonstram papel importante na epidemiologia, atuando como reservatórios de novos vírus ou variantes virais (COTRIM *et al.*, 2007; CASTILLO-URQUIZA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012). Conforme Syller (2012), uma planta daninha como fonte de reservatório viral, favorece eventos de infecções mistas proporcionando a interação entre diferentes espécies e/ou isolados, gerando efeitos como: aumento/decrécimo das taxas de replicação, transmissão e expressão de sintomas na hospedeira. Plantas infectadas com begomovírus apresentam sintomas de mosaico, enrolamento e deformidade foliar, nanismo e diminuição na quantidade e qualidade de frutos produzidos (INOUE-NAGATA; ÁVILLA; BÔAS, 2009).

A epidemiologia das begomovirose está estreitamente relacionada ao comportamento

e biologia do inseto vetor *Bemisia tabaci*, portanto, as medidas mais abrangentes de controle dessas viroses no campo são voltadas para o controle do vetor (BERGAMIN FILHO *et al.*, 2016; GORAYEB *et al.*, 2020). Em função de suas exímias capacidades polífagas, Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1) e Mediterranean (MED) estão dispersas pelo mundo, causando prejuízos em diversas regiões com diferentes condições climáticas (KANAKALA; GHANIM, 2019).

Ainda que existam várias pesquisas relacionadas à cultura do tomate e infecções virais em outros estados do Brasil (ÁVILA *et al.*, 2004; COTRIM, 2007; DUARTE, 2019; AMORIM; NASCIMENTO; CAVALCANTE, 2018; ANDRADE, 2020; SILVA, 2021), poucas informações relacionadas a esse tema estão disponíveis para o Estado de Santa Catarina, pois não se tem conhecimento sobre quais espécies virais e o vetor associado, está ocasionando tais problemas nas áreas de produção no estado. Diante disso, o presente capítulo contempla um levantamento de espécies virais e mosca branca em áreas de produção de tomates no estado de Santa Catarina, propiciando a identificação de espécies de begomovírus infectando plantas de tomate e plantas daninhas. Com a caracterização das espécies virais infectando o tomate, das espécies de plantas daninhas que atuam como reservatório dos vírus e da espécie críptica de mosca branca prevalente, pode-se determinar medidas de manejo mais eficientes na redução da incidência dessas viroses, favorecendo o aumento da produção de tomates no Estado de Santa Catarina.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Obtenção das amostras

As coletas das plantas sintomáticas de tomate, plantas daninhas associadas e moscas-brancas, foram realizadas em áreas de produção nos municípios de Bom Retiro, Caçador, Lebon Régis, Monte Castelo, Major Vieira, Palhoça, Rio do Sul, Santo Amaro da Imperatriz e Urubici (Figura 4).

Figura 4 - Mapa do estado de Santa Catarina indicando locais de coletas das amostras com

marcações em vermelho (Lages, SC, 2022).



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Os pontos de coleta das amostras foram georreferenciados com auxílio de um GPS (Garmin Map 64sx). As informações referentes às coletas de plantas de tomate são apresentadas na Tabela 1, com determinação de grupo e variedade, data de coleta e o local de produção das mudas.

Tabela 1 - Coletas de plantas de tomate, município de coleta, código amostral, variedade, grupo, data de coleta, local de produção das mudas e posicionamento geográfico. (Lages, SC, 2022). (continua)

Local (Município)	Código amostral	Variedade	Grupo	Data da coleta	Local de produção das mudas	Posicionamento geográfico
Urubici	1	Paron	Longa Vida	12/03/2020	Urubici/SC	27°56'13.6"S 49°41'29.7"W
Urubici	5	Paron	Longa Vida	12/03/2020	Urubici/SC	27°56'13.6"S 49°41'29.7"W
Santo Amaro da Imperatriz	9	Valerin	Longa Vida	27/08/2020	Santo Amaro da Imperatriz/SC	27°41'30.9"S 48°44'40.5"W
Santo Amaro da Imperatriz	2	HS	Saladete	28/08/2020	Santo Amaro da Imperatriz/SC	27°41'30.4"S 48°44'30.0"W
Bom Retiro	3	Paron	Longa Vida	12/03/2020	Alfredo Wagner/SC	27°43'37.8"S 49°44'49.7"W
Bom Retiro	6	Coronel	Longa Vida	12/03/2020	Alfredo Wagner/SC	27°43'37.8"S 49°44'49.7"W

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Tabela 2 - Coletas de plantas de tomate, município de coleta, código amostral, variedade,

(continuação)

grupo, data de coleta, local de produção das mudas e posicionamento geográfico. (Lages, SC, 2022).

Local (Município)	Código amostral	Variedade	Grupo	Data da coleta	Local de produção das mudas	Posicionamento geográfico
Bom Retiro	7	Paron	Longa Vida	13/03/2020	Santo Amaro da Imperatriz/SC	27°48'57.2"S 49°35'59.6"W
Bom Retiro	8	Coronel	Longa Vida	12/03/2020	Alfredo Wagner/SC	27°48'35.6"S 49°32'01.2"W
Palhoça	4	-	Grappe	27/08/2020	Palhoça/SC	27°50'27.5"S 48°35'30.5"W
Caçador	10	Plutão	Saladete	05/03/2020	Paiacatu/SP	26°47'06.8"S 51°04'51.5"W
Caçador	11	Tronus	Longa Vida	30/12/2019	Mogi Guaçu/SP	26°41'00.5"S 50°59'10.1"W
Caçador	13	Tronus	Longa Vida	30/12/2019	Mogi Guaçu/SP	26°41'13.2"S 50°58'50.1"W
Caçador	18	Tronus	Longa Vida	30/12/2019	Mogi Guaçu/SP	26°41'13.2"S 50°58'50.1"W
Caçador	20	Coronel	Longa Vida	05/01/2021	Piacatu/SP	26°50'00.7"S 50°57'37.9"W
Caçador	21	Coronel	Longa Vida	05/01/2021	Piacatu/SP	26°50'00.7"S 50°57'37.9"W
Lebom Régis	12	Coronel	Longa Vida	27/12/2019	Piacatu/SP	26°54'16.4"S 50°46'35.4"W
Lebom Régis	15	Coronel	Longa vida	27/12/2019	Piacatu/SP	26°53'02.5"S 50°43'52.4"W
Lebom Régis	16	plutão	Longa vida	27/12/2019	Piacatu/SP	26°54'16.4"S 50°46'35.4"W
Lebom Régis	17	Itaipava	Longa vida	27/12/2019	Piacatu/SP	26°54'16.4"S 50°46'35.4"W
Rio do Sul	14	Anjico	Saladete	04/11/2019	Rio do Sul/SC	26°50'00.7"S 50°57'37.9"W
Monte Castelo/Major Vieira	19	Coronel	Longa Vida	06/01/2021	Piacatu/SP	26°30'07.5"S 50°15'30.1"W

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Na Tabela 3, são exibidas as informações referentes às coletas e georreferenciamento das plantas daninhas encontradas nos municípios de Bom Retiro, Caçador, Monte Castelo/Major Vieira, Santo Amaro da Imperatriz e Urubici.

Tabela 3 - Coletas de plantas daninhas, município de coleta, número da amostra, variedade,

grupo, data de coleta, local de produção das mudas e posicionamento geográfico. (Lages, SC, 2022).

Local (Município)	Código amostral	Data da coleta	Nome científico	Nome comum	Posicionamento geográfico
Santo Amaro da Imperatriz	24	27/08/2020	<i>Solanum americanum</i>	Maria Pretinha	27°41'30.9"S 48°44'40.5"W
Santo Amaro da Imperatriz	22	28/08/2020	<i>Solanum americanum</i>	Maria Pretinha	27°41'30.4"S 48°44'30.0"W
Santo Amaro da Imperatriz	25	29/08/2020	<i>Nicandra physalodes</i>	Joá de capote	27°41'30.4"S 48°44'30.0"W
Urubici	23	12/03/2020	<i>Ipomea sp.</i>	Corda de viola	27°56'13.6"S 49°41'29.7"W
Urubici	29	12/03/2020	<i>Solanum americanum</i>	Maria pretinha	27°56'13.6"S 49°41'29.7"W
Caçador	26	05/03/2020	<i>Solanum americanum</i>	Maria pretinha	26°47'06.8"S 51°04'51.5"W
Caçador	28	05/01/2020	<i>Bidens pilosa</i>	Picão preto	26°47'06.8"S 51°04'51.5"W
Caçador	31	05/01/2020	<i>Amaranthus viridis</i>	Caruru	26°47'06.8"S 51°04'51.5"W
Caçador	33	05/01/2021	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Leiteiro	26°50'00.7"S 50°57'37.9"W
Bom Retiro	27	12/03/2020	<i>Solanum americanum</i>	Maria pretinha	27°48'35.6"S 49°32'01.2"W
Bom Retiro	30	12/03/2020	<i>Solanum americanum</i>	Maria pretinha	27°43'37.8"S 49°44'49.7"W
Monte Castelo/ Major Vieira	32	06/01/2021	<i>Solanum americanum</i>	Maria pretinha	26°30'07.5"S 50°15'30.1"W

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

As plantas sintomáticas foram acondicionadas em vasos identificados para transporte ao Laboratório de Virologia Vegetal (LVV) da Universidade do Estado de Santa Catarina - Centro de Ciências Agroveterinárias (UDESC – CAV), onde foram embalados em sacos de papel alumínio e armazenadas em ultrafreezer (-80°C), para posterior processamento.

Moscas-branca foram encontradas no município de Santo Amaro da Imperatriz, infestando lavouras de tomate e lavouras adjacentes de pepino. A Tabela 4 exibe informações referentes às coletas de moscas-branca, como código amostral, município, hospedeiro e a variedade da planta hospedeira. Coletou-se no mínimo 40 moscas em cada local de coleta, as quais foram acondicionadas em microtubos identificados contendo álcool 70%, transportadas ao LVV (UDESC – CAV), para posterior processamento.

Tabela 4 - Informações sobre coletas de moscas-branca, incluindo o município de coleta,

código amostral, hospedeiro, data de coleta, grupo, variedade, e posicionamento geográfico das amostras.

Local (município)	Código amostral	Data de coleta	Hospedeiro	Grupo	Variedade	Posicionamento geográfico
Santo Amaro da Imperatriz	71-80	03/12/2021	Tomate	Saladete	SVTh3930	27°42'26.9"S 48°45'13.3"W
Santo Amaro da Imperatriz	81-90	03/12/2021	Tomate	Saladete	HS 1188	27°42'26.9"S 48°45'13.3"W
Santo Amaro da Imperatriz	91-100	03/12/2021	Tomate	Saladete	HS 1189	27°42'26.9"S 48°45'13.3"W
Santo Amaro da Imperatriz	101-110	03/12/2021	Tomate	Salada	Tyson	27°42'26.9"S 48°45'13.3"W
Santo Amaro da Imperatriz	111-120	03/12/2021	Tomate	Salada	Tyson	27°42'26.9"S 48°45'13.3"W
Santo Amaro da Imperatriz	121-130	03/12/2021	Tomate	Salada	Paron Oxy	27°42'26.9"S 48°45'13.3"W
Santo Amaro da Imperatriz	131-140	03/12/2021	Pepino	Japonês	Taiko	27°41'24.0"S 48°44'36.0"W
Santo Amaro da Imperatriz	141-150	03/12/2021	Tomate	Salada	Paron Oxy	27°41'24.0"S 48°44'36.0"W
Santo Amaro da Imperatriz	151-160	03/12/2021	Pepino	Japonês	Soldier	27°41'15.3"S 48°45'03.8"W
Santo Amaro da Imperatriz	161-170	03/12/2021	Pepino	Japonês	Soldier	27°41'15.3"S 48°45'03.8"W

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

3.3.2 Extração de ácidos nucleicos

Os testes moleculares foram realizados no Laboratório de Virologia Vegetal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC-CAV). Discos foliares (aproximadamente 50 mg) das 33 amostras foliares selecionadas, foram submetidas à extração de DNA, seguindo o protocolo de extração com CTAB proposto por Doyle e Doyle (1990).

Para identificação das espécies de moscas-branca, foram extraídos o DNA de ao menos 10 moscas-branca usando a resina Chelex-100 (Sigma-Aldrich) (WALSH; METZGER; HIGUCHI, 1991; DE MORAES *et al.*, 2018), de acordo com as recomendações do fabricante.

A integridade e a quantidade dos ácidos nucleicos extraídos foram verificadas utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose 1% e quantificador de ácidos nucleicos Nanodrop 2000 (Thermo Fisher).

3.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras de DNA total dos 33 isolados (plantas de tomate e plantas daninhas) foram submetidas a ensaios de PCR com os iniciadores degenerados “universais” ‘PAL1v1978’ (5’ GCA-TCT-GCA-GGC-CCACAT-YGT-CTT-YCC-NGT 3’) e ‘PAR1c496’ (5’ CAT-GCT-GCA-GTA-CAT-YGGCCT-YTT-DAC-CC 3’); ‘PBL1v2040’ (5’ GCT-CTG-CAG-CAR-TGR-TCK-ATC-TTC-CAT-ACA 3’) e PCRc1 (5’CTA-GCT-GCA-GCA-TAT-TTA-CRA-RWA-TGC-CA 3’) visando amplificar, respectivamente, regiões específicas do DNA-A e DNA-B do genoma de begomovirus (ROJAS *et al.*, 1993). Para o preparo do mix das reações utilizou-se 10,0 µL de tampão da enzima goTaq green DNA polimerase (5X), 0,25 µL da enzima Taq DNA polimerase (5U/µL) (Promega), 1,0 µL de dNTPs (2,5 mM) (Promega), 1,0 µL de cada primer (PAL1v1978/PAR1c496) (10 µM), 34,75 µL de água livre de nuclease e 2,0 µL de DNA total (20 ng/µL) para um total de 50 µL. O DNA foi amplificado usando as seguintes condições: 94°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos, sendo cada um deles composto por: 94°C por 1 minuto para desnaturação, 50°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 3 minutos para extensão, e uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

No total, 100 amostras individuais de mosca-branca foram obtidas, as quais foram submetidas a ensaios de PCR com os iniciadores microssatélite específicos ‘Bem 23 Forward’ (5’ CGG-CTT-TGC-GCC-TTA-GTC 3’) e ‘Bem 23 Reverse’ (5’ CGG-CTT-TAT-CAT-AGC-TCT-CGT 3’) (DE BARRO *et al.*, 2003). Para o preparo do mix da reação utilizou-se 2,5 µL de tampão da enzima GoTaq® Flexi DNA polimerase (5X), 0,25 µL da enzima GoTaq® Flexi DNA polimerase (5U/µL) (Promega), 4,0 µL de MgCl₂, 0,5 µL de dNTPs(2,5 mM) (Promega), 0,5 µL de cada primer (Bem23F/Bem23R) (10 µM), , 3,25 µL de água livre de nuclease e 1,5 µL de DNA total (20 ng/µL) para um total de 13 µL. O DNA foi amplificado usando as seguintes condições: 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos, sendo cada um deles composto por: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 55°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 30 segundos para extensão; e finalmente uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os fragmentos amplificados nas reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corados com GelRed (Biotium), visualizados sob luz UV em transluminador e fotografados.

3.3.4 Sequenciamento Sanger

Os produtos de PCR das amostras vegetais foram enviados para sequenciamento convencional (ACTGene Análises moleculares LTDA) usando os pares de iniciadores degenerados PAL1v1978/PAR1c496 e PBL1v2040/PCRc1, para os genomas DNA-A e DNA-

B de begomovírus, respectivamente. As respectivas sequências foram analisadas e comparadas com outras sequências no *GenBank* usando a ferramenta BLAST disponível em (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas áreas de produção avaliadas foram encontradas plantas de tomate com sintomas de infecção viral de bolhosidades, mosaico, nanismo, manchas escuras púrpuras na face abaxial das folhas, amarelecimento e deformações foliares, surgindo a presença de begomovirose. Entretanto, apenas nos municípios de Santo Amaro da Imperatriz, Urubici, Caçador, Bom Retiro e Monte Castelo, Major Vieira foram encontradas plantas daninhas sintomáticas. Ressalta-se que durante o período de coleta somente foi observado presença de *Bemisia tabaci* (mosca branca) nas lavouras de Santo Amaro da Imperatriz no estado de Santa Catarina (Figura 5).

Figura 5 - Plantas com sintomas de begomovirose oriundas de Santo Amaro da Imperatriz:

A) Tomate manifestando bolhosidades, nanismo, enrolamento e amarelecimento foliar; B) Maria pretinha (*Solanum americanum* Mill.) manifestando sintomas de deformações foliares, mosaico e manchas púrpuras; C) Infestação de mosca-branca em lavoura de pepino adjacente a uma lavoura de tomate.



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

O desenvolvimento e a dispersão de moscas-branca são favorecidos por períodos quentes e secos, sendo observados picos populacionais na estação seca (INOUE-NAGATA *et al.*, 2016), em meses que apresentam maiores valores médios de precipitação (>35mm) a população de moscas-branca tende a diminuir (SOUSA *et al.*, 2021). Considerando a alta variação sazonal da temperatura do ar, apresentando no inverno valores menores e no verão

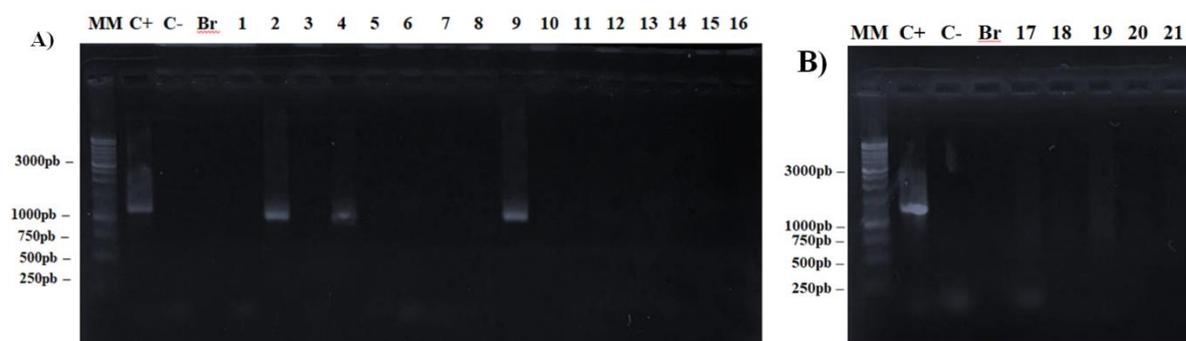
valores maiores, e os efeitos da altitude na temperatura do ar, onde em município com maior altitude observa-se menores temperaturas médias seja em escala mensal, sazonal ou anual.

Nos meses mais quentes do ano (dezembro a março) as temperaturas médias mensais da região do litoral Catarinense podem alcançar máximas superiores a 30 °C (SANTANA, 2020), favorecendo o estabelecimento de moscas-branca. As lavouras visitadas localizadas no meio oeste de Santa Catarina, além de apresentarem alto relevo, encontravam-se rodeadas por culturas perenes como pinus, o que desfavorece e dificulta o deslocamento de moscas-branca.

Nas visualizações de eletroforese em gel de agarose, quando utilizados os oligonucleotídeos PAL1v1978/PAR1C496 (DNA-A), um fragmento de aproximadamente 1,2 kb foi amplificado nas amostras 2; 4; e 9 com DNA de plantas de tomate sintomáticas conforme pode ser observado na Figura 6.

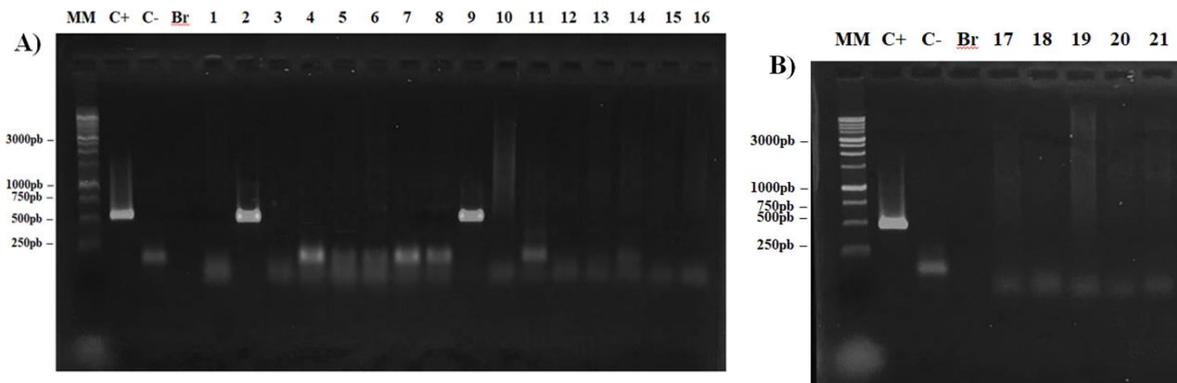
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da PCR para a detecção de espécies do gênero *Begomovirus*, utilizando os oligonucleotídeos PAL1v1978 e PAR1C496.

Geis (A) e (B) representam amostras de tomate 1 – 21. MM: Marcador molecular 1kb (Promega); Br: Branco (PCR realizada com água); C+: Controle positivo (planta infectada por begomovírus); C-: Controle negativo (PCR realizada com uma planta sadia).



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da PCR para a detecção de espécies do gênero *Begomovirus*, utilizando os oligonucleotídeos PBL1v2040 e PCRC1. Geis (A) e (B) representam amostras de tomate 1 – 21. MM: Marcador molecular 1kb (Promega); Br: Branco (PCR realizada com água); C+: Controle positivo (realizada com planta infectada por begomovírus); C-: Controle negativo (PCR realizada com planta sadia).

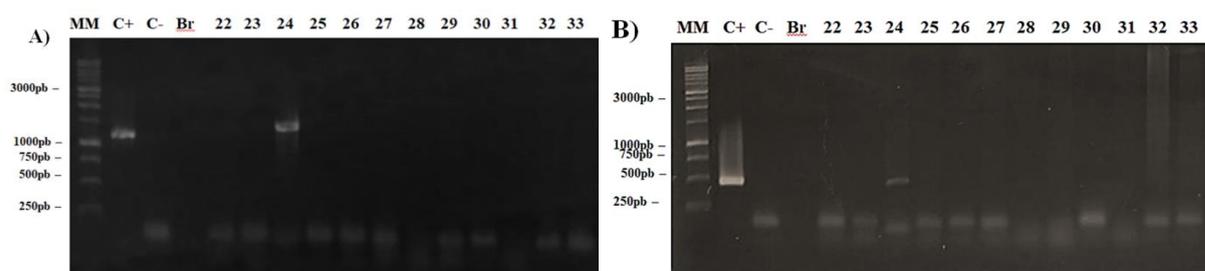


Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Para visualização dos produtos de PCR em eletroforese em gel de agarose das amostras de plantas daninhas, quando utilizados os oligonucleotídeos para amplificação de segmentos do genoma DNA-A, um fragmento de aproximadamente 1,2 kb foi amplificado na amostra 24 (Figura 8A), havendo amplificação na mesma amostra para o componente genômico DNA-B de 0,6 kb (Figura 8B).

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da PCR para a detecção de espécies do gênero *Begomovirus*, utilizando os oligonucleotídeos PAL1v1978/ PAR1C496 (A) e PBL1v2040/PCRC1 (B). - MM: Marcador molecular 1kb (Promega); Br: Branco (PCR realizada com água); C+: Controle positivo (realizada com planta infectada por begomovírus); C-: Controle negativo (PCR realizada com planta sadia); Amostras de plantas daninhas 22 –

33.



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Plantas infectadas por begomovírus foram encontradas nos municípios de Santo Amaro da Imperatriz e Palhoça, litoral Catarinense. Analisaram-se os resultados gerados no sequenciamento, onde as sequências consenso obtidas foram comparadas com sequências disponíveis no *GenBank*.

Para a amostra com código 2, um fragmento de sequência de 973 nt correspondentes ao DNA-A apresentou 99% de identidade de nucleotídeos com a sequência completa correspondente ao segmento DNA-A de um isolado do vírus euphorbia yellow mosaic virus

(EuYMV, acesso no *GenBank* KY559489) e 92,86% de identidade ao gene da proteína relacionada à supressão do silenciamento gênico de um outro isolado do vírus EuYMV (acesso *GenBank* no MG773281). Todavia, a sequência do fragmento de DNA-B de 982 nt apresentou 97,49% de identidade com a sequência completa DNA-B de tomato severe rugose virus (ToSRV) identificado no Brasil (acesso *GenBank* MT627159) (Tabela 5).

Tabela 5 - Porcentagem de similaridade entre sequências nucleotídicas de parte do genoma do fragmento de vírus obtido do gênero *Begomovirus* depositados no *GenBank*.

Genoma	Amostra	Espécie	Código GenBank	Isolado viral	Município	Identidade(%)
DNA - A	2	<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>	KY559489	BR-Cas1073-11	Santo Amato da Imperatriz	99
	4	<i>Tomato severe rugose virus</i>	EU 600238	Brasil	Palhoça	97.97
	9	<i>Tomato severe rugose virus</i>	EU 600238	Brasil	Santo Amato da Imperatriz	97.10
	24	<i>Tomato severe rugose virus</i>	EU 600238	Brasil	Santo Amato da Imperatriz	96.61
DNA - B	2	<i>Tomato severe rugose virus</i>	MT627159	BR:Flo222:14	Santo Amato da Imperatriz	97.20
	9	<i>Tomato severe rugose virus</i>	MT627159	BR:Flo222:16	Santo Amato da Imperatriz	97.44
	24	<i>Tomato severe rugose virus</i>	MT627159	BR:Flo222:18	Santo Amato da Imperatriz	92.24

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

O *Tomato severe rugose virus* foi observado em quatro amostras, com sequências variando de 96,61 a 97,97% de similaridade com isolado do Brasil (EU600238) para o componente genômico DNA-A; para o componente genômico DNA-B, houve similaridade entre 92,24 e 97,44% com a sequência completa do segmento DNA-B de ToSRV (MT627159).

Os geminivirus compõem um dos grupos de plantas com capacidade de evolução mais rápida dentre os vírus de plantas, o que pode ser atribuído a vários fatores incluindo aumento das populações de insetos vetores e rápida evolução viral extremamente responsiva a mudanças de ambiente. Pseudorecombinantes infecciosos podem ser obtidos a partir da troca dos componentes genômicos de dois geminivírus bipartidos em infecções mistas, onde o DNA-B de um vírus pode ser reconhecido pela proteína Rep de outro, conforme Hou e Gilbertson

(1996). Com base nessas propriedades, sugere-se que o vírus presente na amostra de código 2, possa ser um pseudorrecombinante de EYMV e ToSRV. Outra possibilidade seria a ocorrência de infecção mista nesta amostra, o que necessita de mais estudos para confirmação.

De fato, a ocorrência de infecções mistas é um pré-requisito para a ocorrência de pseudorecombinação. Nesse sentido, Duarte *et al.* (2021b) relatam eventos múltiplos e independentes de infecção natural de tomates por isolados de EuYMV com outros vírus, incluindo ToSRV no Estado de Minas Gerais. Isto confirma o status de hospedeiro natural de tomates para isolados de EuYMV, conforme indicado em ensaios de infectividade realizados anteriormente usando inoculação via biobalística (BARRETO *et al.*, 2013).

ToSRV é o begomovírus predominante nas regiões sul e sudeste do Brasil (FERNANDES *et al.*, 2008; GONZÁLEZ-AGUILERA *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2013). Silva *et al.* (2014) provaram que sob condições experimentais de inoculação por biobalística, ToRMV e ToSRV formam pseudorrecombinantes viáveis em todas as combinações possíveis de infecções mistas, com mesmo núcleo de iteron, SPDs idênticos e sequências de DNA-B com 98,2% de similaridade. Neves *et al.* (2020) relataram a presença de ToSRV na planta daninha popularmente conhecida como picão (*Bidens pilosa*) e de EuYMV em leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) apresentando 98 e 92% de identidade com isolados de Góias e Rio Grande do Sul, respectivamente.

ToSRV foi encontrado infectando naturalmente vários hospedeiros cultivados, como batata, feijão, pimenta, berinjela e soja (SOUZA-DIAS *et al.*, 2008; MACEDO *et al.*, 2017) e também plantas não cultivadas, como *Chenopodium album*, *C. ambrosioides*, *Crotalaria* spp., *Euphorbia heterophylla*, *Nicandra physaloides* e *Sida* spp. Outros estudos mostraram que plantas não cultivadas que crescem nas proximidades de lavouras de tomate podem servir como reservatórios virais de begomovírus (BARRETO *et al.*, 2013; BARBOSA *et al.*, 2016; GORAYEB *et al.*, 2020), tendo conseqüente vantagem para begomovírus com ampla gama de hospedeiros, como ToSRV.

Apesar de que ToSRV tenha sido relatado em diversas espécies vegetais tanto em plantas cultivadas quanto em plantas daninhas, no Brasil sua ocorrência natural na planta conhecida como maria pretnha (*Solanum americanum*) era desconhecida até o momento. O sequenciamento obtido para o DNA extraído de maria pretnha (código amostral 24), mostraram identidade de sequências de 96,61 e 93,19% para os componentes DNA-A e DNA-B de *Tomato severe rugose virus* (acesso *GenBank*, MT627159.1), respectivamente, confirmando o primeiro relato de infecção natural desse vírus nessa planta daninha no mundo. Vale destacar que o sequenciamento completo do componente DNA-A é imprescindível para confirmação

taxonômica (espécie) dos isolados caracterizados parcialmente neste estudo.

Em tópico de outra dissertação do nosso grupo de pesquisa realizada anteriormente, Batalhon (2021) concluiu que plantas de tomate no estado de Santa Catarina estão infectadas predominantemente por orthotospovírus, possivelmente a espécie *Tomato chlorotic spot virus*, e nas coletas realizadas para esse trabalho não foram observadas a associação de mosca branca as plantas de tomate e plantas daninhas nas áreas visitadas.

A alta variabilidade genética dos begomovírus é refletida na quantidade de espécies descritas (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000), desencadeando dificuldades na adoção de medidas de controle, de eliminação de hospedeiros alternativas, utilização de variedades resistentes e controle do vetor (medida considerada mais importante para o controle de fitovírus).

Um total de 100 moscas-branca individuais oriundas dos cultivos de tomate e pepino no município de Santo Amaro da Imperatriz foram analisadas. Os resultados da Tabela 6 indicam que a espécie de *Bemisia tabaci* MED foi identificada em 17 amostras individuais, enquanto MEAM1 foi identificada em 12 amostras individuais.

Tabela 6 - Espécies de moscas-branca *Bemisia tabaci Middle East-Asia Minor I* (MEAM1) e *Mediterranean* (MED) coletadas em Santa Amaro da Imperatriz-SC, em 2021.

(continua)

Código amostral	Hospedeiro	Grupo	Variedade	Posicionamento geográfico	Nºde MED/ quantidade amostral	Nºde MEAM1/ quantidade amostral
71-80	Tomate	Saladete	SVTh3930	27°42'26.9"S 48°45'13.3"W	1/10 (10%)	2/10 (20%)
81-90	Tomate	Saladete	HS 1188	27°42'26.9"S 48°45'13.3"W	0/10 (0%)	1/10 (10%)
91-100	Tomate	Saladete	HS 1189	27°42'26.9"S 48°45'13.3"W	0/10 (0%)	1/10 (10%)

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Tabela 7 - Espécies de moscas-branca *Bemisia tabaci Middle East-Asia Minor I* (MEAM1) e *Mediterranean* (MED) coletadas em Santa Amaro da Imperatriz-SC, em 2021.

(continuação)

Código amostral	Hospedeiro	Grupo	Variedade	Posicionamento geográfico	Nºde MED/ quantidade amostral	Nºde MEAM1/ quantidade amostral
101-110	Tomate	Salada	Tyson	27°42'26.9"S 48°45'13.3"W	4/10 (40%)	4/10 (40%)

111-120	Tomate	Salada	Tyson	27°42'26.9"S 48°45'13.3"W	3/10 (30%)	4/10 (40%)
121-130	Tomate	Salada	Paron Oxy	27°42'26.9"S 48°45'13.3"W	5/10 (50%)	0/10 (0%)
131-140	Pepino	Japonês	Taiko	27°41'24.0"S 48°44'36.0"W	3/10 (30%)	0/10 (0%)
141-150	Tomate	Salada	Paron Oxy	27°41'24.0"S 48°44'36.0"W	1/10 (10%)	0/10 (0%)
151-160	Pepino	Japonês	Soldier	27°41'15.3"S 48°45'03.8"W	0/10 (0%)	0/10 (0%)
161-170	Pepino	Japonês	Soldier	27°41'15.3"S 48°45'03.8"W	0/10 (0%)	0/10 (0%)

Pois Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

As amostras de mosca-branca que não resultaram em amplificação com utilização dos primers específicos para MED e MEAM1, possivelmente estão relacionadas à *Trialeurodes vaporariorum*, entretanto análises moleculares com utilização de primers específicos serão realizadas para confirmação dessa hipótese.

Desde que MED foi introduzida no Brasil, seu monitoramento tem sido realizado em diversas pesquisas e análises em diferentes localidades. Até o ano de 2018 a referida espécie estava restrita a apenas cultivos ornamentais, sendo encontrada esporadicamente em hortaliças e plantas daninhas no entorno desses cultivos (DE MORAES *et al.*, 2018). Entretanto, surtos de MED em cultivos de pimentões e pepino em casa de vegetação no Paraná e em São Paulo, são relatados nos últimos anos (BELLO *et al.*, 2020)

MED e MEAM1 transmitem com eficiência as principais begomoviroses associadas ao tomateiro. Nogueira (2018) analisando a eficiência de transmissão de ToSRV e ToRMV por MED e MEAM1, tanto em infecções simples quanto mistas, constatou que ToSRV é transmitido com maior eficiência por MED quando em comparação com MEAM1. Embora, Gorayeb (2020) analisando as interações entre begomoviroses e moscas-branca constatou que a relação entre ToSRV e MEAM1 pode ser mais eficiente que ToSRV e MED, visto que o desempenho de MEAM1 foi melhor em plantas daninhas infectadas com ToSRV, enquanto houve diminuição do desempenho MED quando em comparação com plantas saudáveis. Com relação à eficiência de transmissão, MEAM1 mostrou-se mais eficaz em transmitir ToSRV na maioria das combinações de plantas hospedeiras testadas, incluindo de tomate para tomate, o que pode indicar MEAM1 como um vetor de ToSRV com maior importância do que MED (GORAYEB, 2021). Diferentes espécies do complexo *Bemisia tabaci* podem desempenhar papéis distintos na transmissão e epidemiologia de begomovírus ao infectar tomate.

MEAM1 e MED são populações morfologicamente idênticas, entretanto podem

apresentar características biológicas e ecológicas diferentes, além da diferenciação pela análise do DNA mitocondrial do inseto (DE BARRO *et al.*, 2011). MEAM1 relaciona-se principalmente com o aumento da incidência de begomovírus em solanáceas (RIBEIRO *et al.*, 2003), já MED apresenta alta taxa em se tornar resistente a inseticidas (NAUEN; DENHOLM, 2005) e também apresenta menor suscetibilidade às doses dos inseticidas imidacloprid, tiametoxam, entre outros, quando comparado à espécie MEAM1, e ótima adaptação a cultura do pimentão (SUN *et al.*, 2013).

Ainda que existam várias pesquisas relacionadas à ocorrência de *Bemisia tabaci* em vários estados brasileiros (DE BARRO *et al.*, 2011; DE MORAES *et al.*, 2017; MARTINS, 2021; BELLO; WATANABE; FUSCO, 2020; BARROS *et al.*, 2021), são incipientes as informações referentes à ocorrência de MED no Estado de Santa Catarina, com apenas um relato de em plantas ornamentais na cidade de Lages (DE MORAES *et al.*, 2018). Áreas de produção no Estado de Santa Catarina, especificamente no município de Santo Amaro da Imperatriz, se constitui no segundo lugar registrado em que MED saiu das plantas ornamentais e foi encontrada colonizando cultivos comerciais de tomate. Este é o primeiro relato da ocorrência de MED em cultivos comerciais (campo aberto) no Estado de Santa Catarina; no estado de São Paulo, MED foi encontrada principalmente em casas de vegetação (DE MORAES *et al.*, 2018). Esse resultado pode ser útil para melhorar o monitoramento de *Bemisia tabaci* no campo, o que é importante na tomada de decisão de programas de manejo integrado de pragas para essa praga-chave e viroses.

3.5 CONCLUSÕES

- Planta de tomate coletada no litoral do Estado de Santa Catarina estão possivelmente infectadas com um pseudorecombinante de *Euphorbia yellow mosaic virus* e *Tomato severe rugose virus*.
- *Tomato severe rugose virus* é predominante em Santo Amaro da Imperatriz, região do litoral catarinense.
- *Tomato severe rugose virus* infecta a planta daninha maria pretinha (*Solanum americanum*).
- As espécies do complexo *Bemisia tabaci Mediterranean* (MED) e *Middle East-Asia Minor 1* (MEAM1) são ocorrentes em áreas de produção de campo aberto em Santo Amaro da Imperatriz.

4 CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO DE VIROSES EM *Allium ampeloprasum* L.

4.1 RESUMO

O alho-elefante (*Allium ampeloprasum* L.) é uma hortaliça condimentar cultivada por pequenos produtores de base familiar. O manejo dessa cultura é tipicamente manual e os principais problemas residem na ocorrência de doenças provocadas por vírus que afetam expressivamente a produção. Em área experimental do Instituto Federal Catarinense, câmpus Rio do Sul, foi verificada a presença de sintomas típicos de vírus associados a plantas de alho-elefante. Com o objetivo de identificar o agente causal, realizou-se o presente trabalho utilizando-se técnicas biológicas e moleculares. Amostras de plantas com sintomas de viroses foram coletadas e mantidas em casa de vegetação para posteriores análises. Nos testes moleculares, foram empregados iniciadores universais para detecção de espécies pertencentes aos gêneros *Polerovirus*, *Tobamovirus*, *Orthospovirus*, *Potyvirus* e *Crinivirus*. Os fragmentos obtidos foram purificados e sequenciados, revelando a presença dos potyvirus leek yellow stripe virus (LYSV) e onion yellow dwarf vírus (OYDV) e de uma provável nova espécie de polerovirus denominada allium polerovirus A (APVA). Para a caracterização do genoma desses vírus, foi utilizado o sequenciamento de nova geração (*Next generation sequencing* – NGS) a partir de amostras de RNA de fita simples obtido das plantas de alho. Determinou-se a sequência de nucleotídeos e aminoácidos, a organização genômica e o relacionamento filogenético APVA (isolado denominado LAGbr). Este é o primeiro registro de APVA no Brasil e o primeiro relato da ocorrência de LYSV e OYDV em alho-elefante no Brasil.

Palavras-chave: *Allium polerovirus* A. *Potyvirus*. *Allium ampeloprasum*. Diagnose. Sequenciamento de nova geração.

4.2 INTRODUÇÃO

O gênero *Allium* possui cerca de 800 espécies bulbosas caracterizadas em função da alta diversidade quando considera-se aspectos fisiológicos e morfológicos (CECCANTI *et al.*, 2020). Dentre as espécies que compõem o gênero, *Allium ampeloprasum* L., conhecida também como alho-elefante, se assemelha ao alho-poró (*A. ampeloprasum* var. *porrum* L.) e tem sido proposta como um substituto do alho comum (*A. sativum* L.) na culinária, em função do sabor semelhante, com impacto mais leve ao hálito e melhor digestibilidade do que o alho comum,

embora apresente sabor de queimado quando submetido à fritura, podendo ser utilizado como polpa (BLOCK, 2011). A planta é pouco conhecida dentro do sistema produtivo, entretanto apresenta alto potencial industrial devido sua produtividade podendo formar bulbos com até 500 gramas (MARCUIZZO, 2022).

Como na maioria das culturas, com o aumento do consumo há sucessivamente o aumento da produção, o que acarreta o estabelecimento de pragas e doenças que podem causar danos econômicos e sociais (SILVA, 2014). Alho-elefante é extremamente variável, pode ser encontrada como planta selvagem ou planta daninha, em diversas partes do mundo, principalmente no Mediterrâneo (JONES *et al.*, 1963). Nesse contexto, pode servir como fonte de inóculo para cultivos comerciais de espécies de alho.

As viroses compõem a maior problemática do gênero *Allium* a nível global, sendo mais recorrentes em cultivos de alho comum e transmitidas principalmente por meio de material propagativo infectado. As espécies virais que acometem a cultura do alho podem ser de pelo menos cinco diferentes famílias, podendo ocorrer como infecção única ou mista, segundo Van Dijk (1993). Entre os vírus de maior importância, destacam-se as espécies dos gêneros *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus* (FERNANDES; DUSI; RESENDE, 2013).

Onion yellow dwarf virus (OYDV) e leek yellow stripe virus (LYSV) são considerados os potivírus mais importantes para a cultura, com espécies hospedeiras restritas, sendo *Allium cepa* e *A. cepa* var. *ascalonicum* para OYDV e *Allium porrum*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. Quinoa* e *Celosia argentea* para LYSV (PAVAN; SAKATE, 2015). OYDV provoca redução de até 60% na produção de alho (BOS, 1981). Vírus de outras famílias foram encontrados em alho-poró, como é o caso do Iris yellow spot virus (IYSV), um orthotospovirus da família *Tospoviridae*, relatado na Holanda, Alemanha, Reino Unido, Austrália e Brasil (SCHWARTZ; OTTO, 2007).

As estratégias de controle de viroses em alho incluem propagação de plantas livres de vírus, erradicação de plantas infectadas, cultura de meristemas, cultivo intercalado com outras plantas atrativas ao vetor e controle do vetor. Insetos como os pulgões (Hemiptera: Aphididae), tripses (Thysanoptera: Thripidae) transmitem e disseminam esses vírus nas lavouras de forma não persistente. O inseto quando se alimenta de uma planta doente, adquire o vírus e o transmite a outras plantas em segundos, durante a picada de prova (COSTA, 1998).

No Brasil, encontra-se cultivos de dois tipos de alho, o alho semi-nobre e o alho nobre. Na região sul do país cultiva-se comumente o alho nobre. No Estado de Santa Catarina, a cultura do alho teve importância significativa para a economia em 2019, tendo aumento de 15,18% em produtividade no ano de 2020, segundo Toresan *et al.* (2021). O manejo de alho-poró é uma

atividade com alto valor social, fato atribuído ao cultivo em pequenas áreas por agricultura familiar (REIS *et al.*, 2004).

O presente capítulo teve como objetivo caracterizar vírus encontrados em plantas de alho-elefante (*A. ampeloprasum*) advindas de área experimental do município de Rio do Sul (27°12'51"S 49°38'35"W), região do Vale do Itajaí, Santa Catarina, as quais apresentavam sintomas de estrias de coloração clara e mosaico semelhante aos causados por potyvirus. Como benefícios à cultura, tais informações contribuirão para evolução de estratégias de manejo que permitirão atividade da cultura na região, assim como, impulsionará a busca no impedimento da inserção de novos vírus na cultura do alho comum, sendo mediados por alho-elefante, visto que este pode ser considerado uma daninha e dessa forma exercer a função de reservatório viral.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

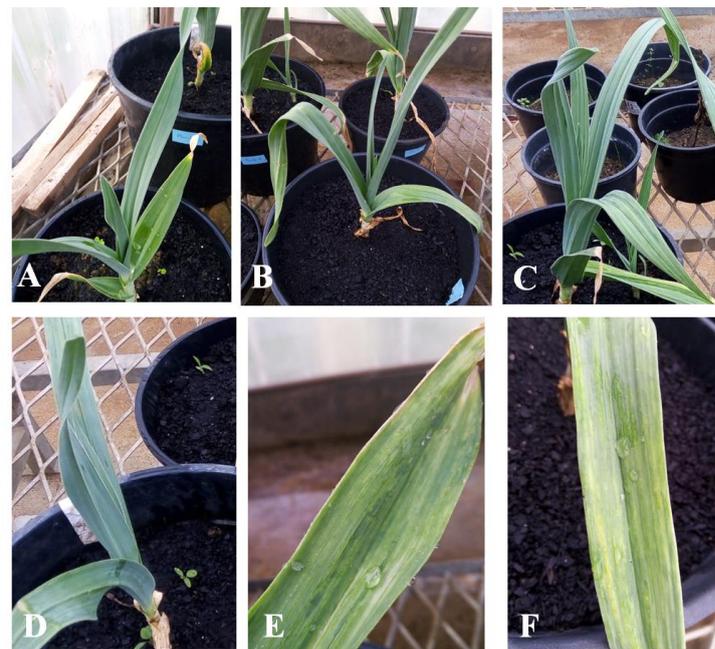
4.3.1 Obtenção das amostras

Em agosto de 2021, plantas de alho-elefante (*A. Ampeloprasum*) apresentando estrias de coloração clara e mosaico (Figura 9), foram coletadas em um campo experimental no Instituto Federal Catarinense (27°11'02.4"S 49°39'36.4"W) no município de Rio do Sul, Santa Catarina.

As seis plantas foram mantidas em vasos contendo mistura de substrato e solo, em casa de vegetação sob condições de temperatura controlada ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC-CAV). Amostras individuais foram coletadas, embaladas em sacos de papel alumínio e armazenadas em ultrafreezer (-80°C), para posterior processamento.

Figura 9 - Sintomas típicos de mosaico em folhas de alho-elefante (*Allium ampeloprasum*) coletadas em Rio do Sul no estado de Santa Catarina. A, B, C, D, E e F – Planta de alho-

elefante 1,2,3,4,5 e 6, respectivamente.



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

4.3.2 Extração de ácidos nucleicos

Os testes moleculares foram realizados no Laboratório de Virologia Vegetal (LVV), do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC-CAV).

Para a caracterização dos vírus com genoma de RNA, aproximadamente 100mg de folhas das plantas coletadas foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e submetidas à extração de RNA total utilizando o reagente Trizol™ (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. A integridade e a quantidade dos ácidos nucleicos extraídos foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% e em quantificador de ácidos nucleicos Nanodrop 2000 (Thermo Fisher).

4.3.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Em microtubos adicionou-se 2 µg de RNA, 0,1µM do oligonucleotideo reverso e água livre de RNase suficiente para completar o volume de 15µl. Os tubos foram incubados a 70°C por 5 min e a 2°C por 2 minutos. Posteriormente, adicionou-se em cada tubo 3µl de água livre de RNase, 5µl de tampão 5x MMLV, 1µl de dNTP's (10µM) e 1µl da enzima RT-MMLV (200u/µL) (Promega), conforme as recomendações do fabricante. Finalmente, os tubos foram incubados a 42°C por 1h.

4.3.4 Reação da Transcriptase Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)

A RT-PCR foi realizada utilizando a enzima GoTaq® Flexi DNA polimerase (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando primers genéricos para a detecção de espécies pertencentes aos gêneros *Polerovirus*, *Tobamovirus*, *Orthospovirus*, *Potyvirus* e *Crinivirus* (Tabela 8) (ROJAS *et al.*, 1993; EIRAS, *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2009; WINTERMANTEL; HLADYK, 2010; LI *et al.*, 2018).

Para o preparo do mix das reações para cada gênero viral, utilizou-se 2,5 µL de tampão (5X) da enzima GoTaq® Flexi DNA polimerase (Promega), 4,0 µL de MgCl₂, 0,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de cada par de iniciadores ('forward' e 'reverse') (10 µM), 0,25 µL da enzima GoTaq® Flexi DNA polimerase (5U/µL) (Promega), 3,25 µL de água livre de nuclease e 1,5 µL de DNA total (20 ng/µL) para um total de 13 µL.

Tabela 8 - Iniciadores utilizados e tamanho dos fragmentos obtidos para os diferentes gêneros testados em alho-elefante.

Oligonucleotídeos	Sequência*	Fragmento esperado(pb)
<i>Potyvirus</i>		
NIB2F	5' GTITGYGTIGAYGAYTTYAAAYAA 3'	350
NIB3R	5' TCIACIACIGTIGAIGGYTGNC 3'	
<i>Orthospovirus</i>		
BR60	5' CCCGGATCCTGCAGAGCAATTGTGTCA 3'	453
BR65	5' ATCAAGCCTTCTGAAAGTCAT 3'	
<i>Polerovirus</i>		
Pol-G-F	5' GAYTGCTCYGGYTTYGACTGGAG 3'	1100
Pol-G-R	5' GATYTTATAYTCATGGTAGGCCTTGAG 3'	
<i>Tobamovirus</i>		
TobamodF	5' TKGAYGGNGTBCCNGGNTGYGG 3'	880
TobamodR	5' ACNGAVTBNABCTGTAATTGCTAT 3'	
<i>Crinivirus</i>		
CriniRDRP 251 F	5' TNGGNAARGGNGARAG 3'	744
CriniRDRP 995R	5' GTRTTNGAYAACCAHGTRTTHG 3'	

* H = A+C+T, I=deoxyinosine, N=A+C+G+T, R= A+G, V= A+C+G, Y=C+T, K=G+T.

Fonte: (ROJAS *et al.*, 1993; EIRAS, *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2009; WINTERMANTEL; HLADYK, 2010; LI *et al.*, 2018).

A programação utilizada para *Potyvirus* consistiu em um pré-aquecimento até 94 °C por dois minutos, seguido de 35 ciclos de: 45 segundos a 94 °C (desnaturação); 45 segundos a 45 °C (anelamento); e 45 segundos a 72 °C (extensão), realizando a extensão final a 72 °C por

cinco minutos (ZHENG *et al.*, 2009).

Para amplificação de *Orthospovirus* foi utilizada a seguinte programação: pré-aquecimento até 94 °C por cinco minutos, seguido de 30 ciclos de: 1 minuto e 50 segundos a 94 °C (desnaturação); 60 segundos a 55 °C (anelamento); e 60 segundos a 72 °C (extensão), realizando a extensão final a 72 °C por sete minutos (EIRAS *et al.*, 2001).

Para a detecção de espécies do gênero *Crinivirus* utilizou-se a programação de: pré-aquecimento até 95 °C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos de: 45 segundos a 95 °C (desnaturação); 30 segundos a 52 °C (anelamento); e 60 segundos a 72 °C (extensão), realizando a extensão final a 72 °C por dez minutos (WINTERMANTEL; HLADYK, 2010).

A programação utilizada para *Polerovirus* foi: pré-aquecimento até 94 °C por cinco minutos, seguido de 40 ciclos de: 30 segundos a 94 °C (desnaturação); 1 minuto e 10 segundos a 60 °C (anelamento); e 60 segundos a 72 °C (extensão), realizando a extensão final a 72 °C por sete minutos (KNIERIM *et al.*, 2013).

Para amplificação de *Tobamovirus* foi utilizada a seguinte programação: pré-aquecimento até 94 °C por cinco minutos, seguido de 40 ciclos de: 30 segundos a 94 °C (desnaturação); 30 segundos a 40 °C (anelamento); e 60 segundos a 72 °C (extensão), realizando a extensão final a 72 °C por sete minutos (LI *et al.*, 2018).

Os produtos da RT-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,0 %), corados com GelRed (Biotium), visualizados sobre luz UV e fotografados. Após a verificação do produto de RT-PCR, os fragmentos de DNA amplificados com o tamanho esperado, foram purificados conforme Sambrook e Russell (2001) com algumas modificações: a 100 µl do produto foram acrescentados 10 µl de acetato de sódio (3M, pH5,2) e em seguida 300 µl de etanol absoluto gelado (proporção 30:1 de [etanol absoluto]:[acetato de sódio 3M]). As amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas por 15 min a temperatura ambiente, seguidas de centrifugação por 20 min/17000rpm a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e em seguida foi ressuspenso em 50 µl de água ultrapura livre de DNases e RNases.

Após análise do produto em gel de agarose, os fragmentos de DNA purificados das amostras 2, 3, 4, 5 e 6 foram enviados para sequenciamento Sanger (ACTGene Análises moleculares LTDA), utilizando os iniciadores correspondentes para cada fragmento amplificado, conforme Tabela 8. As sequências obtidas foram comparadas com sequências disponíveis no *GenBank* usando a ferramenta BLAST disponível em (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.3.5 Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e análises de bioinformática

A partir da comparação com sequências disponíveis no *GenBank* para determinação da

identidade de nucleotídeos obtida no sequenciamento de Sanger, uma amostra composta de RNA das amostras 2, 3 (positivas para dois potyvirus) e 6 (positiva para um possível polerovirus), foi enviada para o sequenciamento de nova geração na Macrogen Inc. (Seul, Coreia do Sul).

As leituras (*reads*) do sequenciamento NGS foram gerados a partir de uma biblioteca de DNA complementar (cDNA), utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2500 (Proteimax Biotecnologia). A qualidade da biblioteca de cDNA foi verificada e os adaptadores e leituras de baixa qualidade foram removidos com auxílio da ferramenta BBDUK versão 37.28 contida no software Geneious versão 11.0.5 (Newark, NJ, EUA) e mapeados usando a ferramenta 'Map to Reference' também contida no mesmo software, utilizando as sequências completas dos genomas do leek yellow stripe virus (LYSV, acesso *GenBank* KP258216), onion yellow dwarf virus (OYDV, MC-005029) e allium polerovirus A (APVA, MH898527) como referência.

4.3.6 Filogenia

Para determinar o relacionamento filogenético do isolado de APVA, a sequência completa de amino-ácidos da capa proteica (CP) desse vírus foi utilizada juntamente com as CPs traduzidas de representantes de todas as espécies virais contidas na família *Solemoviridae*. A árvore filogenética foi construída com o método de máxima verossimilhança contido no programa MEGA 11 (TAMURA *et al.*, 2021), utilizando o modelo proposto por Le e Gascuel (2008), distribuição gama (G) e sítios invariantes (I). A robustez de cada ramo interno da árvore foi estimada a partir de 1000 réplicas de bootstrap utilizando 53 sequências de aminoácidos da CP. Os alinhamentos utilizados para a filogenia foram realizados com a ferramenta MUSCLE disponível no programa MEGA 11 (TAMURA *et al.*, 2021).

Para verificar o relacionamento filogenético do isolado de APVA caracterizado nesse estudo foram utilizadas espécies virais da família *Solemoviridae* (Gêneros *Polerovirus*, *Polemovirus*, *Sobemovirus* e *Enamovirus*). Os seguintes membros da família *Solemoviridae* foram utilizados: brassica yellows virus (BrYV, acesso *GenBank* NC_016038), turnip yellows virus (TuYV, NC_003743), tobacco vein distorting virus (TVDV, NC_010732), sugarcane yellow leaf virus (ScYLV, NC_000874), suakwa aphid-borne yellows virus (SabYV, NC_018571), pumpkin polerovirus (PuPV, MG800833), potato leafroll virus (PLRV, D13954), pepper vein yellows virus 6 (PeVYV-6, LT559483), pepper vein yellows virus 5 (PeVYV-5, NC_036803), pepper vein yellows virus 4 (PeVYV-4, KU999109), pepper vein yellows virus 3 (PeVYV-3, KP326573), pepper vein yellows virus 2 (PeVYV-2, HM439608), pepper vein

yellows virus 1 (PeVYV-1, NC_015050), pepper aphid-borne yellows virus (PABYV, NC_030225), melon aphid-borne yellows virus (MABYV, NC_010809), maize yellow mosaic virus (MaYMV, NC_029990), maize yellow dwarf virus RMV (MYDV-RMV, NC_021484), faba bean polerovirus 1 (FBPV1, NC_008249), cucurbit aphid-borne yellows virus (CabYV, NC_003688), cotton leafroll dwarf virus (CLDV, NC_014545), chickpea chlorotic stunt virus (CpCSV, NC_008249), cereal yellow dwarf virus RPV (CYDV-RPV, NC_004751), cereal yellow dwarf virus RPS (CYDV-RPS, NC_002198), carrot red leaf virus (CtRLV, NC_006265), beet western yellows virus (BWYV, NC_003491), beet mild yellowing virus (BMYV, NC_004756), beet chlorosis virus (BChV, NC_002766), velvet tobacco mottle virus (VTMoV, NC_014509), turnip rosette virus (TroV, NC_004553), subterranean clover mottle virus (SCMoV, NC_004346), soybean yellow common mosaic virus (SYCMV, NC_016033), sowbane mosaic virus (SoMV, NC_011187), southern cowpa mosaic virus (SCPMV, NC_001625), southern bean mosaic virus (SBMV, NC_004060), solanum nodiflorum mottle virus (SNMoV, NC_033706), sesbania mosaic virus (SeMV, NC_002568), reyegrass mottle virus (RGMoV, NC_003747), rottboellia yellow mottle virus (RoMoV, NC_027198), rice yellow mottle virus (RYMV, NC_001575), physalis rugose mosaic virus (PhyRMV, MK681145), papaya lethal yellowing virus (PLYV, NC_018449), lucerne transient streak virus (LTSV, NC_001696), imperata yellow mottle virus (IYMV, NC_011536), cymbidium chlorotic mosaic virus (CyCMV, NC_027123), cocksfoot mottle virus (CfMV, DQ680848), cocksfoot mottle virus (CfMV, NC_002618), blueberry shoestring virus (BSSV, NC_029578), artemisia virus A (ArtVA, NC_017914), pea enation mosaic virus 1 (PEMV1, HM439775), grapevine enamovirus 1 (GEV1, KX645875), citrus vein enation virus (CVEV, NC_021564), alfalfa enamovirus 1 (AEV1, NC_029993), poinsettia latent virus (PnLV, NC_011543) (ICTV, 2022).

4.3.7 Teste biológico – Gama de hospedeiros

Para a realização do teste de gama de hospedeiros utilizou-se o extrato vegetal tamponado [tampão fosfato de sódio 0,02 M (pH 7,0), acrescido de sulfito de sódio 0,02 M] acrescido de carvão ativado, contendo fragmentos das plantas de alho-elefante 2, 3 e 6 infectadas com LYSV, OYDV e APVA, respectivamente.

Para LYSV e OYDV, foram realizados testes de gama de hospedeiros contendo as seguintes espécies vegetais: *Glycine Max*, *Nicotiana tabacum* (cvs. ‘Havana’; ‘TNN’), *Nicotiana turkish*, *Nicotiana clevelandii*, *Physalis peruviana*, *Solanum lycopersicum* (cvs.

‘Santa Clara’), *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Vigna unguiculata*, *Allium schoenoprasum*, *Allium ampeloprasum* var. *porrum* e *Allium Cepa*.

Para APVA, o teste biológico foi realizado com as espécies indicadoras: *Glycine Max*, *Nicotiana tabacum* cv. ‘TNN’, *Solanum lycopersicum* (cvs. ‘Santa Clara’), *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Vigna unguiculata*, *Allium schoenoprasum*, *Allium ampeloprasum* var. *porrum* e *Allium Cepa*.

Após a expansão completa de quatro folhas verdadeiras, cada espécie indicadora foi inoculada em triplicata por meio de inoculação via extrato vegetal tamponado, o extrato bruto foi esfregado suavemente com uma gaze em duas folhas mais jovens totalmente expandidas. O controle negativo foi feito em duplicata para cada hospedeiro testado, consistindo de inoculações apenas com o tampão (sem inóculo). As plantas foram acondicionadas em vasos de 2 L contendo mistura de substrato e solo, com as seguintes características: pH-H₂O, 6.0; M.O.: 7.9%; P: 355,2 mg/dm³; Ca: 7.24 cmolc/dm³; Mg: 2.89 cmolc/dm³; K: >400 mg/dm³ e Al: 0.0 cmolc/dm³. As plantas do teste de gama de hospedeiros foram mantidas em casa de vegetação sob temperatura de 24°C (±7°C) e avaliadas semanalmente quanto à manifestação de sintomas, durante um mês.

Decorridos 30 dias da inoculação foram geradas amostras compostas de cada espécie vegetal inoculada, as quais foram submetidas à extração de ácidos nucleicos com Trizol™ (Invitrogen), à síntese de DNA complementar conforme item 4.3.3, à reação em cadeia da polimerase com utilização dos oligonucleotídeos NIB2F/NIB3R para potyvírus e Pol-G-F/Pol-G-R para polerovírus, e à observação dos produtos de RT-PCR em gel de agarose (1,0%).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

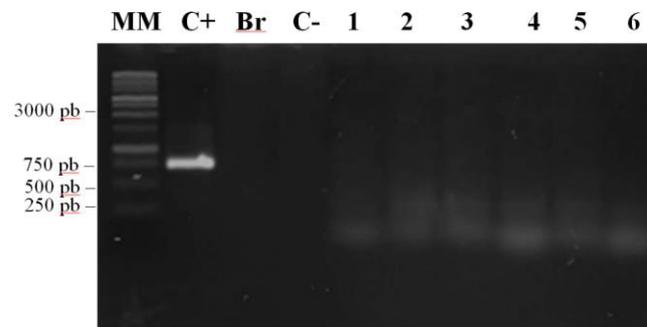
As RT-PCRs utilizando os oligonucleotídeos universais TobamodF/TobamodR, BR60/BR65, CriniRdRp 251F/CriniRdRp não detectaram as espécies virais dos gêneros: *Tobamovirus* (Figura 10), *Orthospovirus* (

Figura 11) e *Crinivirus* (Figura 12), respectivamente.

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da RT-PCR para a detecção de espécies do gênero *Tobamovirus*, utilizando os oligonucleotídeos TobamodF e TobamodR.

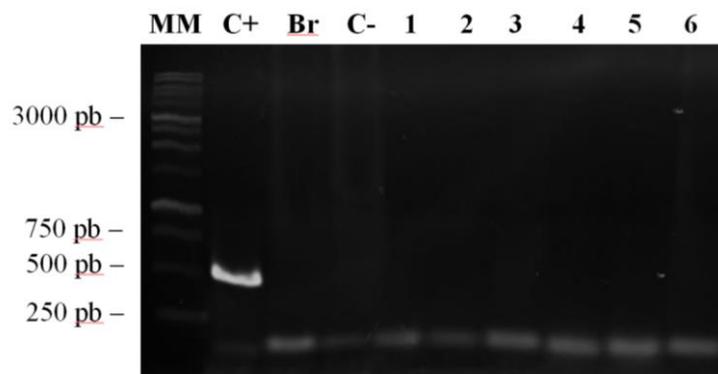
MM: marcador molecular 1kb (Promega); C+: controle positivo (cDNA obtido a partir de RNA total de planta sabidamente infectada por tobamovírus; C-: controle negativo (planta

sadia, sem sintomas); Br: branco; 1 – 6: plantas de alho-elefante sintomáticas oriundas de Rio do Sul, SC.



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

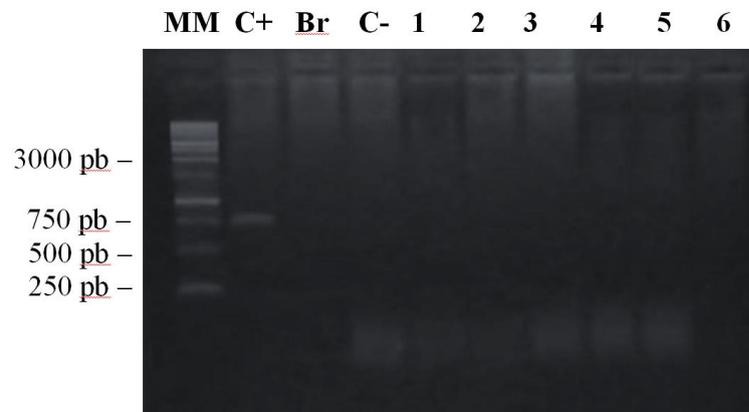
Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da RT-PCR para a detecção de espécies do gênero *Orthotospovirus*, utilizando os oligonucleotídeos BR60 e BR65. MM: marcador molecular 1kb (Promega); C+: controle positivo (cDNA obtido a partir de RNA total de planta sabidamente infectada por orthotospovírus; C-: controle negativo (planta sadia, sem sintomas); Br: branco; 1 – 6: plantas de alho-elefante sintomáticas oriundas de Rio do Sul, SC.



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da RT-PCR para a detecção de espécies do gênero *Crinivirus*, utilizando os oligonucleotídeos CriniRdRp 251F e CriniRdRp 995R. MM: marcador molecular 1kb (Promega); C+: controle positivo (cDNA obtido a partir de RNA total de planta sabidamente infectada por crinivírus; C-: controle

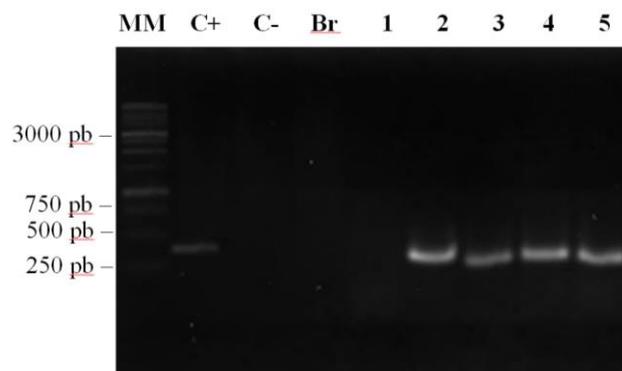
negativo (planta sadia, sem sintomas); Br: branco; 1 – 6: plantas de alho-elefante sintomáticas oriundas de Rio do Sul, SC.



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Em contrapartida, ampliações foram observadas para os gêneros *Potyvirus*, com um fragmento de cerca de 350pb para as amostras 2, 3, 4 e 5 (Figura 13); e para o gênero *Polerovirus*, com um fragmento de aproximadamente 1100pb para a amostra 6 (Figura 14).

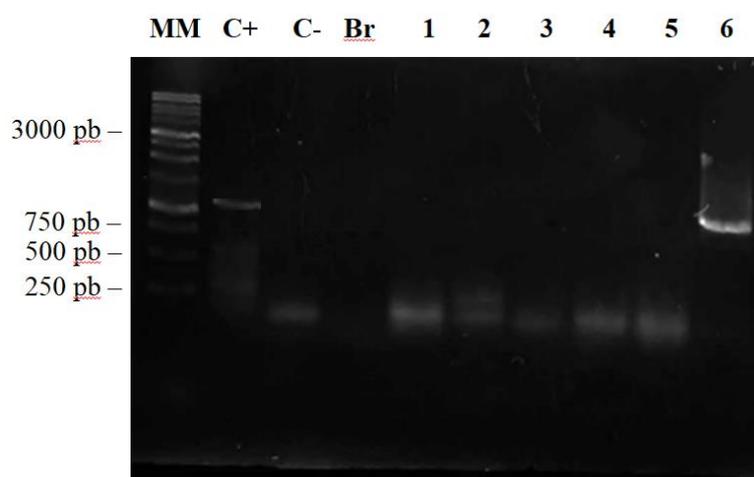
Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da RT-PCR para a detecção de espécies do gênero *Potyvirus*, utilizando os oligonucleotídeos NIB2F e NIB2R. MM: marcador molecular 1kb (Promega); C+: controle positivo (cDNA obtido a partir de RNA total de planta sabidamente infectada por potivírus; C-: controle negativo (planta sadia, sem sintomas); Br: branco; 1 – 6: plantas de alho-elefante sintomáticas oriundas de Rio do Sul, SC.



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da RT-PCR para a detecção de espécies do gênero *Polerovirus*, utilizando os oligonucleotídeos Pol-G-F e Pol-G-R. MM: marcador molecular 1kb (Promega); C+: controle positivo (cDNA obtido a partir de RNA total de planta sabidamente infectada por polerovírus; C-: controle negativo (planta sadia, sem

sintomas); Br: branco; 1 – 6: plantas de alho-elefante sintomáticas oriundas de Rio do Sul, SC.



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Após o sequenciamento e análise dos fragmentos amplificados nas reações de RT-PCR foram determinadas as identidades de nucleotídeos (Tabela 7).

Tabela 9 - Porcentagem de identidade entre sequências de nucleotídeos dos fragmentos de vírus obtidos dos gêneros *Potyvirus* e *Polerovirus* depositados no *GenBank*.

Código amostral	Espécie	Código GenBank	Isolado viral	Origem	Identidade(%)
2	<i>Leek yellow stripe virus</i>	KP258216	Brasil	Brasil	90,14
3	<i>Onion yellow dwarf virus</i>	JN127343	Austrália	Austrália	89,67
4	<i>Leek yellow stripe virus</i>	KF597285	LYSV-SW10	Austrália	93,52
5	<i>Leek yellow stripe virus</i>	MN059547	LYSV-G110	Coréia do Sul	93,77
6	<i>Allium polerovirus A</i>	MH898527	Won	Coréia do Sul	93,74

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

A partir das sequências consenso geradas para cada amostra (sequenciamento utilizando os iniciadores *forward* e *reverse*, obteve-se para a amostra de código 2 90,14% de identidade com LYSV (acesso no *GenBank* KP258216, isolado do Brasil). Para a amostra 3, um fragmento de 369nt apresentou identidade de 89,67% com OYDV (acesso no *GenBank* JN127343, isolado da Austrália). Os resultados de sequenciamento obtidos para as amostras 4 e 5 apresentaram 93,52 e 93,77 % de identidade com LYSV isolados da Austrália e Coréia do Sul (KF597285 e MN059547), respectivamente. Para a amostra 6, o fragmento obtido no sequenciamento de

tamanho 1054nt apresentou 93,74 % de identidade com APVA (MH898527, isolado da Coréia do Sul).

Os resultados apresentados neste estudo demonstraram a presença de duas espécies pertencentes ao gênero *Potyvirus* infectando pela primeira vez alho-elefante no Brasil. Adicionalmente, foi detectada a espécie tentativa *Allium polerovirus A*, a qual apenas possui uma sequência completa depositada no *GenBank*, originária da Coreia do Sul em plantas de alho poró, mas que ainda não foi caracterizada nem relatada no Brasil.

As informações de espécies de vírus ocorrentes na referida cultura são escassas, pois se fundamentam principalmente em métodos tradicionais de detecção. Contudo, doenças de etiologia viral, têm causado danos significativos em campos de produção. O conhecimento atual da diversidade de espécies virais que infectam plantas de alho-elefante ainda é relativamente limitado e necessita de mais investigações, especialmente em alho-elefante.

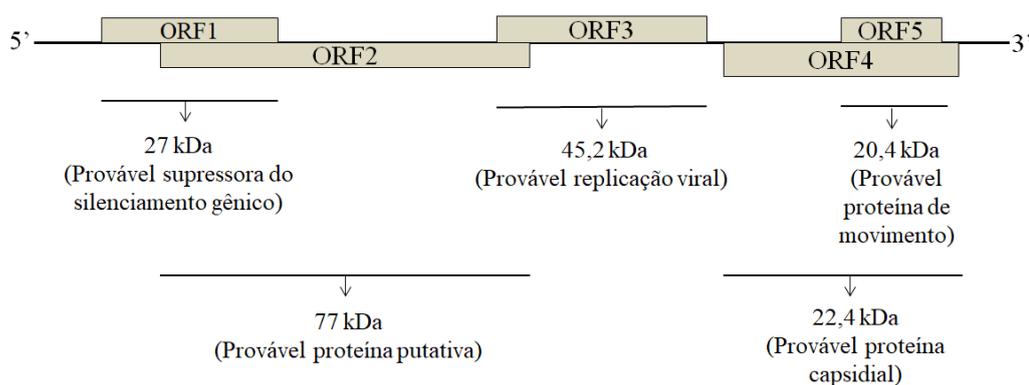
Viroses do gênero *Potyvirus* têm sido frequentemente relatadas em infecções mistas (CONCI; CANAVELLI; LUNELO, 2003; MELO-FILHO *et al.*, 2004; VIEIRA, 2012) em regiões da Argentina e do Brasil. Fayad-André (2010) executou um levantamento sobre a ocorrência das espécies do complexo viral em cinco regiões produtoras de alho no Brasil. Os *Potyvirus* OYDV e LYSV foram prevalentes em quatro regiões, inclusive na região produtora de alho “nobre” no Sul do Brasil.

A partir do sequenciamento de nova geração foram gerados 49.208.894 milhões de leituras de 150 pares de base (reads). As amostras apresentaram um bom rendimento, considerando o número total de bases sequenciadas, número total de leituras e também apresentaram conteúdo CG/AT dentro do esperado. Adicionalmente, os parâmetros relativos a qualidade foram superiores a 99%, indicando excelente qualidade no NGS (dados não mostrados). Com a utilização do software Bbduk, foi realizada a eliminação dos reads de baixa qualidade e adaptadores mantendo somente reads com tamanho maior que 30 pb, resultando em 43.866.110 reads.

O mapeamento realizado com a ferramenta ‘Map to Reference’ usando a sequência de *allium polerovirus A* (APVA, MH898527), resultou em um pareamento de 1.969.818 reads que cobriram 100% da sequência de referência, gerando um genoma de 4.349 nts com organização genômica idêntica à descrita para o isolado da Coréia do Sul, composto por cinco fases abertas de leitura (ORFs): ORF1, ORF2, ORF3, ORF4 e ORF5 (Figura 15), todas iniciando com códons normais de iniciação (AUG) e terminação (UAG, UAA, UGA). As regiões não traduzidas 5’ e 3’ (UTRs) tem 12nt e 38 nt, respectivamente. A ORF1 se inicia no nucleotídeo 12 e vai até o nucleotídeo 743, apresentando 93,8% de identidade de aminoácidos com a proteína P0 (27 kDa)

de APVA e 69% de identidade com P0 de *Brassica yellows virus*. Para espécies virias já caracterizadas, essa região codifica uma proteína associada à supressão do silenciamento gênico (ZHANG *et al.*, 2021; XIANG *et al.*, 2011). A ORF2 se estende do nt 148 até o nt 2238, e possui identidade de aminoácidos de 92,7% com a proteína putativa P1 (77 kDa) do APVA e 70% com a proteína putativa P1 de *Tabacco vein distorting virus* e *Suaeda polerovirus A* (MO; CHEN; CHEN, 2010). A ORF3 tem 1211nt de tamanho (posição 2301-3512 nt) e possui 99,1% de identidade com P2 (45,2 kDa) de APVA e 90,3% de identidade com a proteína de fusão P2 de *Turnip mosaic virus* e *Brassica yellows virus*. A proteína P2 está relacionada com as atividades de Replicação viral (ZHANG *et al.*, 2021). A ORF4 se inicia na posição 3714 e termina na posição 4322, possuindo 97,8% com a provável proteína capsidial (CP, 22,4 kDa) de APVA e 71,4% de identidade com a CP de *Beet western yellows virus* (BEUVE; LEMAIRE, 2002). A ORF5 encontra-se incorporada no segmento do gene ORF4, mas em uma fase de leitura diferente (-2), estando entre os nucleotídeos 3745 até o 4290, e codifica uma proteína com função provável de movimento célula a célula. Essa região possui 97,2% de identidade a provável proteína de movimento (20,4 kDa) de APVA e 74% de identidade com a P4 do *Cotton leafroll dwarf virus* (DISTÉFANO; KRESIC; HOPP, 2010) e do *Beet western yellows virus* (BEUVE; LEMAIRE, 2002).

Figura 15 - Organização genômica do isolado de allium polerovirus A descrito nesse estudo. As ORFs estão demonstradas pelos retângulos e as proteínas traduzidas pelas linhas sólidas, com suas respectivas massas moleculares (kDa).



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

O isolado de APVA caracterizado neste estudo é muito semelhante ao isolado Won da Coreia do Sul previamente disponibilizado no *GenBank* (MH898527, 93,4% de identidade de nt na comparação de todo o genoma). Dentre os critérios de demarcação de espécies dentro do gênero *Polerovirus*, emprega-se a diferença superior a 10% de identidade da sequência em

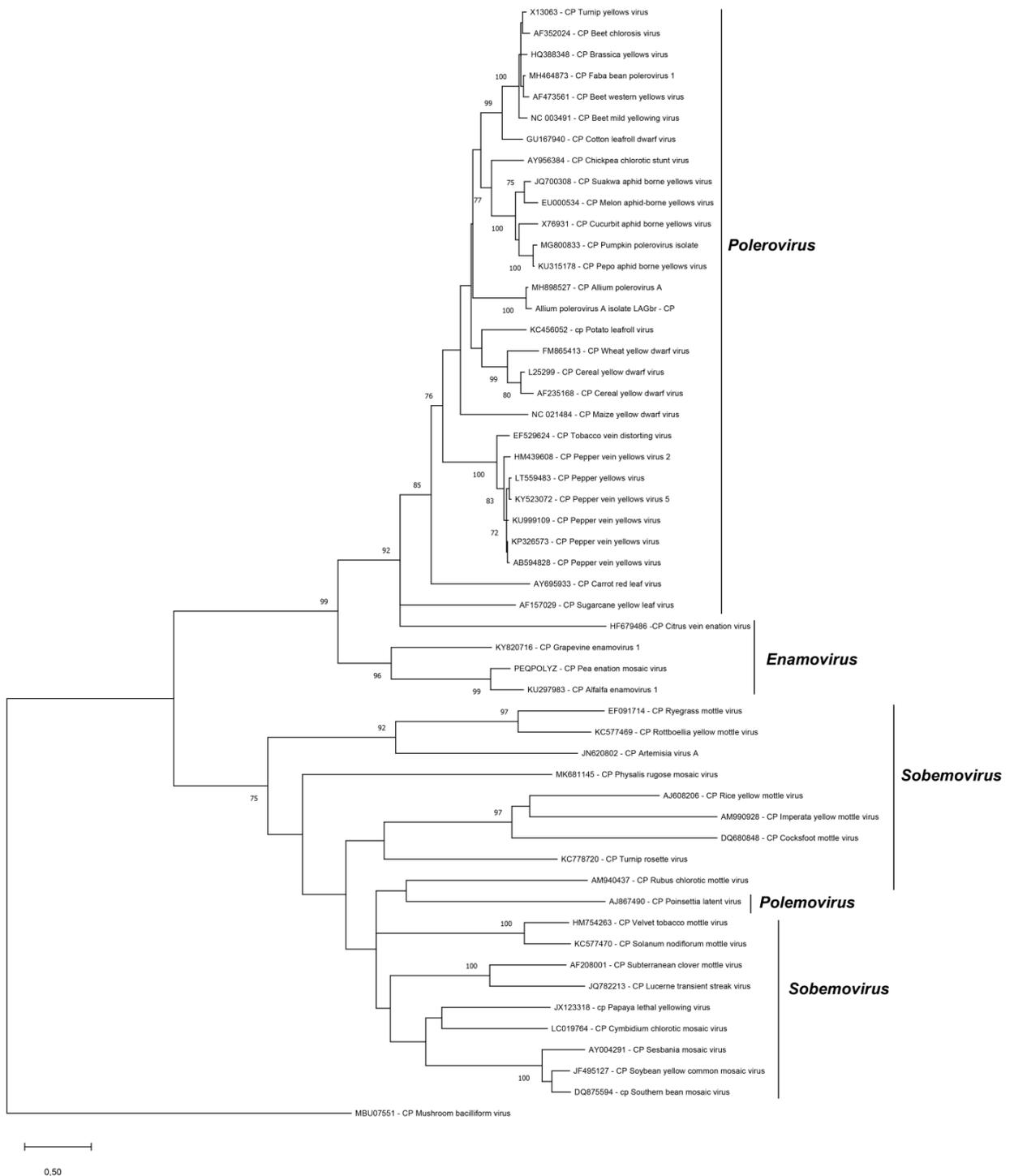
aminoácido de qualquer gene (VEERAKONE *et al.*, 2015), confirmando a etiologia do vírus caracterizado neste estudo.

Para melhor caracterizar o isolado de APVA foi determinado o relacionamento filogenético baseado na CP de diferentes espécies. A árvore gerada indicou que o isolado está relacionado com espécies virais da família *Solemoviridae* (Porém, pode-se observar que o isolado brasileiro, juntamente ao isolado da Coreia do Sul, estão relacionadas entre si dentro do gênero *Polerovirus*, com forte suporte de bootstrap. A topologia observada na árvore filogenética, bem como os dados de sequências e organização genômica sugerem que APVA isolado LAGbr pertence ao gênero *Polerovirus*. A análise filogenética baseada na sequência de aminoácidos da CP indicou uma estreita relação entre os isolados, corroborando com os dados de análise de sequências e suportando a ideia que o isolado viral descrito nesse trabalho pertence à mesma espécie.

Figura 16). Porém, pode-se observar que o isolado brasileiro, juntamente ao isolado da Coreia do Sul, estão relacionadas entre si dentro do gênero *Polerovirus*, com forte suporte de bootstrap. A topologia observada na árvore filogenética, bem como os dados de sequências e

organização genômica sugerem que APVA isolado LAGbr pertence ao gênero *Polerovirus*. A análise filogenética baseada na sequência de aminoácidos da CP indicou uma estreita relação entre os isolados, corroborando com os dados de análise de sequências e suportando a ideia que o isolado viral descrito nesse trabalho pertence à mesma espécie.

Figura 16 - Relacionamento filogenético baseado no alinhamento das sequências de aminoácidos da capa proteica de membros da família Solemoviridae. A árvore filogenética foi construída com o método de máxima verossimilhança implementado no programa MEGA 11 (TAMURA et al., 2021) com o modelo Le Gascuel 2008 (LE; GASCUEL, 2008). Os números nos ramos indicam os valores de bootstrap. Os alinhamentos foram realizados com a ferramenta MUSCLE.



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

O mapeamento dos reads usando o potyvírus leek yellow stripe vírus (LYSV) (KP258216) como referência resultou em um pareamento de 1.586.467 reads. O genoma obtido possui 10.342 nts, excluindo-se a cauda poli A, contendo apenas uma fase aberta de leitura, com início em um códon de iniciação AUG (nt 83) e final em um códon de parada UGA (nt 9784) e codificando uma poliproteína de aproximadamente 364 kDa, que apresenta nove sítios de clivagem dando origem a dez proteínas: P1, HC-PRO, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa- VPg, Nia-

Pro, NIB e CP. As regiões não traduzidas 5' e 3' (UTRs) tem 82nt e 594 nt, respectivamente.

A seguir serão descritas as características estruturais das regiões codificadoras do isolado de LYSV caracterizado nesse estudo, bem como as funções das proteínas maduras (baseado em trabalhos de caracterização funcional de proteínas e informações acumuladas ao longo de décadas para os vírus do gênero *Potyvirus*. A P1(47,8 kDa) inicia no aminoácido (aa) 1 e vai até o aminoácido 430, desempenha um papel significativo na replicação do vírus provavelmente devido à estimulação do gene supressor de silenciamento HC-Pro. Um domínio de serina protease em direção ao terminal C cliva o P1 da poliproteína, tipicamente em Tyr/Phe-Ser. A proteína HC-Pro (51,7 kDa) com início no aminoácido 431 e término no aminoácido 886, tem funções na supressão do silenciamento gênico e na transmissão vetorial, um domínio de protease de cisteína em direção ao terminal C o cliva do restante da poliproteína a jusante, tipicamente em Gly-Gly. A P3 possui 41,4 kDa e início no 887aa e término no 1245aa, envolvida na replicação do vírus e parece ser significativo na gama de hospedeiros e no desenvolvimento de sintomas. A proteína 6K1 possui 5,9 kDa e tem início no aminoácido 1246 e término no aminoácido 1297, apesar de que esta proteína esteja presente no complexo de replicação e seja necessária para a replicação, a função dessa proteína não é conhecida. CI (71,77 kDa) têm início no aminoácido 1298 e término no aminoácido 1932, possui atividade de helicase e se acumula em corpos de inclusão no citoplasma de células vegetais infectadas. 6K2 com 5,98kDa, se inicia no aminoácido 1933 e termina no aminoácido 1985, uma pequena proteína transmembrana provavelmente ancorando o complexo de replicação ao RE. A proteína NIa- VPg possui 21,84 kDa tem início no aminoácido 1986 e término no aminoácido 2177. A Nia-Pro (27,9 kDa) com início no 2178 e término no 2419 aminoácidos, protease de cisteína semelhante à serina responsável pela clivagem da maioria dos locais na poliproteína, tipicamente em Gln/Glu-Ser/Gly/Ala (ADAMS *et al.*, 2005). NIB possui 58,5 kDa com início no aminoácido 2420 e término no aminoácido 2932, com um domínio de RNA polimerase dependente de RNA (RDRP). CP possui 32,1 kDa com início e término nos aminoácidos 2933 e 3221, respectivamente, proteína de revestimento viral que também desempenha papéis no movimento do vírus, na amplificação do genoma e na transmissão vetorial (ICTV, 2022).

O mapeamento usando a sequência de Onion yellow dwarf vírus (OYDV) (NC_005029) resultou em uma sequência composta por 10.820.869 reads sobrepostos. A sequência genômica aqui caracterizada possui 10.532 nts, excluindo-se a cauda poli A, com organização genômica similar à descrita para o isolado da Austrália (JN127343), depositada no *GenBank*. Foi possível obter 98,6% de cobertura da sequência (o segmento faltante compreende do 691 nt ao 906 nt, correspondente a parte de P1). A sequência é composta por apenas uma fase aberta de leitura,

com início no nt 114 e com término no nt 10323 (10532 nts de tamanho), com códon de iniciação AUG e códon de parada UAG, codifica uma poliproteína de aproximadamente 380 kDa, que com nove sítios de clivagem se divide em dez proteínas: P1, HC-PRO, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa- VPg, Nia-Pro, NIB e CP. As regiões não traduzidas 5' e 3' (UTRs) tem 113nt e 210 nt, respectivamente. A P1(53,6 kDa) inicia no aminoácido (aa) 1 e vai até o aminoácido 459. A proteína HC-Pro (52,7 kDa) com início no aminoácido 460 e término no aminoácido 919. A P3 possui 60,8 kDa e início no 920 aa e término no 1448aa.

A PIPO (ORF- 'Pretty Interesting Potyvirus') incorporada no cístron P3 expresso como a proteína P3N-PIPO por um mecanismo de deslizamento da polimerase (CHUNG *et al.*, 2008; OLSPERT *et al.*, 2015; RODAMILANS *et al.*, 2015), inicia com o códon AUG e termina com o códon UAG, com 8,66 kDa (3887 a 4120 nt), se mostra essencial para o movimento intercelular de vírus. A proteína 6K1 possui 5,8 kDa e tem início no aminoácido 1449 e término no aminoácido 1500. A CI (71,3 kDa) têm início no aminoácido 1501 e término no aminoácido 2137 (helicase). 6K2 com 6kDa, se inicia no aminoácido 2138 e termina no aminoácido 2190. A proteína NIa- VPg possui 22,2 kDa tem início no aminoácido 2191 e término no aminoácido 2386. A Nia-Pro (27,4 kDa) com início no 2387 e término no 2628 aminoácido. NIB possui 53,7 kDa com início no aminoácido 2629 e término no aminoácido 3145 (RDRP). CP possui 26,45 kDa com início e término nos aminoácidos 3147 e 3402 (ICTV, 2022).

A caracterização biológica, baseada no teste de gama de hospedeiros, é capaz de fornecer informações de suma importância para o aprofundamento do conhecimento de espécies virais. Neste trabalho, a caracterização biológica foi realizada em conjunto com a caracterização molecular visando estudar as reações das espécies vegetais inoculadas mecanicamente com as três espécies virais encontradas infectando plantas de alho-elefante.

As plantas de alho-elefante coletadas no município de Rio do Sul apresentavam sintomas típicos conhecidos como complexo do alho, que são estrias com coloração verde clara e amarela. A maioria das plantas indicadoras inoculadas com extrato vegetal tamponado não produziram sintomas (Tabela 10), porém em algumas plantas ocorreu manifestação de sintomas aos 21 ± 2 dias após a inoculação.

Tabela 10 - Descrição dos sintomas induzidos pelos vírus leek yellow stripe virus (LYSV), onion yellow dwarf virus (OYDV) e allium polerovirus A, em diferentes plantas indicadoras. AM: Amarelecimento; CLR: Clareamento de nervura; DF: Deformação foliar; MSQ: Mosqueado; -- :Ausência de sintomas; +: RT-PCR positiva; -: RT-PCR negativa.

(continua)

Família, Espécie e cultivar	LYSV			OYDV			<i>Allium polerovirus A</i>		
	Sintoma observado	Plantas sintomáticas/ Plantas inoculadas	Resultado RT-PCR	Sintoma observado	Plantas sintomáticas/ Plantas inoculadas	Resultado RT-PCR	Sintoma observado	Plantas sintomáticas/ Plantas inoculadas	Resultado RT-PCR
Fabaceae									
<i>Glicine max</i> 'codetec RR'	--	0/3	-	--	0/3	-	--	0/3	-
<i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i>	MSQ	2/3	-	--	0/3	-	--	0/3	-
<i>Pisum sativum</i>	--	0/3	-	--	0/3	-	--	0/3	-
<i>Vigna</i> <i>unguiculata</i>	--	0/3	-	DF	3/3	-	MO; DF	3/3	-
Solanaceae									
<i>Nicotiana</i> <i>tabacum</i> 'havana'	--	0/3	-	--	0/3	-	--	0/3	-
<i>N. tabacum</i> 'TNN'	--	0/3	-	--	0/3	-	--	0/3	-
<i>Nicotiana</i> <i>clevelandii</i>	--	0/3	-	--	0/3	-	--	0/3	-

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Tabela 11 - Descrição dos sintomas induzidos pelos vírus leek yellow stripe virus (LYSV), onion yellow dwarf virus (OYDV) e allium polerovirus A, em diferentes plantas indicadoras. AM: Amarelecimento; CLR: Clareamento de nervura; DF: Deformação foliar; MSQ: Mosqueado; -- :Ausência de sintomas; +: RT-PCR positiva; -: RT-PCR negativa.

(continuação)

Família, Espécie e cultivar	LYSV			OYDV			<i>Allium polerovirus A</i>		
	Sintoma observado	Plantas sintomáticas/ Plantas inoculadas	Resultado RT-PCR	Sintoma observado	Plantas sintomáticas/ Plantas inoculadas	Resultado RT-PCR	Sintoma observado	Plantas sintomáticas/ Plantas inoculadas	Resultado RT-PCR
<i>Nicotiana turkish</i>	--	0/3	-	--	0/3	-	--	0/3	-
<i>Solanum Lycopersicum 'Santa Clara'</i>	--	0/3	-	--	0/3	-	--	0/3	-
Amaryllidaceae									
<i>Allium schoenoprasum A.</i>	--	0/3	-	--	0/3	-	--	0/3	-
<i>ampeloprasum var. porrum</i>	--	0/3	-	--	0/3	-	--	0/3	-
<i>A. cepa</i>	--	0/3	-	--	0/3	-	--	0/3	-

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Para o ensaio com inoculação de extrato vegetal tamponado contendo o vírus LYSV, as plantas *Phaseolus vulgaris* apresentaram sintomas de enrolamento foliar. Para o ensaio com inoculação de OYDV, a espécie vegetal *Vigna unguiculata* manifestou deformações foliares. Já para o ensaio com inoculação de extrato vegetal tamponado contendo APVA, *Vigna unguiculata* apresentou mosaico e deformação foliar (**Erro! Autoreferência de indicador não válida.**).

Figura 17 - Sintomas observados no teste de gama de hospedeiros. A) Sintomas de mosaico e deformação foliar em *Vigna unguiculata*; B) Sintoma de mosqueado em *Phaseolus vulgaris*.



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

As espécies hospedeiras descritas para OYDV são *Allium cepa* e *A. Cepa* var. *ascalonicum*, nanismo, para LYSV são *Allium porrum* que manifesta amarelecimento foliar, *Chenopodium amaranticolor* e *C. Quinoa* que produzem lesões locais cloróticas e presença halos cloróticos e *Celosia argentea* onde são observados lesões locais necróticas (PAVAN; SAKATE, 2015).

Embora, plantas inoculadas com LYSV e OYDV pertencentes ao gênero *Potyvirus* tenham manifestado sintomas de distorção foliar e mosqueado, no teste molecular não foi possível detectar a presença de potívirus nas plantas da gama de hospedeiros, o mesmo ocorreu para APVA isolado LAGbr, sugerindo que os sintomas tenham sido de outra origem.

Os polerovírus são limitados ao floema e transmitidos exclusivamente por pulgões; entretanto, pepper whitefly-borne vein yellows virus (PeWBVYV) um polerovírus recombinante foi relatado por Ghosh e Ghanim (2021) sendo transmitido por moscas-branca em culturas de pimenta, relatando também uma nova proteína de inseto, C1QBP, de moscas brancas e pulgões que interagem *in vitro* com a principal proteína de revestimento dos polerovírus, sugerindo um papel funcional putativo na transmissão de polerovírus recombinantes. Recentemente, outro polerovírus recombinante infectando melão na região

nordeste do Brasil foi relatado sendo transmitido por mosca-branca (MEAM1) e não por pulgões (COSTA *et al.*, 2020). Eventos de recombinação favorecem a transmissibilidade de vírus de plantas.

Pequenas áreas cultivadas, como cultivos de fundo de quintal, e plantas daninhas que se encontram nas proximidades de áreas comerciais de alho, podem ocasionar doenças de etiologia viral no cultivo de alho em função de que se tornam potenciais fontes de inóculo, bem como, podem servir como refúgio para os vetores envolvidos na transmissão dessas viroses.

Nesse estudo, um diagnóstico de ocorrência de viroses foi confirmado em campos de produção de alho-elefante na região do Vale do Itajaí em Santa Catarina. As ferramentas moleculares utilizadas para confirmação foram imprescindíveis para elucidar incertezas pré-estabelecidas em função de análises de sintomas visuais. A diagnose baseada apenas na sintomatologia de viroses é difícil, visto que diferentes espécies podem manifestar sintomas semelhantes ou sintomas diferentes, a depender de fatores como variações ambientais, espécie/estirpe viral, infecções simples ou mista e a própria planta hospedeira.

4.5 CONCLUSÕES

Este é o primeiro registro de APVA no Brasil e o primeiro relato da ocorrência de LYSV e OYDV em *Allium ampeloprasum* L. (Alho-elefante) no Brasil;

APVA isolado LAGbr é composto por cinco fases abertas de leitura.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados aqui obtidos indicam que no estado de Santa Catarina, Brasil, a mosca-branca MED é encontrada em tomate em condições de campo. ToSRV e um possível pseudorecombinante entre EuYMV e ToSRV também foram associados a plantas de tomate em áreas de produção. Além disso, o ToSRV foi identificado infectando também a planta daninha maria preteinha pela primeira vez no Brasil. Os dados também mostraram que MED é prevalente em campos de tomate na região de Santo Amaro da Imperatriz e tem se espalhado em condições de campo no Estado.

Os sintomas de mosaico em folhas de plantas de alho-elefante, oriundos de Rio do Sul, são causados por duas espécies virais pertencentes ao gênero *Potyvirus* e um novo isolado de *allium polerovirus A*, possivelmente pertencente ao gênero *Polerovirus*. O RNA genômico do possível novo isolado é composto por cinco ORFs. Ensaio adicionais devem ser realizados para confirmar a prevalência da nova espécie viral em diferentes locais de cultivo de alho no Brasil.

Os resultados gerados pelo presente trabalho permitirá uma aplicabilidade práticas na forma de corrigir o manejo da mosca-branca e evitar surtos de vírus associados ao alho, incluindo alho comum. Os dados apresentados aqui possibilitaram compreender um pouco mais do patossistema envolvendo os begomovirus e moscas-branca na cultura do tomate em Santa Catarina, assim como, ter uma percepção sobre viroses associadas a alho-elefante.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. A. Analgesic effect of *Allium ampeloprasum*: Evidence for the involvement of beta-adrenergic system. **Journal Functional Foods**, v.57, p. 1-6, 2019.
- ACHARYA, C.; CHOUBEY, A.; ACHARYA, M. Biologically active saponin from seeds of *Allium ampeloprasum*. **Journal of Chemistry and Materials Research**, v.3, n.6, 2013.
- ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; BEAUDOIN, F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, n. 4, p. 471-487, 2005.
- ADAMS, M.J. *et al.* Family *Potyviridae*. In: KING, A.M.K.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B. **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London: Elsevier, p. 1069- 1089, 2011.
- AGRIOS, N.G. **Plant Pathology**. Academic Press, 952 p., 2005.
- ALBUQUERQUE, L. C *et al.* Characterization of *Tomato yellow vein streak virus*, a begomovirus from Brazil. **Virus Genes**, v. 40, n. 1, p. 140–147, 2010.
- AMORIM, L. A. da S.; NASCIMENTO, A. V. S. do; CAVALCANTE, L. E. Diagnóstico molecular na interação tomateiro – geminivírus. **Revista Saúde e Ciência**, v. 7, n. 2, p.502, 2018.
- ANDRADE, I. A. de. **Levantamento de novas espécies de begomovírus no Distrito Federal e em Goiás e caracterização molecular de uma nova espécie associada a tomateiro contendo Ty-1**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, 2020.
- ÁVILA, A. C. de *et al.* Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do Estado do Espírito Santo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF: v. 22, n. 3, p. 655-658, 2004.
- BAMPI, D. **Caracterização e identificação de vírus em *Allium* spp.** Tese (doutorado), UNESP, Botucatu, SP, 2015.
- BARBOSA, J. C *et al.* Temporal dynamics of *Tomato severe rugose virus* and *Bemisia tabaci* in tomato fields in São Paulo, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 164, p. 1-10, 2016.
- BARBOSA, L. da F *et al.* Indigenous American species of the *Bemisia tabaci* complex are still widespread in the Americas. **Pest Management Science**, v. 70, p. 1440–1445, 2014.
- BARRETO, S. S *et al.* A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato-infecting begomovirus in central Brazil. **Phytopathology**, v. 103, p. 436-444, 2013.
- BARROS, P. P. S *et al.* Monitoring *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) infestation in soybean by proximal sensing. **Insects**, v. 12, n. 1, 2021.
- BARZON, L *et al.* Applications of Next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 7861-7884, 2011.
- BATALHON, L. **Levantamento e caracterização de viroses com genoma de RNA em tomate e plantas daninhas associadas no Estado de Santa Catarina**. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages, 2021.

BECKER, W. F. *et al.* **Sistema de produção integrada para o tomate tutorado em Santa Catarina**. 1. ed. Florianópolis: Epagri, v. 1, P. 149, 2016.

BEDFORD, I. D *et al.* Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. **Annals of applied biology**, v. 125, p. 311–325, 1994.

BELLO, V. H *et al.* Outbreaks of *Bemisia tabaci* Mediterranean species in vegetable crops in São Paulo and Paraná States, Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, v. 110, p. 487–496, 2020.

BERGAMIN FILHO, A *et al.* The importance of primary inoculum and area-wide disease management to crop health and food security. **Food Security**, v. 8, n. 1, p.221–238, 2016.

BERGER, P. H *et al.* *Potyviridae* In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, V.; BALL, L. A. **Virus Taxonomy**. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. San Diego, Elsevier Academic Press, p. 1259, 2005.

BETANCOURT, M *et al.* Estimation of the effective number of founders that initiate an infection after aphid transmission of a multipartite plant virus. **Journal of Virology**, Washington, v.82, n.24, p.12416–12421, 2008.

BEUVE, M.; LEMAIRE, O. Sugar beet-infecting Beet western yellows virus (BWYV)-USA strain represents a distinct Polerovirus species. **Biologie des Interactions Virus Vecteur**, France, 2002.

BFG - The Brazil Flora Group. Brazilian Flora 2020: innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **GSPC - Global Strategy for Plant Conservation**. Rodriguésia, v.69, p.1513-1527, 2018.

BLOCK, E. Challenges and artifact concerns in analysis of volatile sulfur compounds. In: Volatile sulfur compounds in food. **American Chemical Society**, v. 1068, p. 35-63, 2011.

BOHANEK, B *et al.* Genetic characterization of an unknown Chinese bulbous leek-like accession and its relationship to similar *Allium* species. **Hortscience**, v.40, p. 1690 – 1694, 2005.

BORGES, R *et al.* First report of tomato chlorosis virus infecting *Tectona grandis* associated with infestation of *Bemisia tabaci* Mediterranean in Central Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n.10, p. 2704-2705, 2019.

BOS, L. *Leek yellow stripe virus*. **Descriptions of plant viruses**, CMI/AAB, p. 240, 1981.

BOTHMER, R. Cytological studies in *Allium* I. Chromosome numbers and morphology in *Allium* Sect. *Allium* from Greece. **Botaniska Notiser**, v. 123, p. 518-550, 1970.

BOTHMER, R. Studies in the Aegean Flora XXI. Biosystematic studies in the *Allium ampeloprasum* complex. **Opera Botanica** (Lund), v.34, pp. 1-104, 1974.

BRIDDON, R. W.; STANLEY, J. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. **Virology**, [S. l.], v. 344, n. 1, p. 198–210, 2006.

BROWN, J. K *et al.* Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. **Archives of virology**, [S. l.], v. 160, p. 1593–1619, 2015.

- BROWN, J. K.; FROHLICH, D. R.; ROSELL, R. C. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? **Annual Review of Entomology**, v. 40, p. 511-534, 1995.
- CANAVELLI, A.; NOME, S. F.; CONCI, V. C. Efecto de distintos virus en la production de ajo (*Allium sativum*) Rosado Paraguayo. **Fitopatol. Bras.**, v. 23, pp. 354-358, 1998.
- CARVALHO, A. D. F. de *et al.* **Hortaliças de propagação vegetativa: tecnologia de multiplicação**. – Brasília, DF : Embrapa, 2016.
- CASTILLO-URQUIZA, G *et al.* Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology*, v. 153, p. 1985- 1989, 2008.
- CECCANTI, C *et al.* Comparative phytochemical profile of the Elephant garlic (*Allium ampeloprasum* var. *holmense*) and the common garlic (*Allium sativum*) from the Val di Chiana area (Tuscany, Italy) before and after in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 338, 2020.
- CHARE, E. R.; HOLMES, E. C. Selection pressures in the capsid genes of plant RNA viruses reflect mode of transmission. **Journal of General Virology**, London, v.85, n.1, p.3149–3157, 2004.
- CHAVES, A. L. R *et al.* First report of *Tomato mottle leaf curl virus* infecting tomato in São Paulo state, Brazil. **Summa Phytopathologica**, [S. l.], v. 43, n. 4, p. 353, 2017.
- CHETELAT, R. T *et al.* Distribution, ecology and reproductive biology of wild tomatoes and related nightshades from the Atacama Desert region of northern Chile. **Euphytica**, [S. l.], v. 167, n. 1, p. 77–93, 2009.
- CHUNG, B. Y *et al.* An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.105, n.15, p.5897-5902, 2008.
- CLAVERIE, S *et al.* From spatial metagenomics to molecular characterization of plant viruses: a geminivirus case study. **Elsevier**, 1^a ed, 2018.
- CLEMENTE, F. M. V. T.; BOITEUX, L. S. (Eds.). **Produção de tomate para processamento industrial** (Embrapa.). Brasília, 2012.
- Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. **Tomate: Análise dos Indicadores da Produção e Comercialização no Mercado Mundial, Brasileiro e Catarinense**. Companhia Nacional de Abastecimento, v. 1, Brasília, 2019.
- CONCI, V. C.; CANAVELLI, A. E.; LUNELLO, P. A. Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. **Plant Disease**, v.87, p.1411-1415, 2003.
- COSTA, C. L. Vetores de vírus de plantas - insetos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v.6, p. 103– 171, 1998.
- COSTA, T. M *et al.* The recombinant isolate of cucurbit aphid-borne yellows virus from Brazil is a polerovirus transmitted by whiteflies. **Plant Pathology**, v. 69, p. 1042 – 1050, 2020.
- COTRIM, A. de A *et al.* Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 3, p. 300–303, 2007.

- CUI, X *et al.* A Begomovirus DNA -Encoded Protein Binds DNA, Functions as a Suppressor of RNA Silencing, and Targets the Cell Nucleus. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 79, n. 16, p. 10764–10775, 2005.
- CZOSNEK, H *et al.* The incredible journey of Begomoviruses in their whitefly vector. **Viruses**, v. 9, 2017.
- DE BARRO, P. J *et al.* *Bemisia tabaci*: A Statement of Species Status. **Annual Review of Entomology**, [S. l.], v. 56, n. 1, p. 1–19, 2011.
- DE BARRO, P. J *et al.* Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bemisia tabaci*. **Molecular Ecology**, Notes 3, p.40–43, 2003.
- DE MORAES, L. A *et al.* New invasion of *Bemisia tabaci* Mediterranean species in Brazil associated to ornamental plants. **Phytoparasitica**, v.45, p. 517–525. 2017.
- DE MORAES, L. A *et al.* Distribution and phylogenetics of whiteflies and their endosymbiont relationships after the Mediterranean species invasion in Brazil. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1–13, 2018.
- DEY, P.; KHALED, K. L. An Extensive review on *Allium ampeloprasum*: A magical herb. **International Journal of Science and Research**, v.4, n.7, p. 371-377, 2015.
- DISTÉFANO, A. J.; KRESIC, B. I.; HOPP, H. E. The complete genome sequence of a virus associated with cotton blue disease, *Cotton leafroll dwarf virus*, confirms that it is a new member of the genus Polerovirus. **Archives of virology**, v.11, p.1849-54, 2010.
- DOMINGO, E.; HOLLAND, J. RNA virus mutations and fitness for survival. **Annual Reviews in Microbiology** 51, 151-178, 1997.
- DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- DRAKE, J.W *et al.* Rates of spontaneous mutation. **Genetics**, Colorado, v.148, n.4, p.1667–1686, 1998.
- DUARTE, M. F. **Diversidade espaço-temporal de espécies de Begomovirus em regiões produtoras de tomateiro no Bioma Mata Atlântica**. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana)—Universidade de Brasília, Brasília, 2019.
- DUARTE, M. F *et al.* Diversity of tomato-infecting begomoviruses and spatiotemporal dynamics of an endemic viral species of the Brazilian Atlantic rain forest biome. **Virus Genes**, v. 57, n. 1, p. 83–93, 2021a.
- DUARTE, M. F *et al.* Natural infection of tomatoes (*Solanum lycopersicum*) by *Euphorbia yellow mosaic virus* isolates across four brazilian states. **Plant Disease**, v. 105, p. 518, 2021b.
- DUFFY S.; SHACKELTON L. A.; HOLMES, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: Patterns and determinants. **Nature Reviews Genetics**, v. advanced online publication, p. 2008.
- EIRAS, M *et al.* RT-PCR and dot clob hybridization methods for a universal detection of tospoviruses. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p.170-175, 2001.
- FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O. **Transmissão de vírus e controle de viroses em plantas**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 24 p, 2019.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO Statistical Yearbook**. 2021. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, Acesso em 18 de janeiro de 2022.

FAO. FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION - **FAO Statistical Yearbook**. New York, 2019. Disponível em: <www.fao.org.com> Acesso em: 12 de janeiro de 2022.

FAO. The State of Food and Agriculture 2021. Making agrifood systems more resilient to shocks and stresses. **FAO Statistical Yearbook**. Rome, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/cb4476en>. Acesso em 03 de janeiro de 2022.

FAYAD-ANDRÉ, M. S. **Diagnose, disseminação e efeitos fisiológicos do complexo viral do alho em regiões produtoras do Brasil**. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

FERNANDES, F. R *et al.* Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, v.36, n.1, p. 251–258, 2008.

FERNANDES, F. R.; DUSI, A. N.; RESENDE, F. V. **Viroses do alho no Brasil: importância e principais medidas de controle**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, p.9 (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 122), 2013.

FERRO, C. G *et al.* Revealing the complexity of Sweepovirus-Deltasatellite-Plant host interactions: expanded natural and experimental helper virus range and effect dependence on Virus-Host combination. **Microorganisms**, 9, 1018, 2021.

FIALLO-OLIVÉ, E *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: *Geminiviridae*. **Journal of General Virology**, 2021.

FIALLO-OLIVÉ, E.; NAVAS-CASTILLO, J. Molecular and biological characterization of a New World Mono-/Bipartite Begomovirus/Deltasatellite complex infecting *Corchorus siliquosus*. **Frontiers Microbiology**, v. 11, 2020.

FIALLO-OLIVÉ, E *et al.* Transmission of begomoviruses and other whitefly-borne viruses: Dependence on the vector species. **Phytopathology**, v. 110, n. 1, p. 10–17, 2020.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 3º ed., 2013.

FILHO, J. de S. R.; MARIN, J. O. B.; FERNANDES, P. M. Os agrotóxicos na produção de tomate de mesa na região de Goianópolis, Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, n. 4, p. 307-316, 2009.

FONTES, E. P. B *et al.* Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p. 8459-8465, 1994.

GARCIA-ARENAL, F *et al.* Variation and evolution of plant virus populations. **International Microbiology**, Espanha, v.6, n.4, p. 225–232, 2003.

GERA, A *et al.* The natural occurrence of turnip mosaic potyvirus in *Allium ampeloprasum*. **Journal of Phytopathology**, v.145 (7), p.289-293, 1997.

GHOSH, D.; MALAVIKA, M.; CHAKRABORTY, S. Impact of viral silencing suppressors on plant viral synergism: a global agro-economic concern. **Applied Microbiology and**

Biotechnology, v. 105, p. 6301–6313, 2021.

GHOSH, S.; GHANIM, M. Factors determining transmission of persistent viruses by *Bemisia tabaci* and emergence of new virus–vector relationships. **Viruses**, v. 13, n. 9, p.1808, 2021.

GILBERTSON, R. L *et al.* Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. **Journal of General Virology**, v. 4, p. 23-31, 1993.

GILBERTSON, R. L *et al.* Role of the insect supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. **Annual Review Virology**, v. 2, p. 67–93, 2015.

GIORDANO, L. de B *et al.* Efeito da infecção precoce por Begomovirus com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n.3, p. 815–818, 2005.

GONZÁLEZ-AGUILERA, J *et al.* Genetic structure of a Brazilian population of the begomovirus tomato severe rugose virus (ToSRV). **Tropical Plant Pathology**, v. 37, p. 346-353, 2012.

GORAYEB, E. D. **Interaction and management of begomoviruses and whiteflies in weeds and horticulture crops in the State of São Paulo and survey of orthospoviruses and associated thrips in the Arica y Parinacota region – Chile.** Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista- UNESP, Botucatu, 2021.

GORAYEB, E. S *et al.* Evaluation of *Datura stramonium* and *Nicandra physaloides* as reservoirs of *Tomato severe rugose virus* and whiteflies. **Plant Pathology**, v.69, n. 3, p. 569–575, 2020.

GUERN, M.; LECORFF, J.; BOSCHER, J. Comparative karyology of the *Allium ampeloprasum* complex in France. **Bulletin de la Societe Botanique de France-Lettres Botaniques**, v. 138, p. 303-313, 1991.

HAMILTON, W. D. O *et al.* Complete nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of *Tomato golden mosaic virus*: potential coding regions and regulatory sequences. **The EMBO Journal**, [S. l.], v. 3, n. 9, p. 2197–2205, 1984.

HANLEY-BOWDOIN, L *et al.* Geminiviruses: Masters at redirecting and reprogramming plant processes. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 11, p. 777–788, 2013.

HE, YA-ZHOU *et al.* A plant DNA virus replicates in the salivary glands of its insect vector via recruitment of host DNA synthesis machinery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 29, p. 16928-16937, 2020.

HIRSCHEGGER, P.; GALMARINI, C.; BOHANEK, B. Characterization of a novel form of fertile great headed garlic (*Allium* sp.). **Plant Breeding**, v.125, p.635-637, 2006.

HOROWITZ, A. R.; ISHAAYA, I. Dynamics of biotypes B and Q of the whitefly *Bemisia tabaci* and its impact on insecticide resistance. **Pest Management. Sci** v. 70, p. 1568–1572, 2014.

HOU, Y. M.; GILBERTSON, R. L. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. **Journal of Virology**, v. 70, p. 5430-

5436, 1996.

HULL, R. M. **Plant Virology**. 4 ed. New York: Academic Press, 1056 p., 2002.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário 2017**: resultados definitivos. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017>. Acesso em: 03 de janeiro de 2022.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. 2021. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2021_maio.pdf. Acesso em: 05 de janeiro de 2022.

ICTV. **International Committee on Taxonomy of Viruses**. 2022. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> Acesso em: 09 de janeiro de 2022.

IDRIS, A. M *et al.* Cotton leaf curl Gezira virus-satellite DNAs represent a divergent, geographically isolated Nile Basin lineage: Predictive identification of a satDNA REP-binding motif. **Virus Research**, [S. l.], v. 109, n. 1, p. 19–32, 2005.

INOUE-NAGATA, A. K.; ÁVILLA, A. C. de; BÔAS, G. L. V. Os Geminivírus em Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria. **Embrapa Hortaliças: Circular Técnica**, p. 1–12, ISSN 1415-3033, 2009.

INOUE-NAGATA, A. K *et al.* Vírus transmitidos por moscas-brancas no Brasil: vetores, principais doenças e manejo. **Revisão Annual de Patologia de Plantas**, v. 24, p. 7–29, 2016.

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

JACOBSON, A. L.; DUFFY, S.; SSERUWAGI, P. Whitefly-transmitted viruses threatening cassava production in Africa. **Current Opinion in Virology**, v. 33, p. 167–176, 2018.

JOHANSEN, L. K.; CARRINGTON, J. C. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium mediated transient expression system. **Plant Physiology**, v. 126, p.930–938, 2001.

JONES, H. A.; MANN, L. K. **Onions and their Allies** — Botany, cultivation, and utilization. Leonard Hill Books Limited, London, 1963.

KANAKALA, S.; GHANIM, M. Global genetic diversity and geographical distribution of *Bemisia tabaci* and its bacterial endosymbionts. **PLoS ONE**, v.1, n.3, 2019.

KING, A. M. Q *et al.* Virus Taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Elsevier Academic Press**, San Diego CA, USA, 9th Ed. P. 1327, 2012.

KNIERIM, D.; TSAI, W. S.; KENYON, L. Analysis of sequences from field samples reveals the presence of the recently described *Pepper vein yellows virus* (genus *Polerovirus*) in six additional countries. **Archives of virology**, v.158, p.1337-1341. 2013.

LAI, M. M. C. RNA recombination in animal and plant viruses. **Microbiological Reviews**, v. 56, p. 61-79, 1992.

LAVANYA, R.; ARUN, V. Detection of Begomovirus in chilli and tomato plants using functionalized gold nanoparticles. **Sci Rep**, v.11, n. 14203, 2021.

LAZAROWITZ, S. G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 11, p.327-349, 1992.

LEANDRO, V. dos S. L. **Etiologia viral da doença fogo mexicano do tomateiro**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

LE, S. Q.; GASCUEL, O. An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p.1307-1320, 2008.

LI, Y *et al.* Detection of tobamoviruses by RT-PCR using a novel pair of degenerate primers. **Journal of Virological Methods**, v. 259, p. 122-128, 2018.

LIMA, A. T. M *et al.* Malvaviscus yellow mosaic virus, a divergent begomovirus carrying a nanovirus-like nonanucleotide and a modified stem-loop structure. **Annals of applied biology**, Vol.179 (1), p.96-107, 2021.

LONDONO, A.; RIEGO-RUIZ, L.; ARGUELLO-ASTORGA, G. R. DNA-binding specificity determinants of replication proteins encoded by eukaryotic ssDNA viruses are adjacent to widely separated RCR conserved motifs. **Archives of Virology**, v. 155, p. 1033-1046, 2010.

LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. **Doenças do tomateiro**. 2. ed. Brasília: Embrapa, v. 1, p. 151, 2005.

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

LU, X *et al.* Determination of total phenolic content and antioxidant activity of Garlic (*Allium sativum*) and Elephant Garlic (*Allium ampeloprasum*) by attenuated total reflectance–fourier transformed infrared spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59 (10), pp. 5215-5221, 2011.

LUCINI, M. A. Alho roxo no Brasil: um pouco da história dos números desse nobre. **Revista Nosso Alho**, v. 1, n. 1, 2008.

LUNELLO, P *et al.* C. An Argentinean isolate of *Leek yellow stripe virus* from leek can be transmitted to garlic. **Journal of Plant Pathology**, v. 84, p. 11–17, 2002.

MACEDO, M. A *et al.* First report of *Tomato severe rugose virus*, a tomato-infecting begomovirus, in soybean plants in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, p.1959, 2017.

MACEDO, M. A *et al.* Characterization of *Tomato leaf curl purple vein virus*, a new monopartite New World begomovirus infecting tomato in Northeast Brazil. **Archives of Virology**, [S. 1.], v. 163, n. 3, p. 737–743, 2018.

MACHADO, J. J. Caracterização molecular de uma nova espécie de geminivírus e análise de infectividade dos genomas virais clonados. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

MACHILI, B. J. As mudanças climáticas na província do Niassa e seu impacto para a agricultura. **Holos**, Ano 36, v.7, e10281, 2020.

MAIA, I.G.; HAENNI, A.L.; BERNARDI, F. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. **Journal of General Virology**, v.77, p.1335-1341. 1996.

MAKUCH, M.A.; CONCI, V. Evaluación de clones de ajo elefante como donantes de semilla y su efecto sobre la calidad sanitaria. **CVT INTA-Gigantajo**, La Consulta, Mendoza, 1999.

MARCUZZO, L. L. Ocorrência de doenças em alho-elefante. **Revista Agronomia Brasileira**. v. 6, p.1-6, 2022.

MARTINS, T. P. **O patossistema begomovírus e mosca-branca em tomateiro: relato de uma nova espécie e controle do vetor Bemisia tabaci**. Tese (Doutorado em Biologia Molecular), Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

MELGAREJO, T. A *et al.* Characterization of a New World Monopartite Begomovirus Causing Leaf Curl Disease of Tomato in Ecuador and Peru Reveals a New Direction in Geminivirus Evolution. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 87, n. 10, p. 5397–5413, 2013.

MELO-FILHO, P. A *et al.* Detection of three Allexivirus species infecting garlic in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p. 375-340, 2004.

MENDES, A. L. S. F *et al.* High molecular diversity and divergent subpopulations of the begomovirus *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* associated with *Cnidoscolus urens*. **Archives of Virology**, v. 166, p. 3289–3299, 2021.

MITUTI, T. **Viroses do alho: métodos de diagnose e degenerescência do alho semente livre de vírus**. Tese Doutorado Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2013.

MO, X. H.; CHEN, Z. B.; CHEN, J. P. Complete nucleotide sequence and genome organization of a Chinese isolate of *Tobacco vein distorting virus*. **Virus Genes**, v.41, p. 425–431, 2010.

MORIN, S *et al.* A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. **Virology**, v. 256, p.75–84, 1999.

MURAKAMI, R *et al.* The genome sequence of *Pepper vein yellows virus* (family *Luteoviridae*, genus *Polerovirus*). **Archives of Virology**, v. 156, p. 921-923, 2011.

NAGY, P. D.; SIMON, A. E. New insights into the mechanisms of RNA recombination. **Virology**, v. 235, p. 1-9, 1997.

NAGY, P. D. *et al.* Building Viral Replication Organelles: Close Encounters of the Membrane Types. **PLOS Pathogens**, Florida, v.12, n.10, p.1-6. 2016.

NAUEN, R; DENHOLM, I. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 58, p. 200-15, 2005.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. GenBank. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 14 de janeiro de 2022.

NEE, M. Synopsis of Solanum in the New World. In Solanaceae IV. Advances in biology and utilization. **The Royal Botanic Gardens**, Kew. pp. 233–285, 1999.

- NEVES, C. G *et al.* de. Identificação molecular de begomovírus associados a plantas daninhas. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 3, p. 16430-16436, 2020.
- NOGUEIRA, A. M. **Bipartite begomoviruses: replication, transmission and interaction with alphasatellites**. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.
- OLIVEIRA, A. M. E. de *et al.* Interação vírus/vetor para pulgões (Hemiptera: *Aphididae*) e mosca-branca (Hemiptera: *Aleyrodidae*). **Caderno De Ciências Agrárias**, v.11, p.1–12, 2019.
- OLIVEIRA, M. de L. B. de *et al.* Uso, classificação e diversidade de *Solanum* L. (Solanaceae). **Biodiversidade**, v.19, n.3, pág. 142, 2020.
- OLIVEIRA, M. L *et al.* Analysis of the presence of viruses in garlic seed produced by thermotherapy culture and tissue. **Summa Phytopathologica**, v.40, n.1, p.75-77, 2014.
- OLSPERT, A.; CHUNG, B. Y.; ATKINS, J. F.; CARR, J. P.; FIRTH, A. E. Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family *Potyviridae*. **EMBO Reports**, v. 16, n.8, p. 995-1004, 2015.
- OROZCO, B. M *et al.* Functional domains of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 272, n. 15, p. 9840–9846, 1997.
- PAGÁN, I.; HOLMES, E. C. Long-term evolution of the Luteoviridae: time scale and mode of virus speciation. **Journal of Virology**, n.84 p. 6177-6187, 2010.
- PAKKIANATHAN, B. C *et al.* Replication of *Tomato yellow leaf curl virus* in its whitefly vector, *Bemisia tabaci*. **Journal Virology**, v. 89, p. 9791–9803, 2015.
- PAPROTKA, T.; METZLER, V.; JESKE, H. The first DNA 1-like α satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. **Virology**, [S. l.], v. 404, n. 2, p. 148–157, 2010.
- PAVAN, M. A. **Viroses em alho nobre: identificação, estabelecimento de métodos eficientes para obtenção de plantas livres de vírus, seleção de clones assintomáticos em campo e avaliação comparativa do desempenho em condições controladas**. Tese (Livre Docência em Fitopatologia Geral)–Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 1998.
- PAVAN, M. A; SAKATE, R. K. **A cultura do alho: Produzir com qualidade para competir**. Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Bocucatu, 2015.
- PERALTA, I. E.; KNAPP, S.; SPOONER, D. M. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. **Tomato Genetics Cooperative Report**, [S. l.], v. 56, p. 6–12, 2006.
- POIRIER, E. Z.; VIGNUZZI, M. Virus population dynamics during infection. **Current Opinion in Virology**, Oxford, v.23, n.1, p.82-87, 2017.
- POLSTON, J.E.; DE BARRO, P.; BOYKIN, L.M. Transmission specificities of plant viruses with the newly identified species of the *Bemisia tabaci* species complex. **Pest Management Science** 70: 1547-1552, 2014.
- QUADROS, A. F. F *et al.* Two new begomoviruses infecting tomato and *Hibiscus* sp. in the Amazon region of Brazil. **Archives Virology**, v. 164, p. 1897–1901, 2019.
- RAHIMI-MADISEH, M *et al.* Effect of hydroalcoholic *Allium ampeloprasum* extract on

oxidative stress, diabetes mellitus and dyslipidemia in alloxan-induced diabetic rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 86, pp. 363-367, 2017.

RAJAMAKI, M. L *et al.* A novel insertion site inside the potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous proteins and suggests some P1 functions. **Virology**, v. 342, p. 88–101, 2005.

REIS, A *et al.* Powdery mildew of *Allium* species caused by *Oidiopsis taurica* in Brazil. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.4, p. 758-760, 2004.

RESENDE, F. V *et al.* Produção de alho-semente. In: NASCIMENTO, W. M.; PEREIRA, R. B. **Hortaliças de vegetação vegetativa: tecnologia de multiplicação**. Embrapa, Brasília - DF. 1 ed., p. 228, 2016.

RESENDE, J. T. V *et al.* Vernalização do alho e datas de plantio em Guarapuava. **Horticultor Brasileira**. Brasília, DF, v. 20, n. 2, p. 193–198, 2011.

RIBEIRO, S. G *et al.* Distribution and genetic diversity of tomato-infecting geminiviruses in Brazil. **Archives Virology**, 281-295, 2003.

RIBEIRO, S. G *et al.* Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. **Fitopatologia brasileira**, v. 19, p. 330, 1994.

RISHISHWAR, R.; DASGUPTA, I. Suppressors of RNA silencing encoded by geminiviruses and associated DNA satellites. **Virus Disease**, v. 30, n. 1, p. 58–65, 2019.

ROCHA, C. S *et al.* Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. **Journal of Virology**, v.87, p. 5784-5799, 2013.

RODAMILANS, B *et al.* RNA polymerase slippage as a mechanism for the production of frameshift gene products in plant viruses of the *potyviridae* family. **Journal Virology**, v. 8, n.13. p. 6965-6967, 2015.

RODRIGUES, C. S. **Qualidade de mudas de tomateiro como um componente para o manejo da begomovirose**. Tese de Doutorado em Fitopatologia, Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, p. 105, 2021.

RODRIGUES, C. S *et al.* Evidence of spread of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) mediated by internal transportation of ornamental plants in Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 50, n.5, p. 850-857, 2021.

ROJAS, M. R *et al.* Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v.77, n.4, p. 340-347, 1993.

ROJAS, M. R *et al.* Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 361-394, 2005.

ROMAY, G *et al.* Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 155, n. 11, p. 1843–1847, 2010.

ROMAY, G *et al.* *Tomato Twisted Leaf Virus*: A Novel Indigenous New World Monopartite Begomovirus Infecting Tomato in Venezuela. **Viruses**, v. 11, n.4, p. 327, 2019.

ROOSSINCK, M. J.; MARTIN, D. P.; ROUMAGNAC, P. Plant virus metagenomics: advances in virus discovery. **Phytopathology**, v. 105, p. 716– 727, 2015.

- RUBIO, L *et al.* Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family *Closteroviridae*. **Frontiers Microbiology**, Lausanne, v.4, n.151, p.1-15, 2013.
- RYAN, M. D.; FLINT, M. Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. **Journal of General Virology**, v.78, p.699-723, 1997.
- SACRISTAN, S *et al.* Estimation of population bottlenecks during systemic movement of *Tobacco mosaic virus* in tobacco plants. **Journal of Virology**, Washington, V.77, n.18, p. 9906–9911, 2003.
- SALOMON, R. Virus diseases in garlic and propagation of virus free plants. H.D. Rabinowitch, L. Currah (Eds.), **Allium Crop sciences: Recent Advances**, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 311-328, 2002.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning - a laboratory manual. 3. ed. Cold Spring Harbor: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**; 2001.
- SAMPAIO, V. da. S. **O Gênero *Solanum* L. (SOLANACEAE) na Floresta Atlântica ao norte do Rio São Francisco**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- SÁNCHEZ-CAMPOS, S *et al.* *Tomato yellow leaf curl virus*: No evidence for replication in the insect vector *Bemisia tabaci*. **Scientific Reports**. v. 6, p. 1–6, 2016.
- SANTANA, J. L. R. **Estudo da temperatura e umidade relativa do ar de um perfil longitudinal em Santa Catarina**. Trabalho de Graduação Individual, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.
- SAUNDERS, K *et al.* A unique virus complex causes *Ageratum yellow vein disease*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 97, n. 12, p. 6890–6895, 2000.
- SCHWARTZ, H. F.; OTTO, K. First Report of *Iris yellow spot virus* in Commercial Leek (*Allium porrum*) in the United States. **Plant Disease**, v.91, n.10, p. 1365, 2007.
- SEAL, S. E.; VANDEN BOSCH, F.; JEGER, M. J. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, p. 23-46, 2006.
- SILVA, F. N *et al.* Recombination and pseudorecombination driving the evolution of the begomoviruses Tomato severe rugose virus (ToSRV) and Tomato rugose mosaic virus (ToRMV): Two recombinant DNA-A components sharing the same DNA-B. **Virology Journal**, [S. l.], v. 11, p. 1–11, 2014.
- SILVA, J. F. da. **Deteção de *Cucumber mosaic virus* em alho-poró na região agreste de Pernambuco, Brasil**. Dissertação, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.
- SILVA, J. P. da. ***Tomato severe rugose virus*: phylogeny, phylogeography, and identification of new natural hosts**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)—Universidade de Brasília, Brasília, 2021.
- SILVA, S. J. C *et al.* Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant Pathology**. v. 61, n. 3, p. 457–467, 2012.

SIMON, P. W.; JENDEREK, M. M. **Floração, produção de sementes e a gênese do melhoramento de alho**. Em Janick J (ed) Revisões de melhoramento de plantas, 2003.

SÕMERA, M *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: *Solemoviridae*. **Journal of General Virology**, 2021.

SOUSA, G. P *et al.* Incidência de mosca-branca nas culturas de soja e milho e possibilidade de refúgios em área de Cerrado. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, 2021.

SOUZA, M. V. P. de *et al.* Estresse salino e uso de biofertilizante bovino na cultura do tomate. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v.13, nº.4, p. 3524 - 3532, 2019.

SOUZA, T. A *et al.* A temporal diversity analysis of Brazilian begomoviruses in tomato reveals a decrease in species richness between 2003 and 2016. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1–13, 2020.

SOUZA-DIAS, J. A. C *et al.* *Tomato severe rugose virus*: Another begomovirus causing leaf deformation and mosaic symptoms on potato in Brazil. **Plant Disease**, v. 92, p.487-488, 2008.

SUN, D. B *et al.* Competitive displacement between two invasive whiteflies: insecticide application and host plant effects. **Bulletin of Entomological Research**, v.103, p.344–353, 2013.

SYLLER, J. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infection. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, p. 204-216. 2012.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution** <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>. 2021.

TORESAN, L *et al.* **Indicadores de desempenho da agropecuária e do agronegócio de Santa Catarina: 2019 e 2020**. Florianópolis, SC: Epagri, p.76, 2021.

TORRE, C *et al.* Characterization of begomoviruses sampled during severe epidemics in tomato cultivars carrying the Ty-1 gene. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, p. 1–22, 2018.

VAGHI MEDINA, C.G.; BORNANCINI, V.A.; LÓPEZ LAMBERTINI, P.M. *Tomato vein clearing leaf deformation virus*, a new begomovirus species infecting tomato in Argentina. **European Journal of Plant Pathology**, v. 156, p. 285–290, 2020.

VALDEZ, J. G. **Estudios preliminares para la selección de clones de ajo elefante productores de semilla botánica con alto PG (poder germinativo)**. Trabajo Curso Morfología y Anatomía de Semilla. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, p. 17, 2003.

VALLI, A.; LOPEZ-MOYA, J.; GARCIA, A. Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family Potyviridae. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1016–1026, 2007.

VAN DIJK, P. Survey and characterization of potyviruses and their strains of *Allium* species. **Netherlands Journal of Plant Pathology**. v. 99, n. 2, p. 1-48, 1993.

VAN REGENMORTEL, M. H. V *et al.* (Eds.). *Virus taxonomy. Classification and*

nomenclature of viruses. In: REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES. New York. Report New York: **Academic Press**, v.7, p. 985, 2000.

VANITHARANI, R *et al.* Differential Roles of AC2 and AC4 of Cassava Geminiviruses in Mediating Synergism and Suppression of Posttranscriptional Gene Silencing. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 78, n. 17, p. 9487–9498, 2004.

VEERAKONE, S *et al.* A review of the plant virus, viroid, liberibacter and phytoplasma records for New Zealand. **Australasian Plant Pathology**, v.44, n.5, p. 463- 514, 2015.

VERCHOT, J.; CARRINGTON, J.C. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. **Journal of Virology**, v. 69, p. 3668 – 3674, 1995.

VIEIRA, R. L. **Aspectos fisiológicos e fitossanitários na micropropagação para a obtenção de alho-semente livre de vírus**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

VILLAS-BÔAS, G. L.; CASTELO-BRANCO, M. **Manejo Integrado da mosca-branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) em sistema de produção integrada de tomate indústria (PITI)**. Circ. Técnica - EMBRAPA. Brasília, DF, 2009.

WALKER, G. P.; PERRING, T. M.; FREEMAN, T. P. **Life History, Functional Anatomy, Feeding and Mating Behavior**. In *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*, eds. Philip A Stansly e Steven E Naranjo. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 109–160. 2010.

WALKEY, D. G. A. Virus diseases. **CRC Press**, Boca Raton, Florida, pp. 191-212, 1990.

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **BioTechniques**, v.10, p. 506–513, 1991.

WHITFIELD, A. E.; FALK, B. W.; ROTENBERG, D. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. **Virology**, [S. l.], v. 479–480, p. 278–289, 2015.

WINTERMANTEL, W. M.; HLADYK, L. L. Method for detection and differentiation of existing and new crinivirus species through multiplex and degenerate primer RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.170, p.106-114, 2010.

WU, C. N *et al.* Growth, bolting and yield of garlic (*Allium sativum* L.) in response to clove chilling treatment. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 43 – 52, 2015.

WYLIE, S. J *et al.* Ictv Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Potyviridae*. **Journal of General Virology**, v.98, n.3, p. 352-354, 2017.

XIANG, H. Y *et al.* Molecular characterization of two genotypes of a new polerovirus infecting brassicas in China. **Archives of virology**, v.156, p.2251–2255, 2011.

ZERBINI, F. M *et al.* ICTV virus taxonomy profile: *Geminiviridae*. **Journal of General Virology**, [S. l.], v. 98, n. 2, p. 131–133, 2017.

ZERBINI, F. M *et al.* Variabilidade genética de vírus de plantas. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W.C.; RODRIGUES, F.A. (Org.). **O Essencial da Fitopatologia - Controle de Doenças de Plantas**. 1ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v. 4, p. 65-98, 2014.

ZHANG, X. Y *et al.* Comparative Analysis of Biological Characteristics among P0 Proteins from Different *Brassica yellows virus* Genotypes, **Biology** (Basel), 2021.

ZHENG, L *et al.* A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. **Plant Pathology**, v.59 p. 211-220, 2009.

ZHOU, X. Advances in Understanding Begomovirus Satellites. **Annual Review of Phytopathology**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 357–381, 2013.