



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS

LAURA ARAUJO DA SILVA AMORIM

AVALIAÇÃO SINTOMATOLÓGICA NA INTERAÇÃO
***BEGOMOVIRUS-SOLANUM LYCOPERSICUM* E DETECÇÃO VIA PCR**
COM MARCADORES ESPECÍFICOS

SUMÉ-PB

2018

LAURA ARAUJO DA SILVA AMORIM

**AVALIAÇÃO SINTOMATOLÓGICA NA INTERAÇÃO
BEGOMOVIRUS- SOLANUM LYCOPERSICUM E DETECÇÃO VIA PCR
COM MARCADORES ESPECÍFICOS**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientadora: Professora Dra. Ana Verônica Silva do Nascimento

SUMÉ-PB

2018

A524a Amorim, Laura Araujo da Silva.

Avaliação sintomática na interação *Begomovirus-Solanum Lycopersicum* detecção via PCR com marcadores específicos. / Laura Araújo da Silva Amorim. - Sumé - PB: [s.n], 2018.

38 f.

Orientadora: Professora Dra. Ana Verônica Silva do Nascimento.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Doença de plantas. 2. Fitopatologia. 3. *Solanum lycopersicum*. 4. Hortaliças. I. Título.

CDU: 581.2(043.1)

LAURA ARAUJO DA SILVA AMORIM

**AVALIAÇÃO SINTOMATOLÓGICA NA INTERAÇÃO
BEGOMOVIRUS- SOLANUM LYCOPERSICUM E DETECÇÃO VIA PCR
COM MARCADORES ESPECÍFICOS**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

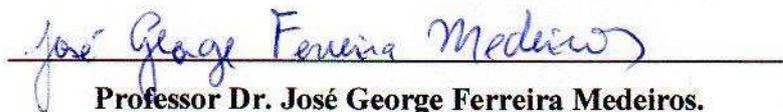
BANCA EXAMINADORA:



**Professora Dra. Ana Verônica Silva do Nascimento.
(Orientadora – UAEB/CDSA/UFCG)**



**Dr. Leidson Allan Ferreira de Lucena.
(Examinador I – UAEB/CDSA/UFCG)**



**Professor Dr. José George Ferreira Medeiros.
(Examinador II UATEC/CDSA/UFCG)**

Aprovado em: 19 de março de 2018.

Dedico ao meu avô Raimundo Ferreira da Silva in memoriam. A sua força e alegria sempre estarão gravadas na minha memória e coração.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar forças, por todo seu amor e por estar presente em todas as partes do meu ser. Toda conquista alcançada em minha vida é devido a Ti.

Aos meus pais, Laércio Bezerra de Amorim e Ronivete Araujo da Silva Amorim, não estaria onde estou e não seria quem sou sem vocês. Vocês me apoiaram, amaram e acreditaram em mim, até mesmo quando eu não acreditava; foram vocês que me ensinaram a não desistir nas dificuldades, persistir em meus sonhos e viver a vida com alegria, obrigado por serem o meu exemplo, serem presentes, serem amigos, e principalmente serem a minha fortaleza. A vocês todo meu amor, carinho, respeito, consideração e gratidão. Sem vocês nada disso seria realidade, essa vitória é nossa!

À toda a minha família, mesmo distante, eu pude sentir todo amor, carinho, torcida e apoio de vocês, sendo isso muitas vezes o motivo por eu continuar minha trajetória, vocês são o meu alicerce. Em especial às minhas avós, Eunice Gomes da Silva e Eunice Menezes de Araújo, vocês são a luz da minha vida.

À minha irmã Luiza e minhas primas Gabrielle e Sarah, muito mais que laços de sangue nos unem, e toda essa união, companheirismo, amor, carinho, alegria, apoio e cuidado foram essenciais não só nessa etapa da minha vida, mas em toda ela.

Aos amigos conquistados nesses cinco anos de curso, em especial ao meu QG: Caio Azevedo, Canígia Galvão, Catarina Muniz, Darlysson Guimarães, Elder Miguel, Felipe Ravelly, Jessica Leite, Jessyca Dayse e Mônica Rocha, por terem feito esses anos os mais loucos e felizes que poderiam ser, amo muito vocês e já estou com saudades; e às antigas amizades, que apesar da distância, permaneceram fortes: Debora Sophia, Tayana Livia, Luiza Tarsila, Rita Duarte, Vitória Ribeiro, Anna Clara, Ana Paula, Gabriella Zuza e Hellen Peixinho, sei que posso contar com vocês nos melhores e nos piores momentos, amo vocês, muito obrigada!

Aos meus colegas da Residência Universitária, que apesar das dificuldades da convivência, vocês foram uma família para mim. Mesmo que, como em toda família, tenha seus problemas, seus momentos felizes, os mais próximos e os mais distantes, todos vocês foram fundamentais nessa caminhada, vou sentir saudades. Em especial às minhas colegas de quarto: Samantha Joyce, Jessyca Dayse, Elizandra Sarana, Georgia Luana e Aline Pimental, vocês são como irmãs para mim, vou sempre guardar vocês no coração; e aos amigos Amélia Lopes, Crisóstomo Trajano, Davi Neves, Dayse Farias, Emanuelle Bezerra, Kamila Sotero,

Lucas Wagner, Marco Silva, Micilene Araújo e Roger Farias, obrigada por todo apoio, confiança e alegria diária, vou sentir saudades da nossa convivência, amo vocês!

Aos colegas da turma 2013.1 e demais no qual convivi esses anos na universidade, vocês foram fundamentais no meu crescimento pessoal e profissional, muito obrigada!

Agradeço à professora Dra. Ana verônica pela orientação e o empenho na realização deste trabalho; por toda paciência, atenção e carinho comigo. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos e conselhos.

Agradeço à professora Dra. Marcia Vanusa da Silva, à Dra. Clébia Maria Alves de Almeida, ao Dr. Daniel Oliveira Jordão do Amaral, ao Dr. Leidson Allan Ferreira de Lucena, e ao amigo Laedson Eneas Cavalcante, por todo auxílio, apoio, colaboração e paciência comigo na realização deste trabalho.

À banca examinadora: Professor Dr. José George Ferreira Medeiro e o Dr. Leidson Ferreira de Lucena. Obrigada pelas contribuições.

Aos professores do Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos e aos demais professores do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação. Agradeço pelos ensinamentos.

Enfim... A todos que direta ou indiretamente me ajudaram e apoiaram para minha formação acadêmica, meus sinceros agradecimentos.

A todos vocês, meu muito obrigada!

“Depois de todas tempestades e naufrágios o que fica de mim e em mim é cada vez mais essencial e verdadeiro.”.

Caio Fernando Abreu

RESUMO

Solanum lycopersicum L. é uma das principais hortaliças em termos de importância econômica e alimentar, sendo cultivado em todas as regiões tropicais e subtropicais do Mundo. Dentre os problemas fitossanitários na cultura de *S.lycopersicum*, destacam-se as doenças causadas por vírus que podem variar amplamente em termos de severidade. Uma das viroses limitantes são os representantes da família *Geminiviridae*, mais principalmente espécies do gênero *Begomovirus*. Neste trabalho avaliou-se a incidência e influência de *Begomovirus* em áreas produtoras de *S.lycopersicum* na região do Cariri do estado da Paraíba. Um levantamento de plantas sintomáticas, em duas áreas produtoras de tomateiro, foi realizado nos municípios de Serra Branca (Área 1) e Amparo (Área 2) com a finalidade de identificar a incidência e influência do vírus na cultura. Amostras foliares de *S. lycopersicum* foram coletadas para observação e classificação dos sintomas. Análises multivariadas não-paramétricas (presença/ausência) com base nos sintomas virais observados, em ambas as áreas, foram realizadas para verificar a influência do vírus nas plantações de *S. lycopersicum*. As amostras foliares também foram utilizadas para extração de DNA, através do método CTAB. O DNA viral foi avaliado através de PCR específico, utilizando os marcadores moleculares PAL1v1978 e PAR1c496. Através da PERMANOVA observou-se que houve divergências na severidade dos sintomas virais em cada plantação, além de ter sido evidenciado no teste de similaridade (SIMPER) os sintomas que mais ocorreram nas plantações, sendo rugosidade (31,54%) e deformação foliar (59,03%) em Amparo; rugosidade (75,11%) e manchas amareladas (18,45%) em Serra Branca. O DNA viral foi confirmado para a presença de *Begomovirus* através da análise molecular.

PALAVRAS-CHAVE: *Solanum lycopersicum*. Geminiviroses. Diagnóstico molecular. Análise multivariada.

ABSTRACT

Solanum lycopersicum L. is a vegetable with economic and food importance. She is cultivated in tropical and subtropical regions a round the world. Many phytosanitary problems in their cultivation are related. For example, viral diseases can vary in severity. Limiting viruses are of the Family Geminiviridae where the species of genre *Begomovirus* which act more strongly in plantation. In the work was evaluated the incidence and influence of *Begomovirus* in producing areas of *S. lycopersicum* in Cariri region, Paraíba state. A data collection of symptomatic plants in two producing áreas was performed in Serra Branca (area1) and Amparo cities (area 2) identifying the incidence and influence of virus in plantation. Samples foliar of *S. lycopersicum* were collected to observation and classification of symptions. Non parametric multivariate analysis (presence/absence) in both areas, were realized to verify the influence of virus in *S. lycopersicum* based on the virals symptions. DNA extraction was performed by CTAB method to virus identification. An especific PCR was used to DNA with molecular markers PAL1v1978 and PAR1c496. Permutational analysis of variance (PERMANOVA) has shown divergences in severity of virals symptions in each plantation. The tests howed a similarity between the symptions observed to roughness (31.54%) and deformation leaf (59.03%) in Amparo; roughness (75.11%) and yellowish patches (18.45%) in Serra Branca. The DNA was confirmed to *Begomovirus*.

KEY WORDS: *Solanum lycopersicum*. Geminiviruses. molecular diagnosis. multivariate analysis.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da organização genômica de um <i>Begomovirus</i> bipartido.....	20
Figura 2a - Plantação de tomateiro situada no município de Serra Branca (área 1).....	23
Figura 2b - Plantação de tomateiro situada no município de Amparo (área 2).....	23
Figura 3 - Ordenação dos eixos da análise de redundância explicando a influência dos sintomas entre os locais estudados.....	29
Figura 4 - Quantificação de DNA proveniente de tomateiro em gel de agarose.....	32
Figura 5 - Amplificação de DNA via PCR quantificado em gel de agarose.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise de permutação multivariada (PERMANOVA) entre os locais trabalhados (Amparo x Serra Branca). Onde: gl = graus de liberdade; DP = desvio padrão; MP = média padrão; p(MC) = Teste de significância de Monte-Carlo.....	27
Tabela 2a - Percentagem de Similaridade (SIMPER) dos sintomas virais para plantação de Amparo	28
Tabela 2b - Percentagem de Similaridade (SIMPER) dos sintomas virais para plantação de Serra Branca.....	28
Tabela 3: Porcentagem de Variação explicada para os eixos da Análise de Redundância (dbRDA) dos sintomas virais entre os Locais.....	30
Tabela 4: Correlação parcial múltipla da análise de redundância (dbRDA) entre as coordenadas das variáveis medidas (sintomas virais) e os locais estudados (Amparo x Serra Branca)	30

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AFLP Amplified Fragment Length Polymorphism

DNA Deoxyribonucleic Acid

PCR Polymerase Chain Reaction

RAPD Random Amplified Polymorphism DNA

RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism

SCAR Sequence Characterized Amplified Regions

STS Sequence Tagged Sites

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3.1 TOMATEIRO.....	16
3.2 GEMINIVIRUS.....	18
3.3 <i>BEGOMOVIRUS</i>	20
3.4 DIAGNÓSTICO VIRAL.....	21
4 METODOLOGIA	23
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO E COLETA DO MATERIAL.....	23
4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS OBTIDOS	24
4.3 EXTRAÇÃO TOTAL DE DNA	25
4.4 DIAGNÓSTICOS DO DNA VIRAL VIA PCR ESPECIFICO.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
5.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5.2 ANÁLISE MOLECULAR.....	32
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

A cultura do tomateiro, *Solanum lycopersicum* L., é originário da parte ocidental da América do Sul. É uma das olerícolas de maior importância econômica, sendo também uma das mais difundidas no mundo, devido a sua grande aceitabilidade e consumo (ALENCAR et al. 2012). O fruto do tomateiro e seus produtos representam uma das mais importantes fontes de vitamina C, pró-vitamina A (beta-caroteno) e antioxidantes (licopeno e outros carotenoides) na dieta humana. No Brasil, a cultura do tomateiro para consumo *in natura* tem sido uma importante fonte de renda e ocupação de mão de obra rural.

O tomate pode ser cultivado em regiões tropicais e subtropicais no mundo inteiro, tanto para consumo *in natura*, no cultivo tutorado, como para a indústria de processamento, através do cultivo rasteiro (SANTOS, 2009).

No Nordeste brasileiro, a área utilizada para a produção dessa cultura é correspondente a 17,2% da área nacional, se aproximando da área produtora do estado de São Paulo correspondente a 19,5%. No entanto, enquanto em São Paulo a produtividade é por volta de 21,1% da produção total, o Nordeste apresenta uma produtividade de 9,9% (IBGE, 2018). O cultivo de tomate no Nordeste brasileiro apresenta como uma atividade agrícola de expressiva importância socioeconômica (FÁRI; RESENDE; MELO, 2000). Já no estado da Paraíba a produção corresponde à 0,2%, com uma área de 0,5% do total, sendo um valor muito abaixo da média nacional (IBGE, 2018).

Devido às condições edafoclimáticas favoráveis e a incorporação de novas tecnologias, o Estado do Paraíba tem se apresentado promissor no cultivo do tomate. Entretanto, com a expansão da área cultivada, foram observadas perdas significativas em todas as áreas produtoras, a maioria por problemas fitossanitários (TOGNI et al., 2009). Dentre os problemas fitossanitários na cultura do tomateiro, destacam-se as doenças causadas por vírus que podem variar amplamente em termos de severidade, incluindo respostas tolerantes que pouco alteram a fisiologia da planta hospedeira, até respostas severas que podem culminar com a morte da planta. Medidas de controle na maioria das vezes não são eficientes (HULL, 2002). Vários são os vírus que podem infectar a cultura do tomate, entretanto, os *Geminivirus*, possuem grande importância econômica, devido às perdas ocasionadas à agricultura (POLSTON ET al., 2014). A interação *Geminivirus*-tomate inicia-se geralmente com clareamento acentuado nas nervuras foliares, acentuando a manchas cloróticas na forma de mosqueado e um intenso mosaico amarelo. Quando a infecção ocorre precocemente, a planta tem seu crescimento e desenvolvimento paralisado (VILLAS-BÔAS,

2009). Um dos gêneros de maior importância da família *geminividae*, sendo o maior deles, é o gênero *Begomovirus* (ROCHA, 2017).

A ocorrência de epidemias cada vez mais severas de begomoviroses, aliada a dificuldade de controle dessa doença, faz com que ela seja considerada um dos maiores problemas fitossanitários da cultura do tomateiro (QUEZADO-DUVAL et al., 2014). Os *Begomovirus* apresentam uma grande variabilidade de espécies, sendo que as espécies encontradas no Brasil não são relatadas em outros países, sugerindo que os mesmos sejam nativas (SOUZA, 2014).

Além da diversidade de espécies virais encontradas em tomateiro e a alta incidência de diferentes viroses, o maior problema que os agricultores possuem em relação as viroses é o seu controle, já que não existe como controlar as viroses sem causar algum dano a planta hospedeira (SOUZA, 2014). Assim, uma boa medida no controle de doenças causadas por vírus no campo depende do diagnóstico preciso e de um manejo efetivo da praga.

No diagnóstico de viroses vegetais são utilizados métodos biológicos, sorológicos e moleculares. Uma premissa básica para auxiliar o diagnóstico de vírus são estudos de incidência no campo. Entretanto, uma simples observação visual de sintomas de incidência de vírus em plantio de tomateiro no campo não é suficiente para atestar a presença desses vírus, uma vez que os sintomas podem ser facilmente confundidos com os causados por desequilíbrios nutricionais, diferenças varietais e infecção por outros vírus. Nesse contexto, surgem para auxiliar no diagnóstico os métodos moleculares através da reação de polimerização em cadeia (PCR) (MULLIS; FALOONA, 1987) o que acelerou o desenvolvimento de novas classes de marcadores moleculares.

Diante desse quadro, torna-se necessário um levantamento das áreas produtoras de tomate, buscando diagnosticar corretamente a etiologia viral de infecção através de métodos moleculares em conjunto com a análise da severidade dos sintomas encontrados nas mesmas, o que irá proporcionar uma precisão no diagnóstico e na avaliação de diferentes níveis de influência do vírus; auxiliando, assim, futuras pesquisas objetivando um melhor entendimento da relação da cultura do tomateiro com o *Begomovirus* no Estado da Paraíba.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a incidência de *Begomovirus* em áreas produtoras de tomateiro localizadas no Cariri paraibano e detectar via PCR com primer específico

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar amostras foliares de tomateiro com infecção viral;
- Avaliar visualmente e classificar os diferentes tipos de sintomas de infecção viral presentes na cultura;
- Avaliar a influência do *Begomovirus* por meio de sintomas virais observados em duas plantações de tomate;
- Analisar, através das frequências sintomáticas observadas nas plantações, a severidade da ação do *Begomovirus* em tomateiros do cariri paraibano;
- Realizar a extração de DNA viral utilizando o método CTAB;
- Realizar reação de PCR utilizando marcadores específicos;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. TOMATEIRO

Pertencente à família Solanaceae, o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma planta pilosa e herbácea, que quando jovem possui caule flexível, tornando-se fibroso com o passar do tempo. Apresenta dois hábitos de crescimento que pode ser indeterminado e determinado. Nas cultivares de hábito indeterminado, as plantas são tutoradas e desbrotadas e os frutos são destinados diretamente ao consumo humano. Já no cultivo de hábito determinado as plantas são adaptadas para cultivo rasteiro e são destinadas a agroindústrias (SANTOS, 2010). O melhor desempenho das plantas é observado em temperaturas diurnas de 18°C a 25°C e noturnas de 13°C a 24°C (SANTOS, 2009), sendo preferível realizar o plantio em regiões ou épocas de temperaturas amenas (BOITEUX et al., 2012). Segundo Santos (2009), o número de flores e o pigmento do fruto podem ser afetados de acordo com as condições ambientais a qual a planta está submetida, sendo intimamente influenciadas por temperaturas acima ou abaixo dos limites recomendados para seu cultivo, fazendo com que a qualidade e quantidade dos frutos seja afetada.

Originário da América do Sul, mais precisamente onde hoje são localizados Peru, Chile e Equador, o tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das culturas mais difundidas no mundo, isso devido a sua grande aceitabilidade e consumo (ALENCAR et al., 2012). O tomateiro apresenta grande importância econômica, social e nutricional. Sua importância econômica vem do valor de produção arrecadado; a importância social se dá pelos empregos direto e indireto que o seu cultivo gera (MAKISHIMA, 2003); já nutricionalmente o tomate e seus produtos são uma fonte rica em vitamina C, pró-vitamina A (beta-caroteno) e antioxidantes (licopeno e outros carotenoides) (BOITEUX et al., 2012), além de ser rico em glicose, frutose, lipídeo, proteína e sais minerais como: fósforo, cálcio, potássio e magnésio (MAKISHIMA, 2003).

Sendo uma das hortaliças mais difundidas mundialmente, o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é, principalmente, cultivado nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (BOITEUX et al., 2012). Acredita-se que o cultivo do tomateiro teve início na Itália por volta de 1550, levando a crer que os italianos foram os primeiros a utilizá-lo na alimentação humana no século XVIII (RICK, 1978). No Brasil o tomate foi introduzido no final do século XIX através dos imigrantes europeus (SANTOS, 2010).

Atualmente, o Brasil ocupa a nona posição de maior produção de tomate com uma produção aproximada de 4,15 milhões de toneladas por ano. Com 1,04 milhão de toneladas produzidas anualmente, o estado de São Paulo é o maior produtor do País (AGRIANUAL, 2017).

O tomate é uma hortaliça que faz parte, diariamente, da alimentação da maioria da população brasileira. Dentre as hortaliças, é uma das mais importantes, não somente no âmbito produtivo, mas também em valor socioeconômico. Sua cultura é formada por duas cadeias produtivas distintas, caracterizadas pelo segmento de mesa, destinado ao consumo *in natura*, e à fins industriais. Cada cadeia produtiva possui características intrínsecas na produção, beneficiamento, processamento e comercialização (SANTOS, 2009).

Nos últimos anos a cultura do tomate tem obtido ganhos com o melhoramento genético (SANTOS, 2009), onde foram priorizadas características relacionadas ao aumento de produtividade, dando pouca atenção às defesas físicas (e. g. pilosidade) e químicas (metabólitos secundários tóxicos a herbívoros) da planta. Por isso, as variedades utilizadas no cultivo são susceptíveis a insetos e doenças, dificultando a produção em sistemas orgânicos (TOGNI, 2009). Para reverter esta situação diferentes espécies do gênero *Solanum* vêm sendo utilizadas em programas de melhoramento genético, visando a introdução de genes que conferem resistência a pragas e doenças, melhoria da qualidade nutricional dos frutos e tolerância a estresses abióticos (BARONE et al., 2009). Porém, apesar das melhorias genéticas ocorridas no tomate, a planta é suscetível ainda a pragas como, por exemplo, broca-pequena, traça, ácaros, mosca-branca, tripses, pulgões e burrinho, além de doenças causadas por vírus e bactérias (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

No Estado da Paraíba, apesar de possuir condições de cultivo favoráveis e se apresentado promissor na produção de tomates, foram observadas perdas significativas em todas as áreas produtoras, a maioria por problemas fitossanitários (TOGNI et al., 2009). Esta perda pode ser decorrente da monocultura intensiva do tomate gerando problemas fitossanitários decorrentes das viroses, como as tospoviroses e geminiviroses (SOUZA, 2014). Em pesquisa realizada pelo IBGE no ano de 2016 foi averiguado que a produção de tomate na Paraíba foi de 8995 toneladas, tendo um total de área plantada de 331 ha e uma área coletada de 287 ha, possuindo assim um rendimento de 31202 Kg/ha. Estes dados nos mostram que houve uma redução entre o total de área plantada para colhida de 44 ha, podendo essa redução ser ocasionada por fatores abióticos (clima) e bióticos (doenças e insetos).

Doenças provocadas por vírus de tomate possuem um difícil controle e manejo. Sendo assim, os principais vírus que infectam o tomateiro, pela sua importância econômica, estão:

Tobamovirus; *Tospovirus*; *Potyvirus*; *Crinivirus*; *Begomovirus*, que possuem inúmeras espécies relatadas em todo Brasil (SOUZA, 2014).

3.2. GEMINIVIRUS

Vários são os vírus que podem infectar a cultura do tomateiro, entretanto, os *Geminivirus*, possuem grande importância econômica, devido às perdas ocasionadas à agricultura (BRIDDON, 2003). A interação *Geminivirus*-tomateiro inicia-se geralmente com clareamento acentuado nas nervuras foliares, acentuando-se por inúmeras manchas cloróticas na forma de mosqueado e mosaico, além de um intenso mosaico amarelo. Quando a infecção ocorre precocemente, a planta tem seu crescimento e desenvolvimento paralisado (VILLAS-BÔAS, 2009).

Os *Geminivirus* infectam tanto plantas monocotiledôneas, quanto plantas dicotiledôneas, e apesar de haver epidemias de geminivirose com mais frequência em cultivos presentes em regiões tropicais e subtropicais, este vírus tem surgido em todo o mundo (SOUZA, 2014). A família *Geminiviridae* inclui espécies com um ou dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) (FERNANDES, 2001), transmitidos pela “mosca-branca” *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae).

O primeiro relato de *Geminivirus* em tomateiro no Brasil foi feito na década de 70 (COSTA et al., 1975). Seis diferentes vírus transmitidos por mosca-branca (*Bemisia tabaci*) foram identificados, porém sem causar danos de importância econômica (BEDFORD et al., 1994). A partir de 1992, no estado de São Paulo, constatou-se a presença do biotipo B de *B. tabaci*, provavelmente introduzido pela importação de plantas ornamentais da Europa ou dos EUA (MELO, 1992). O biotipo B apresenta maior grau de adaptação e dispersão, além de gama de hospedeiro muito mais ampla, que inclui solanáceas, como o tomateiro, e diversas espécies de plantas silvestres e/ou daninhas (BEDFORD et al., 1994). Após o relato da presença do biotipo B, sintomas típicos de infecção por begomovírus em tomateiro foram descritos no Distrito Federal por França et al. (1996), no Triângulo Mineiro por Rezende et al. (1996) e Zerbini et al. (1996), no Rio de Janeiro por Galvão et al. (1998), em São Paulo por Faria et al. (1997) e na região Nordeste por Ribeiro et al. (1996). Na região Nordeste do Brasil os estados da Bahia e Pernambuco são as principais regiões produtoras de tomate, onde foram registrados os primeiros diagnósticos do *Begomovirus* (BEZERRA et al., 1997).

A presença do *Begomovirus* em tomateiros no Brasil pode ter sido favorecida pela rápida disseminação do biotipo B de *B. tabaci*. Agindo como vetor, o inseto teria permitido que os

vírus que estava infectando plantas silvestres e daninhas chegassem ao tomateiro e, por meio de recombinação e/ou reagrupamento de componentes do genoma, se adaptassem ao novo hospedeiro em um processo evolutivo rápido que culminou com o surgimento de novas espécies. Estudos anteriores realizados no México e nos EUA sugerem que esse processo de evolução e adaptação pode ocorrer em períodos relativamente curtos (HOU; GILBERTSON, 1996).

Os vírus pertencentes à família Geminiviridae são caracterizados pela morfologia de partículas icosaédricas geminadas e genoma composto por DNA de fita simples circular (STANLEY et al., 2005) com um ou dois componentes genômicos, monopartidos ou bipartidos, respectivamente. Esses componentes genômicos possuem tamanho de 2,5 a 3 Kb, denominados de DNA-A e DNA-B (Medeiros et al., 2015). Atualmente a família é formada por nove gêneros: *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, *Becurtovirus*, *Eragrovirus*, *Capulavirus*, *Grablovirus* e *Turncurtovirus* (ICTV, 2017). Os principais critérios para a separação desses gêneros são a organização do genoma, as plantas hospedeiras e o tipo de inseto vetor (RÊGO, 2016).

Por possuírem como genoma o DNA, os geminivirus, em alguns casos, incorporam o DNA viral no genoma da planta hospedeira, podendo o mesmo permanecer por muito tempo inativado, sendo “ativado” por um fator abiótico ou biótico. Em outros casos, podem auxiliar outros vírus que não possuem a capacidade de replicação, causando maiores perdas. Esse tipo de associação faz com que a ocorrência desse vírus seja bastante imprevisível (ROCHA, 2017). Desta forma, medidas de controle são realizadas para controlar o agente vetor, e a influência do vírus na planta, como, por exemplo, a rotação de culturas, retirada e destruição de restos culturais, manejo de ervas invasoras, períodos livres de plantios, barreira viva, cultura-armadilha, estande mais denso, cobertura de solos com plásticos ou com outras substâncias refletivas ou ainda coberturas vivas (SANTOS, 2009). Porém, estas medidas não se tornam eficazes para combater o agente vetor (inseto), bem como o agente infeccioso (vírus) nas plantas.

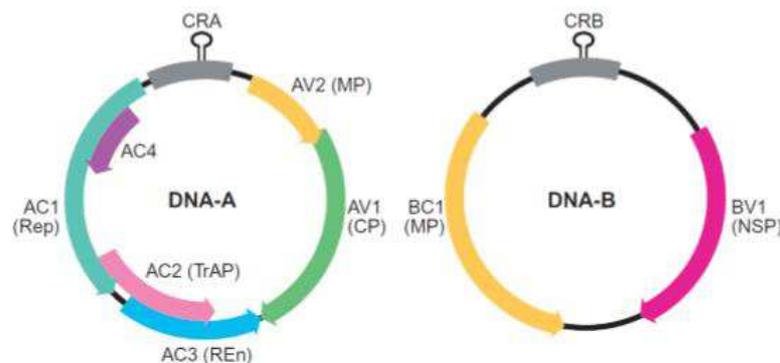
Sendo assim notável a importância fitopatogênica da família Geminiviridae, pois viroses causadas por espécies dessa família estão sempre surgindo no mundo todo, causando severos danos econômicos em importantes culturas (SANTOS, 2009).

3.3. BEGOMOVIRUS

Os *Begomovirus* infectam plantas dicotiledôneas, possuem gama de hospedeiros relativamente restritas e a maioria possui dois componentes genômicos, com exceção de alguns isolados da espécie TYLCV (FERNANDES, 2001), sendo que cada componente genômico tem entre 2,5 e 2,6 kb de tamanho além de em alguns casos possuir DNA's satélites. As funções dos DNA's satélites ainda não estão totalmente elucidadas, dependendo, em grande parte, a quais *Begomovirus* os satélites estão ligados, porem há estudos que apontam uma ligação com o aumento da virulência do patógeno e supressão do silenciamento gênico da planta (SOUZA, 2014). Entre os *Begomovirus* de maior importância econômica pode-se citar o BGMV, o ACMV e o TYLC (POTTER et al., 2003).

Na grande maioria dos *Begomovirus* o componente genômico denominado DNA-A é responsável pela replicação e encapsidamento do genoma viral, enquanto o componente genômico denominado DNA-B contém os genes requeridos para o movimento célula-a-célula e a longa distância, gama de hospedeiros e desenvolvimento de sintomas (Figura 1). Para que ocorra a infecção sistêmica é necessário a presença de ambos os componentes. Os componentes A e B não possuem homologia de sequência, exceto por uma região intergênica com aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (RC), que é altamente conservada entre os dois componentes de uma determinada espécie viral (acima de 90% de homologia) (FERNANDES, 2001). A identificação do vírus é baseada na análise e comparação do genoma do DNA-A dos isolados (SOUZA, 2014).

Figura 1 - Representação esquemática da organização genômica de um *Begomovirus* bipartido.



Fonte: King et al. (2011)

De acordo com o International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2017), atualmente o gênero *Begomovirus* possui 388 espécies descritas. Essas espécies de *Begomovirus*, geralmente, apresentam uma distribuição geográfica bem definida, onde os vírus com um componente genômico encontram-se no Velho Mundo (países da Europa, África e Ásia) e os vírus com dois componentes genômicos encontram-se no Novo Mundo (SOUZA, 2014).

As espécies de *Begomovirus* relatadas no Brasil não são encontradas em nenhum outro local, sugerindo que as mesmas são nativas, sendo todas bipartidas. Sabe-se que há uma aparente distribuição diferenciada de espécies dentro do país, sendo o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) encontrado predominante na região centro-sul, e por outro lado o *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV) parece ser predominante na região Nordeste. Entretanto, é preciso ressaltar que o estudo de diversidade e distribuição dos *Begomovirus* ainda é deficiente para a região nordeste brasileira (SOUZA, 2014).

Além da diversidade viral e a alta incidência de vírus encontrados em tomateiros, o maior problema encontrado pelos agricultores é o controle dos mesmos, já que não é possível eliminá-los sem prejudicar a planta hospedeira (SOUZA, 2014). Assim, como o *Begomovirus* possui grande influência na cadeia produtiva do tomate, progressos consideráveis na identificação e caracterização biológica-molecular do vírus foram realizados, contribuindo assim para o desenvolvimento de materiais resistentes, sendo a forma mais eficiente de se combater o aumento da incidência e da severidade das infecções por *Begomovirus* em tomateiro no Brasil (HURTADO et al., 2012).

3.4. DIAGNÓSTICO VIRAL

Uma boa medida no controle de doenças causadas por vírus no campo depende do diagnóstico preciso. No diagnóstico de viroses vegetais são utilizados métodos biológicos, sorológicos e moleculares. Uma premissa básica para auxiliar o diagnóstico de vírus são estudos de incidência no campo. Entretanto, uma simples observação visual de sintomas de incidência de vírus em plantio de tomateiro no campo não indica a presença desses vírus, uma vez que podem ser facilmente confundidos com os causados por desequilíbrios nutricionais, diferenças varietais e infecção por outros vírus.

A diagnose precisa de uma doença é um requisito essencial para a recomendação de medidas de controle. O ideal é que um teste diagnóstico proporcione resultados rápidos e precisos a baixo custo, o que geralmente não acontece na prática, uma vez que a rapidez e

precisão dos testes são inversamente proporcionais ao seu custo. Os testes mais comumente utilizados para a diagnose das fitoviroses podem ser divididos em três grupos: a) biológicos baseados nas propriedades biológicas dos vírus, como morfologia da partícula e gama de hospedeiros; b) sorológicos, com base na detecção da proteína capsidial do vírus; c) testes moleculares, os quais são fundamentados na detecção e/ou análise do ácido nucléico viral (LIMA, 2009).

Com o desenvolvimento da Biologia Molecular, várias técnicas foram evidenciadas como ferramenta auxiliar para identificação de fitopatógenos, o que elevou consideravelmente a eficiência e segurança, principalmente no que diz respeito à taxonomia e classificação (ZERBINI et al., 1996). Por meio de estudos moleculares é possível detectar indivíduos e suas diferenças que muitas vezes são causadas por alterações de um único par de bases, tendo aplicações imediatas na identificação e caracterização de linhagens e genótipos (BORÉM; CAIXETA, 2006). Uma vantagem observada na utilização das técnicas moleculares é o grande aumento da sensibilidade em comparação a outros métodos, como por exemplo o teste de ELISA, no qual a sensibilidade pode ser de cem a mil vezes maior (SILVANO, 2003).

Os marcadores moleculares podem ser definidos como características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e que são herdados geneticamente, sendo um marcador genético ao ser comprovado que seu comportamento está de acordo com as leis de Mendel da herança (SILVA, 2008).

O método molecular mais utilizado no diagnóstico é a PCR, onde são empregados oligonucleotídeos universais, e a hibridação de ácidos nucléicos, utilizando fragmentos clonados do DNA viral (Rojas et al., 1993).

O RAPD, AFLP, microssatélites, SCAR e STS, são exemplos de técnicas moleculares derivados da aplicação da técnica de PCR. Outras técnicas que se destacam são RFLP e os minissatélites que são baseados em hibridização (SILVA, 2008).

No melhoramento genético de plantas, tem-se buscado, cada vez mais, a manipulação assistida por marcadores moleculares, visando obter maior eficiência na transferência de fatores genéticos. Marcadores moleculares ligados a diferentes características de importância econômica tem sido desenvolvido, permitindo a seleção indireta de características desejáveis em gerações segregantes precoce. Esta estratégia reduziria tempo, fontes e energias necessários não só para desenvolver grandes populações segregantes por várias gerações, mas também para estimar parâmetros usados na seleção indireta. Nesse contexto, marcadores moleculares são ferramentas úteis para detectar variações no genoma, aumentando o poder de análise genética das plantas (BORÉM & CAIXETA, 2006).

4 METODOLOGIA

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO E COLETA DO MATERIAL

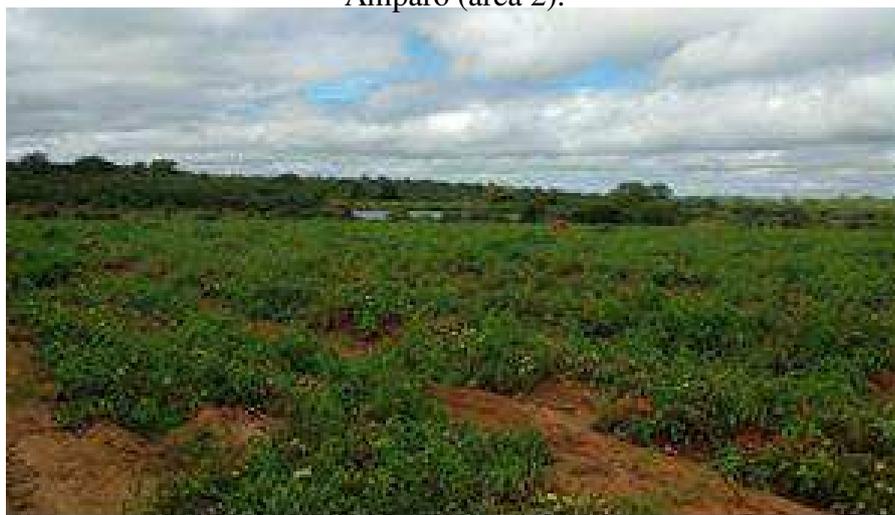
Duas áreas produtoras de tomate do tipo italiano (*Solanum lycopersicum*) foram selecionadas na região do Cariri Paraibano, abrangendo os municípios de Serra Branca (07° 29' 00'' S e 36° 39' 54'' W – Área 1) (Figura 2a) e Amparo (07° 34' 05'' S e 37° 03' 49'' W – Área 2) (Figura 2b). Buscou-se padronizar as áreas escolhidas quanto ao tipo de solo Brunos Não Cálcico vértico, fase pedregosa, com caatinga hiperxerófila; e relevo suave ondulado, associado com solos litólicos eutróficos com fraca textura arenosa e/ou média fase pedregosa e rochosa. A temperatura média anual nestas áreas é de 24,5 °C.

Figura 2a - Plantação de tomateiro situada no município de Serra Branca (área 1).



Fonte: Arquivo da pesquisa.

Figura 2b - Plantação de tomateiro situada no município de Amparo (área 2).



Fonte: Arquivo da pesquisa.

Com as duas áreas definidas, amostras foliares, apresentando sintomas virais característicos, foram coletadas e armazenadas em sacos do tipo flip-flop. As amostras foram fotodocumentadas para comparação dos sintomas, embaladas, etiquetadas e levadas para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande (CDSA/UFCG), onde foram armazenadas a - 20°C para posterior análise molecular. Duas folhas sintomáticas por indivíduo foram coletadas totalizando 83 indivíduos amostrados sendo, respectivamente, 51 amostras de plantas sintomáticas em Serra Branca e 32 em Amparo.

Os sintomas avaliados foram com base nos estudos realizados por Souza (2014), os quais observaram deformações foliares em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) provocados por vírus. Os sintomas mais característicos são: (i) clareamento das nervuras foliares; (ii) mosaico amarelo; (iii) deformação foliar; e (iv) rugosidade foliar (enrolamento das bordas para cima). Com base nestes sintomas, Santos (2009) descreve que o clareamento das nervuras nas folhas em tomateiro é provocado sobretudo por *Begomovirus*, enquanto os outros sintomas podem ser provocados por mais de um tipo de vírus. Desta forma, as coletas foram padronizadas de acordo com os sintomas relatados pelos autores citados acima e tomado nota das folhas que apresentaram clareamento nas nervuras.

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS OBTIDAS

Para explorar diferenças nas duas áreas de plantações de tomateiro (Amparo x Serra Branca) com base nos sintomas virais observados, análises multivariadas não-paramétricas foram realizadas usando o Primer 6 (v. 6.1.13) com a extensão PERMANOVA+ versão 1.0.3 (CLARKE & GORLEY, 2006; ANDERSON et al. 2008). Uma matriz qualitativa com dados binários (presença/ausência), de indivíduos infectados por área, foi montada e feita uma análise de agrupamento pelo vizinho mais próximo e mais distante, pretendendo realçar em grupos as duas áreas, por meio da análise de similaridade de correspondência simples (Simple Matching). Para testar o efeito das interações das similaridades entre os locais estudados (fator fixo), uma análise permutacional de variância (PERMANOVA), com 999 permutações aleatórias não restritivas, foi aplicada para testar diferenças entre os sintomas observados nos tomateiros. O teste de Monte-Carlo foi aplicado para validação da PERMANOVA. Verificamos também a percentagem de contribuição por cada sintoma nos locais estudados,

no intuito de verificar quais sintomas estavam mais ocorrentes por plantação e qual o grau da influência do *Begomovirus* nos tomateiros. A contribuição de cada sintoma foi determinada pela percentagem de similaridade (SIMPER), foram considerados apenas indivíduos infectados (CLARKE, 1993).

Uma análise de redundância (RDA) com a matriz de similaridade dos dados binários foi realizada para discriminar quais as variáveis sintomáticas que mais contribuíram na variação dos indivíduos das plantações de tomate coletadas, e que percentagem desta variância é explicada por estes sintomas. Este teste foi realizado utilizando o Primer 6 (v. 6.1.13) com a extensão PERMANOVA+ versão 1.0.3 (CLARKE & GORLEY, 2006; ANDERSON et al. 2008).

4.3 EXTRAÇÃO TOTAL DE DNA

Para a diagnose do *Begomovirus*, as amostras coletadas foram submetidas à extração de DNA total utilizando-se os métodos CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987), com algumas modificações. A metodologia consistiu, inicialmente, na maceração das folhas até a formação de um pó bem fino, e incubados em tubos eppendorf de 1,5 mL.

Após a maceração das folhas utilizamos o método CTAB para a extração de DNA viral, onde foi adicionado em cada eppendorf 0,5 g de tecido com 800 µL de solução tampão de extração (20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCL pH 8,0; 2 M NaCl; 2% CTAB; 2% PVP; 2% βmercaptoetanol) que foram submetidos a incubação em banho-maria a 65°C durante 1 hora. Para a separação do DNA viral, utilizou-se extração por precipitação com a adição de 600 µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1) e agitado vigorosamente por 5 min com Vortex. Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação com centrífuga CK-12 Kitlab por 10 min a 14000 rpm, com o fim deste processo o sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf e foram adicionados 500 µL de CIA e novamente centrifugados. O sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf e foram adicionados 500 µL isopropanol. Os tubos foram agitados manualmente por inversão, resfriados a - 20 °C, pernoitados e centrifugados a 9000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 800 µL de etanol 70% duas vezes. Nova centrifugação foi realizada por 4 min a 9000 rpm com o sobrenadante descartado e adicionado 790 µL de álcool absoluto. O preparado foi centrifugado por 4 min a 9000 rpm e o precipitado seco a temperatura ambiente (25 °C), por

aproximadamente 50 min. O DNA foi ressuspendido em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA) tratado com RNase (10 mg/mL) a 37 °C por 30 min e armazenado a -20°C até o momento do uso do preparado para realizar a PCR (reação de cadeia de polimerase).

A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8%.

4.4 DIAGNÓSTICO DO DNA VIRAL VIA PCR ESPECÍFICO

Após a extração do DNA, a identificação viral foi realizada com reação de PCR específica utilizando oligonucleotídeos PAL1v1978 (5'GCATCTGCAGGCCCACTYGTCTTYCCNGT3') e PAR1c496 (5'AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG3') que amplificam o fragmento de, aproximadamente, 1,2 Kb do DNA-A do *Begomovirus* (Rojas et al., 1993). As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 µL contendo 2.5 µL de Tampão 10X da enzima Taq DNA Polymerase (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 e 500 mM KCl (Invitrogen,)), 1.0 µL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 0.5 µL dNTPs (2,5 mM, Invitrogen), 1.0 µL de cada primer PALv1978/PARc715 (10uM), 0.3 µL da enzima Taq DNA Polimerase (5U/µL, Invitrogen), água MiliQ e 100ng de DNA. As amostras foram submetidas à amplificação em termociclador Master Cycler, nas condições de desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 25 ciclos (95 °C por 30s; 48 °C por 40s e 72 °C por 1 min) e extensão final a 72 °C durante 3 min. A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com os dados da matriz binária (presença/ausência) e os resultados de similaridade Simple Matching utilizando o fator fixo (Amparo x Serra Branca), a análise de permutação multivariada (PERMANOVA) mostrou diferenças significativas ($p = 0,001$) entre os locais. Assim, havendo divergências na severidade dos sintomas virais por cada plantação de *Solanum lycopersicum*. Os resultados da PERMANOVA se encontram na Tabela 1.

Observa-se também que o número de permutações foi inferior da esperada (999), sendo realizadas 550 permutações, nos levando a resultados aceitáveis, porém não ideais.

Tabela 1 - Análise de permutação multivariada (PERMANOVA) entre os locais trabalhados (Amparo x Serra Branca). Onde: gl = graus de liberdade; DP = desvio padrão; MP = média padrão; p(MC) = Teste de significância de Monte-Carlo.

Fonte de Variação	gl	DP	MP	Pseudo-F	P(perm)	Permutações	p(MC)
Locais	1	7911,4	7911,4	41,101	*0,001	550	*0,001
Resíduos	71	13667	192,49				
Total	72	21578					

De acordo com a análise de percentagem de Similaridade (SIMPER), a qual calcula a contribuição percentual de cada sintoma ocorrido nas plantações, a Tabela 2a mostra que os sintomas com maior contribuição foram rugosidade e deformação foliar, com contribuição 31,94% e 59,03%, respectivamente. Outro sintoma observado foi à ocorrência do clareamento das nervuras, com 9,03%, nos indicando a influência do *Begomovirus* nos indivíduos na plantação de tomate, em Amparo, de maneira mais forte. Na Tabela 2b, para os indivíduos de *Solanum lycopersicum* avaliados em Serra Branca, os sintomas mais frequentes foram rugosidade, manchas amareladas e deformação foliar, com 75,11%, 18,45% e 6,44%, respectivamente. Percebemos que não houve uma influência maior do *Begomovirus* na plantação de Serra Branca quando comparada com a plantação de Amparo, o que pode indicar a presença de outros patógenos que causam sintomas semelhantes encontrados no presente

estudo. A exemplo, a grande frequência do sintoma rugosidade que pode ser característico dos vírus dos gêneros *Tobamovirus* e *Cucumovirus* (PEREIRA-CARVALHO et. al, 2014), os vírus ToYTV (*Tomato yellow top virus*) e TBYLV (*Tomato bottom yellow leaf virus*) da família *Luteoviridae* (KUROZAWA e PAVAN, 2005).

Tabela 2a - Percentagem de Similaridade (SIMPER) dos sintomas virais para plantação de Amparo.

Sintomas	Amparo	
	Contribuição (%)	Contribuição Cumulativa (%)
Manchas Amareladas	0	0
Clareamento	9,03	9,03
Rugosidade	31,94	40,97
Deformação	59,03	100

Tabela 2b: Percentagem de Similaridade (SIMPER) dos sintomas virais para a plantação de Serra Branca.

Sintomas	Serra Branca	
	Contribuição (%)	Contribuição Cumulativa (%)
Clareamento	0	0
Deformação	6,44	6,44
Manchas Amareladas	18,45	24,89
Rugosidade	75,11	100

A análise de redundância (dbRDA) mostrou uma variação total de 71,5% explicada para o eixo 1 e 50,1% para o eixo 2 (Figura 3), enquanto a variação individual no eixo 1 foi de 59,28% e no eixo 2 41,56% (Tabela 3). Os sintomas que contribuíram com maior

representatividade da variância nos eixos foram clareamento das nervuras, deformação foliar e rugosidade (Tabela 4). Assim, tem-se a demonstração de que as duas áreas apresentaram frequência de sintomas diferentes, variando de acordo com a severidade dos mesmos. No município de Amparo observamos maior influência do *Begomovirus* nas plantações de tomate quando comparado com Serra Branca.

Figura 3 - Ordenação dos eixos da análise de redundância explicando a influência dos sintomas entre os locais estudados.

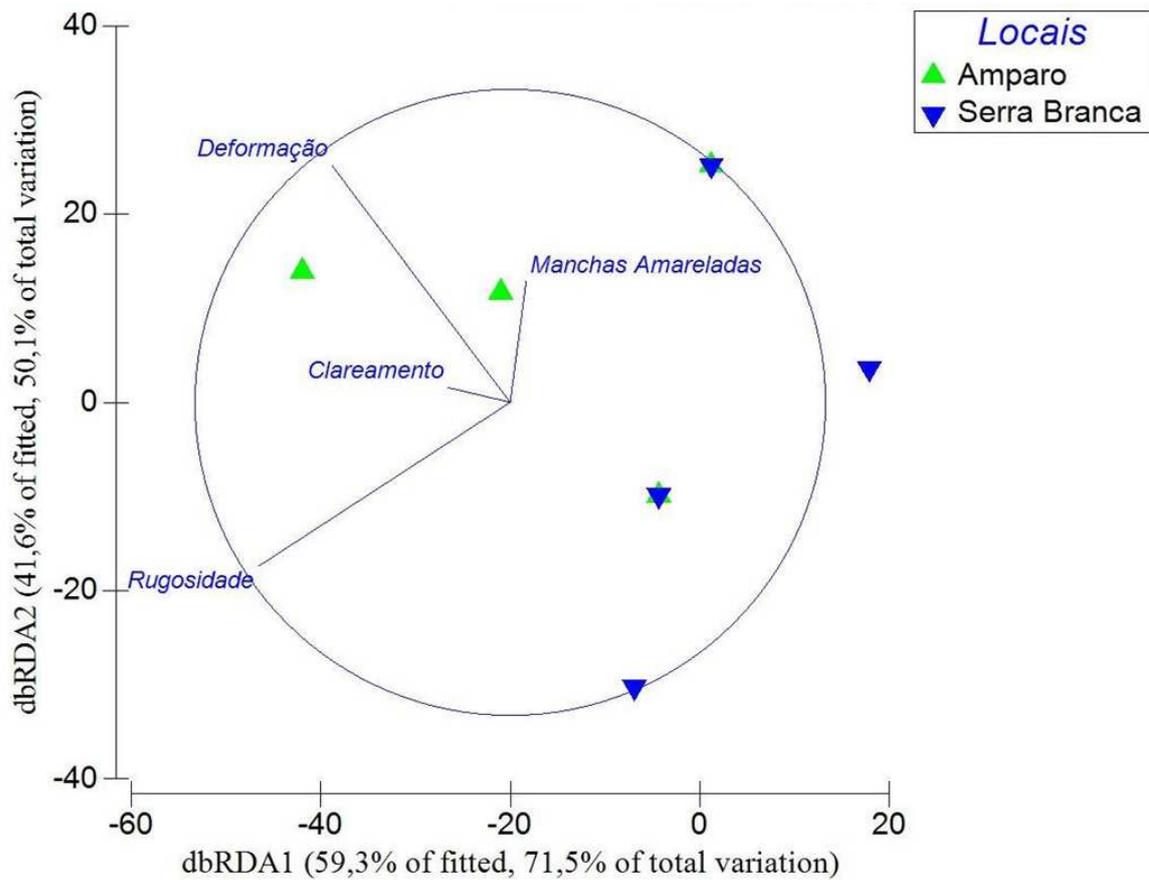


Tabela 3 - Porcentagem de Variação explicada para os eixos da Análise de Redundância (dbRDA) dos sintomas virais entre os Locais.

dbRDA				
Eixos	Varição por Eixo (%)		Varição Total (%)	
	Individual	Cumulativa	Individual	Cumulativa
1	59,28	59,28	71,46	71,46
2	41,56	100,84	50,11	121,57
3	2,03	102,87	2,45	124,02
4	-2,87	100	-3,46	120,56

Tabela 4: Correlação parcial múltipla da análise de redundância (dbRDA) entre as coordenadas das variáveis medidas (sintomas virais) e os locais estudados (Amparo x Serra Branca).

dbRDA (correlação parcial múltipla)				
Variáveis	dbRDA1	dbRDA2	dbRDA3	dbRDA4
Clareamento das Nervuras	-0,198	0,047	-0,681	0,703
Manchas Amareladas	0,051	0,387	-0,655	-0,647
Deformação Foliar	-0,566	0,758	0,312	0,092
Rugosidade	-0,799	-0,524	-0,094	-0,281

Como mostrado na Tabela 1, contendo o resultado da PERMANOVA, houve uma diferença significativa na severidade dos sintomas entre as áreas estudadas. Esta diferença pode ser proveniente de diversos fatores. Segundo Rêgo (2016), a frequência e intensidade de doenças no tomateiro podem ser influenciada por distintas causas, como: a forma de

implantação e condução da lavoura; a qualidade da semente, localização da área plantada e estado nutricional da planta. Outro aspecto a ser observado é o fato de que na plantação de Amparo a cultura de tomateiro era plantada em conjunto com cultura de pimentão, o que não acontecia em Serra Branca, sendo isso um fator a ser considerado. Já que de acordo com Calegario (2004), espécies de *Begomovirus* também infecta outras culturas economicamente importantes, como o pimentão, o que possibilitaria a manutenção do vírus nas épocas que o tomateiro não está presente no campo, servindo de reservatório de inóculo para o próximo plantio.

Deve-se ponderar também o fator climático, tendo em vista que as plantações foram analisadas em diferentes épocas do ano, sendo feita a coleta de Serra Branca no mês de janeiro de 2017, e a coleta de Amparo em julho de 2017, podendo assim ter influenciado na severidade dos sintomas. Santos (2009) também realizou seus experimentos com análise de sintomas de ToYVSV, uma espécie de *Begomovirus*, e averiguou que apesar das coletas terem sido realizadas no mesmo local e em épocas diferentes, foi observado um aumento da influência viral junto as variações ambientais interferindo nos sintomas avaliados. Já Rocha (2017) afirma que uma mesma espécie de vírus pode causar respostas diferentes em um mesmo hospedeiro, se os mesmos estiverem em ambientes distintos, corroborando, assim, com os resultados apresentados neste trabalho. Neste mesmo experimento, Rocha (2017) elucida que as diferenças de sintomas podem ser expressas, em determinadas situações, devido ao estresse abiótico e a interação com outros patógenos. Desta forma, pode-se supor a possibilidade de ter havido outros patógenos presentes nas amostras coletadas, resultando nas diferenças de frequência dos sintomas nas áreas apresentadas nas Tabelas 2a e Tabela 2b.

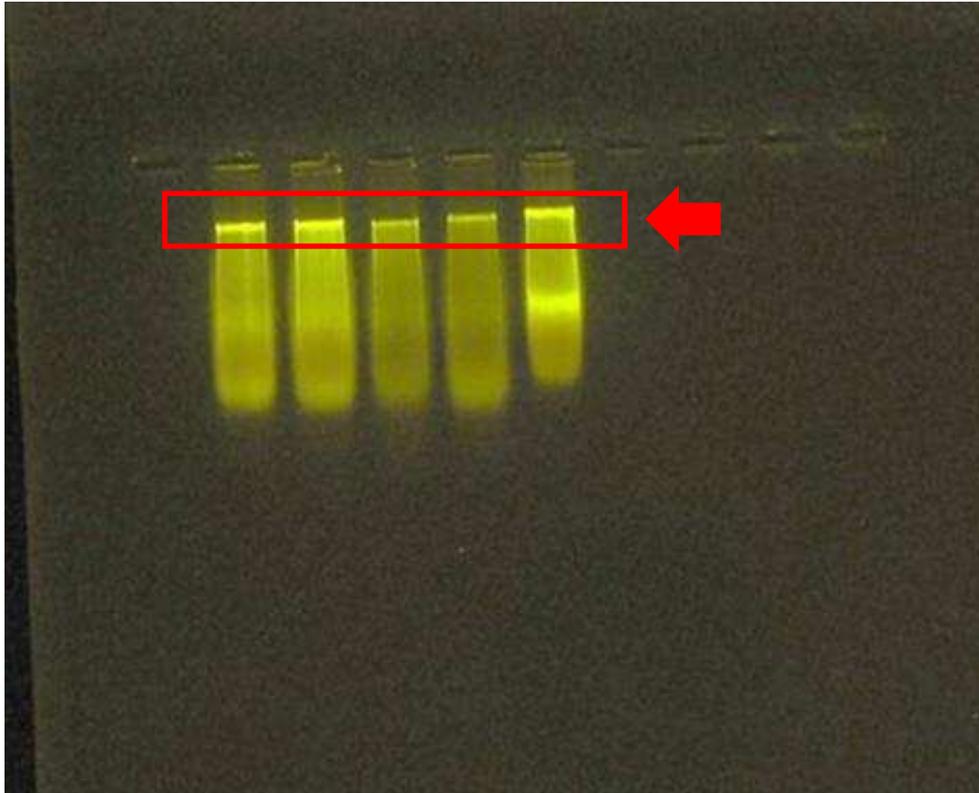
Alguns autores citam, como exemplo, Pereira-Carvalho et al. (2014) que falam das espécies de *tospovirus* podem causar deformação foliar; já as espécies de *tobamovirus* e *cucumovirus* apresentam como um dos sintomas o enrolamento foliar (rugosidade); sintomas característicos de *crinivirus* são as manchas cloróticas/amareladas. Já Kurozama e Pavan (2005) descrevem os vírus ToYTV e TBYLV da família Luteoviridae, causadores do sintoma enrolamento foliar (rugosidade). Rêgo (2016) cita a família *Potyviridae* como causadora dos sintomas deformação foliar e manchas cloróticas/amareladas.

Mesmo o *Begomovirus* estando presente na plantação de Serra Branca, os sintomas apresentados nesta área foram brandos, fazendo necessário a realização de novos estudos que possam elucidar a diversidade viral presente e a influência da interação desses patógenos na sintomatologia.

5.2 ANÁLISE MOLECULAR

Até a conclusão deste trabalho, só foram realizadas as análises moleculares das amostras coletadas na área de Serra Branca. Através do método CTAB foi possível realizar a extração de DNA das amostras coletadas na área 1, e posteriormente sua quantificação (Figura 4).

Figura 4 - Quantificação de DNA proveniente de tomateiro em gel de agarose.

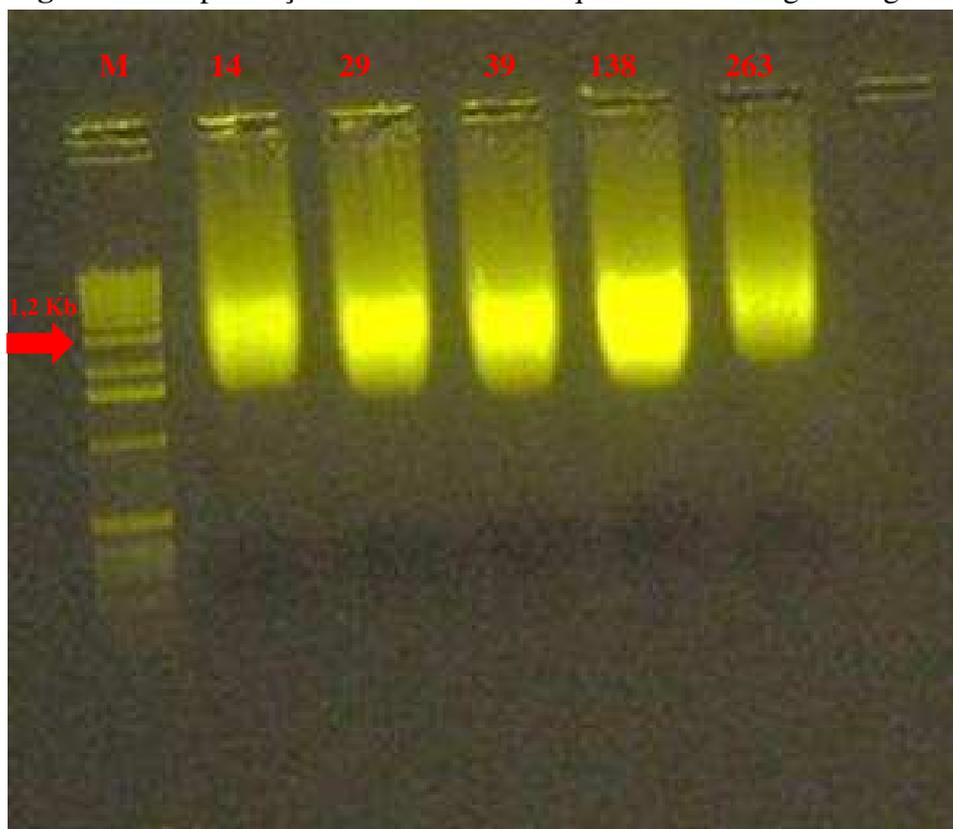


Fonte: Arquivo da pesquisa.

É notável na Figura 4, que o DNA apresentou um padrão de arraste no gel, que demonstra a degradação do mesmo. Esta degradação pode ser proveniente de diversos fatores, como o tempo de armazenamento das amostras ou possíveis contaminantes. Entretanto, é possível visualizar bandas, evidenciando a extração do DNA viral.

Logo após, foi realizada a reação PCR específica utilizando os marcadores moleculares PAL1v1978 e PAR1c496, ocorrendo a quantificação posteriormente à amplificação (Figura 5).

Figura 5 - Amplificação de DNA via PCR quantificado em gel de agarose.



Fonte: Arquivo da pesquisa.

É possível visualizar na Figura 5 que há um arraste no gel comprometendo o resultado da amplificação, sendo o mesmo proveniente da degradação do DNA anteriormente mencionado. Entretanto, ainda é aparente a presença de bandas amplificadas no tamanho, aproximado, de 1,2 Kb, corroborando com o diagnóstico do DNA viral para *Begomovirus*.

Esta análise se faz necessária já que, a presença ou ausência de sintomas, e os diferentes níveis de severidade dos mesmos, não são suficientes para afirmar a infecção do tomateiro por *Begomovirus*, apesar de ser um forte sinalizador. O resultado do nosso estudo mostra a eficiência da análise molecular para identificação viral. Estudos realizados por Arnaud et al. (2007) mostra que testes sorológicos não são tão conclusivos na identificação de vírus, já que diversas identificações podem apresentar um resultado falso-positivo.

Araujo (2014), também realizou o diagnóstico molecular para detecção de *Begomovirus* presente em amostras de tomateiro em seu trabalho, e conclui que a sintomatologia visual não é parâmetro suficiente para identificação de fitopatógenos, sendo assim necessário a utilização de técnicas moleculares, já que a mesma permite com eficiência e rapidez a detecção e estudo de variabilidade genética de vírus.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através das análises realizadas no presente estudo, chegou-se as seguintes conclusões:

- Dos sintomas avaliados nas plantações de tomate para Amparo e Serra Branca não são exclusivos para o *begomovirus*, apenas clareamento de nervura ocorrido em Amparo, o que caracterizou a baixa frequência sintomática do vírus diagnosticado nas duas plantações.
- As diferenças das estações de coleta, quanto a período do ano, formas do cultivo e diferenças climáticas, por exemplo, podem ter contribuído nos resultados no presente estudo. Desta maneira, é necessária uma nova avaliação nas plantações de tomateiro na região do Cariri paraibano, principalmente realizando uma diagnose viral mais conclusiva para o vírus estudado e para outros vírus não diagnosticados no presente estudo. Assim, poderemos ter uma investigação mais precisa quanto a influência do *begomovirus* nas plantações estudadas, que venha a corroborar com os resultados apresentados deste estudo.
- Apesar do viés amostral, o presente trabalho traz informações pertinentes na identificação e influência dos vírus nas plantações de tomate na região do cariri paraibano. Sabemos que a região possuía grandes produções de tomate que era comercializada para todo o estado da Paraíba e outros estados vizinhos. Com o tempo, os pequenos agricultores não conseguiram produzir tomate por vários motivos adversos, não conseguindo obter bons frutos para comercialização. Logo, com o trabalho realizado, temos uma primeira evidência da influência viral nestas plantações o que pode contribuir na baixa produtividade afetando a economia da região.
- A análise molecular realizada com os marcadores PAL1v1978 e PAL1v1978 foi conclusiva para o diagnóstico de *begomovirus* na plantação de Serra Branca.

REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL 2017: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comercio, 2015. 472 p.
- ALENCAR, F. C. et al. Avaliação in vitro do antagonismo de BPCPs ao *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. **Horticultura Brasileira**, [S.L], v. 30, n. 2, p. 185-191, jul./jul. 2012.
- ANDERSON, M. J.; GORLEY, R. N.; CLARKE, K. R. PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to software and Statistical Methods. Institute of Information and Mathematical Sciences. Massey University. 2008.
- ARAÚJO, A. L. R. **Desempenho agrônômico de genótipos de tomateiro e reação a Geminivirus**. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas), Universidade Federal Rural do Pernambuco, Recife, PE. 2014. 58f.
- ARNAUD, L.S.E.P., SANTOS, C.D.G., LIMA, J.A.A. & FEITOSA, F.A.A. Predominância de begomovírus em tomateiros na região produtora da Ibiapaba, Ceará, e sua detecção natural em plantas daninhas. **Fitopatologia Brasileira** 32:241-246. 2007.
- BARONE, A., DI MATTEO, A., CARPUTO, D. & FRUSCIANTE, L. 2009. High-throughput genomics enhances tomato breeding efficiency. *Current genomics*, 10, 1.
- BEDFORD, I. D.; BRIDDON, R. W.; BROWN, J. K.; ROSELL, R. C.; MARKHAM, P. G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. **Annals of Applied Biology**, v. 125, p. 311-325, 1994.
- BEZERRA, I.C., LIMA, M.F., RIBEIRO, S.G., GIORDANO, L.B., ZERBINI, F.M., ÁVILA, A.C. Occurrence of geminivirus in tomato-producing areas in Submédio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 331, 1997.
- BRIDDON, R.W. Cotton leaf curl disease, multicomponent Begomovirus. **Complex. Molecular plant Pathology**, v.4, p.427-434, 2003.
- BOITEUX, L. S., FONSECA, M. E. N., VIERA, J. V. & PEREIRA-CARVALHO, R. C. 2012. Melhoramento para resistência a doenças virais. In: BORÉM, A. & FRITSCH-NETO, R. (eds.) **Melhoramento de Plantas para Condições de Estresses Bióticos**. Visconde de Rio Branco, MG: Suprema.
- BORÉM, A., CAIXETA, E. T. Marcadores moleculares. In: ARRIEL, N.H. DE CASTRO., COSTA, M.M., TREVISOLI, S.H.U., MAURO, A.O. (org). **Outras aplicações dos marcadores**. Viçosa-MG, p.145-204, 2006.
- CALEGARIO, R. F. **Caracterização de um isolado de begomovirus sida micranta mosaic virus (SimMV)**. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2004. 50f.
- CLARKE, K. R.; GORLEY, R. N. **PRIMER V6: User Manual/ Tutorial**. PRIMER-E, Plymouth, UK. 2006.
- Clarke K. R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. **Aust. J. Ecol.** 18, 1993. 117-43.

COSTA, A.S., OLIVEIRA, A.R., SILVA, D.M. Transmissão mecânica do mosaico dourado do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 147, 1975.

DOYLE, J.J., AND J.L DOYLE, 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. **Phytochem Bull** 19: 11–15

FARIA, J.C., SOUZA-DIAS, J.A.C., SLACK, S., MAXWELL, D.P. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, v. 81, p. 423, 1997.

FÁRI, MIKLÓS; RESENDE, GERALDO MILANEZ DE; MELO, NATONIEL FRANKLIN DE. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE REGENERAÇÃO IN VITRO EM TOMATEIRO INDUSTRIAL1. **Pesq. agropec. bras**, Brasília, v. 35, n. 8, p. 1523-1529, ago. 2000.

FERNANDES, J. J. **Caracterização e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro na região do triângulo mineiro**. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2001. 163f.

FRANÇA, F.H., VILLAS-BOAS, G.L., CASTELO-BRANCO, M. Ocorrência de Bemisia argentifolii Bellows & Perring (Homoptera:Aleyrodidae) no Distrito Federal. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v. 25, p. 369-372, 1996.

GALVÃO, R.M., FERNANDES, A.V., ALMEIDA, J.D., ALFENAS, P.F., ANDRADE, E.C., FONTES, E.P.B. Molecular characterization of two new tomato-infecting geminiviruses and the Sida-infecting geminiviruses complex from Brazil. International Workshop on Bemisia and Geminiviral diseases. San Juan - Puerto Rico, p. L-93, 1998.

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. **Matthew's Plant Virology**. Londres: Academic Press, 2002. 1001p.

HURTADO FD; GIL MA; ZUBIAUR YM; AGUILERA JG; XAVIER CAD; ZERBINI JUNIOR FM; SILVA DJH. 2012. Fontes de resistência em tomateiro aos begomovírus bissegmentados Tomato yellow spot virus e Tomato severe rugose virus. **Horticultura Brasileira** 30: 639-644.

IBGE, 2018. **Estatística mensal da Produção Agrícola Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: <file:///C:/Users/Laura/AppData/Local/Temp/Temp1_estProdAgr_201802.zip/estProdAgr_201802.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2018.

ICTV. **Virus taxonomy: 2017 release**. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 01 mar. 2018.

KING, A. M. Q., LEFKOWITZ, E., ADAMS, M. J. & CARSTENS, E. B. **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, Elsevier Science. 2011.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro. In: **Manual de fitopatologia: Doenças de Plantas cultivadas**. São Paulo: Agrônoma Ceres, 2005. p.607-626.

LIMA, M. F. **Detecção e Controle de Viroses em Videira**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. 9 p. (Embrapa Semiárido: Circular Técnico, 90).

MAKISHIMA, N. O popular tomate. In: PROGRAMA BRASILEIRO PARA MODERNIZACAO DA HORTICULTURA. **Normas de classificação do tomate**. São Paulo: Centro de Qualidade em Horticultura/CEAGESP, 2003. (CQH. Documentos, 26).

MEDEIROS, R. B. de et al. *Virologia vegetal*. Brasília: Universidade de Brasília, 2015. 765p.

MELO, P.C.T. Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Campinas, SP, Brazil: Asgrow do Brasil Sementes Ltda., Technical Bulletin 1992.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in enzymology**, v.15, p.335-350, 1987.

PEREIRA-CARVALHO, R. D. C.; TOBAR, L.; DIANESE, E. D. C.; FONSECA-BOITEUX, M. D. N.; BOITEUX, L. Melhoramento genético de tomateiro para resistência a doenças de etiologia viral: avanço e perspectivas. Disponível em: [https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1009855/1/RAPP2014Melhoramento tomatevirus.E. 2014](https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1009855/1/RAPP2014Melhoramento%20tomatevirus.E.2014).

POLSTON, Jane E; BARRO, Paul De; BOYKIN, Laura M. Transmission specificities of plant viruses with the newly identified species of the Bemisia tabaci species complex. **Pest Manag Sci**, [S.L], v. 70, p. 1547-1552, jan. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ps.3738>>. Acesso em: 01 mar. 2018.

POTTER, J.L., NAKHA, M.K., MEJIA, L., MAXWELL, D.P. PCR and DNA hybridization methods for specific detection of bean-infecting begomoviruses in the Americas and Caribbean. **Plant Disease**, v. 87, p. 1205-1212, 2003

QUEZADO-DUVAL AM; NASCIMENTO AR; PONTES NC; MOITA AW; ASSUNÇÃO A; GOLYNSKI A; INOUE-NAGATA AK; OLIVEIRA RT; CASTRO YO; MELO BJ. 2014. Desempenho de híbridos de tomate para processamento industrial em pressão de begomovirose e de mancha-bacteriana. **Horticultura Brasileira** 32: 446-452. DOI - <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620140000400012>

RÊGO, C. M. **Diversidade genômica de begomovírus em tomateiros resistente (brs sena) e suscetível (h-9553)**. Dissertação (Mestrado Fitopatologia), Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2016. 101f.

REZENDE, E.A. et al. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 424, 1996.

RIBEIRO, S.G., BEZERRA, I.C., LIMA, M.F., ÁVILA, A.C., GIORDANO, L.B. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. VIII Encontro Nacional de Virologia (Resumos). São Lourenço, MG: SBV, p. 290, 1996.

RICK, C.M. El tomate. **Investigacion y Ciencia**, v.25, p.45-55, 1978.

ROCHA, G. A. **Begomovírus em áreas de cerrado: de herbáceas cultivadas a arbóreas selvagens**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2017. 70f.

ROJAS MR; GILBERTSON RL; RUSSELL DR; MAXWELL DP. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease** 77: 340-347.

SANTOS, F. F. B. **Obtenção e Seleção de Híbridos de Tomate Visando à Resistência ao *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV)**. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Genética), Melhoramento Vegetal e Biotecnologia, Instituto Agronômico, Campinas, SP. 2009. 75f.

SANTOS, J. C. S. **Seleção de linhagens avançadas de tomateiro resistentes ao geminivírus (*Tomato yellow vein streak virus* – ToYVSV)**. Dissertação (Mestrado em Concentração em Genética), Melhoramento Vegetal e Biotecnologia, Instituto Agronômico, Campinas, SP. 2010. 80f.

SILVA, E. K. C. Cowpea severe mosaic virus: **Diagnóstico, estudo de herança e identificação de marcadores moleculares associados a resistência**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE. 2008. 72f.

SILVANO, P. E. S. **Diagnose das viroses do enrolamento das folhas associado-3 e do intumescimento dos ramos da videira (*vittis* spp) em Santa Catarina**. Dissertação (Mestrado Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2003. 82f.

SOUZA, J. O. **Análise da Diversidade de Begomovírus em Tomateiros (*Solanum lycopersicum*) da Região Nordeste do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2014. 101f.

STANLEY, J., BISARO, D.M., BRIDDON, R.W., BROWN, J.K., FAUQUET, C.M., HARRISON, B.D., RYBICKI, E.P., STENGER, D.C. Family Geminiviridae. In: FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L.A. (Eds.). Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, p. 301-326, 2005.

TOGNI, P. H. B. **Bases Ecológicas para o Manejo de *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em Sistemas Orgânicos de Produção de Tomate**. Dissertação (Mestrado em Ecologia), Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2009. 110f.

VILLAS-BÔAS, G.L.V.; BRANCO, M. C. Manejo Integrado da Mosca-Branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) em Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria (PITI). Brasília: **Embrapa**, p.16, 2009. (Comunicado Técnico).

ZERBINI, F.M., ZAMBOLIM, E.M., CARRIJO, I.V., GILBERTSON, R.L. A new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Minas Gerais, **Brazil**. *Phytopathology*, v. 86, p. S1, 1996.