

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *Tomato severe rugose virus* E *Tomato chlorosis virus* EM TOMATEIRO DETERMINADO

LEYSIMAR RIBEIRO PITZR GUIMARÃES

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP

Fevereiro – 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *Tomato severe rugose virus* E *Tomato chlorosis virus* EM TOMATEIRO DETERMINADO

LEYSIMAR RIBEIRO PITZR GUIMARÃES

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Denise Nakada Nozaki

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP

Fevereiro – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

G963i Guimarães, Leysimar Ribeiro Pitzr, 1986-
Indução de resistência a *Tomato severe rugose virus* e *Tomato chlorosis virus* em tomateiro determinado / Leysimar Ribeiro Pitzr Guimarães. - Botucatu : [s.n.], 2016
ix, 55 f. : fots. color.; grafs. color., ils. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016
Orientador: Marcelo Agenor Pavan
Coorientador: Denise Nakada Nozaki
Inclui bibliografia

1. Tomate - Doenças e pragas. 2. *Lycopersicon* - Resistência a doenças e pragas. 3. Víroses de plantas. 4. Fungicidas - Efeito fisiológico. I. Pavan, Marcelo Agenor. II. Nozaki, Denise Nakada. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "INDUÇÃO DA RESISTÊNCIA A *Tomato Severe rugose virus* E *Tomato chlorosis virus* EM TOMATEIRO DETERMINADO"

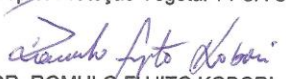
AUTORA: LEYSIMAR RIBEIRO PITZ GUIMARÃES

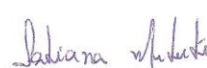
ORIENTADOR: MARCELO AGENOR PAVAN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MARCELO AGENOR PAVAN
Depto. Proteção Vegetal / FCA Unesp Botucatu


Profa. Dra. RENATE KRAUSE SAKATE
Depto. Proteção Vegetal / FCA Unesp Botucatu


DR. ROMULO FUJITO KOBORI
Fitopatologia / Sakata Seed Sudamerica Ltda


Profa. Dra. TATIANA MITUTI
Depto. Fitopatologia e Nematologia / Esalq USP


Prof. Dr. JOÃO DOMINGOS RODRIGUES
Dept. de Botânica / IBB Unesp Botucatu

Botucatu, 18 de fevereiro de 2016.

Sabemos como é a vida: num dia dá tudo certo e no outro as coisas já não são tão perfeitas assim.

Altos e baixos fazem parte da construção do nosso caráter.

Afinal, cada momento, cada situação, que enfrentamos em nossas trajetórias é um desafio, uma oportunidade única de aprender, de se tornar uma pessoa melhor.

Só depende de nós, das nossas escolhas...

Não sei se estou perto ou longe demais, se peguei o rumo certo ou errado.

Sei apenas que sigo em frente, vivendo dias iguais de forma diferente.

Já não caminho mais sozinho, levo comigo cada recordação, cada vivência, cada lição.

E, mesmo que tudo não ande da forma que eu gostaria, saber que já não sou a mesma de ontem me faz perceber que valeu a pena.

Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso. O sucesso é só consequência.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por eu ter conseguido realizar este trabalho, e ainda me ensinando sobre Fé.

A Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agronômicas – Campus de Botucatu, pela oportunidade da realização do curso de doutorado.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Ao Professor Marcelo Pavan pela oportunidade e confiança depositada, pelos ensinamentos e orientações prestados durante a realização do trabalho.

À minha querida amiga e Co-Orientadora Denise Nakada Nozaki, pelos momentos de conversa, pela paciência em me ensinar e me ouvir, pelos estímulos nos momentos difíceis, pela confiança e contribuição para que nosso trabalho fosse concluído.

A Professora Renate Krause-Sakate, pelas sugestões e contribuições para o desenvolvimento do trabalho, por toda simpatia e educação e ensinamentos prestados ao longo do curso.

À empresa BASF, que nos apoiou e confiou em nosso projeto, nos cedendo os produtos para serem testados tanto na dissertação quanto na tese, o nosso muito obrigado.

Ao meu pai Adelino Pitzer Guimarães, por ter me educado, e mesmo distante, incentivando em todas as minhas decisões.

À minha mãe Neusa Enir Ribeiro Guimarães, por ter me gerado, educado, orado com bastante fé para tudo dar certo e apoiando em todo os momentos difíceis.

Aos meus irmãos, Markelly, Higyson e Geysielle Guimarães, pela compreensão, auxílio e participação em vários momentos de nossas vidas, das quais me lembro todos os dias, em algum momento, e por todo apoio prestado, me fazendo acreditar que eu era capaz de realizar esse sonho.

Aos meus avós paternos, Juarez Guimarães e Maria Rosa Pitzer Guimarães, à minha avó materna Rosa Marcílio Ribeiro, às minhas Tias Ione Guimarães, Ivone Guimarães e Rosenir Marcílio Ribeiro, pelo carinho, apoio e torcida por mais uma vitória em minha vida.

Ao querido José Anchieta Callou Júnior, pela motivação nos momentos difíceis, pela paciência nas horas de estresse, pela cumplicidade, carinho e amor.

A Lidiane Fernandes Colombari, Michely Alves, Mariane Coelho, obrigada pela amizade, pelo convívio, pelos momentos de descontração, paciência e compreensão, durante o meu trajeto.

As minhas amigas Daniela Oliveira, Mariana Silvestre, Barbara Rhein, Lília Marquione, pela amizade e que mesmo longe nunca me esqueceram, me deram apoio e incentivo para a realização desse trabalho.

Aos amigos Ruralinos e Unespianos, Laís Lorena, Itaynara Batista, Deivid Machado, Nathalia Rodrigues obrigada pela amizade, companheirismo, incentivo e principalmente por compartilhar comigo alegrias e tristezas.

Aos amigos do Laboratório de Virologia, Letícia Moraes, Cristiane Melo, Tatiana Mituti, Daiana Bampi, Mônica Fecury, Leonardo Barbosa, Milena Leite, Bruno De Marchi, Késsia Pantoja, David Spadotti, Evelynne Urzêdo, Francielle, Naiara Vallado, Gabriel, Luiz Fernando, Guilherme Gotardi, Vinicius Bello, muitos ainda estão presentes e alguns que já seguiram sua caminhada... e aos amigos do laboratório de Bacteriologia, João César e Marcelo Soman, obrigada a todos pela amizade, companheirismo, pelos momentos de conversa e cafezinhos no corredor do departamento.

As amigas Paulinha Leite, Patrícia Leite, Kelly Nunes, Marina Mouzinho, Erika Correa, a quem tive o prazer em conhecer e compartilhar momentos de alegria e descontração.

Ao Paulo Roberto Rodrigues (Paulinho) e Ademir Pereira (Sr. Pereira), funcionários do Departamento de Proteção Vegetal por toda ajuda prestada, sem vocês eu não conseguiria levar meus experimentos até o final, o meu muito obrigado.

As queridas funcionárias da limpeza Maria e Luciana, por toda alegria, educação, carinho e conversas no corredor do departamento.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Minha sincera gratidão.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
1 RESUMO	1
2 SUMMARY	3
3 INTRODUÇÃO GERAL	4
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
4.1 Cultura do tomateiro.....	6
4.1.1 Aspectos gerais da cultura do tomateiro	6
4.1.2 Produção da tomaticultura nacional e mundial	7
4.2 Gênero Begomovirus - <i>Tomato severe rugose virus</i>	9
4.3 Gênero Crinivirus - <i>Tomato chlorosis virus</i>	11
4.4 Produtos de efeitos fisiológicos e seu incremento nas culturas	14
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
CONSIDERAÇÕES GERAIS	49
 CAPÍTULO 1	 23
RESUMO	24
ABSTRACT	25
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E MÉTODOS	27
Instalação do experimento e Delineamento experimental.....	27
Condução do experimento.....	28
Detecção do Tomato severe rugose virus (ToSRV) e do Tomato chlorosis virus (ToCV) .	28
Aspectos de produção e análises químicas dos frutos de tomateiro.....	29
Quantificação por PCR em tempo real (qPCR) de ToSRV	29
Atividade de Peroxidase.....	30
RESULTADOS	30
Idade fenológica do tomateiro cv Mariana e eficiência de inoculação do ToSRV e ToCV	30
Efeito da Piraclostrobina+Metiram no desenvolvimento, produção e qualidade dos frutos	31
Quantificação de ToSRV nas diversas fases fenológicas da cultura e efeito da	
Piraclostrobina+Metiram sobre a replicação	32

Modelo de quantificação de ToSRV e a relação com atividade de Peroxidase	33
DISCUSSÃO.....	34
CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	37
APÊNDICES	50
APÊNDICE A	51
APÊNDICE B	52
APÊNDICE C	53
APÊNDICE D	54
APÊNDICE E.....	55

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Efeito da aplicação Piraclostrobina+Metiran em plantas infectadas com ToSRV e ToCV sobre a produção total (kg-1), peso de frutos (g-1), % frutos verdes e Ratio (Sólidos Solúveis/ Acidez Titulável), em plantas que receberam o pre-tratamento na semeadura.....	44
Tabela 2. Efeito da aplicação Piraclostrobina+Metiran em plantas infectadas com ToSRV e ToCV sobre a produção total (kg-1), peso de frutos (g-1), % frutos verdes e Ratio (Sólidos Solúveis/ Acidez Titulável), em plantas não tratadas na semeadura.....	45
Tabela 3. Análise conjunta dos experimentos com ou sem pré-tratamento de Piraclostrobina+Metiram ((P+M) (3 g. l ⁻¹) (BASF) ® + Boscalida (0,3 g. l ⁻¹) (BASF) ®) na bandeja após a semeadura.	46

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação esquemática do genoma do <i>Bean golden yellow mosaic virus</i> (BGYMV), espécie tipo do gênero <i>Begomovirus</i> . Extraído de GUTIERREZ, et al. (2004). ..	10
Figura 2. Representação esquemática do genoma <i>Tomato chlorosis virus</i> (ToCV), espécie do gênero <i>Crinivirus</i> Extraído de WINTERMANTEL et al. (2005).	13

CAPITULO 1

Figura 1. Quantificação absoluta de Tomato severe rugose virus (ToSRV) em tomateiro determinado híbrido “Mariana”. As inoculações foram realizadas aos A) 15 DAT, B) 30 DAT, C) 45 DAT, D) 60 DAT, e as quantificações representadas no eixo “X” realizadas aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após inoculações (DAI).....	47
Figura 2. Modelo da quantificação do Tomato severe rugose virus em tomateiro híbrido “Mariana” inoculado aos 15, 30, 45, 60 e 75; DAT com o ToSRV.e sua relação com a atividade de peroxidase (POD). POD com Pré-Trat/ Com P+M: $y = -0,0002x^3 + 0,0317x^2 - 1,3638x + 20,06$ ($R^2 = 0,9457$); POD sem Pré-Trat/ Sem P+M: $y = -0,0002x^3 + 0,0262x^2 - 1,1455x + 17,09$ ($R^2 = 0,9003$).	48

1 RESUMO

Uma das principais causas da perda de produção do tomateiro ocorre devido à infecção precoce das plantas por vírus dos quais podemos destacar as espécies *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato chlorosis virus* (ToCV). O controle de vírus é muito difícil, e diversas táticas podem ser utilizadas pelo produtor, dos quais podemos citar o uso de produtos químicos que causam efeitos fisiológicos secundários. Nesta linha o presente trabalho avaliou o efeito da aplicação de Piraclostrobina+Metiram (Cabrio Top®) na produção e qualidade de frutos de tomate em plantas infectadas por ToSRV e ToCV, em diferentes fases fenológicas do ciclo da cultura. O ToSRV também foi quantificado por qPCR nestas plantas. Dois experimentos foram realizados paralelamente, onde um recebeu um pré-tratamento pela aplicação de Piraclostrobina+Metiram (P+M) (3 g. l^{-1}) (BASF) ® + Boscalida ($0,3 \text{ g. l}^{-1}$) (BASF) ® na bandeja após a semeadura e no outro as mudas de tomateiro não receberam nenhum produto. Os tratamentos foram constituídos da inoculação do vírus por *Bemisia tabaci* biótipo B aos 15, 30, 45, 60, 75 dias após o transplantio (DAT) com aplicação ou não de Piraclostrobina+Metiram (P + M) (4.0 g. l^{-1}). O ToSRV foi detectado por RCA-PCR e qPCR e o ToCV por NESTED RT-PCR, além das características de produção e qualidade de frutos terem sido avaliadas. Os resultados obtidos demonstraram que plantas infectadas após os 45 DAT são menos afetadas pela infecção de ToSRV e ToCV e a aplicação de P + M ao longo do ciclo da cultura trouxe

benefícios ao tomateiro uma vez que características de produção e qualidade dos frutos foram menos afetadas. A replicação viral do ToSRV foi negativamente influenciada pela aplicação do P + M sugerindo um possível envolvimento de mecanismos de resistência da planta ao vírus induzidos pelo produto.

Palavras-chave: *Begomovirus*, *Crinivirus*, *Solanum lycopersicum*, qPCR

INDUCTION OF RESISTANCE TO *Tomato severe rugose virus* and *Tomato chlorosis virus* IN DETERMINED TOMATO . Botucatu, 2016, 65f. Dissertação (Doutorado em Agronomia/ Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: Leysimar Ribeiro Pitzr Guimarães

Adviser: Marcelo Agenor Pavan

Co-Adviser: Denise Nakada Nosaki

2 SUMMARY

The early infection of plants by viruses such as the species of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) and *Tomato chlorosis virus* (ToCV) is one of the main causes of tomato yield loss. The virus control is very difficult and different approaches can be used by the growers against the viruses. The use of chemicals that cause secondary physiological effects is one example. Based on this information the present study evaluated the effect of applying Pyraclostrobin + Metiran (Cabrio Top®) on production and fruit quality of tomato plants infected by ToSRV and ToCV in different phenological phases of the crop cycle. The ToSRV was also quantified by qPCR in these plants. Two experiments were carried out in parallel, where one received a pretreatment by applying Pyraclostrobin + metiram (P + M) (3 g. L⁻¹) (BASF) ® + Boscalida (0.3 g. L⁻¹) (BASF) ® in the tray after sowing and the other the tomato seedlings did not receive any product. The treatments consisted of virus inoculation by *Bemisia tabaci* biotype B at 15, 30, 45, 60, 75 days after transplanting (DAT) with application or not of Pyraclostrobin + Metiram (P + M) (4.0 g. L⁻¹). The ToSRV was detected by RCA-PCR and qPCR and ToCV by NESTED RT-PCR. In addition fruit production and quality characteristics were also evaluated. The results indicated that infected plants after 45 DAT are less affected by the infection of ToSRV and ToCV and application of P + M during the crop cycle brought benefits to the tomato, because production and fruit quality characteristics were less affected. Viral replication in ToSRV was negatively influenced by the application of P + M suggesting a possible involvement of plant resistance mechanisms to the virus induced by the product.

Keywords: *Begomovirus*, *Crinivirus*, *Solanum lycopersicum*, qPCR.

3 INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, o tomateiro é cultivado praticamente em todos os Estados, destacando-se as regiões Sudeste e Centro-Oeste. Em 2014 foram produzidos cerca de 18 milhões toneladas de hortícolas, sendo que a cultura do tomateiro sozinha equivaleu a quase um quarto do total dessa produção, com de mais de 4 milhões de toneladas de frutos colhidos (ABCSEM, 2014; AGRIANUAL, 2015). O Estado de São Paulo é o segundo maior produtor do País, com uma área colhida superior a 11 mil ha e produção de aproximadamente 850 mil toneladas de frutos (AGRIANUAL, 2015).

Apesar de todo potencial que a cultura apresenta, ela ainda exige muitos cuidados, uma vez que está sujeita a uma grande quantidade de doenças e pragas, exigindo intenso manejo desde o plantio até a colheita. É um dos setores agrícolas que mais consome produtos fitossanitários, com um gasto médio de R\$ 3.961,67/ha/ano (AGRIANUAL, 2015).

Dentre as diversas doenças que causam problemas à cultura destacam-se as viroses, responsáveis por grandes perdas de produção. O tomateiro pode ser infectado por diversos vírus, dentre os quais se destacam o gênero *Begomovirus* onde a espécie *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), é uma das predominantes no Estado de São

Paulo e vem ocasionando danos na produção (MACÊDO, 2011; ROCHA et al., 2010; FERNANDES et al., 2008). Um outro gênero de grande importância e recentemente detectado no Brasil é o *Crinivirus* com a espécie *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (BARBOSA et al. 2008). Incidências de ToSRV e ToCV isoladamente e/ou em infecção mista em tomateiro tem sido relatadas no Brasil (MACEDO et al., 2014).

Diversos estudos visam melhorar o manejo das doenças causadas por vírus, incluindo a utilização de produtos com efeitos fisiológicos secundários. Esses produtos alteram a fisiologia da planta, aumentam a produtividade, ativam mecanismos de defesa e controle de diversas doenças (GUIMARÃES et al.; 2014, ITAKO et al., 2012; VIGO et al., 2012; TÓFOLI et al., 2003; HERMES et al., 2002).

Assim, o presente trabalho foi realizado em capítulo único e intitulado como “Piraclostrobina + Metiram induz menor replicação do *Tomato severe rugose virus* em tomateiro cv Mariana e maior produção em plantas com infecção mista com *Tomato chlorosis virus*”.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Cultura do tomateiro

4.1.1 Aspectos gerais da cultura do tomateiro

O tomateiro, botanicamente denominado de *Solanum lycopersicum*, é uma planta originária dos países andinos, pertencente à família das Solanaceas, sendo uma das hortaliças mais cultivadas em todo o mundo (FILGUEIRA, 2008). Ela é uma planta perene, mas cultivada como anual, herbácea e de porte arbustivo. Pode ser cultivado em dois tipos de segmentos produtivos, um destinado ao mercado para consumo *in natura* e outro para processamento industrial (ALVARENGA, 2004; FILGUEIRA, 2008).

A arquitetura da planta pode ser profundamente modificada pela poda, condicionando o tipo de cultura, de indústria no cultivo rasteiro ou para consumo fresco, no cultivo envarado ou estaqueado. Além disso, esse manejo pode determinar os hábitos de crescimento, onde na cultura do tomateiro existem dois tipos. O tipo indeterminado ocorre na maioria das cultivares para a produção de frutos para mesa, que são tutoradas e podadas e cujo caule pode ultrapassar dois metros de altura. O hábito determinado é característico das cultivares adaptadas especialmente para a cultura rasteira,

cujos frutos destinam-se para a agroindústria e suas hastes atingem cerca de um metro de altura (FILGUEIRA, 2008), porém existem algumas espécies cuja produção é destinada ao consumo *in natura*, ou seja, possuem dupla aptidão.

As flores são pequenas e amarelas, formato de cachos ou racemo e são hermafroditas, o que aumenta a taxa de autopolinização. Possui inflorescência cimeira de formas simples, bifurcadas ou ramificadas (SILVA; GIORDANO, 2000).

A cultura adapta-se melhor ao cultivo em clima tropical de altitude, como o das regiões serranas ou de planalto, e também ao clima subtropical ou temperado, seco e com luminosidade elevada. É uma cultura exigente em termoperiodicidade diária, requer temperaturas diurnas amenas e noturnas menores, com diferença de 6-8 °C entre elas, no entanto a faixa ideal de temperatura está entre 15°C a 20°C, variando entre a idade da planta e da cultivar. O número de flores e o pegamento do fruto são intimamente influenciados por temperatura abaixo ou acima dos limites indicados para seu cultivo, logo, a qualidade e quantidade de fruto são afetadas com a permanência de temperatura acima de 28°C (SEDIYAMA et al., 2003; FILGUEIRA, 2008).

O fruto do tomateiro é do tipo baga, com diferentes tamanhos e formato, constituindo-se de película, polpa, placenta e sementes. Internamente, é dividido em lóculos onde as sementes encontram-se imersas na mucilagem placentária e, dependendo da cultivar, os frutos podem ser biloculares, triloculares, tetraloculares ou multiloculares. O formato do fruto define os tipos varietais do tomate no Brasil, atualmente, consideram-se cinco segmentos principais: santa cruz, salada (Maçã, Caqui ou Tomatão), italiano (Saladete ou San Marzano), cereja e grupo industrial (MELO 1989; FERREIRA et al., 2004; FILGUEIRA, 2008).

4.1.2 Produção da tomaticultura nacional e mundial

O tomate é um dos produtos olerícolas mais consumidos no mundo juntamente com a batata, a cebola e o alho. Para o tomate industrial, a produção é realizada com preços previamente acordados em contratos entre produtores e indústrias, enquanto que para o tomate de mesa o mercado é livre, com forte sazonalidade de preços e quantidades. Os canais principais de distribuição no Brasil são os entrepostos normatizados e as redes varejistas (CAMARGO et al, 2006b).

De acordo com os dados divulgados pela FAOSTAT (2014), os maiores produtores mundiais de tomate são: China, Estados Unidos, Índia, Turquia, Egito, Itália, Irã, Espanha, Brasil e México, respectivamente. Estes países produzem 76% da produção mundial desta cultura.

A produção de tomate no mundo aumentou nos últimos anos, sendo que em 1992 a produção mundial era apenas de 74,9 milhões de toneladas e em 2012 alcançou-se uma produção superior a 161 milhões de toneladas, perfazendo uma expansão de 116% nos últimos 20 anos. O aumento da produção foi seguido pelo aumento do consumo, o que acompanhou o crescimento populacional (FAOSTAT, 2014).

No entanto, apesar do avanço da produtividade, o brasileiro consome pouco tomate. O último levantamento feito pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, mostra que os brasileiros consomem apenas 20,2 kg de tomate/pessoa/ano, comparado a outros países como Grécia, Espanha e Estados Unidos que consomem 105,3; 58,9 e 44,3 kg/pessoa/ano, respectivamente (FAOSTAT, 2014).

Em 2014 o Brasil produziu cerca de 18 milhões de toneladas de hortícolas, sendo que a cultura do tomateiro sozinha equivaleu a quase um quarto do total, com uma produção de mais de 4 milhões de toneladas de frutos colhidos (ABCSEM, 2014; AGRIANUAL, 2015).

A produção de tomate no Brasil, envolvendo os segmentos, para processamento e mesa, alcançou 4,2 milhões de toneladas, com a região Sudeste sendo a maior produtora e responsável por mais de 44% do total produzido, com destaque para o Estado de São Paulo que representa 45% da produção da região Sudeste. A segunda maior região produtora é o Centro-Oeste com participação de 31% da produção nacional no mesmo ano. O Estado de Goiás foi o maior produtor do Brasil, em 2014, com uma safra de 1.269 milhão toneladas de tomate, equivalente a 29% da produção nacional, seguido pelo Estado de São Paulo com uma produção de 849.052 toneladas de tomate (AGRIANUAL, 2015).

Apesar das regiões Sudeste e Centro-Oeste deterem a maior área colhida do País, a Safra 2015 de tomate inicia com dados de produção em queda de 19,3%. Este fato é resultado principalmente da redução da área plantada em 15,7%. Os três principais Estados produtores, Goiás, São Paulo e Minas Gerais estimam redução da área plantada e o principal fator limitante da produção nesta safra é o clima que se mostrou até o momento com precipitações pluviométricas abaixo do necessário para o bom

desenvolvimento da cultura. Mesmo em áreas que utilizarão a irrigação teme-se que a falta de chuva diminua ainda mais os níveis dos reservatórios e que estes sejam insuficientes para atender a área com a cultura (IBGE, 2015).

Embora a cultura de tomate tenha ganhado muito com o melhoramento genético de plantas, muitos problemas ainda surgem durante o ciclo de desenvolvimento, dentre eles o de principal importância são os fitossanitários, na qual podemos destacar as viroses como um dos fatores mais limitantes para a cultura, com alto poder restritivo sobre a produção, em todas as regiões onde o tomate é cultivado.

4.2 Gênero Begomovirus - *Tomato severe rugose virus*

Os begomovírus têm partículas geminadas, com simetria icosaédrica e diâmetro de 15 a 20 nm. São constituídos de um ou dois DNAs circulares de fita simples que produzem pseudorecombinantes viáveis (KING et al., 2011). O DNA-A dos begomovírus possui seis ORF's ("open reading frames" – regiões abertas para codificação) das quais a AV1 (CP) e AV2 são transcritas no sentido viral, e as ORF's AC1 (Rep), AC2 (TrAP), AC3 (REn) e AC4 são transcritas no sentido complementar (STANLEY et al., 2005; ROJAS et al., 2005), conforme Figura 1. No entanto, a ORF AV2 não é encontrado em begomovírus do novo mundo (RYBICKI, 1994).

A proteína capsidial (CP) AV1, é responsável pela encapsidação do genoma viral e essencial para transmissão pelo inseto vetor (FONTES et al., 1992; HOFER et al., 1997). A ORF AC1 está associada à replicação (Rep, "replication-associated protein"), cuja função é reconhecer e se ligar à origem de replicação e iniciar a síntese de DNA viral via mecanismo de círculo rolante; uma proteína transativadora da transcrição dos genes CP e NSP (FONTES et al., 1992; OROZCO et al., 1997). A ORF AC2 codifica a proteína TrAP ("trans-activating protein") e que também atua como supressora de silenciamento; uma proteína acessória que aumenta os níveis de acúmulo de DNA viral (VOINNET et al., 1999 ; ZERBINI et al., 2006). A ORF AC3 codifica a proteína REn ("replication-enhancer protein), que atua na replicação viral, não essencial para replicação mas quando está presente aumenta o acúmulo de DNA viral (FARIA & ZERBINI, 2000; ZERBINI et al., 2006). A ORF AC4 é uma proteína que atua na expressão de sintomas (ROJAS et al., 2005).

O DNA-B (Figura 1), codifica duas proteínas ligadas diretamente no movimento do vírus, sendo a MP – “proteína de movimento célula a célula” ou BC1 transcrita no sentido complementar, que é responsável pelo aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (NOUEIRY et al., 1994) e a NSP – “proteína de transporte” ou BV1 no sentido viral, responsável pelo transporte do DNA viral através dos poros nucleares (SANDERFOOT et al., 1996; FARIA et al., 2000). Os begomovírus se multiplicam no núcleo da célula e não no citoplasma, por isso necessitam dessa etapa adicional para a entrada e saída do núcleo com ajuda dos genes MP e NSP (PALMER & RYBICKI, 1998).

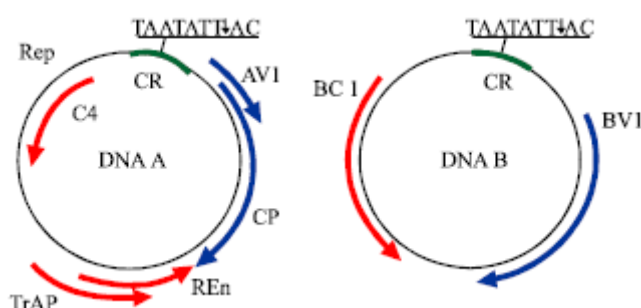


Figura 1. Representação esquemática do genoma do *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), espécie tipo do gênero *Begomovirus*. Extraído de GUTIERREZ, et al. (2004).

Os begomovírus geralmente não são transmitidos naturalmente por semente ou por extrato vegetal. A dispersão natural ocorre via inseto vetor, mais especificamente pelo aleirodídeo *Bemisia tabaci*. Atualmente *B. tabaci* é considerado um complexo de 36 espécies crípticas que variam quanto a biologia, principalmente em relação a sua gama de hospedeiros, fecundidade, resistência a inseticidas, transmissão de vírus e indução de distúrbios em plantas, além de aspectos moleculares (DINSDALE et al., 2010; HU et al., 2011; FIRDAUS et al., 2013).

A transmissão de vírus por *B. tabaci* pode ser do tipo não persistente, persistente e semi-persistente. Para vírus que são transmitidos de maneira não persistente e semi-persistente, o aparelho bucal do vetor, em vários casos, é o local de retenção do vírus. Na transmissão não persistente, o inseto adquire o vírus por picadas de prova e o tempo de retenção é de minutos ou horas. Na transmissão semi-persistente são necessários minutos para aquisição e o tempo de retenção pode ser de horas a dias. A transmissão persistente necessita que o inseto se alimente por horas na planta para adquiri-

lo e o tempo de retenção do vírus na hemolinfa pode durar dias ou até mesmo toda a vida do inseto. Neste tipo de interação o vírus pode replicar no inseto (propagativo) ou não replicar (não propagativo) (JAMES; BRYCE, 2006; HOGENHOUT et al, 2008). O ToSRV é transmitido de forma eficiente pela mosca branca *B. tabaci* biótipo B – Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), de modo persistente e não propagativo (HULL, 2002; POLSTON et al., 2014).

Tomato severe rugose virus (ToSRV), pertence à família *Geminiviridae* e ao gênero *Begomovirus*, é um dos vírus mais importante em tomateiro infectando especialmente plantas da família *Solanaceae* (FERNANDES et al., 2008; ROCHA et al., 2010, BARBOSA et al., 2011a). O ToSRV foi detectado pela primeira vez no Brasil em 2003 (BEZERRA-AGASIE et al., 2006) e atualmente há registros da ocorrência desse begomovírus causando danos em diversos estados produtores como Pernambuco, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Distrito Federal e Goiás (ROCHA et al., 2010; CASTILLO-URQUIZA et al., 2007; COTRIM et al., 2007; FERNANDES et al., 2008; LIMA et al., 2006; REZENDE et al., 1997). No Estado de São Paulo é a espécie predominantes (MACÊDO, 2011; ROCHA et al., 2010; COTRIM et al., 2007; FERNANDES et al., 2008).

O genoma de ToSRV foi estudado atualmente e possui dois DNAs circulares de fita simples: o DNA-A com 2592 nucleotídeos e cinco ORFs, denominadas AV1, AC1, AC2, AC3, AC4 e o DNA-B com 2568 nucleotídeos e duas ORFs, BV1 and BC1 (BARBOSA et al., 2011a).

Apesar dos avanços em diferentes campos de estudos, as doenças causadas pelos begomovírus continuam sendo um problema na cultura do tomateiro e em diversas solanáceas, não apenas no Brasil, mas em outras regiões do mundo (HANSSEN et al., 2010), e por isso muitos estudos estão sendo realizados a fim de descobrir os danos causados por begomovírus em diferentes culturas.

4.3 Gênero *Crinivirus* - *Tomato chlorosis virus*

Tomato chlorosis virus (ToCV), pertence à família *Closteroviridae* e ao gênero *Crinivirus*, é um vírus que foi recentemente detectado no Brasil e atualmente vem causando muitos problemas na cultura do tomateiro (BARBOSA et al., 2011b).

Os crinivirus possuem duas moléculas de RNA de fita simples e senso positivo. O RNA1 contém quatro ORFs, e o RNA2 contém nove ORFs que codificam proteínas associadas com funções como movimento, encapsidação do vírus e transmissão pela mosca branca (WINTERMANTEL et al., 2005). O RNA 1 possui 8595 nucleotídeos e contém quatro ORFs (Figura 2). A ORF 1a estende ao longo dos nucleotídeos 303-6140, e codifica uma proteína multifuncional de 221 kDa comum entre os membros da família *Closteroviridae*, contendo domínios de protease, helicase e metiltransferase. A ORF 1b com nucleotídeos entre 6142-7656, codifica uma RNA dependente de RNA polimerase de 59 kDa (RdRp), contendo os oito motivos conservados identificados por Koonin (1991) entre os aminoácidos 186 e 422. A RdRp é altamente conservada entre os membros do gênero *Crinivirus*. A ORF 2 presente entre os nucleotídeos 7663-8244 codifica uma proteína putativa de 22 kDa de função desconhecida, com pouca homologia com outras proteínas na base de dados (WINTERMANTEL et al., 2005). Uma pequena ORF está localizada na extremidade 3' do RNA 1 com 155 nucleotídeos, contendo um “start” códon putativo de iniciação. O peptídeo 5 kDa previsto tem um domínio transmembrana entre os aminoácidos 20 e 42 similar às proteínas no 3' terminal do RNA 1 de outros crinivirus (WINTERMANTEL et al., 2005).

O RNA 2 possui 8247 nucleotídeos e contém nove ORFs (Figura 2) (WISLER et al, 1998b). A ORF 1 se estende ao longo dos nucleotídeos 239–340 e codifica uma pequena proteína de 4 kDa com um grande domínio hidrofóbico entre os resíduos 10 e 32 sugerindo que funciona como uma proteína transmembrana. A ORF 2 presente entre os nucleotídeos 733–2397 codifica a “heat shock protein 70” (HSP70h) e está envolvida na montagem de partículas virais e movimento célula-a-célula.(WINTERMANTEL et al., 2005).

A ORF 3 com 203 nucleotídeos e codifica uma proteína de 8 kDa com similaridade com 6 kDa codificados por *Beet pseudo yellows virus* (BPYV) e *Strawberry pallidosis associated virus* (SPaV). A ORF 4 presente entre os nucleotídeos 2562-4115 codifica uma proteína de 59 kDa (P59) que também está associada com a extremidade dos virions e provavelmente está envolvida no movimento célula-a-célula. A ORF 5 presente entre os nucleotídeos 4097-4333 codifica uma proteína 9 kDa ainda com função desconhecida (WINTERMANTEL et al., 2005).

As ORFs 6 com 773 e ORF 7 com 2009 codificam as proteínas da capa “major coat protein” (CP - 29 kDa) e “minor coat protein” (CPm – 76 kDa). A CP

encapsida a maior parte da partícula viral, enquanto que a CPm está associada a extremidade dos virions e encapsidação da região 5' terminal. A ORF 8 com 698 nucleotídeos, codifica a proteína 27 kDa (P27) e é exclusiva dos crinivirus. A ORF 9 localizada entre os nucleotídeos 832-8029 é exclusiva do ToCV e codifica uma proteína putativa de 7 kDa com um domínio transmembrana entre os resíduos 5 e 27. Isto sugere que pode ser uma proteína funcional, apesar de nenhuma homologia ter sido encontrada a quaisquer outras proteínas nas bases de dados (WINTERMANTEL et al., 2005).

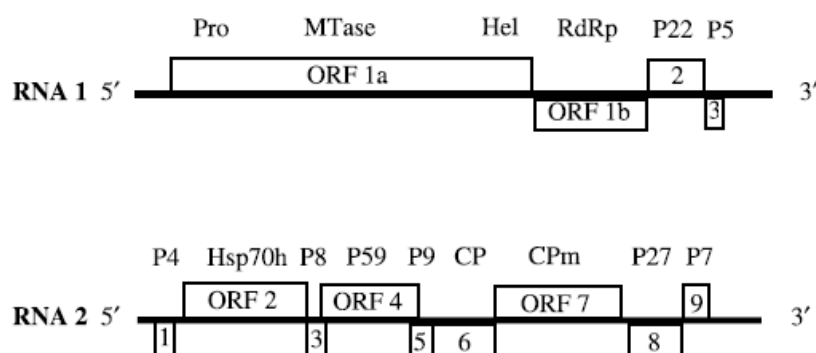


Figura 2. Representação esquemática do genoma Tomato chlorosis virus (ToCV), espécie do gênero Crinivirus Extraído de WINTERMANTEL et al. (2005).

O genoma bipartido do isolado ToCV brasileiro (ToCV-BR) consiste em 8594 nucleótidos (nt) para RNA 1 e para o RNA 2 8242 (nt), e possuem características típicas de outros isolados ToCV descritos (ALBURQUERQUE et al., 2013).

O ToCV é um vírus limitado ao floema e transmitido na natureza de uma forma semi persistente por moscas brancas de dois gêneros diferentes, *Trialeurodes* (*T. abutilonea* e *T. vaporariorum*) e por *B. tabaci* biótipos A, B e Q (WINTERMANTEL; WISLER., 2006; WINTERMANTEL et al., 2008, NAVAS-CASTILLO et al., 2011). Filogeneticamente, a CPm do ToCV compartilha características de vírus transmitidos por *T. vaporariorum* e *B. tabaci*, portanto, esta proteína pode estar envolvida na determinação da ampla transmissibilidade do ToCV por seus vetores (WINTERMANTEL et al., 2005).

O ToCV é o único vírus conhecido transmitido pelos dois gêneros de mosca branca vetores de viroses, o que leva a crer que o ToCV é um elo evolucionário entre os vírus que eram originalmente transmitidos por *Trialeuroides* e passaram a ser transmitidos por *Bemisia tabaci* (WISLER, 1998a).

No Brasil o ToCV teve sua primeira constatação em 2006 em tomateiros na região de Sumaré, São Paulo (BARBOSA et al. 2008). Posteriormente foi constatado nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais e Rio de Janeiro (BARBOSA et al., 2011b).

Poucos estudos demonstram danos quantitativos e/ou qualitativos provocados por esse vírus no Brasil. Recentemente, Mansilla (2015) avaliou a tolerância de diferentes genótipos de tomateiro ao ToCV e constatou redução do peso dos frutos colhidos das plantas infectadas, da ordem de 21 a 52 % no primeiro ensaio e 0 a 49%, no segundo, quando comparados com plantas sadias. Já para a cultura do pimentão foi encontrada diferença significativa na produção de 45-75% entre plantas infectadas e sadias (FORTES; MORIONES; NAVAS-CASTILLO, 2012).

Incidências de ToCV isoladamente e/ou em infecção mista com ToSRV em tomateiro tem sido relatado no Brasil. No estado de Goiás e Distrito Federal um total de 150 amostras foram coletadas, sendo 123 do híbrido Dominador e 27 híbrido AP 533 respectivamente. Desse total, cerca de 48% das plantas testadas foram infectadas com ambos os vírus, 32% foram infectados somente com ToCV e apenas 20% estavam infectadas com o ToSRV. Analisando os híbridos de forma isolada para o Dominador, das 123 amostras, 23 estavam infectadas com ToSRV, 44 com ToCV e 56 apresentaram infecção com ambas as espécies. Enquanto que para o híbrido AP 533, das 27 amostras avaliadas, 7 estavam infectadas com ToSRV, 3 com ToCV e 17 plantas apresentaram infecção mista. De acordo com os autores, a cultivar Dominador é tolerante ao begomovirus e suscetível ao crinivirus, enquanto AP 533 é suscetível para ambas as espécies (MACEDO et al., 2014).

4.4 Produtos de efeitos fisiológicos e seu incremento nas culturas

São produtos de efeitos fisiológicos aqueles que alteram a fisiologia da planta, podendo promover aumento de produtividade e/ou qualidade na produção final. Cada cultura tem sua condição ideal para atingir o máximo em produção e isso depende da adubação, qualidade de semente, qualidade e nutrição do solo, controle de pragas e doenças, irrigação, luminosidade, temperatura, etc (RAMOS, 2013).

Produtos da classe das estrobirulinas estão sendo muito estudados, uma vez que seu modo de ação age inibindo a respiração mitocondrial atuando no sítio Qo (quinona oxidase). Algumas das estrobilurinas mais comuns são a Azoxistrobina, Metil-cresoxima, Picoxistrobina, Fluoxastrobina, Orizastrobina, Dimoxiystrobina, Piraclostrobina e Trifloxistrobina (PARREIRA et al., 2009).

A Piraclostrobina auxilia a planta na melhor utilização do CO₂, reduzindo os gastos de energia e levando ao maior acúmulo de carboidratos, aumentando a fotossíntese líquida, causando incremento da atividade da enzima Nitrato redutase que é fundamental para a incorporação de nitrogênio em moléculas vitais à planta causando o efeito verde pelo maior teor de clorofila. Além disso, ocorre a diminuição do estresse associado à redução da produção de etileno, o que permite maior duração da vida útil das folhas e principalmente maior rendimento devido a maiores produtividades. Esses efeitos estão associados ao modo de ação do produto que atua na respiração celular na mitocôndria, especificamente no citocromo Bc1, interferindo no transporte de elétrons (OLIVEIRA, 2005, VENÂNCIO et al., 2003).

O Cabrio Top® (BASF) é constituído de Metiram +Piraclostrobina, pertence a classe dos Ditiocarbamatos e Estrobirulinas e apresenta duplo modo de ação atuando através do ingrediente ativo Piraclostrobina como inibidor do transporte de elétrons nas mitocôndrias das células dos fungos, inibindo a formação de ATP que é essencial nos processos metabólicos e através do ingrediente ativo Metiram que ao se decompor forma compostos tóxicos que reagem inespecificamente com enzimas sulfidrílicas, as quais estão largamente distribuídas na célula do fungo, atuando assim sobre um grande número de processos vitais da célula do fungo inibindo a germinação dos esporos, bem como o desenvolvimento do tubo germinativo (BASF, 2007).

As estrobilurinas proporcionam maior produtividade, folhas mais verdes e maior teor de clorofila (BASF, 2005), devido ao aumento da fotossíntese líquida, redução da respiração das plantas e aumento da atividade da enzima nitrato redutase, o que resulta em melhor balanço hormonal, aumentando teores de ácido indolilacético (IAA), isopentenil adenina (I6-ADE) e ácido abscísico (ABA) e diminuindo a produção de etileno (YPEMA; GOLD, 1999).

Efeitos fisiológicos das estrobilurinas foram observados sobre os reguladores vegetais endógenos. Onde níveis de auxina são alterados, uma vez que ocorre aumento na produção de ácido indolilacético (IAA), que estimula o alongamento e divisão

celular, desenvolvimento inicial das raízes, atraso da senescência das folhas e do amadurecimento dos frutos. Além de aumentar os níveis endógenos de ácido abscísico (ABA) que permite melhor adaptação da planta em situações de estresse (KÖEHLE et al., 1994).

Fungicidas registrados para a cultura do tomateiro, como os pertencentes da classe das estrobirulinas, possuem vantagens como ação de efeitos fisiológicos positivos sobre as plantas, além de serem capazes de ativar mecanismos bioquímicos da planta que incrementam a resistência aos patógenos (VENANCIO *et al.*, 2003) podendo ser uma possibilidade para viroses.

Diversos trabalhos mostram aumento de produtividade, ativação de mecanismos de defesa e controle de diversas doenças, com o uso do Cabrio Top® (GUIMARÃES et al.; 2014, ITAKO et al., 2012; VIGO et al., 2012; TÓFOLI et al., 2003; HERMES et al., 2002). A junção da molécula piraclostrobina com metiran reforça o controle da doença no campo, podendo tornar mais difícil o surgimento de resistência ao produto, uma vez que a atuação de cada molécula ocorre de forma diferente (GALVINO, 2008).

A possibilidade desse fungicida agir no desenvolvimento das doenças viróticas, por meio da ativação de mecanismos de defesa que podem ser responsáveis por diminuir ou paralisar a replicação e/ou movimentação viral, seria uma alternativa de manejo muito interessante, uma vez que esse mesmo produto é capaz de controlar de maneira bastante eficiente diversas doenças fúngicas e de aumentar a resistência de doenças bacterianas do tomateiro. O uso desse produto pode servir como um benefício extra para a cultura e para o produtor, podendo diminuir as perdas causadas pelos vírus, incrementando a produção.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCSEM – Associação brasileira do comércio de sementes e mudas - **2º Levantamento de dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil.2014.**

Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/releases>. Acesso em: 25 jul. 2015.

AGRIANUAL. AGRIANUAL 2015: **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria, 2015.472 p.

ALBUQUERQUE, L. C. et al. Molecular characterization reveals Brazilian *Tomato chlorosis virus* to be closely related to a Greek isolate. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 38, n. 4, p. 332-336, 2013.

ALVARENGA, M. A. R. **Tomate**: produção em campo, em casa-de-vegetação e em **hidroponia**. Lavras: UFLA, 2004. 400 p.

BARBOSA, J. C. et al. Characterization and experimental host range of a Brazilian tomato isolate of *Tomato severe rugose virus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 9,p. 644-646, 2011a.

BARBOSA, J. C.et al. Occurrence of *Tomato chlorosis virus* in tomato crops in five Brazilian states. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 36, p. 256-258, 2011b.

BARBOSA, J. C. et al. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, p.1709-1709, 2008.

BASF. **Fungicidas Cabrio Top**. Disponível em:

http://www.agro.basf.com.br/agr/ms/apbrazil/pt_BR/content/APBrazil/solutions/fungicidas/fungicidas_product/CABRIO_TOP. Acesso em 15 dez. 2015.

BASF. F500 O fungicida Premium. Boletim Técnico, São Bernardo do Campo: Basf, 2005. 35p

BEZERRA-AGASIE, I. C. et al. First report of *Tomato severe rugose virus* in chili pepper in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 114-114, 2006.

CAMARGO FILHO, W. P., OLIVEIRA, A.C. **Perfil da olericultura no Brasil e em São Paulo, 2011-junho/2012**. Disponível em: <http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa/estudos_lupa/Perfil_da_Olericultura_SP_2011-2012.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2015.

CASTILLO-URQUIZA, G. P. et al.. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato in Paty do Alferes, Rio de Janeiro State, Brasil. **Virus Reviews and Research**, Ribeirão Preto, v.12, p.233, 2007.

COTRIM, M. A. A.; et al. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. **Summa Phytopathologica, Botucatu**, v.33. p.300-303. 2007.

DINSDALE, A.; et al. Refined global analysis of Bemisia tabaci (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) Mitochondrial Cytochrome Oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. **Annals of the Entomological Society of America**, Cary, v. 103, n. 2, p. 196-208, 2010.

IBGE - Instituto brasileiro de geografia e estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro v.29 n.1 p.1-83,2015. Disponível em : [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/lspa_201501.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201501.pdf). Acesso em: 03 agost.2015.

FAOSTAT - **Food and agriculture organization of the united nations faostat** (2014). Disponível em: [http:// faostat.fao.org />](http://faostat.fao.org/). Acesso em: 03 agost. 2015.

FARIA, J.C.; et al. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, p. 125-137, 2000

FARIA, J. C.; ZERBINI, F. M. Família Geminiviridae - taxonomia, replicação e movimento. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 8, p. 25-65, 2000.

FERNANDES, F. et al. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, New York, v. 36, p. 241-258, 2008.

FERREIRA, S. M. R.; FREITAS, R. J. S.; LAZZARI, E. N. Padrão de identidade e qualidade do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) de mesa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p. 329-335, 2004.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2008. p. 194-241.

FIRDAUS, S. et al. The Bemisia tabaci species complex: Additions from different parts of the world. **Insect Science**, Richmond, v. 20, n. 6, p. 723-733, 2013.

FONTES, E.P.B.; LUCKOW, V.A.; HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. **Plant Cell**, Rockville, v. 4 p. 597-608, 1992.

FORTES, I.M.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. *Tomato chlorosis virus* in pepper: prevalence in commercial crops in southeastern Spain and symptomatology under experimental conditions. **Plant Pathology**, Chichester,, v. 61, n. 5, p. 994-1001, 2012.

GALVINO, S. B. F. **Efeito de fungicidas na produção de batata e na disseminação de vírus e detecção dos variantes genéticos PVYN-Wi e NE-11 no Brasil**. 42 p. 2008. Dissertação (Mestrado – Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008.

GUIMARÃES, L. R. P. et al. Polyamines in tomato plants grown during an incidence of tospovirus exposure. **European Journal Plant Pathology**, Dordrecht, v. 140, p. 701-709, 2014.

GUTIERREZ, C. ;et al. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 111-119, 2004.

HANSEN, I. M.; LAPIDOT, M.; THOMMA, B. P. Emerging viral diseases of tomato crops. **Molecular Plant Microbe Interact**, Saint Paul, v. 23, p.539-548. 2010.

HERMES, S.; SEEHAUS, K.; KOEHLE, H. A. Strobirulin fungicide enhances the resistance of tobacco against *Tobacco mosaic virus* and *Pseudomonas syringae* pv. Tabaci. **Journal Plant Physiology**, Jena, v. 130, p. 120-127, 2002.

HOGENHOUT, S. A. et al. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 46, p. 327-359, 2008.

HOFER, P. et al. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. **Virology**, Waltham, v. 236, p. 295-298, 1997.

HU, J. et al. An Extensive Field Survey Combined with a Phylogenetic Analysis Reveals Rapid and Widespread Invasion of Two Alien Whiteflies in China. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 6, n.1, p.16061. 2011.

HULL, R. MATTHEW'S. Plant virology. **New York: Academic**, 2002, 1001 p.

INOUE-NAGATA, A. K. et al. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, p. 1329-1332, 2006.

ITAKO, A. T. et al. Effect of chemicals on the bacterial spot (*Xanthomonas perforans*) and the activation of pathogenesis-related proteins in tomato. **Idesia**, Chile, 30: 85-92, 2012.

JAMES, C. K. N. G.; BRYCE, W. F. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 183-212, 2006.

KING, A. M. et al. **Virus taxonomy**: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier, 2011. 1338 p.

KÖEHLE, H.; GROSSMANN, K.; JABS, T.; GERHARD, M.; KAISER, W.; GLAAB, J.; CONRATH, U.; SEEHAUS, K.; HERMS, S. Physiological effects of strobilurin fungicide F 500 on plants. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 22, n. 65, 1994.

KOONIN, E. V. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive strand RNA viruses. **Journal of General Virology**, Reading, v.72, p.2197–2206, 1991.

LIMA, A. T. et al. Primeiro relato de infecção pelo geminivírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em tomateiro no estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, p. 224-224, 2006.

MACÊDO, M. A. **Estudo dos fatores que influenciam a predominância do begomovirus *Tomato severe rugose virus* no Brasil**. 2011. 92f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

MACEDO, M. A.; BARRETO, S. S.; HALLWASS, M.; INOUE-NAGATA, A. K. High incidence of *Tomato chlorosis virus* alone and in mixed infection with begomoviruses in two tomato fields in the Federal District and Goiás state, Brazil. **Tropical Plant Pathology**. Brasília, DF, v. 39, p. 449-452, 2014.

MANSILLA CORDOVA, P. J. **Resistência de genótipos de tomateiro à infecção com o *Tomato chlorosis virus* e tolerância à doença**. 2015. 61f Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Piracicaba, 2015.

MELO, P.C.T. **Melhoramento genético do tomateiro**. Campinas: Asgrow do Brasil, 1989. 55 p.

NAVAS-CASTILLO, J. et al. Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 219-248, 2011.

NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, Cambridge, v. 76, p.925–32, 1994.

OLIVEIRA, R. F. Efeito fisiológico do F500 na planta. **Atualidades Agrícolas**, São Bernardo do Campo, n. 4, p. 9-11, 2005.

OROZCO, B. M. et al. Functional domains of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 272, p. 9840-9846, 1997.

PALMER, K. E.; RYBICKI, E. P. The molecular biology of mastreviruses. **Advances in Virus Research**, Maryland Heights, v. 50, p. 183-234, 1998.

PARREIRA, D. F.; NEVES, W. S.; ZAMBOLIM, L. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 3, n. 2, p. 24-34, 2009.

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**, Chichester, v. 70, p. 1547-1552, 2014.

RAMOS, A. R. P. **Produtos de efeitos fisiológicos no desenvolvimento de plantas de tomate ‘Giuliana’, na produção e pós-colheita de frutos**. 2013. 147f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

REZENDE, W.L.; MILITÃO NETO, V.; GOULART, L.R.; GIOVANINI, M.P.; JULIATTI, F.C.; FERNANDES, J.J. Mixed infection by geminiviruses in tomato plants, detected by LIS-SSCP-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 22, p. 338, 1997.

ROCHA, K. C. G. et al. Ocorrência e variabilidade genética do *Tomato severe rugose virus* em tomateiro e pimentão no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, p. 222-227, 2010.

ROJAS, M. R. et al. Exploiting Chinks in the plant's armor: Evolution and Emergence Geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v 43, p.361–394, 2005.

RYBICKI, E. P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. **Archives of Virology**, Viena, v.139. p. 49-77, 1994.

SANDERFOOT, A.A.; INGHAM, D.J.; LAZAROWITZ, S.G. A viral movement protein as a nuclear shuttle. The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. **Plant Physiology**, Rockville, v.110, p.23-33. 1996.

SEDIYAMA, M. A. N.; FONTES, P. C. R.; SILVA, D. J. H. Práticas culturais adequadas ao tomateiro. **Informe Agropecuário**, Cidade Nova, v. 24, n. 219, p. 19-25, 2003.

SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B. Produção mundial e nacional. In: SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B. (Ed.). **Tomate para processamento industrial**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2000. cap. 1, p. 8-11.

STANLEY, J. et al. . Geminiviridae. In: FAUQUET, C. M. et al. (Ed.), **Virus Taxonomy. Eight Report of the Internacional Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier, London, 2005, p. 301-326.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; GARCIA JUNIOR, O. Controle da requeima do tomateiro com fungicidas e seus reflexos na produção. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70 p. 473-482, 2003.

VENÂNCIO, W. S. et al Physiological effects of strobilurin fungicides on plants, **Publicatio UEPG**, Ponta Grossa, v.9, p. 59-68. 2003

VIGO, S. C. et al. Evaluation of pyraclostrobin and acibenzolar-S-methyl on common bacterial blight of snap bean. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, , v. 33, p. 167-174, 2012.

VOINNET, O.; PINTO, Y. M.; BAULCOMBE, D. C. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences** Washington, v.96, p.14147–14152, 1999.

ZERBINI, F. M.; CARVALHO, M. G.; ZAMBOLIM, E. M. Estratégias de replicação do genoma viral. In_____. **Introdução à virologia vegetal**, 2 ed., Viçosa: UFV, 2006. Cap. 5, p.41-62.

ZERBINI, F. M.et al. Um novo geminivirus isolado de tomateiro (*L. esculentum*) em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 21, p. 430, 1996.

YPEMA, H. L.; GOLD, R. E. Kresoxym-methyl modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, n. 1, p. 4-19, 1999.

WINTERMANTEL, W. M. et al. The complete nucleotide sequence and genome organization of Tomato chlorosis virus. **Archives of Virology**, Viena, v. 150, n. 11, p. 2287-2298, 2005.

WINTERMANTEL, W. M. et al Co-infection by two criniviruses alters accumulation of each virus in a host-specific manner and influences efficiency of virus transmission. **Phytopathology**, Saint Paul v. 98, p. 1340-1345, 2008.

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

WISLER, G. C.et al. Ecology and epidemiology of whiteflytransmitted closteroviruses. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 270–280, 1998a.

WISLER, G. C.et al. Tomato chlorosis virus: a new whitefly transmitted phloem-limited bipartite closterovirus of tomato. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p. 402–409, 1998b.

CAPÍTULO 1

Piraclostrobina + Metiram induz menor replicação do *Tomato severe rugose virus* em tomateiro determinado e maior produção em plantas com infecção mista com *Tomato chlorosis virus*

Pyraclostrobin + Metiram induces lower replication of *Tomato severe rugose virus* in determined tomato and higher production in mixed infected plants with *Tomato chlorosis virus*

Leysimar R. P. Guimarães¹, Denise N. Nozaki¹, Mônica F. Moura¹, David M. A. Spadotti¹, Tatiana Mituti², Renate Krause-Sakate¹, Marcelo A. Pavan¹

¹ Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Campus de Botucatu. Departamento de Proteção Vegetal, Rua Jose Barbosa de Barros, 1780, 18610-370, Botucatu, SP, Brasil.

² Universidade de São Paulo, ESALQ, Departamento de Nematologia e Fitopatologia, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

RESUMO

As espécies de vírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato chlorosis virus* (ToCV) são importantes em tomateiro no Estado de São Paulo e sua incidência tem sido cada vez mais crescente. Diante da dificuldade de controle destes vírus no campo, o presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito da aplicação de Piraclostrobina+Metiran (Cabrio Top®) na produção e qualidade de frutos em tomateiro infectado por ToSRV e ToCV. A concentração do ToSRV após aplicação dos produtos também foi avaliada por PCR quantitativo. Dois experimentos foram realizados paralelamente, um recebeu pré-tratamento com (Piraclostrobina+Metiram (P+M) (3 g. l⁻¹) + Boscalida (0,3 g. l⁻¹) (BASF) ®) na bandeja após a semeadura e no outro as mudas de tomateiro não receberam nenhum produto. Os tratamentos foram constituídos da inoculação do vírus por *Bemisia tabaci* biótipo B em cinco fases de crescimento: 15, 30, 45, 60 e 75 dias após o transplante (DAT), com aplicação ou não de P+M (4.0 g. l⁻¹) a cada quinze dias. Para ambos os experimentos foram avaliados a parâmetros de produção e de qualidade como ratio (°Brix/acidez titulável). A quantificação do ToSRV por PCR em tempo real foi realizada quinzenalmente após cada inoculação até o final do ciclo da

cultura. Observou-se que o experimento que recebeu o pré-tratamento na semeadura e posteriormente aplicação de P+M apresentou os melhores resultados de produção e qualidade dos frutos de tomate, principalmente quando os vírus foram inoculados mais tardiamente (60 e 75 DAT). A infecção viral precoce (15 e 30 DAT) por ToSRV e ToCV causou drástica redução na qualidade e produção dos frutos, independente do tratamento utilizado. A replicação viral do ToSRV foi negativamente influenciada pela aplicação do P + M sugerindo um possível envolvimento de mecanismos de resistência da planta ao vírus induzidos pelo produto.

Palavras-chave: Begomovirus, Crinivirus, *Solanum lycopersicum*, qPCR, Indução de resistência

ABSTRACT

The incidence and importance of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) and *Tomato chlorosis virus* (ToCV) has been increasingly growing on tomatoes in the State of São Paulo. The control of these viruses is very difficult in the field. Due to this facts, this study aimed to verify the effect of the application of Pyraclostrobin + Metiran (Cabrio Top®) on production and fruit quality of tomato infected by ToSRV and ToCV. The concentration of ToSRV after application of the products was also evaluated by qPCR. Two experiments were carried out in parallel, one received pretreatment with Pyraclostrobin + metiram (P + M) (3 g. L⁻¹) + Boscalida (0.3 g. L⁻¹) (BASF) ® in the tray after sowing and the other the tomato seedlings did not receive any product. The treatments consisted of virus inoculation by *Bemisia tabaci* biotype B in five growth stage: 15, 30, 45, 60 and 75 days after transplanting (DAT), with application or not of P + M (4.0 g l⁻¹) every fortnight. For both experiments production and quality parameters such as ratio (° Brix / acidity) were evaluated. Quantification of ToSRV by qPCR was performed every two weeks after each inoculation by the end of the crop cycle. It was observed that the experiment that received pretreatment at sowing and subsequent application of P + M showed the best results of production and quality of tomato fruits, especially when the viruses were inoculated later (60 and 75 DAT). The early viral infection (15 and 30 DAT) by ToCV and ToSRV caused drastic reduction of production and quality of the fruit, regardless the treatment. Viral replication in ToSRV was negatively influenced by the application of P + M suggesting a possible involvement of plant resistance mechanisms to the virus induced by the product.

Keywords: Begomovirus, Crinivirus, *Solanum lycopersicum*, qPCR, Resistance induction

INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicon*) é uma das hortaliças mais produzidas no Brasil e no mundo. No entanto, é uma cultura que está sujeita a diversos problemas fitossanitários, sejam eles patogênicos ou associados a insetos, onde a mosca branca (*Bemisia tabaci*) aparece entre as pragas que vem causando problemas cada vez mais frequentes em plantios de tomates cultivados em todo o mundo, sendo considerada uma das principais pragas do século 20 (JONES et al., 2008). O clima brasileiro é propício para a multiplicação e disseminação deste inseto, a sua dispersão torna-se mais fácil e de difícil controle (FARIA et al., 2000).

Como consequência observou-se o aumento na incidência de vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* (*Tomato severe rugose virus* - ToSRV) e também *Crinivirus* (*Tomato chlorosis virus* - ToCV) (NAVAS-CASTILLO et al., 2011), ambos transmitidos pela mosca branca. Essas duas espécies de vírus são consideradas atualmente as mais importantes limitadoras da produção de tomate, além de sua presença ter sido verificada também em outras solanáceas importantes na agricultura como o pimentão e a batata (BARBOSA et al., 2008, FREITAS, 2012).

A espécie *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) é transmitida de forma eficiente pela *Bemisia tabaci* biótipo B de modo persistente e não propagativo (POLSTON et al., 2014). *Tomato chlorosis virus* (ToCV) é um vírus limitado ao floema e é transmitido na natureza de forma semi-persistente por moscas brancas de dois gêneros diferentes, *Bemisia* (*B. tabaci* biótipos A, B e Q) e *Trialeurodes* (*T. vaporariorum* e *T. abutilonea*) (WINTERMANTEL & WISLER., 2006; WINTERMANTEL et al., 2008; NAVAS-CASTILLO et al., 2011).

Incidências de ToSRV e ToCV isoladamente ou em infecção mista em tomateiro tem sido relatadas no Brasil (MACEDO et al., 2014, BARBOSA et al., 2011a, BARBOSA et al., 2011b, FERNANDES et al., 2008). No entanto danos quantitativos e/ou qualitativos provocados por esses vírus ainda são bastante escassos.

A utilização de cultivares resistentes pode ser considerada a opção mais eficaz, durável e estável dentro da estratégia de manejo integrado de viroses em hortaliças, no entanto é sabido que apesar de existir resistência a geminivírus em tomateiro, onde os genes (Ty-1, Ty-2, Ty-3, Ty-4 e Ty-5) (HANSON et al., 2006; JI et al., 2007, JI et al., 2009a, JI et al., 2009b, HUTTON et al., 2012) atuam, no entanto, esses genes podem não oferecer boa resistência aos isolados de vírus brasileiros (HURTADO et al., 2011).

Devido à dificuldade na obtenção de plantas resistentes à viroses umas das medidas utilizadas pelos produtores é o controle químico do inseto vetor e o uso de produtos com efeitos fisiológicos secundários. Esses produtos alteram a fisiologia da planta, aumentam a produtividade, ativam mecanismos de defesa e podem controlar diversas doenças (GUIMARÃES et al., 2014, ITAKO et al., 2012; VIGO et al., 2012; TÓFOLI et al., 2003; HERMES et al., 2002).

Tendo em vista que há poucos dados sobre a ação de produtos químicos no controle de vírus, o presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito da aplicação de Piraclostrobina+Metiran (Cabrio Top®) na produção e qualidade de frutos de tomate em plantas infectadas por ToSRV e ToCV, em diferentes fases fenológicas do ciclo da cultura e acompanhar a replicação do ToSRV após aplicação do produto por qPCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Instalação do experimento e Delineamento experimental

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, no Departamento de Proteção Vegetal, em área pertencente à Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP, campus Botucatu, SP. Foram utilizadas mudas de tomateiro de crescimento determinado híbrido 'Mariana' (Sakata®), que possui boa aceitabilidade no mercado. Foram conduzidos dois experimentos paralelos (um que recebeu pré-tratamento com Piraclostrobina+Metiram ((P+M) (3 g. l⁻¹) + Boscalida (0,3 g. l⁻¹) (BASF) ®) na bandeja após a semeadura e no outro as mudas de tomateiro não receberam nenhum produto. O delineamento foi de blocos inteiramente casualizados com 6 tratamentos (5 fases de inoculação dos vírus pelo vetor *B. tabaci* biótipo B em cinco fases de crescimento: 15 dias após o transplante (DAT); 30 DAT; 45 DAT; 60 DAT; 75 DAT e testemunha não inoculada) x 2 (Com aplicação ou não de Piraclostrobina+Metiram (Cabrio Top®) (P + M) (4.0 g. l⁻¹) ao longo do tempo, perfazendo cinco repetições.

Para verificar a influência do pré-tratamento na semeadura, foi realizada uma análise conjunta dos experimentos. Os dados de ambos os experimentos foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% probabilidade. As análises foram feitas pelo software estatístico SISVAR.

Condução do experimento

Aos vinte dias após o transplântio, trinta plantas de ambos os experimentos, receberam pulverização com P+M (4.0 g. l⁻¹). O produto aplicado foi de acordo com as normas de recomendação do fabricante, totalizando 4 aplicações, espaçadas de 15 dias ao longo do ciclo da cultura.

Plantas de tomateiro apresentando infecção mista por ToSRV e ToCV foram utilizadas como fonte de inóculo para transmissão do vírus por *B. Tabaci* biotipo B, utilizando-se um período de aquisição (PAA) e período de acesso a inoculação (PAI) de 48 horas, onde dez plantas de ambos os experimentos receberam as viroses. Foram utilizadas 20 moscas virulíferas por planta a ser inoculada. Após o PAI, as plantas foram pulverizadas com inseticida (Tiametoxam® 2 g. l⁻¹) e mantidas em estufa durante um período de 90 DAT. A avaliação da doença foi realizada a cada 15 dias após a inoculação até ao final do ciclo da cultura.

Deteção do Tomato severe rugose virus (ToSRV) e do Tomato chlorosis virus (ToCV)

Para a detecção de ToSRV, a extração do DNA genômico total foi feita por meio do kit DNeasy Mini Plant (Qiagen, Hilden, Germany) e realizada a cada 15 dias após as inoculações até o fim do ciclo da cultura. O DNA total de todas as amostras coletadas foi amplificado por círculo rolante (RCA) segundo método descrito por Inoue-Nagata et al., 2004 e Haible et al., 2006, por meio do kit Templi Phi DNA Amplification (GE Healthcare, USA). O produto do RCA foi utilizado na reação de PCR (Kit PCR Master Mix – Promega) utilizando-se os oligonucleotídeos PALIv1978 (5'-GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT-3') PAR1c496 (5'-AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG 3'), (ROJAS et al. 1993).

Para a detecção do ToCV, foi realizada a extração do RNA total utilizando-se Trizol® LS (Invitrogen) de acordo com protocolo do fabricante. Folhas sintomáticas foram

coletadas de cada tratamento e as extrações foram realizadas a cada 15 dias após as inoculações até o fim do ciclo da cultura. Foi realizado o Nested-RT-PCR com os pares de primers HS-11 (5'-GG(G/T)TT(A/G)GA(G/T)TT(C/T)GGTACTAC-3') / HS-12 (5'-CC(G/T) CCACCAAA (A /G)TCGTA-3') e TOC-5 (5-'GGTTTGGATTTTGGTACTACATTTCAGT-3')/ TOC-6 (5'-AAACTGCCTGCATGAAAAGTCTC-3') (Dovas et al., 2002).

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1% corado com Neotaq Brilliant Green Plus DNA Stain (NEOBIO, Brasil).

Aspectos de produção e análises químicas dos frutos de tomateiro

A colheita foi realizada aos 90 DAT, avaliando-se a produção total de frutos (média de frutos por planta); peso médio de frutos (média de 10 frutos colhidos); percentual de número de frutos verdes (total de frutos verdes / número de frutos totais). Foram analisados os sólidos solúveis totais (°Brix) (A.O.A. C, 1997) e acidez titulável (BRASIL, 2005), para obtenção do ratio (sólidos solúveis totais/acidez titulável) e pH. Os dados de produção e características físicas químicas dos frutos de tomateiro foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando o software estatístico SISVAR.

Quantificação por PCR em tempo real (qPCR) de ToSRV

A partir do produto do DNA total extraído com o kit DNeasy Mini Plant, foram realizadas quantificações utilizando os primers específicos ToSRV (+) TAAAGTGATTGTCTGTGGCCC/ ToRSV (-) CCGTTTAACAACCTGGGCCT (NOZAKI et al.,2016) nas concentrações de 600nM.

A reação de qPCR foi realizada em placas com 96 poços “MicroAmp” (Life Technologies) com volume final de 25µl utilizando SYBR Green GoTaq® qPCR Master Mix (PROMEGA) seguindo as instruções do fabricante, analisadas no Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). O protocolo de PCR incluiu um ciclo de 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto..

A curva padrão foi preparada usando diluições seriadas de DNA amplificadas por círculo rolante (RCA) quantificadas em espectrofotômetro (nanodrop) e diluídas nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 ng/µL.

Foi realizada a quantificação absoluta do número de DNA viral nos diferentes tratamentos, cada uma das amostras foi analisada em triplicada, usando quatro plantas por tratamento.

Atividade de Peroxidase

A atividade da peroxidase (EC 1.11.1.7) foi realizada por Guimarães (2013) e determinada conforme Lima et al., (1999). O material vegetal (folhas sadias, que receberam ou não pré-tratamento na semeadura, aplicação ou não de P+M (4.0 g. l⁻¹)) foi homogeneizado em fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,7 e centrifugado a 10000 xg (Hettich-Micro 220R) durante 10 min a 4 ° C. O sobrenadante foi obtido e considerado como extrato enzimático. A leitura do extrato foi realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda 505 nm e os resultados expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ decomposto $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$, peso fresco. A enzima foi analisada estatisticamente com base nas diferentes épocas de coleta e comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Idade fenológica do tomateiro cv Mariana e eficiência de inoculação do ToSRV e ToCV

Aos 15, 30 e 45 DAT todas as plantas inoculadas estavam infectadas por ambos os vírus. Aos 60 DAT, 60% das plantas que receberam o pré-tratamento com o produto na semeadura foram infectadas com ambos os vírus, enquanto que 80% para as que não receberam o produto na semeadura. Nas plantas previamente consideradas negativas por RCA-PCR, quando quantificadas por qPCR de ToSRV, apesar da baixa concentração viral, o vírus foi detectado (Figura 1). Aos 75 DAT, as plantas mantiveram-se assintomáticas até o final da avaliação, sendo o vírus não detectado por PCR convencional, porém detectado por qPCR (4.10×10^{-6} – 6.81×10^{-6} ng/ μl) porém com baixa concentração viral quando comparadas às inoculações aos 15, 30 e 45 DAT (0.44 – 1.80, 0.75 – 2.74 e 1.28 – 5.82 ng/ μl respectivamente (Figura 1). Para o ToCV não foi realizado a qPCR.

Os sintomas mais severos de subdesenvolvimento, clorose intensa e enrugamento foram observados aos 15 e 30 DAT, culminando com menor produção (Tabela 1 e 2). Aos 45 e 60 DAT, os sintomas foram bastante variáveis, geralmente na parte apical das plantas e com grande parte das plantas assintomáticas.

Efeito da Piraclostrobina+Metiram no desenvolvimento, produção e qualidade dos frutos

Em média as mudas tratadas com o produto na semeadura apresentaram maior altura (11,2 cm) comparadas com as sem tratamento (7,3 cm), essa medida foi realizada no dia do transplantio, isso reforça o efeito benéfico do pré-tratamento em mudas de tomateiro. Para as plantas pré-tratadas na semeadura, observou-se significância pela análise de variância, para a produção total de frutos, assim como para o peso médio. As plantas inoculadas aos 15 e 30 DAT, praticamente não produziram frutos, isso provavelmente ocorreu devido a presença da infecção viral nas fases iniciais da cultura, nas inoculadas a partir dos 45, 60 e 75 DAT e que receberam a aplicação de P+M (4 g. l⁻¹) tiveram um melhor desenvolvimento e uma maior produção, não diferindo estatisticamente da não inoculada (Tabela 1).

A mesma tendência foi verificada no experimento onde as mudas não receberam o pré-tratamento com os fungicidas após a semeadura (Tabela 2). Pode-se observar que plantas que receberam o produto ao longo do ciclo da cultura tiveram uma maior produção, quando comparadas às que não receberam. A produção das plantas inoculadas aos 45, 60 e 75 DAT foi equivalente a de uma planta não infectada pelos vírus (Tabela 1 e 2).

Foi observado que plantas que receberam o produto P+M (4 g. l⁻¹) e foram inoculadas com os vírus aos 45, 60, 75 DAT apresentaram menos frutos verdes, sugerindo que a aplicação do produto ao longo do ciclo da cultura é benéfica à uniformidade da maturação dos frutos (Tabela 1 e 2).

A variável pH apresentou diferenças estatísticas significativas apenas para as fases de inoculação ($P < 0,05$), onde de modo geral os frutos das plantas inoculadas com os vírus aos 15 DAT apresentaram pH 4.0 e não inoculadas pH 4.18. Já no experimento sem pré-tratamento o pH foi significativo para a aplicação do produto P+M (4 g. l⁻¹) durante o ciclo da cultura e para as fases de inoculação dos vírus ($P < 0,05$). As médias entre os tratamentos estavam na faixa de 3.94 (15 DAT) e 4.18 (plantas não inoculadas).

A relação SS/AT ('ratio') expressa o sabor dos frutos, onde podemos verificar que os frutos provenientes de mudas tratadas na semeadura e de plantas inoculadas mais tardiamente aos 45, 60, 75 DAT e o não inoculado apresentaram maior relação SS/AT quando comparadas aos tratamentos 15 e 30 DAT (Tabela 1). Não houve diferenças significativas para aplicação de P+M (4 g. l⁻¹), no entanto observou-se de modo geral que

os tratamentos que receberam o fungicida apresentam maior ratio, ou seja, características gustativas mais agradáveis ao consumidor (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos no experimento sem pré-tratamento na semeadura (Tabela 2).

Pela análise conjunta (Tabela 3), o pré-tratamento realizado na semeadura ocasionou efeitos benéficos à cultura e suas variáveis de produção. O não tratamento na semeadura foi benéfico apenas para o peso unitário dos frutos. Como foram retirados 10 frutos de cada tratamento de modo aleatório, a não uniformidade desses frutos pode ter causado essadiferença, no entanto pode-se observar que os maiores valores foram encontrados para a aplicação de P+M. Para as características de físico químicas como oratio, diferenças significativas não foram observadas (Tabela 3). Há de se ressaltar que para quase todos os fatores analisados, a aplicação de P+M (4 g. l^{-1}) ao longo do ciclo da cultura, acarretou em melhorias de produção e qualidade dos frutos (Tabela 3).

Quantificação de ToSRV nas diversas fases fenológicas da cultura e efeito da Piraclostrobina+Metiram sobre a replicação

Para a quantificação absoluta do ToSRV em tomateiro determinado híbrido “Mariana” os tratamentos foram inoculados aos 15, 30, 45, 60 e 75 DAT (Figura 1A,1B, 1C, 1D), porém as quantificações foram realizadas para todos os tratamentos a cada quinze dias após inoculação (DAI), nos períodos de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 (Figura 1). A detecção de ToCV foi realizada apenas por PCR convencional, não por qPCR, uma vez que o trabalho objetiva verificar o efeito do produto sobre a replicação de ToSRV. Trabalhos futuros visando verificar o efeito de produtos da classe das estrobirulinas sobre a replicação do ToCV serão realizados.

Observou-se aos 15 DAT que as plantas de tomateiro que não receberam o pré-tratamento na semeadura e nem aplicação de P+M (4 g. l^{-1}) ao longo do ciclo apresentaram uma maior replicação viral variando em média de $1.13 - 1.80 \text{ ng/}\mu\text{l}$ dos 30 DAI até 90 DAI, respectivamente. A menor replicação para 15 DAT foi observada para plantas que receberam o pré-tratamento na semeadura e aplicação de P+M (4 g. l^{-1}) (Figura 1A).

Para a inoculação realizada aos 30 DAT, as quantificações foram feitas aos 45, 60, 75 e 90 dias (Figura 1B). Plantas sem o pré-tratamento e que posteriormente foram aplicadas com P+M (4 g. l^{-1}), apresentaram uma menor replicação do ToSRV, sendo que em termos médios sua quantificação variou de $0.75 \text{ ng/}\mu\text{l}$ (45 DAI) a $0.95 \text{ ng/}\mu\text{l}$ (90 DAI). Esse

resultado sugere que para essa fase fenológica, independente da planta ter sido submetida ao pré-tratamento, o produto agiu fazendo com que a replicação viral fosse alterada. O pico de concentração viral foi verificado aos 90 DAI para plantas que não receberam o pré-tratamento e nem aplicação do produto ao longo do ciclo da cultura (Figura 1B).

Plantas inoculadas aos 45 DAT tiveram o ToSRV quantificados aos 60, 75 e 90 dias (Figura 1C). Maiores valores de quantificação foram encontrados aos 90 DAI, onde a máxima replicação foi de 5.82 ng/μl para plantas sem pré-tratamento na semeadura e sem aplicação de P+M durante o ciclo da cultura. A menor replicação viral foi observada para plantas com pré-tratamento na semeadura e com uso de P+M (1.28 - 1.52 ng/μl, 60 e 75 DAI, respectivamente) (Figura 1C).

As plantas que foram inoculadas com o vírus aos 60 DAT foram quantificadas aos 75 e 90 dias. Queda na replicação viral foi verificada para todos os tratamentos, especialmente para os que receberam o pré-tratamento na semeadura (Figura 1D). Plantas que foram inoculadas somente aos 75 DAT e avaliadas aos 90 dias, possibilitaram uma replicação viral extremamente baixa com médias entre 4.10×10^{-6} – 6.81×10^{-6} ng/μl, sendo que por PCR convencional não foi possível a detecção do vírus.

Modelo de quantificação de ToSRV e a relação com atividade de Peroxidase

A Figura 2 mostra o modelo de quantificação viral do ToSRV em tomateiro determinado híbrido “Mariana” em todas as fases de inoculação e sua relação com a atividade de peroxidase em plantas sadias que receberam ou não pré-tratamento na semeadura, e posterior aplicação ou não de P+M (4.0 g. l^{-1}), essa análise foi retirada extraídas em experimentos executados por Guimarães (2013) Verificou-se que plantas inoculadas aos 15 DAT e 30 DAT, apresentam uma replicação constante ao longo do ciclo da cultura. O maior pico de replicação viral foi verificado em plantas inoculadas vírus aos 45 DAT. Decréscimos de replicação são verificados nos tratamentos aos 60 e 75 DAT (Figura 2).

Ao correlacionar a atividade de peroxidase com a quantificação do ToSRV em tomateiro cv ‘Mariana’, aumentos da atividade da enzima foram observados até os 60 DAT, fase onde ocorre aumento de replicação viral do ToSRV, sendo que a partir deste período decréscimos da atividade da enzima, assim como da replicação são verificados (Figura 2). Maiores níveis de peroxidase e baixa concentração viral podem estar relacionados com a ação desta enzima nos mecanismos de defesa bioquímicos existentes

na planta, possivelmente estimulados pela aplicação do produto durante o desenvolvimento da cultura (Figura 2).

DISCUSSÃO

Tem sido bastante discutida a existência de efeitos fisiológicos dos fungicidas do grupo das estrobilurinas em diversas culturas, inclusive em solanáceas. Algumas empresas têm divulgado o uso desses fungicidas para o manejo de estresses bióticos e abióticos em diversas culturas, sugerindo um potencial aumento de produtividade mesmo na ausência de doenças no campo (WISE & MUELLER, 2011). No entanto, não se conhecem resultados de pesquisa correlacionando esse potencial no aumento da produtividade causado pelo uso desses fungicidas em tomate com a quantificação da doença e o efeito na replicação do vírus.

Os resultados obtidos das inoculações de plantas de tomateiro híbrido “Mariana” infectadas com o ToSRV e o ToCV sugerem que as plantas infectadas nos estádios fenológicos mais avançados (45, 60 e 75 DAT) possibilitam maior resistência a infecção mista, quando comparadas às inoculadas aos 15 e 30 DAT e por consequência apresentam melhores produções e qualidade de frutos (Tabelas 1 e 2). Mediante o aumento da idade da planta, ocorrem modificações nas plantas hospedeiras como o espessamento das paredes das células, formação de lignina que podem influenciar no estabelecimento do vírus na planta (BALAMURALIKRISHNAN et al., 2003).

A influencia da idade das plantas e infecção pelo vírus foi observada também em outros patossistemas como *Maize dwarf mosaic virus* em diferentes híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor*) (RANGEL et al., 1996), *Sugarcane mosaic virus* em cana-de-açúcar (*Saccharum* L.) (BALAMURALIKRISHNAN et al., 2003), *Cotton leaf curl virus* em algodão (AKHTAR et al., 2004), reforçando que plantas fenologicamente mais velhas exibem menos doença e o processo de infecção é mais lento quando comparado à plantas jovens.

A aplicação da Piraclostrobina+Metiram na semeadura, seguida da pulverização com P+M (4 g. l⁻¹) durante o ciclo da cultura do tomateiro híbrido “Mariana”, induziu melhorias nas características das mudas e das plantas de tomateiro, maior peso e produção de frutos foram encontrados (Tabela 1 e 2). Produtos como a Piraclostrobina+Metiram pertencem à classe de fungicidas das estrobilurinas e ditiocarbamatos, esses princípios

ativos possuem uma variedade de compostos sintéticos com atividade antifúngica de largo espectro de ação (KOZLOWSKI et al., 2009; VENÂCIO et al., 2003). Além de atuarem diretamente sobre o patógeno, apresentam efeitos secundários altamente benéficos às plantas. Esse efeito fisiológico resulta no aumento da fotossíntese líquida e da atividade da enzima nitrato-redutase, além da diminuição da síntese do etileno. Todos esses fatores reunidos contribuem para o aumento da produtividade e qualidade da planta (GALVINO, 2008; TÖFOLI et al., 2003; KÖEHLE et al., 2002). Este efeito fisiológico inclui o chamado "efeito verde", isto é, mesmo na ausência de ataque de patógenos, as plantas tratadas com estrobilurinas possuem um verde intenso quando comparadas às não tratadas com fungicidas (KÖEHLE et al., 2002).

Outro aspecto importante observado foi com relação a menor porcentagem de frutos verdes nas plantas tratadas com P+M (4 g. l⁻¹) (Tabelas 1 e 2). Efeitos fisiológicos das estrobilurinas foram observados sobre os reguladores vegetais endógenos. Onde níveis de auxina, ácido indolilacético (IAA) e ácido abscísico (ABA) são alterados (KÖEHLE et al., 1994). O ABA desempenha papel semelhante ao etileno interferindo na maturação dos frutos e senescência dos frutos, sendo, portanto, considerado um outro regulador do controle do amadurecimento (ZHANG et al., 2009). O conteúdo ABA em frutos verdes é baixo, aumentando durante o amadurecimento tanto de frutos climatéricos (BUESA et al., 1994) como de não climatéricos (KONDO & TOMIYAMA, 1998).

Em tomate Bastias et al. (2011) constataram que o ABA controla o amadurecimento aumentando os níveis de açúcares solúveis, que são componentes essenciais na qualidade dos frutos do tomateiro, que fazem com que a fruta fica mais doce e saborosa. Neste trabalho foi observado um aumento no ratio em frutos de plantas inoculadas mais tardiamente e que receberam aplicação de P+M (4 g. l⁻¹) ao longo do ciclo da cultura (Tabela 1 e 2).

A relação sólidos solúveis/acidez titulável denominada de “ratio” é uma das melhores formas de avaliação do sabor dos frutos, uma vez que os açúcares, ácidos, fenóis e os minerais fazem a maior contribuição ao gosto do tomate, sendo o “ratio” mais representativo que a medição isolada de açúcares ou da acidez, proporcionando, assim, boa ideia do equilíbrio entre esses dois componentes (BECKLES, 2012).

Outro parâmetro avaliado neste trabalho foi a replicação do ToSRV, verificando-se menores taxas de replicação deste vírus em plantas tratadas com P+M ao longo do ciclo da cultura e que receberam o pré-tratamento na semeadura, quando comparadas ao tratamento

controle (sem pré-tratamento, sem P+M) (Figura 1). Plantas de pimentão, inoculadas por biobalística com *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) e tratadas com o produto Benzothiadiazole (BTH) apresentaram diminuição de 5-6 vezes da concentração viral quando comparadas às não tratadas com o produto (TREJO-SAAVEDRA et al., 2013), indicando efeito direto do BTH na replicação do PeGMV. Em nosso experimento obteve-se redução de aproximadamente 4 vezes para plantas inoculadas aos 45 dias e tratadas com o produto na semeadura e durante o ciclo da cultura, quando comparadas as não tratadas (Figura 1).

Tentando correlacionar a atividade de peroxidase realizada por Guimarães (2013) e a quantificação de ToSRV, observamos que a atividade da enzima em plantas de tomateiro híbrido Mariana alcança um pico em torno dos 60 DAT e posteriormente declina (Figura 2). Em nosso estudo observamos que maior replicação e concentração viral do ToSRV em plantas inoculadas aos 15, 30, 45 DAT, coincide com maiores concentrações de peroxidase na planta (Figura 2). A peroxidase está envolvida em várias reações, tais como a oxidação de fenóis, oxidação de ácido indol-3-acético (IAA), cicatrização de feridas, defesa contra agentes patogênicos na resposta de hipersensibilidade (HR), aumento de lignina e a suberina para a síntese e espessamento da parede da célula, regulação do alongamento celular e senescência (QUIROGA et al, 2000; CAMPOS et al, 2004). O aumento da atividade da peroxidase pode ser uma resposta à produção de espécies reativas de oxigênio que estão sendo geradas ou terem sido estimuladas pela aplicação do produto. Plantas tratadas com produto da classe das estrobirulinas apresentam maiores picos de atividade enzimática quando comparadas as não tratadas e assim conseguem realizar a ativação de mecanismos de defesa em patossistemas diversos como infecção por *Tobacco mosaic virus* e *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* em *Nicotiana tabacum* cv Xanthi (HERMES et al, 2002), *Crinipellis pernicioso* em cacaueiro (*Theobroma cacao*) (NOJOSA et al; 2003), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris*) (VIGO et al. , 2012) e *Xanthomonas perforans* em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) (ITAKO et al, 2012), *Potato virus X* e *Potato virus Y* em batata (*Solanum tuberosum*) (GERALDINO et al., 2007), *Tospovirus* em tomateiro (*Solanum lycopersicum*), (GUIMARÃES, 2013).

CONCLUSÃO

O uso do pré-tratamento combinado com aplicação de P + M (4 g.l⁻¹) induziu um maior volume de produção e características melhoradas dos frutos de tomate híbrido “Mariana”, principalmente quando inoculados mais tardiamente com o ToSRV e ToCV. A exposição das plantas a esse combinação influenciou a replicação do ToSRV analisada por qPCR, sugerindo um possível envolvimento na indução de mecanismos de resistência virais ou estresse.

REFERÊNCIAS

- AKHTAR, K. P.; HUSSAIN, M.; AZEEM, I.; KHAN, AHSANUL.; HAQ, M. Influence of plant age, whitefly population and cultivar resistance on infection of cotton plants by *cotton leaf curl virus* (CLCuV) in Pakistan. **Field Crops Research**, v. 86, p. 15–21, 2004.
- A. O. A.C. (Association of official analytical chemistry). **Official methods of analysis of the association of official analytical chemistry**. 11 ed. Maryland, 1997. 1141 p.
- BALAMURALIKRISHNAN, M.; SABITHA DORAISAMY, T.; GANAPATHY, R.; VISWANATHAN. *Sugarcane Mosaic Virus* Infection Progress in Relation to Age of Sugarcane . **Sugar Tech**, v. 5, p. 21-24, 2003.
- BARBOSA, J. C.; BARRETO, S. S.; INOUE-NAGATA, A. K.; REZENDE, J. A. M. Characterization and experimental host range of a Brazilian tomato isolate of *Tomato severe rugose virus*. **Journal of Phytopathology**, v. 159, p. 644-646, 2011a.
- BARBOSA, J. C.; COSTA, H.; GIORIA, R.; REZENDE, J. A. M. Occurrence of *Tomato chlorosis virus* in tomato crops in five Brazilian states. **Tropical Plant Pathology** v. 36, p. 256-258, 2011b.
- BARBOSA, J. C.; TEIXEIRA, A. P. M.; MOREIRA, A. G.; CAMARGO, L. E. A.; BERGAMIN FILHO, A.; KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A. M. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Brazil. **Plant Disease**, v. 92, p.1709, 2008.

BASTIAS, A., LOPEZ-CLIMENT, M., VALCARCEL, M., ROSELLO, S., GOMEZCADENAS, A. & CASARETTO, J. A. Modulation of organic acids and sugar content in tomato fruits by an abscisic acid-regulated transcription factor. **Physiologia Plantarum**, v. 141, p. 215-226. 2011.

BECKLES, D.M. Factors affecting the postharvest soluble solids and sugar content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 63, p.129–140, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Brasil: Ministério da Saúde, 2005. 1018 p.

BUESA, C., DOMINGUEZ, M. & VENDRELL, M. Absciscic-Acid Effects on Ethylene Production and Respiration in Detached Apple Fruits at Different Stages of Development. **Revista Espanola De Ciencia Y Tecnologia De Alimentos**, v. 34, p. 495-506, 1994.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, G. A.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Peroxidase and polyphenol oxidase activity in bean anthracnose resistance. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 39, p.637-643, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2004000700004>. Acesso 25 set 2015

DOVAS, C. I.; KATIS, N. I.; AVGELIS, A. V. Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. **Plant Disease**, v. 86, p.1345–1349, 2002.

FARIA, J. C. et al . Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 125-137, 2000.

FERNANDES, F. R; ALBUQUERQUE, L. C; GIORDANO, L. B; BOITEUX, L. S; ÁVILA, A. C; INOUE, A. K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, 36: 251-258, 2008.

FREITAS, D. M. S. **Tomato severe rugose virus (ToSRV) e Tomato chlorosis virus (ToCV):** relações com a *Bemisia tabaci* biótipo B e eficiência de um inseticida no controle da transmissão do ToSRV. 2012. 74 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

GALVINO SBF. 2008. 42 p. **Efeito de fungicida na produção de batata e na disseminação de vírus e detecção dos variantes genéticos PVYn-wi e NE-11 no Brasil.** Dissertação (Mestrado/Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008.

GERALDINO, P. S; FIGUEIRA, A. R ; OLIVEIRA, C.L. ; RIBEIRO, S .R. R. P ; ALMEIDA, J. E. M . **Concentração viral e produção de plantas de batata infectadas com Potato virus X (PVX) e Potato virus Y (PVY) tratadas com piraclostrobina.** In: XIII Encontro Nacional de Produção e Abastecimento de Batata, IX Seminário Nacional de Batata Semente, IV ABBA Batata Show, 2007, Holambra. ABBA-Associação Brasileira da Batata, 2007

GUIMARÃES, L. R. P. **Avaliação da indução de resistência no controle do vira cabeça do tomateiro.** 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

HAIBLE, D.; KOBER, S.; JESKE, H. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam v. 135 p. 9–166, 2006.

HANSON, P.; GREEN, S.K.; KUO, G. Ty-2, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Tomato Genetics Cooperative Report*, v.56, p.17-18, 2006.

HERMES, S.; SEEHAUS, K.; KOEHLE, H. A Strobirulin fungicide enhances the resistance of tobacco against *Tobacco mosaic virus* and *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci*. **Journal Plant Physiology**, Jena, v. 130, p. 120-127, 2002.

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

HUTTON, S. F.; SCOTT, J. W.; SCHUSTER, D. J. Recessive Resistance to Tomato yellow leaf curl virus from the Tomato Cultivar Tyking Is Located in the Same Region as Ty-5 on Chromosome 4. **Hortscience** 47(3):324–327. 2012.

INOUE-NAGATA, A. K.; ALBUQUERQUE, L. C.; ROCHA, W. B.; NAGATA T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam v. 116, p. 209–211, 2004.

ITAKO, A. T. et al. Effect of chemicals on the bacterial spot (*Xanthomonas perforans*) and the activation of pathogenesis-related proteins in tomato. **Idesia**, Chile, 30: 85-92, 2012.

Ji, Y.; SCHUSTER, Ji, Y.; SCHUSTER, D.J.; SCOTT, J.W. Ty-3, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato. **Molecular Breeding**, v.20, p.271-284, 2007.

Ji, Y.; J.W. SCOTT.; D. J. SCHUSTER. Toward fine mapping of the tomato yellow leaf curl virus resistance gene Ty-2 on chromosome 11 of tomato. **HortScience**. v.44, p. 614–618, 2009a.

Ji, Y.; J.W. SCOTT.; D.J. SCHUSTER.; D.P. MAXWELL. Molecular mapping of Ty-4, a new Tomato Yellow Leaf Curl Virus resistance locus on chromosome 3 of tomato. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** v.134, p. 281–288, 2009b.

JONES, C. M. et al. High-throughput allelic discrimination of B and Q biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci*, using TaqMan allele-selective PCR. **Pest Management Science**, Chichester, v. 64, n. , p. 12-15, 2008.

ITAKO, A. T.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; SILVA JÚNIOR, T. F.; SOMAN, M. J.; MARINGONI, A. C. Effect of chemicals on the bacterial spot (*Xanthomonas perforans*) and the activation of pathogenesis-related proteins in tomato. **Idesia**, Chile, 30: 85-92, 2012.

KÖEHLE, H.; GROSSMANN, K.; JABS, T.; GERHARD, M.; KAISER, W.; GLAAB, J.; CONRATH, U.; SEEHAUS, K.; HERMS, S. Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants. In: DEHNE, H. W.; GISI, U.; KUCK, K. H.; RUSSELL, P. E.; LYR, H. (Ed.). **Modern fungicides and antifungal compounds III**. Andover: Editora, 2002. p. 61-74.

KÖEHLE, H.; GROSSMANN, K.; JABS, T.; GERHARD, M.; KAISER, W.; GLAAB, J.; CONRATH, U.; SEEHAUS, K.; HERMS, S. Physiological effects of strobilurin fungicide F 500 on plants. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 22, n. 65, 1994.

KONDO, S.; TOMIYAMA, A. Changes of free and conjugated ABA in the fruit of 'Satohnishiki' sweet cherry and the ABA metabolism after application of (s)-(+)-ABA. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.73, p. 467-472, 1998.

KOZLOWSKI, L. A.; SIMÕES, D. F. M.; SOUZA, C. D.; TRENTO, M. Physiological effects of strobilurins F 500® in the growth and yield of bean. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 7, n. 1, p. 41-54, 2009.

LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G.; OLIVEIRA, A. M. Polyamines and peroxidase activity in bean (*phaseolus vulgaris* l.) grown under saline stress. **Scientia Agrícola**, v. 56, p. 21-25, 1999.

MACEDO, M. A, BARRETO, S. S, HALLWASS, M, INOUE-NAGATA, A. K. High incidence of *Tomato chlorosis virus* alone and in mixed infection with begomoviruses in two tomato fields in the Federal District and Goiás state, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, p. 449-452, 2014.

NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVE, E.; SANCHEZ-CAMPOS, S. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 219–248, 2011.

NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V.; AGUILAR, M. A. G., BEZERRA, K. M. T.; ANHERT, D. E. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, p. 148-154, 2003.

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*. 2014, 24 p.

QUIROGA, C.; GUERREIRO, C.; BOTELLA, M. A.; BARCELÓ, A.; AMAYA, I.; MEDINA, M. I.; ALONSO, F. J.; FORCHETTI, S. M.; TIGIER, H.; VALPUESTA, V. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. **Plant Physiology**, v. 122, p. 1119-1128, 2000.

RANGEL, Y.; GARRIDO, M. J.; MONTEVERDE, E. Effect of maize dwarf virus Venezuelan strain on some biometrics characteristics associated to yield of three sorghum cultivars. **Fitopatologia**, Venezuela, v. 9, p.36-41, 1996.

ROJAS, M. R.; GILBERTSON, R. T.; RUSSEL, D. R.; MAXWELL, D. P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p. 340-347, 1993.

TREJO-SAAVEDRA, D.L.; GARCÍA-NERIA, M. A.; RIVERA-BUSTAMANTE, R. F. Benzothiadiazole (BTH) induces resistance to *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) in pepper (*Capsicum annuum* L.), **Biological Research**, p. 46, v. 333-340, 2013.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; GARCIA JUNIOR, O. Controle da requeima do tomateiro com fungicidas e seus reflexos na produção. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70 p. 473-482, 2003.

TZANETAKIS I. E.; MARTIN, R. R.; WINTERMANTEL, W. M. Epidemiology of criniviruses: an emerging problem in world agriculture. **Frontiers Microbiology**, v. 4, p.119, 2013.

VENANCIO, W. S.; RODRIGUES, M. A. T.; BEGLIOMINI, E.; SOUZA, N. L. Physiological effects of strobilurin fungicides on plants. **Publication UEPG - Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharia**, Ponta Grossa, v. 9, n. 3, p. 59-68, 2003.

VIGO, S. C.; MARINGONI, A. C.; LIMA, G. P. P.; CAMARA, R.C. Evaluation of pyraclostrobin and acibenzolar-S-methyl on common bacterial blight of snap bean. **Semina- Ciências Agrárias** (Online), v. 33, p. 167-174, 2012.

WINTERMANTEL, W.M.; CORTEZ, A. A.; ANCHIETA, A. G.; GULATI-SAKHUJA, A. Co-infection by two criniviruses alters accumulation of each virus in a host-specific manner and influences efficiency of virus transmission. **Phytopathology**. v. 98, p. 1340-1345, 2008.

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

WISE K.; MUELLER, D. Are fungicides no longer just for fungi? An analysis of foliar fungicide use in corn. **APSnet Features**, 2011. DOI:10.1094/APSnetFeature-2011-0531.

ZHANG, M., YUAN, B. & LENG, P. 2009. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, 60, 1579-1588

Tabela 1. Efeito da aplicação Piraclostrobina+Metiran em plantas infectadas com ToSRV e ToCV sobre a produção total (kg-1), peso de frutos (g-1), % frutos verdes e Ratio (Sólidos Solúveis/ Acidez Titulável), em plantas que receberam o pre-tratamento na semeadura.

Trat.	Produção Total (kg/planta)			Peso de frutos (g ⁻¹)			% Frutos verdes			Ratio (SS/AT)		
	Com *	Sem	Média	Com *	Sem	Média	Com*	Sem	Média	Com *	Sem	Média
	aplicação	Aplicaçã o		aplicação	Aplicação		Aplicação	aplicação		aplicação	aplicação	
15 DAT	1.39±0.09	1.11±0.18	1.25 b	34.36±3.65	29.80±3.29	32.08 c	54.24±5.61	70.31±8.11	62.27 a	4.88±0.20	6.57±0.37	5.72 b
30 DAT	1.92±0.20	1.30±0.21	1.61 b	50.18±2.19	38.38±3.79	44.28 b	62.46±6.65	66.07±8.71	64.26 a	6.29±0.44	6.93±0.14	6.61 ab
45 DAT	2.51±0.08	1.68±0.07	2.10 a	59.09±3.08	39.94±4.30	49.51ab	40.74±6.93	50.34±2.89	45.54ab	7.35±0.53	7.19±0.07	7.27 a
60 DAT	2.43±0.20	1.96±0.14	2.20 a	55.01±1.78	42.27±2.48	48.64ab	35.64±2.36	43.55±4.42	39.60 b	7.40±0.20	7.13±0.25	7.27 a
75 DAT	2.58±0.05	2.23±0.05	2.40 a	66.0±2.77	42.69±3.27	54.38 a	35.26±2.13	40.83±3.53	38.04 b	7.63±0.62	7.21±0.45	7.42 a
Sem vírus	2.26±0.03	2.33±0.08	2.30 a	62.50±2.84	52.54±1.69	57.52 a	34.80±1.54	34.22±1.84	34.51 b	7.65±0.25	7.55±0.31	7.60 a
Média	2.18 A	1.77 B		54.53 A	40.94 B		43.86	50.88		6.87	7.10	
P (A)		0.0010			0.0010			0.0663			0.3192	
P (Trat.)		0.0010			0.0010			0.0010			0.0020	
P(A x Trat)		0.0750			0.0980			0.8582			0.0896	

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre se pelo teste de Tukey p<0.05.

* A (Aplicação de Piraclostrobina+Metiran (4 g. l⁻¹)), Trat (Tratamentos).

Tabela 2. Efeito da aplicação Piraclostrobina+Metiran em plantas infectadas com ToSRV e ToCV sobre a produção total (kg-1), peso de frutos (g-1), % frutos verdes e Ratio (Sólidos Solúveis/ Acidez Titulável), em plantas não tratadas na semeadura.

Trat.	Produção Total (kg/planta)			Peso de frutos (g ⁻¹)			% Frutos Verdes			Ratio (SS/AT)		
	Com *	Sem	Média	Com *	Sem	Média	Com *	Sem	Média	Com *	Sem	Média
	Aplicação	Aplicação		Aplicação	aplicação		Aplicação	aplicação		aplicação	aplicação	
15 DAT	1.38±0.25 aB	0.64±0.16 Bb	1.01	39.12±2.60 aC	14.28±2.11 bE	26.70	74.90±4.85	90.06±2.32	82.48 a	6.10±0.38	5.22±0.45	5.66 b
30 DAT	2.16±0.16 aA	0.84±0.10 bB	1.50	46.34±3.96 aBC	26.90±0.87 bD	36.62	69.65±3.67	79.96±3.22	74.80 a	6.59± 0.31	5.79±0.32	6.19 ab
45 DAT	2.03±0.17 aA	1.51±0.05 bA	1.77	57.31±1.02 aB	50.27±3.18 aC	53.79	49.81±3.29	61.93±10.92	55.87 b	6.68±0.18	6.19±0.29	6.44 ab
60 DAT	2.03±0.17 aA	1.77±0.08 aA	1.90	71.02±2.75 aA	70.95±3.92 aB	70.98	49.45±1.77	58.39± 6.60	53.92 b	6.87±0.16	6.93±0.30	6.90 a
75 DAT	2.14±0.05 aA	2.01±0.13 aA	2.08	80.93±3.37 aA	81.45±1.71 aAB	81.19	44.55±2.22	41.60± 3.13	43.07 b	7.02± 0.43	7.09±0.41	7.05 a
Sem vírus	2.40±0.10 aA	2.04±0.09 aA	2.22	87.28±1.08 aA	82.22±2.24 aA	84.75	44.44±3.09	41.15±2.03	42.79 b	7.14±0.38	7.09±0.37	7.11 a
Média	2.02	1.47		63.66	54.34		55.47 B	62.18 A		6.73	6.39	
P (A)		0.0001			0.0001			0.0296			0.1252	
P (Trat.)		0.0001			0.0001			0.0001			0.0022	
P(A x Trat)		0.0049			0.0001			0.3422			0.6766	

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre se pelo teste de Tukey p<0.05.

* A (Aplicação de Piraclostrobina+Metiran (4 g. l⁻¹)), Trat (Tratamentos).

Tabela 3. Análise conjunta dos experimentos com ou sem pré-tratamento de Piraclostrobina+Metiram ((P+M) (3 g. l⁻¹) (BASF) ® + Boscalida (0,3 g. l⁻¹) (BASF) ®) na bandeja após a semeadura.

Fatores	Produção Total (kg/planta)		Peso de frutos (g ⁻¹)		% Frutos Verdes		Ratio (SS/AT)	
	*Com pré-tratamento	Sem pré-tratamento	Com pré-tratamento	Sem pré-tratamento	Com pré-tratamento	Sem pré-tratamento	Com pré-tratamento	Sem pré-tratamento
Com P+M	2.18 a	2.02 a	54.53 a	63.66 a	43.86 a	55.47 b	6.87 a	6.73 a
Sem P+M	1.77 b	1.47 b	40.94 b	54.34 b	50.88 a	62.18 a	7.10 a	6.39 a
Médias	1.98	1.75	47.74	57.27	47.37	58.83	6.99	6.56
Desvio Padrão	0.33	0.34	7.89	6.54	9.79	7.74	0.96	1.12
C.V. (%)	16.64	19.68	16.45	11.08	22.32	15.22	13.90	17.90
P (A)	0.0023	0.0039	0.0043	0.0020	0.3650	0.0065	0.2800	0.5400
P (In.)	0.0019	0.0016	0.0013	0.0013	0.0068	0.0018	0.0051	0.00398
P(A x In)	0.2150	0.0038	0.1920	0.0084	0.5000	0.1480	0.2220	0.2500

a,b - média dos níveis de cada fator na coluna, seguidas de mesma letra minúscula, não diferem pelo teste de Tuckey (P>0,05)

A - Aplicação de Piraclostrobina+Metiran (P+M 4 g. l⁻¹), In - Inoculações (Tratamentos)

* Com pré-tratamento (aplicação de Piraclostrobina+Metiram ((P+M) (3 g. l⁻¹) (BASF) ® + Boscalida (0,3 g. l⁻¹) (BASF) ®) na bandeja após a semeadura).

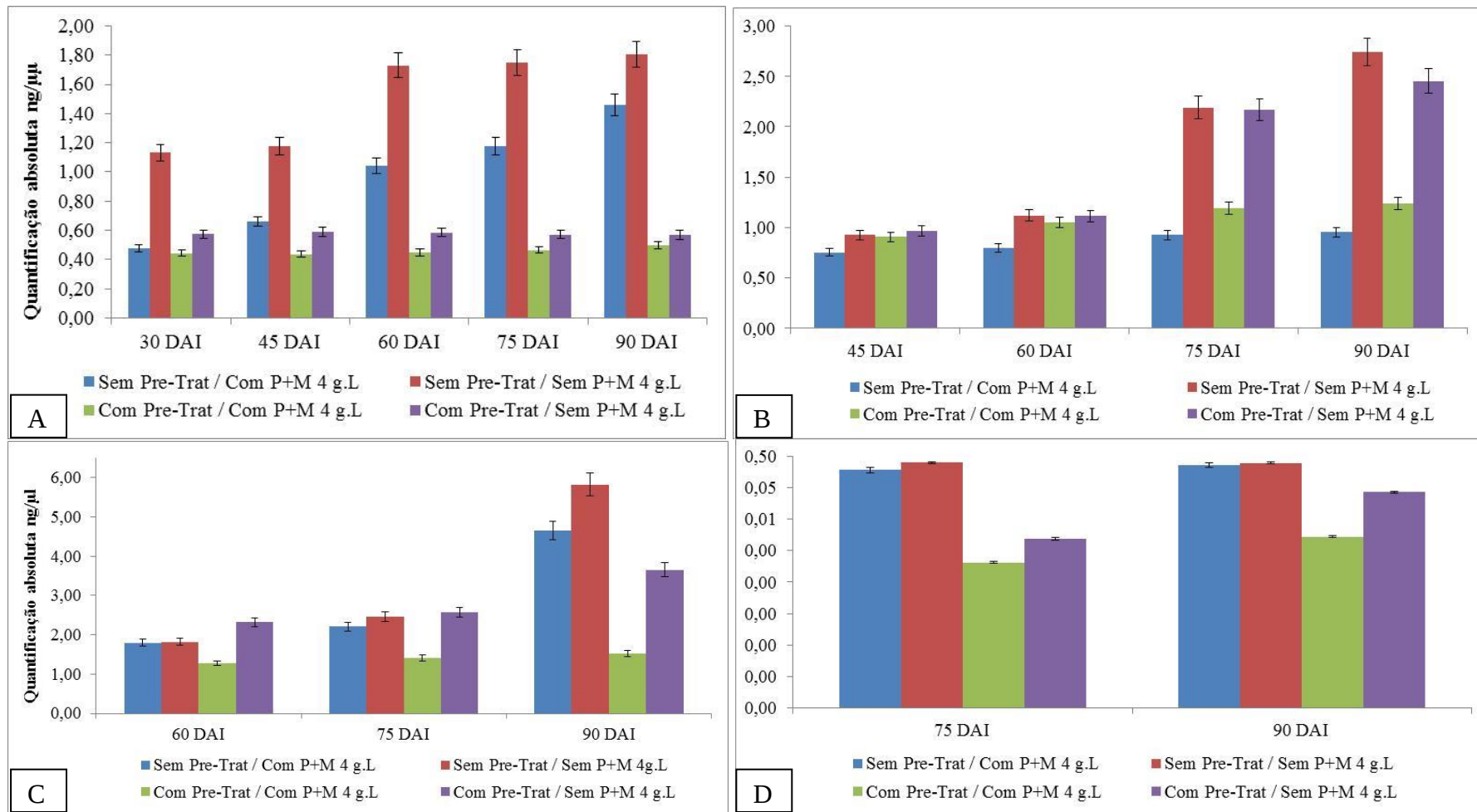


Figura 1. Quantificação absoluta de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em tomateiro determinado híbrido “Mariana”. As inoculações foram realizadas aos A) 15 DAT, B) 30 DAT, C) 45 DAT, D) 60 DAT, e as quantificações representadas no eixo “X” realizadas aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após inoculações (DAI).

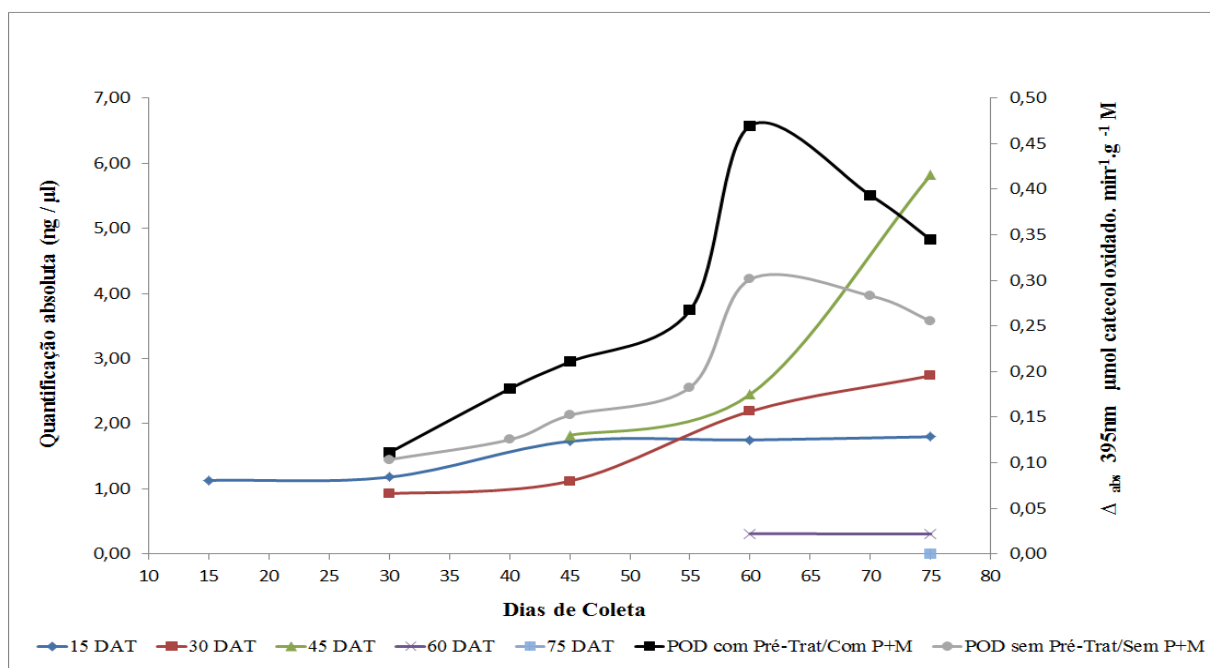


Figura 2. Modelo da quantificação do *Tomato severe rugose virus* em tomateiro híbrido “Mariana” inoculado aos 15, 30, 45, 60 e 75; DAT com o ToSRV.e sua relação com a atividade de peroxidase (POD).

POD com Pré-Trat/ Com P+M: $y = -0,0002x^3 + 0,0317x^2 - 1,3638x + 20,06$ ($R^2 = 0,9457$);

POD sem Pré-Trat/ Sem P+M: $y = -0,0002x^3 + 0,0262x^2 - 1,1455x + 17,09$ ($R^2 = 0,9003$).

CONSIDERAÇÕES GERAIS

- Plantas infectadas após os 45 DAT são menos afetadas pela infecção de ToSRV e ToCV.
- A aplicação de Piraclostrobina+Metiram ao longo do ciclo da cultura mostrou-se de forma benéfica aos experimentos, uma vez melhorou as características de produção e qualidade dos frutos em ambos os experimentos.
- O uso de Piraclostrobina + Metiram (3 g. l^{-1}) + Boscalida ($0,3 \text{ g. l}^{-1}$) na semeadura, influenciou positivamente as plantas de tomate quando comparados aos que não receberam o pré-tratamento.
- A replicação viral é afetada com a aplicação do Piraclostrobina + Metiram (Cabrio Top) principalmente quando as plantas recebem o pré-tratamento na semeadura

APÊNDICES

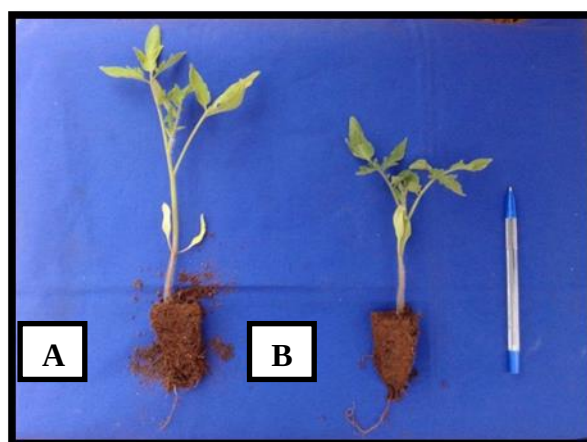
APÊNDICE A

Figura 1. Mudanças de tomateiro cv. Mariana. A) Mudanças tratadas com Piraclostrobina+Metiram (3 g. l^{-1}) + Boscalida ($0,3 \text{ g. l}^{-1}$) na semeadura e utilizadas no experimento 1. B) Mudanças não tratadas na semeadura e utilizadas no experimento 2.

APÊNDICE B

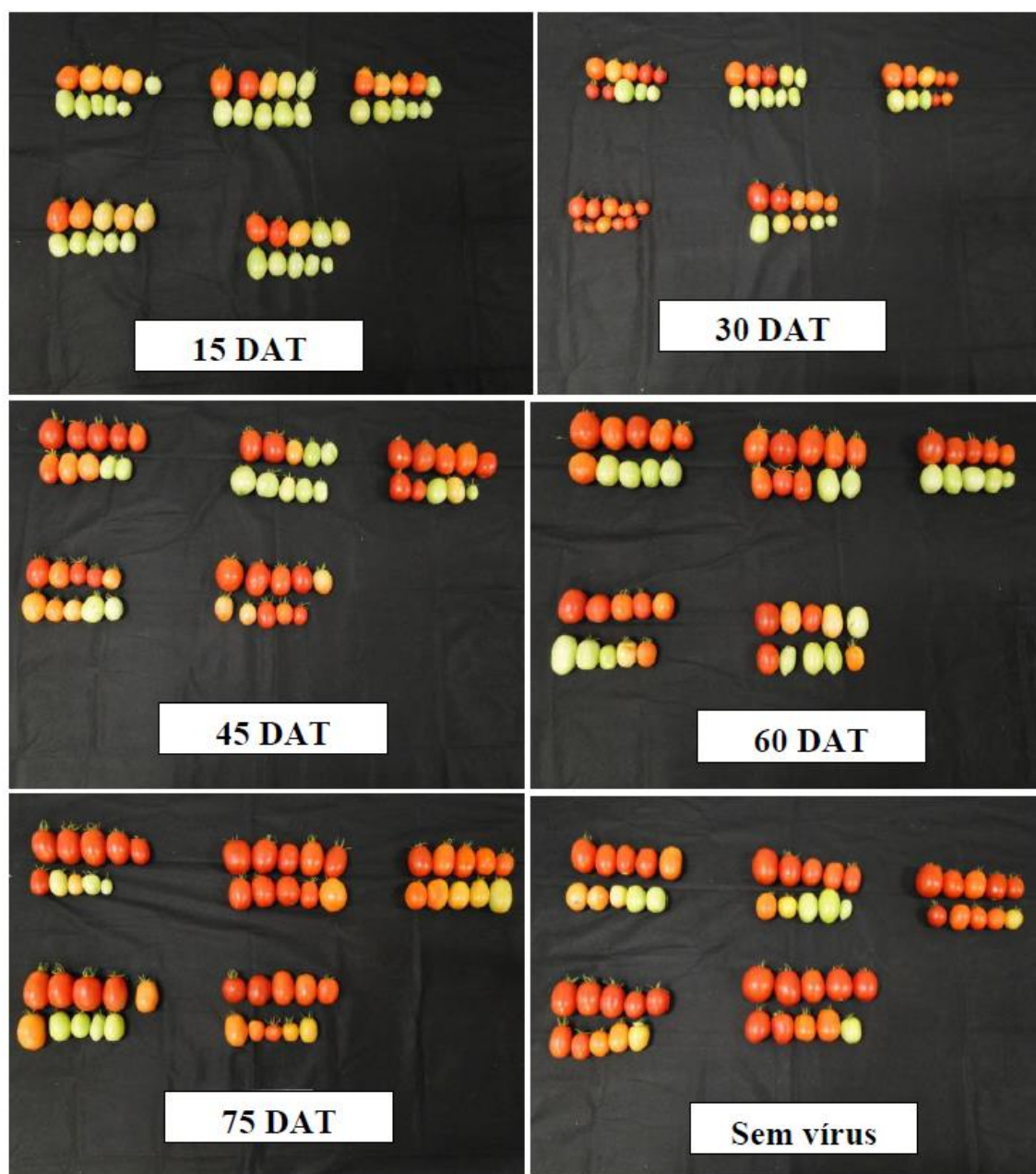


Figura 2. Produção de frutos de tomate cv “Mariana” com pré-tratamento na semeadura, com aplicação de P+M (4 g. l⁻¹) ao longo do ciclo da cultura e inoculadas com ToSRV e ToCV nas diferentes fases fenológicas 15, 30, 45, 60, 75 DAT e SV (sem vírus).

APÊNDICE C

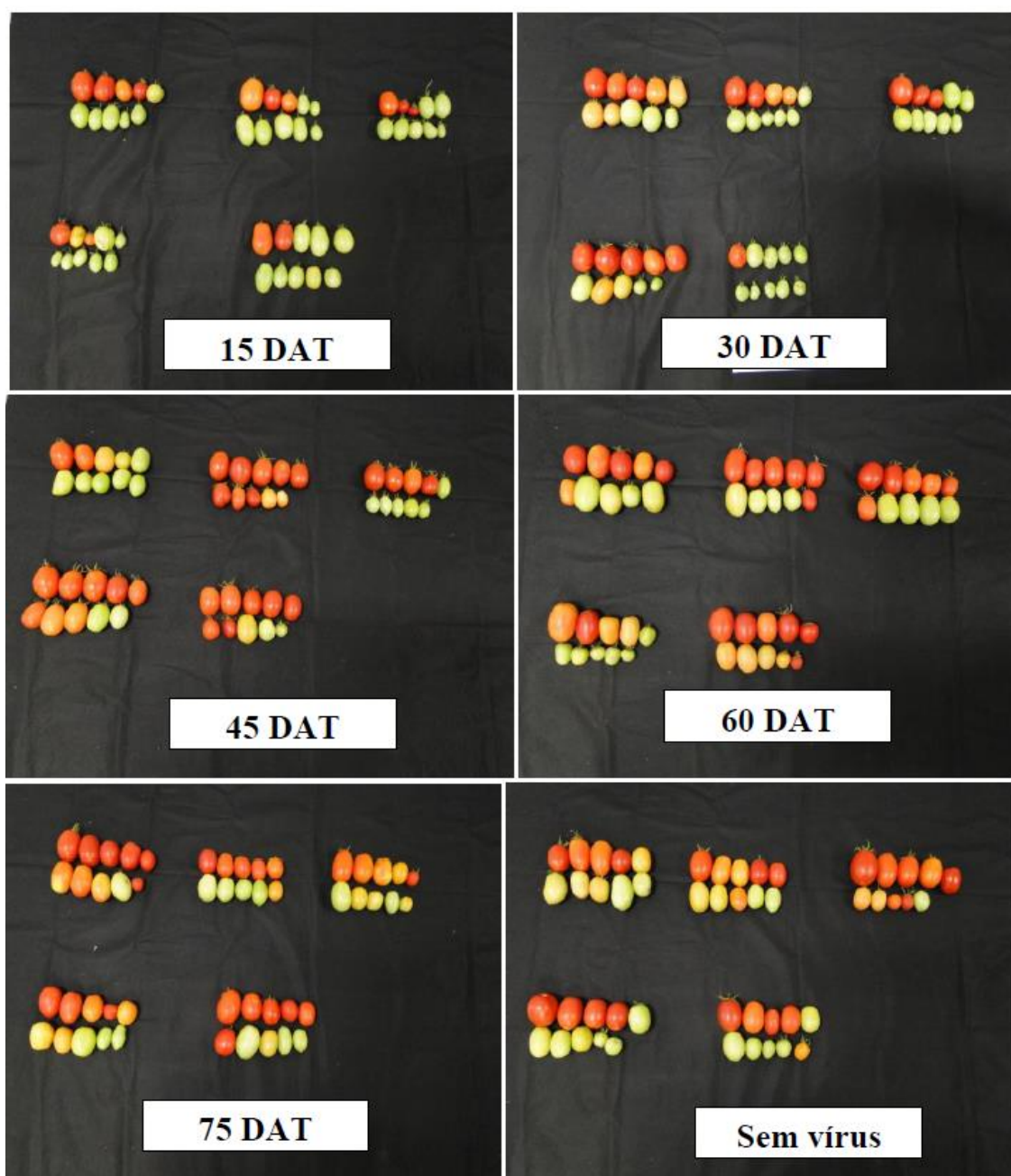


Figura 3. Produção de frutos de tomate cv “Mariana” com pré-tratamento na semeadura, sem aplicação de P+M (4 g. l^{-1}) ao longo do ciclo da cultura e inoculadas com ToSRV e ToCV nas diferentes fases fenológicas 15, 30, 45, 60, 75 DAT e SV (sem vírus).

APÊNDICE D

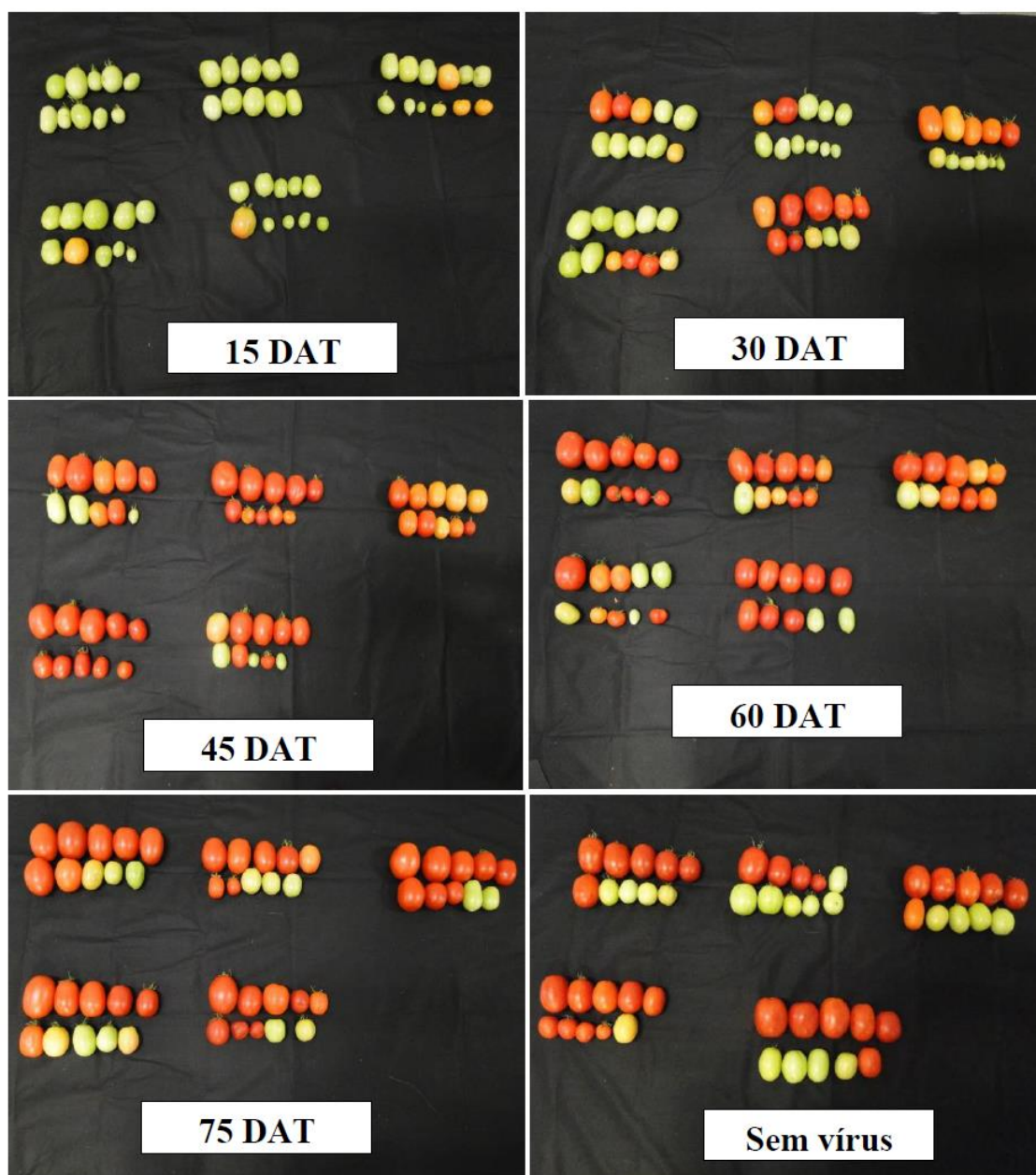


Figura 4. Produção de frutos de tomate cv “Mariana” sem pré-tratamento na semeadura, com aplicação de P+M (4 g. l⁻¹) ao longo do ciclo da cultura e inoculadas com ToSRV e ToCV nas diferentes fases fenológicas 15, 30, 45, 60, 75 DAT e Sem vírus.

APÊNDICE E

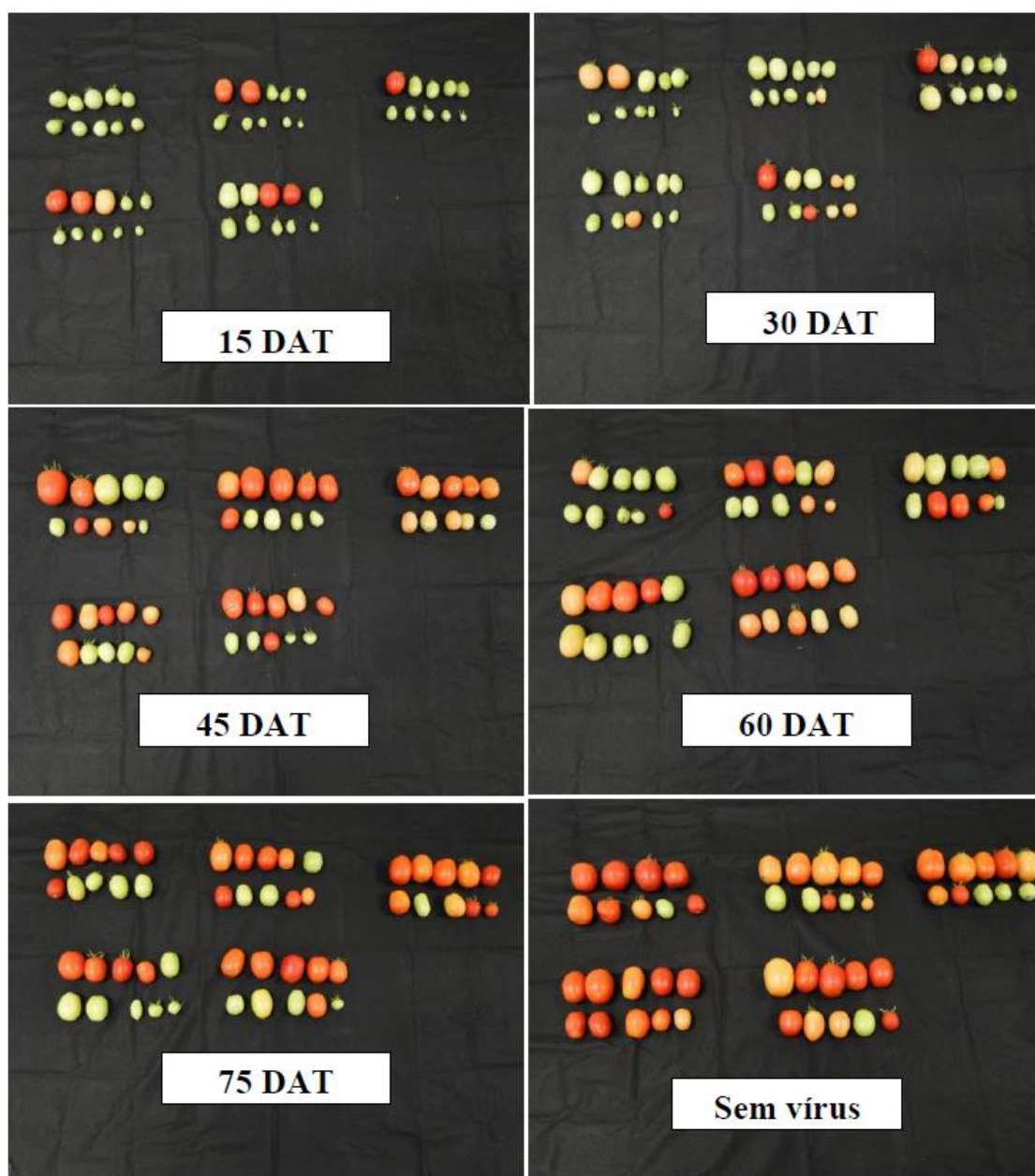


Figura 5. Produção de frutos de tomate cv “Mariana” sem pré-tratamento na sementeira, e sem aplicação de P+M (4 g. l^{-1}) ao longo do ciclo da cultura e inoculadas com ToSRV e ToCV nas diferentes fases fenológicas 15, 30, 45, 60, 75 DAT e Sem vírus.