



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

Yanca Francine Martins Ferreira

***Topilevirus solani: construção de clone infeccioso, resposta de  
cultivares de tomateiro e análise de potenciais vetores***

Brasília, DF

Yanca Francine Martins Ferreira

***Topilevirus solani: construção de clone infeccioso, resposta de cultivares de tomateiro e análise de potenciais vetores***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.  
Orientadora: Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata

Brasília, DF

## ***Topilevirus solani*: construção de clone infeccioso, resposta de cultivares de tomateiro e análise de potenciais vetores**

### **Resumo**

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma das hortaliças mais cultivadas no mundo, com grande relevância econômica. No entanto, a cultura é frequentemente afetada por doenças virais que comprometem seu desenvolvimento e produtividade. Recentemente foram observadas em lavouras de tomate do Programa de Assentamento Dirigido do Distrito Federal, plantas com sintomas de forte enrolamento foliar, clorose internerval e nanismo. A realização de testes de detecção com análises moleculares das amostras sintomáticas revelou o potencial agente causal como tomato apical leaf curl virus (ToALCV), membro da espécie *Topilevirus solani* pertencente ao gênero *Topilevirus*, da família *Geminiviridae*, que já foi detectado no Distrito Federal e relatado pela primeira vez na Argentina. Considerando os fortes sintomas como uma ameaça ao cultivo do tomateiro e a falta de informações sobre sua biologia e vetores, este trabalho teve como objetivo investigar aspectos da interação entre o ToALCV, seus hospedeiros e possíveis vetores. Para isso, foi construído um clone infeccioso do vírus, inserido em vetor binário. Esse clone demonstrou ser funcional, permitindo a reprodução dos sintomas observados em campo e o cumprimento dos postulados de Koch. O clone representa o isolado de ToALCV obtido diretamente das lavouras infectadas. Esse clone foi utilizado em inoculações mediadas por *Agrobacterium tumefaciens* em cultivares híbridas e de polinização aberta comerciais de tomateiro, com o objetivo de avaliar sua suscetibilidade à infecção. Todos os materiais testados, Arezzo, Atari, Candieiro, Compact, Dominador, Gaúcho, Lampião, Matinella, Mascot, Nivus, Parma, Santa Clara, Santa Cruz, BRS Sena e Tyson, foram suscetíveis à infecção por ToALCV, incluindo os com resistência moderada a begomovírus, embora em graus variados de suscetibilidade conforme a cultivar. Adicionalmente, foram realizados testes de transmissão mecânica e experimentos em condições laboratoriais para investigar potenciais insetos vetores. A mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e a cigarrinha (*Agallia albidula*) não se mostraram vetores do ToALCV e o vírus também não foi transmitido mecanicamente para plantas sadias de tomateiro. Os resultados obtidos contribuem para o entendimento da doença causada por ToALCV, mas reforçam a necessidade

de continuidade nos trabalhos de caracterização do vírus, seus mecanismos de transmissão e manejo.

# ***Topilevirus solani*: construction of an infectious clone, response of tomato cultivars, and analysis of potential vectors.**

## **Abstract**

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most widely cultivated vegetables worldwide and holds great economic importance. However, this crop is frequently affected by viral diseases that affect its development and yield. Recently, tomato plants showing severe symptoms such as strong leaf curling, interveinal chlorosis, and stunting were observed in fields from the Programa de Assentamento Dirigido in the Federal District of Brazil. Molecular detection tests performed on symptomatic samples revealed the likely causal agent to be tomato apical leaf curl virus (ToALCV), a member of the species *Topilevirus solani*, genus *Topilevirus*, family *Geminiviridae*. This virus has previously been detected in the Federal District and was first reported in Argentina. Considering the severity of the symptoms and the lack of information regarding the virus biology and transmission, this study aimed to investigate aspects of the interaction between ToALCV, its hosts, and potential vectors. To this end, an infectious clone of the virus was constructed and inserted into a binary vector. The clone was shown to be functional, reproducing the symptoms observed in the field and fulfilling Koch's postulates. This clone represents the ToALCV isolate obtained directly from infected tomato fields. The clone was used for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated inoculations in commercial hybrid and open-pollinated tomato cultivars to assess their susceptibility to infection. All tested hybrids and open-pollinated cultivars, Arezzo, Atari, Candieiro, Compack, Dominador, Gaúcho, Lampião, Matinella, Mascot, Nivus, Parma, Santa Clara, Santa Cruz, BRS Sena, and Tyson, were susceptible to ToALCV infection, including those with moderate resistance to begomoviruses, although susceptibility levels varied among cultivars. Additionally, mechanical transmission tests and laboratory experiments were conducted to identify potential insect vectors. The whitefly (*Bemisia tabaci*) and the leafhopper (*Agallia albidula*) were not able to transmit ToALCV, and the virus was also not mechanically transmitted to healthy tomato plants. The results contribute to a better understanding of the disease caused by ToALCV and highlight the need for further studies on the virus characterization, transmission mechanisms, and management strategies.



## INTRODUÇÃO

O tomate é uma das hortaliças mais amplamente cultivadas no mundo, com capacidade de adaptação a diferentes regiões geográficas (CONAB, 2019). Em 2023, o Brasil figurava entre os dez maiores produtores mundiais de tomate para processamento industrial (WPTC, 2024). O estado de Goiás lidera a produção de tomate, sendo responsável por uma grande parcela do volume cultivado no país. Essa produção é predominantemente direcionada ao setor industrial (IBGE, 2022), mas o cultivo de tomateiro em larga escala e em amplas áreas pode favorecer a disseminação e emergência de doenças (Hanssen et al., 2010).

Dentre os agentes etiológicos, as viroses têm se mostrado como um dos principais desafios da produção do tomate, devido a sua rápida disseminação dos vírus e a dificuldade no controle dos insetos vetores (Lima e Freitas, 2015). Entre as viroses que afetam o tomateiro, as geminiviroses estão entre as doenças virais mais destrutivas que afetam a agricultura brasileira, estando presentes de forma recorrente nas principais regiões produtoras do Brasil (Inoue-Nagata et al., 2016). As perdas de produtividade em culturas suscetíveis podem variar de 30% a 70%, além de casos de perda total da lavoura, sendo comuns em situações de alta pressão de inóculo e populações elevadas do vetor (Beam e Ascencio-Ibañez, 2020).

A interação entre geminivírus e as plantas hospedeiras é marcada por um processo dinâmico de adaptação mútua (Ramesh et al., 2017; Zhang et al., 2023), sendo que as plantas desenvolveram sistemas de defesa complexos capazes de reconhecer e limitar a infecção viral, enquanto os vírus evoluíram as estratégias para contornar ou inibir essas respostas de defesa (Ragunathan et al., 2023). Diversas estratégias têm sido adotadas para o manejo de geminiviroses, como o controle químico dos vetores com uso de inseticidas, a eliminação de plantas infectadas (roguing), a retirada de plantas daninhas e restos culturais, além da implementação de um período de vazio sanitário. Embora essas medidas possam contribuir para a redução da disseminação viral, o uso das cultivares resistentes é reconhecido como uma abordagem mais eficaz (Boiteux et al. 2012).

Seis genes de resistência são conhecidos na cultura do tomateiro, nomeados de *Ty-1* a *Ty-6* (Prabhandakavi et al. 2020), além do *tcm-1* (Giordano et al. 2005) e *tgr-1* (Bian et al. 2007), sendo que alguns desses genes são usados em programas de melhoramento. O *Ty-1* tem desempenhado um papel importante no melhoramento genético de tomate, conferindo resistência em diferentes espécies de begomovírus

(Voorburg et al., 2020). *Ty-1* e *Ty-3* são genes alélicos (Verlaan et al. 2013). A resistência conferida pelo gene *Ty-1* é caracterizada como do tipo tolerância (Cooper & Jones 1983), as plantas podem apresentar acúmulo viral, mas em menor quantidade e, com isso, os sintomas são reduzidos em plantas afetadas por begomoviroses (Boiteux et al. 2007). É sugerido que o gene *Ty-1* esteja presente na maioria dos materiais comerciais atualmente disponíveis com resistência a begomovírus, conferindo um bom nível de resistência frente à diversidade de espécies virais, reduzindo seus sintomas (Fu et al., 2021).

Estudos recentes apontam que o *Ty-1* pode atuar como um gene de resistência de amplo espectro, com potencial de proteção para outros membros da família *Geminiviridae*, como o curtovírus beet curly top virus (Voorburg et al., 2020).

Nesse cenário, a preocupação com doenças causadas por fitoviroses se intensifica, especialmente diante do surgimento de novos vírus que podem representar riscos para a produção. Um geminivírus emergente que tem chamado a atenção é o tomato apical leaf curl virus (ToALCV), que foi relatado pela primeira vez na Argentina em tomateiros causando sintomas como amarelecimento, enrolamento e redução da área foliar (Vaghi Medina et al. 2018). Outros dois isolados do mesmo vírus foram detectados no Brasil em 2003 e 2016 com sintomas de mosaico, enrolamento foliar e necrose (Souza et al., 2020; Batista et al., 2019), o que indica que ele está presente no país há muito tempo.

Embora pertença à família *Geminiviridae*, o tomato apical leaf curl virus (ToALCV) não é classificado no gênero *Begomovirus*, mas no gênero *Topilevirus* que atualmente possui dois membros descritos: ToALCV e tomato geminivirus 1 (Fontenele et al., 2017; Vaghi Medina et al., 2018). Até o momento, o vetor de ToALCV permanece desconhecido, embora Medina et al. (2018) tenham sugerido o membracídeo *Micruitalis malleifera* como possível agente de transmissão. O ToALCV é um vírus de DNA circular de fita simples (ssDNA), com genoma monopartido de aproximadamente 2,8 kb (ICTV, 2021). Por outro lado, o gênero *Begomovirus* é o maior dentro da família *Geminiviridae*, com mais de 400 espécies descritas. Os begomovírus possuem genomas monopartidos ou bipartidos de ssDNA e são transmitidos por moscas-brancas do complexo de espécies *Bemisia tabaci* (Brown et al., 2015).

Apesar dos relatos anteriores, o ToALCV permanece pouco caracterizado biologicamente, com lacunas como a sua distribuição no país e vetores. A ocorrência

dos fortes sintomas nas plantas infectadas indica que esse vírus pode representar um risco à cultura do tomateiro. Diante disso, são necessários estudos que aprofundem o conhecimento sobre seus sintomas, mecanismos de infecção e potencial de disseminação, que possam contribuir para o manejo adequado.

## **Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho é investigar os aspectos biológicos e patogênicos do ToALCV, com ênfase na suscetibilidade em cultivares comerciais de tomateiro, capacidade de transmissão mecânica e a identificação de possíveis vetores envolvidos em sua disseminação no campo.

## **Objetivos específicos**

1. Reproduzir os sintomas observados em campo em plantas saudáveis por meio da inoculação de um clone infeccioso do vírus.
2. Investigar a capacidade de transmissão do vírus por insetos da ordem Hemiptera.
3. Avaliar a possibilidade de transmissão mecânica do vírus para plantas de tomateiro.
4. Analisar a suscetibilidade de cultivares de tomateiros comerciais à infecção pelo vírus.

## Material e métodos

### Obtenção da amostra

Durante uma visita de campo ao Programa de Assentamento Dirigido do Distrito Federal (PAD-DF), foram observadas plantas de tomateiro estakeado da cultivar Predador apresentando severos sintomas de nanismo, enrolamento foliar e clorose internerval, sugerindo uma possível infecção viral (Figura 1). Amostras de plantas sintomáticas foram coletadas para diagnóstico.



**Figura 1.** Comparação entre tomateiro assintomático (esquerda) e tomateiro com sintomas de nanismo (direita), enrolamento foliar, clorose internerval, coletado no PAD-DF.

Além das amostras do PAD-DF, foram coletadas amostras foliares de tomateiro em diferentes regiões do Distrito Federal e em algumas regiões do estado de Goiás. O objetivo dessa análise foi investigar a presença do ToALCV em diferentes regiões do Distrito Federal e de Goiás, possibilitando avaliar sua ocorrência sob distintas condições de cultivo e em diferentes cultivares de tomateiro.

## **Extração de DNA e teste diagnóstico por RCA**

A extração de DNA foi realizada utilizando o método CTAB, conforme descrito por Doyle e Doyle (1990). O DNA total extraído foi submetido à amplificação por círculo rolante (RCA), conforme protocolo descrito por Inoue-Nagata et al. (2004), utilizando a enzima phi29 DNA polymerase (New England Biolabs, Massachusetts, EUA) e primer randômico. A reação foi incubada por 24 horas a 30 °C para promover a amplificação das moléculas de DNA circular. O produto da RCA foi posteriormente digerido com a enzima de restrição Mspl (New England Biolabs) para análise do padrão dos fragmentos de DNA. Em seguida, o produto da digestão foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1%, preparado com tampão TBE 0,5x (Tris-borato EDTA), corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador.

## **Seleção de enzimas de restrição para clonagem**

Para a clonagem, o produto de RCA da amostra 10 foi selecionado e avaliado utilizando 14 enzimas de restrição: KpnI, Apal, Xhol, HinclI, Sall, HindIII, EcoRI, EcoRV, PstI, SmaI, BamHI, XbaI, SacII e SacI. Após a digestão, os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, preparado com tampão TBE 0,5x, corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador sob luz UV. A enzima PstI foi selecionada para o processo de clonagem por gerar um único fragmento quando o DNA foi digerido e uma digestão em maior volume foi realizada. A banda correspondente ao fragmento de interesse foi cuidadosamente cortada do gel com o auxílio de um bisturi, sob iluminação UV, e purificada com o kit Wizard SV (Promega Corporation, Wisconsin, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

O fragmento de DNA resultante da digestão foi ligado ao vetor pBlueScript SK+ (Agilent Technologies, Califórnia, EUA) linearizado e desfosforilado, usando a proporção de vetor e inserto de 1:3 com a enzima T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). A reação foi incubada por 24 horas a 14 °C. A amostra foi dialisada em membrana de nitrocelulose por 15 minutos com água. Após a remoção dos sais, essa ligação foi introduzida em células bacterianas da cepa DH10 $\beta$  de *Escherichia coli* por eletroporação, conforme descrito por Dower et al. (1988). Para a seleção de colônias recombinantes, o meio sólido LB foi suplementado com antibiótico, IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósideo) e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranósideo), que permitem a identificação de colônias

contendo o inserto por meio da diferenciação entre colônias brancas e azuis. Após 24 horas de incubação a 28 °C, foram selecionadas seis colônias brancas, as quais foram cultivadas em meio líquido LB contendo antibiótico e submetidas à extração plasmidial com o kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, EUA), conforme as instruções do fabricante.

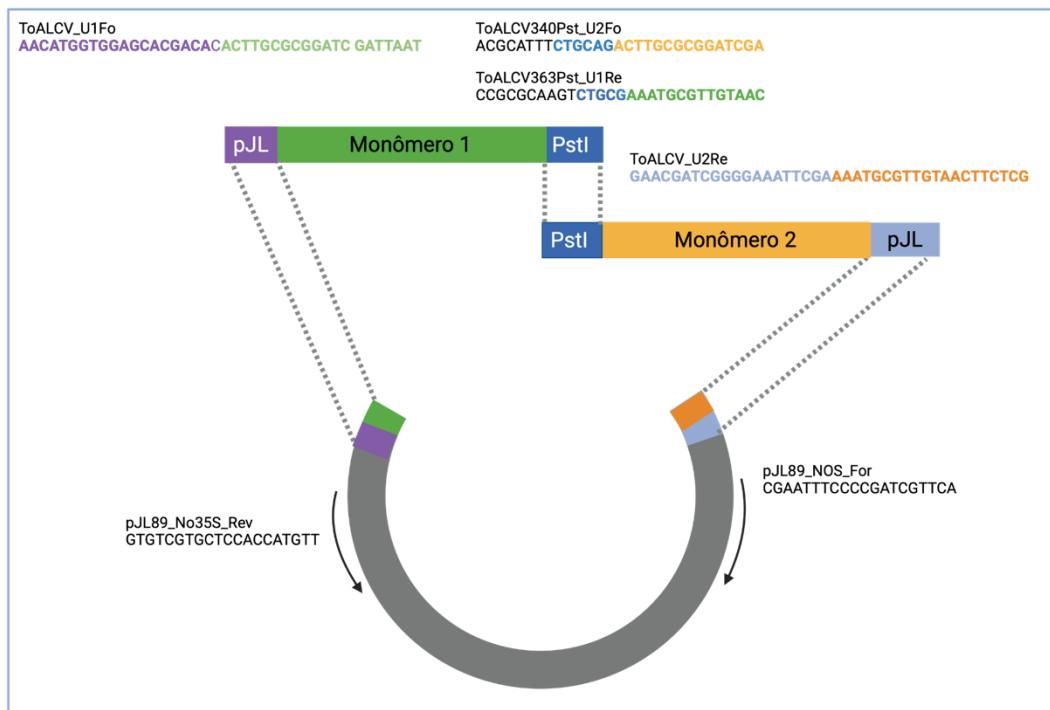
## **Sequenciamento**

O DNA plasmidial contendo o genoma viral foi purificado utilizando o kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, EUA), conforme as instruções do fabricante, e posteriormente sequenciado pela empresa Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul), utilizando primers do vetor e do inserto. As sequências obtidas foram montadas e editadas utilizando o software Geneious (versão 8.1.9, BIOMATTERS LTD.) e analisadas com a ferramenta BLASTn, disponibilizada pelo NCBI (Altschul et al., 1990).

## **Primers para clonagem utilizando Gibson Assembly**

A partir da identificação do vírus, primers específicos foram desenhados com base na sequência do isolado 10, visando a construção de um clone infeccioso por Gibson Assembly (Ferro et al., 2019) contendo duas cópias do genoma completo do ToALCV (Figura 2). Os primers foram desenhados para amplificar duas cópias do genoma viral e incluir extremidades de 21 (ToALCV\_U1Fo) ou 20 (ToALCV\_U2Re) bases complementares ao vetor binário pJL89 (Blawid e Nagata, 2015), a partir de amplificação por PCR. A clonagem foi realizada utilizando o Gibson Assembly Cloning Master Mix (New England BioLabs, Massachusetts, EUA), seguindo as instruções do fabricante e segundo Ferro et al. (2019). Para a construção dos fragmentos utilizados na clonagem, foi realizada uma reação de PCR utilizando a enzima Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Massachusetts, EUA). Três regiões distintas foram amplificadas, o primeiro fragmento foi gerado com os primers ToALCV\_U1Fo, contendo sequência complementar ao vetor pJL, e ToALCV363Pst\_U1Re, que inclui um sítio de restrição da enzima PstI. O segundo fragmento foi amplificado com os primers ToALCV340Pst\_U2Fo, contendo um sítio de restrição PstI compatível com o U1R, e U2R, complementar ao vetor pJL. O terceiro fragmento corresponde ao vetor pJL89, amplificado por PCR com primers desenhados a partir da sequência do plasmídeo. Todos os produtos de PCR gerados, incluindo o vetor pJL amplificado,

foram purificados com o objetivo de serem usados nas etapas subsequentes de montagem do clone.



**Figura 2.** Representação esquemática da construção do clone infeccioso do ToALCV utilizando a técnica de Gibson Assembly. A montagem resultou em um dímero do genoma viral, permitindo sua posterior clonagem e inoculação.

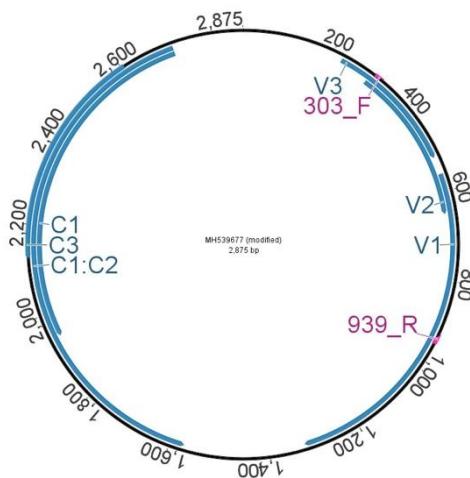
Para a montagem da reação, foram utilizados 1  $\mu$ L do vetor linearizado (179,8 ng/ $\mu$ L), 3  $\mu$ L do fragmento U1 (68,8 ng/ $\mu$ L), 3,5  $\mu$ L do fragmento U2 (59,2 ng/ $\mu$ L) que foram amplificados por PCR, e 0,5  $\mu$ L de água ultrapura, totalizando 8  $\mu$ L. A solução foi incubada a 37 °C por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 10  $\mu$ L do Master Mix, seguida de incubação a 50 °C por mais 1 hora. Após esse processo, a reação foi submetida à diálise por 25 minutos para remoção de sais e preparo para a transformação.

Cinco microlitros da reação foram transformados em células competentes de *Escherichia coli* DH10 $\beta$  por choque elétrico, conforme protocolo descrito por Morais et al. (2024). A transformação foi plaqueada em duas placas contendo meio Luria Bertani (LB) sólido suplementado com canamicina (50  $\mu$ g/mL) e incubada a 28 °C por aproximadamente 24 h. Colônias resultantes foram cultivadas em meio LB líquido com canamicina (1  $\mu$ L/mL), em agitação a 28 °C por 24 h. Uma colônia foi selecionada e inoculada em meio LB líquido para extração plasmidial utilizando o kit PureLink

Quick Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific, EUA). O DNA obtido foi amplificado por RCA, seguido de digestão com a enzima Mspl. Duas amostras com perfil de digestão compatível com ToALCV foram selecionadas para sequenciamento e a sequência determinada como descrito anteriormente. A sequência resultante foi comparada à sequência do monômero construído em pBluescript utilizando a ferramenta Blast2 (Altschul et al., 1990).

### Primers para detecção

Para a detecção específica do vírus, foi realizada uma reação de PCR utilizando os primers ToALCV\_303Fo (GTGTGGCAGAAGGTCGTGTA) e ToALCV\_939Re (TCAACAGCAGCAGAACCTGT), desenhados para amplificar uma região de aproximadamente 636 pb do genoma do ToALCV, correspondente às ORFs V3, V2 e parte da V1 conforme a figura 3. As reações foram realizadas com desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos, com uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.



**Figura 3.** Organização genômica do ToALCV e localização dos primers utilizados para detecção. Os primers ToALCV\_303Fo e ToALCV\_939Re foram desenhados para amplificar uma região que compreende as ORFs V3, V2 e parte da V1, conforme indicado na ilustração.

### Agroinjeção

O clone infeccioso gerado por Gibson Assembly foi transformado em células

de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 por choque térmico (Dower et al. 1988). A suspensão bacteriana foi cultivada em placa de Petri contendo LB meio sólido, suplementado com os antibióticos rifampicina e canamicina, e incubada a 28 °C por 48 horas. Após esse período, uma única colônia foi selecionada e inoculada em meio líquido LB com os mesmos antibióticos, sendo incubada sob agitação a 28 °C por mais 48 horas. A cultura bacteriana foi centrifugada a 4.000 g por 5 minutos, e o pellet formado foi ressuspensionado em tampão de inoculação MES (10 mM MES, 10 mM MgCl<sub>2</sub> e 150 µM de acetoseringona, pH 5,6). A densidade óptica da suspensão bacteriana utilizada para inoculação foi de OD<sub>600</sub> = 1,0, medida em espectrofotômetro. Para a agroinjeção em plantas sadias de tomate da cultivar Santa Clara, com duas folhas desenvolvidas, foi utilizada uma seringa de 1 mL para realizar microferimentos no tecido foliar e no pecíolo, onde foi depositada uma gota da suspensão bacteriana. Cada planta recebeu 100 µL da solução.

### **Experimentos de inoculação em cultivares híbridas comerciais**

Para avaliar a suscetibilidade de diferentes cultivares de tomateiro ao clone infeccioso 146 do ToALCV, foram selecionadas cultivares com resistência intermediária à infecção por begomovírus e suscetíveis disponíveis no mercado. As cultivares testadas foram: Arezzo, Atari, Candieiro, Compact, Dominador, Gaúcho, Lampião, Matinella, Mascot, Nivus, Parma, Santa Clara, Santa Cruz, BRS Sena e Tyson. As plantas foram mantidas em casa de vegetação não climatizada, localizada na Embrapa Hortaliças, em Brasília, Distrito Federal. Para cada cultivar, foram utilizadas 20 plantas, sendo que 18 foram submetidas à inoculação e duas mantidas como controle negativo (não inoculadas). A inoculação foi realizada quando as plantas tinham duas folhas verdadeiras desenvolvidas, utilizando uma seringa de 1 mL para injeção de 100µL inóculo nas folhas mais novas e no pecíolo de cada planta, que receberam duas inoculações, com quatro dias de diferença (conforme descrito anteriormente).

Para a detecção do ToALCV, a extração de DNA foi realizada utilizando o método CTAB, conforme descrito por Doyle e Doyle (1990), seguida por PCR convencional usando os primers para detecção ToALCV\_303Fo e ToALCV\_939Re. Os amplicons foram visualizados em eletroforese conforme descrito anteriormente. Com base nos sintomas e análises moleculares observados no primeiro ensaio, quatro cultivares (Compact, Matinella, Santa Clara e BRS Sena) foram selecionadas

para um segundo experimento. Nesta etapa, as cultivares foram novamente inoculadas com o ToALCV, utilizando o mesmo método anterior, porém com apenas uma inoculação. Foram utilizadas 20 plantas por cultivar, sendo 18 inoculadas e 2 mantidas como controle, visando confirmar a resposta observada anteriormente.

### **Inoculação mecânica**

Para a inoculação mecânica do ToALCV, foi utilizada como fonte de inóculo uma planta da cultivar Santa Clara previamente infectada com o vírus. O tecido foliar infectado foi coletado e macerado em tampão fosfato a 10mM (pH 7,0), utilizando um cadrinho autoclavado e pistilo, até a obtenção do extrato foliar. As plantas sadias, com duas folhas verdadeiras, foram polvilhadas com carborundum para fazer microferimentos na superfície foliar, facilitando a entrada do vírus. Em seguida, o extrato vegetal foi aplicado diretamente sobre as folhas. Foram utilizadas 75 plantas para a inoculação com ToALCV. Além disso, 15 plantas foram inoculadas com tomato mosaic virus (ToMV), como controle positivo da eficiência da inoculação mecânica. Após 14 dias da inoculação, foi realizada a extração de DNA total das plantas e a detecção de ToALCV por PCR e dot-ELISA para a confirmação das amostras que foram inoculadas com ToMV.

### **Ensaio de transmissão com cigarrinha (*Agallia albidula*)**

Para avaliar o potencial de transmissão do ToALCV pela cigarrinha *Agallia albidula*, foram realizados ensaios utilizando insetos avirulíferos mantidos em criatórios em plantas de milho, beterraba e maria pretinha. Os testes foram conduzidos em diferentes formatos, com insetos adultos e ninfas. No primeiro experimento, 30 cigarrinhas, distribuídas em 15 “clipcages” com dois insetos cada, foram confinadas em plantas de tomateiro infectadas com ToALCV. Os insetos permaneceram se alimentando nessas plantas por 24 horas (período de acesso à aquisição, PAA), após esse período foram transferidos para plantas sadias, onde permaneceram por mais 24 horas (período de acesso à inoculação, PAI). No final desse período, as cigarrinhas foram coletadas e armazenadas a -80 °C para posterior extração de DNA.

No segundo ensaio, o procedimento foi repetido com maior número de insetos por planta. Foram utilizadas 5 cigarrinhas por “clipcage”, totalizando 70 cigarrinhas. Com o período de aquisição em plantas infectadas estendido para 48 horas, seguido

de 48 horas de inoculação em plantas sadias. Após o experimento, os insetos foram igualmente coletados e armazenados para extração de DNA. Na terceira repetição, foram utilizadas 10 cigarrinhas, distribuídas em “clipcages” com dois insetos cada, mantendo os períodos de PAA e PAI em 48 horas. Ao final da repetição, as cigarrinhas foram coletadas e armazenadas para extração de DNA.

Uma segunda repetição desse experimento foi conduzida utilizando 18 cigarrinhas, também mantidas em “clipcages” com dois insetos cada, com o mesmo período de PAA e PAI. Após essas avaliações, foi realizado um ensaio adicional com 17 cigarrinhas em diferentes estádios de desenvolvimento (do 1º ao 5º ínstar) para verificar a capacidade de transmissão do ToALCV por ninfas. Os insetos foram colocados em “clipcages” e mantidos por 48 horas em plantas infectadas (PAA) e em seguida por 4 dias em plantas sadias (PAI). Após o PAI, as cigarrinhas foram coletadas para extração de DNA. Como controle negativo, 6 cigarrinhas avirulíferas foram mantidas em plantas não infectadas por 48h e transferidas para plantas sadias por 48h. A extração de DNA dos insetos foi realizada pelo método CTAB. As plantas de todos os ensaios foram coletadas após 14 dias para extração de DNA e análise. O DNA dos insetos e das plantas foram submetidos a PCR utilizando primers específicos para detecção do ToALCV.

#### **Ensaio de transmissão com mosca-branca (*Bemisia tabaci*)**

Para avaliar a *Bemisia tabaci* MEAM1 (biótipo B), como possível vetor do ToALCV, foi realizado um ensaio de transmissão com moscas-brancas. Três folhas de couve infestadas com moscas-brancas foram removidas do criatório, onde as moscas-brancas são mantidas em plantas de couve livres de vírus, e introduzidas em gaiolas medindo 48 cm por 57,5 cm com plantas de tomateiro infectadas com o ToALCV. As folhas foram posicionadas de uma forma que os insetos fossem espontaneamente para as plantas de tomateiro, uma vez que as folhas de couve secam e se tornam menos atrativas como fonte de alimento. As moscas permaneceram nas gaiolas por 48 horas, período de aquisição do vírus.

Após esse período, as gaiolas foram transferidas para uma câmara fria por cinco minutos, com o objetivo de reduzir a movimentação dos insetos e facilitar a manipulação. Em seguida, folhas de tomateiro infestadas com as moscas-brancas foram cuidadosamente destacadas com o auxílio de uma tesoura e transferidas para

novas gaiolas contendo plantas de tomate sadias, onde permaneceram por mais 48 horas, correspondendo ao período de inoculação.

Ao final do experimento de transmissão, as moscas-brancas foram coletadas com auxílio de um sugador e armazenadas em tubos de microcentrífuga de 1,5mL (Axygen, Nova Iorque, Estados Unidos), contendo ~60 indivíduos por tubo. As plantas foram mantidas nas gaiolas para avaliação da possível transmissão do ToALCV, feita 14 dias após a exposição aos insetos com a extração de DNA seguida de PCR. O experimento foi repetido duas vezes, seguindo exatamente as mesmas condições descritas, com o objetivo de validar os resultados obtidos. Além disso, o experimento teve um controle positivo, onde as moscas-brancas se alimentaram de plantas infectadas com o vírus ToSRV pelo mesmo período e nas mesmas condições. Esse controle foi utilizado para garantir que caso o inseto não transmita o ToALCV que não fosse relacionado ao método, mas a ausência da capacidade de transmissão do vetor. Após a fase de transmissão, moscas-brancas foram coletadas para extração de DNA e armazenadas em tubos de microcentrífuga de 1,5mL contendo ~60 indivíduos por tubo. Após 14 dias da exposição às moscas-brancas, as plantas foram coletadas para verificação do vírus.

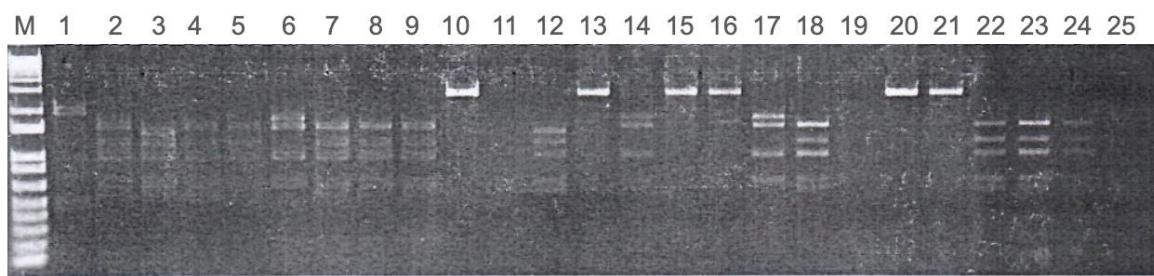
### **Insetos coletados em campo**

Além dos ensaios realizados em condições controladas, foi conduzida uma análise de insetos coletados em campo no Distrito Federal e em áreas do entorno. A coleta foi realizada em cultivos de tomateiro e na vegetação ao redor das lavouras, utilizando uma rede entomológica. Após a coleta, os insetos foram analisados e aqueles pertencentes à ordem Hemiptera foram separados para posterior extração de DNA e análise para a detecção do ToALCV. Entre os hemípteros coletados, foi observada uma diversidade de cigarrinhas (cicadellidae), das quais muitas não puderam ser identificadas com precisão até o nível de espécie. Também foram encontrados outros poucos hemípteros de morfologia não caracterizada, que também foram incluídos nas análises.

## Resultados

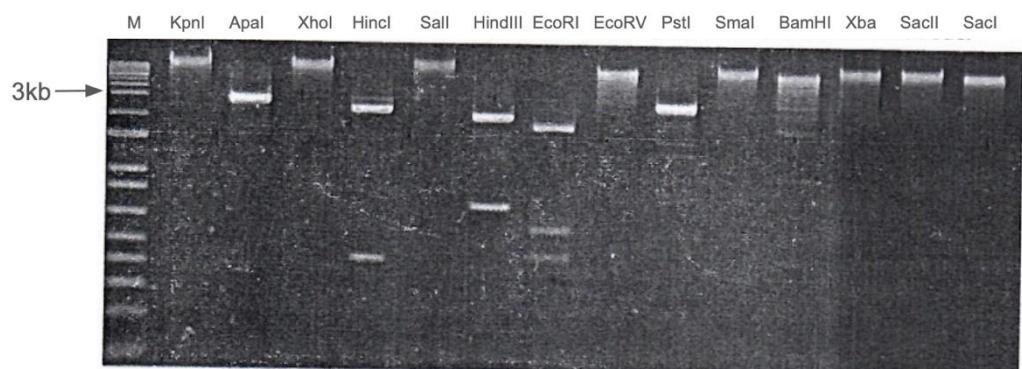
### Detecção e identificação

Com o objetivo de investigar a possível presença de geminivírus em plantas de tomateiro com sintomas típicos de infecção viral, como nanismo, enrolamento foliar e clorose internerval, foram analisadas amostras foliares coletadas no Projeto de Assentamento Dirigido do Distrito Federal (PAD-DF). As 25 amostras de DNA foliares foram submetidas à amplificação por círculo rolante, seguida por digestão com a enzima de restrição Mspl (RCA-RFLP), com o objetivo de detectar e identificar vírus com genoma de DNA circular, característicos da família *Geminiviridae*. Dentre elas, 14 apresentaram perfil de digestão compatível com ToSRV (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 17, 18, 22, 23 e 24) e 6 amostras apresentaram uma banda de aproximadamente 3,0 kbp semelhante ao perfil descrito por Souza et al. (2020) para ToALCV (10, 13, 15, 16, 20 e 21). A amostra 1 apresentou perfil de digestão compatível com Brazilian curly top virus (BraCTV), enquanto as amostras 11, 19 e 25 não apresentaram bandas visíveis após a digestão, consideradas negativas (Figura 4). Não foram observados indícios de infecção mista, já que os perfis obtidos apresentaram padrões específicos e não sobrepostos. Os sintomas característicos de virose, como nanismo, enrolamento foliar e clorose internerval, estavam presentes em todas as plantas analisadas, reforçando a correlação entre os sintomas observados em campo e os resultados obtidos.



Com base no perfil de digestão, a amostra 10 foi selecionada para confirmação da identidade e caracterização. ToALCV é um vírus ainda pouco

estudado, principalmente no Brasil. Assim, procedeu-se ao processo de clonagem, com o objetivo de isolar o genoma viral e avaliar a capacidade do isolado de reproduzir os sintomas observados em campo, além de viabilizar análises biológicas complementares. Para isso, a amostra 10 foi submetida à digestão com 14 enzimas de restrição: KpnI, ApaI, XbaI, HinclI, Sall, HindIII, EcoRI, EcoRV, PstI, SmaI, BamHI, XbaI, SacII e SacI para selecionar aquela que digere em um ponto no genoma gerando monômeros para serem clonados. Os produtos da digestão foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 5). Dentre as enzimas testadas, apenas ApaI e PstI clivaram o DNA aparentemente em um único ponto e a enzima PstI escolhida para a clonagem do genoma viral.



**Figura 5.** Gel de agarose a 1% com produtos de digestão de DNA. A seta indica a banda de aproximadamente 3.000 pares de bases, correspondente à digestão com a enzima de restrição PstI. M: marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific).

Após a ligação do fragmento de DNA viral digerido com PstI ao vetor pBlueScript SK+ linearizado com a mesma enzima, a reação foi utilizada para transformação em *Escherichia coli* DH10B por eletroporação. O plaqueamento em meio contendo o antibiótico ampicilina, IPTG e X-gal permitiu a identificação das colônias recombinantes. Após o período de incubação, foram observadas colônias brancas e azuis. Seis colônias brancas foram selecionadas, indicando possível presença do inserto viral. O DNA plasmidial extraído dessas colônias foi analisado por digestão com a enzima de restrição utilizada na construção e avaliado em gel de agarose a 1%. A análise mostrou perfis que confirmavam a inserção do fragmento viral em algumas colônias. Com base nesse resultado, uma colônia, denominada

colônia 20, foi selecionada para as etapas subsequentes de caracterização e montagem do clone infeccioso.

### **Identificação do ToALCV a partir do sequenciamento**

A sequência do clone 20, obtida a partir da clonagem do isolado 10, foi submetida a análise de identidade utilizando a ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides). Os resultados mostram que a sequência apresenta 99,34% de identidade com o isolado tomato apical leaf curl virus BR:Brasilia:Tom18 (acesso MH539677), confirmando a identidade do vírus da amostra 10 como um isolado de ToALCV. Também foram observadas altas identidades com o isolado BR:G1 (96,56%, MT135209) do Distrito Federal e com isolados da Argentina, onde foi identificado pela primeira vez, AR:Yuto:Tom419:08 (95,90%, MG491195) e AR:Yuto:Tom420:08 (95,83%, MG491196).

A organização genômica do isolado é compatível com a descrita para membros do gênero *Topilevirus* e da família *Geminiviridae*, com três quadros de leitura abertos (ORFs) no sentido viral e três no sentido complementar (Figura 3). No sentido viral, a ORF V1 é responsável pela codificação da proteína do capsídeo, enquanto a ORF V2 pode estar relacionada à codificação de uma proteína de movimento. A ORF V3, assim como a C3, codifica proteínas cuja função ainda não é conhecida. No sentido complementar, as ORFs C1 e C2, com base na localização e similaridade com outros geminivírus, estão associadas à proteína associada à replicação (Rep), sendo que a Rep é traduzida a partir de um transcrito com splicing e a RepA a partir do transcrito que não é processado. A ORF C3 está inserida na C1. Além das ORFs, o genoma apresenta duas regiões intergênicas: uma região intergênica longa (IR) e uma região intergênica curta (SIR), associada à origem de replicação da fita complementar. Na região intergênica longa, existe uma estrutura do tipo grampo (stem-loop) que contém uma sequência conservada (5'-TAATATTAC-3'), que é características dos geminivírus e está associada à origem da replicação das fitas virais.

### **Ocorrência e distribuição**

Além da detecção de ToALCV em amostras coletadas no PAD-DF, a ocorrência do ToALCV foi confirmada em diferentes regiões do Brasil por meio de sequenciamento realizado por Roberta Rúbia, pesquisadora de pós-doutorado do

mesmo grupo de pesquisa. Com base no sequenciamento de produtos amplificados por RCA utilizando Nanopore, foram detectados reads compatíveis com ToALCV em amostras de tomate e pimentão de diferentes lugares do Brasil. Os resultados indicaram a presença do vírus em tomateiros de Campinas (SP) e de Taquara (DF) e também em pimentões coletados em Sinop (MT) e em Taquara (DF) (Roberta Rúbia Pinto Nogueira Lima, comunicação pessoal).

### **Produção de clone infeccioso de ToALCV**

A amplificação do fragmento viral utilizado como inserto foi realizada por PCR a partir do DNA total extraído do isolado 10. Produtos únicos foram obtidos por PCR, visualizados em gel de agarose na (Figura 6). Esses fragmentos foram clonados por Gibson Assembly, e após incubação por 24 horas após transformação, 20 colônias foram selecionadas e submetidas à PCR de colônia utilizando primers específicos para detecção do ToALCV. Seis dessas amostras testaram positivo e duas colônias que apresentaram amplificação positiva foram selecionadas para extração plasmidial e sequenciamento pelo método de Sanger, que confirmou 100% de identidade de ambas com a sequência previamente clonada em pBlueScript SK+. Um clone, denominado 146, foi selecionado e inoculado em 15 mL de meio líquido LB para extração do DNA plasmidial, posteriormente utilizado na transformação de *Agrobacterium tumefaciens*. A bactéria transformada foi inoculada em plantas por agroinjeção. Foram analisadas 13 amostras de plantas, incluindo quatro cultivares de tomate (Graziane, Matinella, Santa Clara e BRS Sena) e uma planta daninha (*Datura stramonium*). As plantas foram avaliadas por PCR 14 dias após a inoculação, e 12 amostras apresentaram amplificação positiva, confirmando infecção pelo ToALCV. A única exceção foi uma amostra de tomateiro da cultivar Matinella, que não apresentou amplificação. Além disso, as plantas infectadas, com exceção da planta daninha, apresentaram sintomas como enrolamento foliar do topo e clorose entre as nervuras após 30 dias de infecção. Esses resultados demonstraram que o clone de ToALCV foi infeccioso e capaz de induzir os sintomas observados no campo.



**Figura 6.** **A)** Produtos de PCR dos fragmentos utilizados para clonagem por Gibson Assembly visualizados em gel de agarose a 1%. As amostras correspondem ao vetor pJL89 e aos fragmentos U1 e U2 amplificados; **B)** Colônias de *Escherichia coli* crescidas em meio LB sólido 24 horas após transformação com o produto da clonagem do ToALCV; e **C)** Planta de tomateiro com sintomas de enrolamento apical e clorose entre as nervuras, aproximadamente 30 dias após a agroinjeção com o clone infeccioso de ToALCV.

### Inoculação mecânica

Com o objetivo de avaliar a possibilidade de transmissão mecânica do ToALCV, um experimento de inoculação mecânica em plantas de tomate foi conduzido. Das 75 plantas inoculadas mecanicamente com o extrato contendo ToALCV, nenhuma planta apresentou amplificação positiva por PCR utilizando os primers de detecção, ToALCV\_303Fo e ToALCV\_939Re. Das 15 plantas inoculadas com ToMV como controle positivo, todas apresentaram reação positiva no teste de dot-ELISA. Enquanto o ToMV causou sintomas visíveis a partir de 7 dias após a inoculação, confirmando a eficácia do procedimento, as plantas inoculadas com ToALCV não apresentaram sintomas (Figura 7). Nenhuma planta do controle negativo apresentou amplificação ou sintomas de infecção viral.



**Figura 7.** Planta de tomateiro infectada com ToMV (à esquerda), com sintomas típicos de mosaico foliar 30 dias após a inoculação mecânica. À direita, planta inoculada com ToALCV no mesmo período, sem sintomas característicos de infecção viral.

### **Inoculação em cultivares híbridas comerciais**

Com o objetivo de avaliar a infectividade do ToALCV em cultivares híbridas utilizadas na produção comercial de tomate, foram selecionadas diferentes variedades para os testes de inoculação por agroinjeção. As cultivares de tomateiro avaliadas apresentaram diferentes níveis de suscetibilidade à infecção pelo clone infeccioso 146 do ToALCV após a inoculação por *Agrobacterium tumefaciens*. A taxa de infecção foi determinada com base na detecção do vírus por PCR usando os primers ToALCV\_303Fo e ToALCV\_939Re (Tabela 1). As cultivares Gaúcho, Matinella, Mascot, Nivus, Parma e Sena apresentaram 100% de infecção nas plantas inoculadas, indicando alta suscetibilidade ao vírus. As cultivares Arezzo, Candieiro, Lampião, Tyson e Santa Clara apresentaram taxas de infecção elevadas, variando de 94,4% a 94,5%. Já Atari, Dominator e Santa Cruz apresentaram infecção entre 77,8% e 88,9% das plantas inoculadas. Por outro lado, a cultivar Compack apresentou a menor taxa de infecção (33,3%), sugerindo uma menor suscetibilidade ao ToALCV entre as cultivares testadas. As informações de resistência disponíveis para as cultivares indicam que algumas delas possuem resistência intermediária (IR) ou alta (HR) a vírus como tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) e tomato severe rugose virus (ToSRV), ambos do gênero *Begomovirus* pertencentes a família *Geminiviridae*, e ao

tomato spotted wilt virus (TSWV), pertencente ao gênero *Orthotospovirus*, da família *Tospoviridae* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Inoculação de cultivares híbridas comerciais de tomateiro com ToALCV em condições controladas

Cultivar	Nº de plantas inoculadas	Nº de plantas positivas	% de infecção	Resistência relatada
<b>Compack</b>	18	6	33,3	AR: TMV - RI: TSWV
<b>Dominador</b>	18	14	77,7	AR: ToMV, TYLCV
<b>Santa Cruz</b>	18	14	77,7	Podridão apical e rachaduras
<b>Atary</b>	18	16	88,8	AR: ToMV - RI: TSWV, TYLCV
<b>Arezzo</b>	16	15	94,4	AR: ToMV - RI: TSWV, TYLCV
<b>Candieiro</b>	18	17	94,4	AR: ToMV - RI: TSWV, TYLCV
<b>Lampião</b>	18	17	94,4	RI: TYLCV
<b>Tyson</b>	18	17	94,4	AR: TMV - RI: TSWV, TYLCV
<b>Santa Clara</b>	18	17	94,4	-
<b>Gaúcho</b>	18	18	100	-
<b>Mascot</b>	18	18	100	AR: TMV
<b>Nivus</b>	20	20	100	AR: TMV - RI: TSWV
<b>Matinella</b>	18	18	100	RI: ToSRV, TSWV
<b>BRS Sena</b>	16	16	100	RI: ToSRV
<b>Parma</b>	7	7	100	AR: ToMV - RI: TSWV, TYLCV

Número de plantas infectadas determinadas por PCR a partir de amostras foliares coletadas 14 dias após a inoculação. AR: alta resistência; RI: resistência intermediária.

Com base nos resultados obtidos no primeiro ensaio de inoculação, foi realizado um segundo experimento com quatro cultivares de tomate previamente selecionadas: Compack, Matinella, Santa Clara e BRS Sena. Foram utilizadas 20 plantas por cultivar, das quais 18 foram inoculadas por agroinjeção utilizando o clone

infeccioso 146 do ToALCV, mediado por *A. tumefaciens*. A taxa de infecção foi determinada por PCR usando os mesmos primers, a partir da detecção do vírus nas plantas inoculadas. Os resultados mostraram que as cultivares Matinella e BRS Sena apresentaram as maiores taxas de infecção, ambas com 88,9% das plantas inoculadas testando positivo. A cultivar Santa Clara também apresentou alta suscetibilidade, com 83,3% de infecção. Por outro lado, a cultivar Compack, que no primeiro ensaio havia mostrado menor suscetibilidade, manteve uma taxa de infecção mais baixa, com 66,7% das plantas testando positivo para ToALCV.

**Tabela 2.** Segundo ensaio de inoculação em cultivares selecionadas

Cultivar	Nº de plantas	Nº de plantas inoculadas	Nº de plantas positivas	% de infecção
Compack	20	18	12	66,7
Matinella	20	18	16	88,9
Santa Clara	20	18	15	83,3
BRS Sena	20	18	16	88,9

Número de plantas infectadas determinadas por PCR a partir de amostras foliares coletadas 14 dias após a inoculação

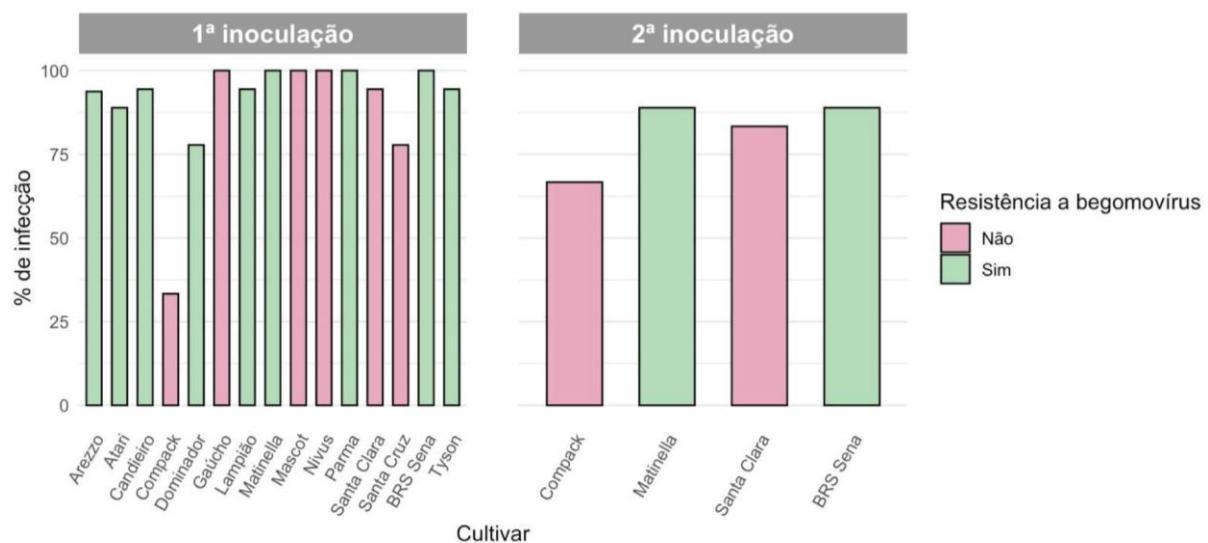
Após a agroinjeção com o clone infeccioso de ToALCV, as plantas foram monitoradas por até 30 dias para a avaliação de sintomas. Os primeiros sinais visuais de infecção foram observados a partir de 21 dias após a inoculação (DAI), com clorose internerval, variando em intensidade entre as cultivares. Os principais sintomas observados incluíram clorose entre as nervuras e enrolamento foliar no topo com diferentes níveis de severidade. A presença do vírus foi confirmada por PCR em plantas sintomáticas utilizando os primers para detecção do ToALCV. Nenhuma das plantas do controle negativo apresentou sintomas característicos de infecção por viroses (Figura 8). Todas as cultivares avaliadas se mostraram suscetíveis ao vírus, embora a cultivar Compack tenha apresentado a menor taxa de infecção entre as plantas inoculadas.



**Figura 8.** Cultivares de tomateiro não inoculadas (à esquerda) e 30 dias após a inoculação com ToALCV (à direita). A) Controle negativo da cv. Santa Clara, sem sintomas de infecção viral. B) Tomateiro cv. Santa Clara inoculado com ToALCV e PCR positivo, apresentando sintomas de clorose internerval. C) Controle negativo da

cv. Compack, sem sintomas de infecção viral. D) Tomateiro cv. Compack inoculada com ToALCV e PCR positivo, exibindo leves sintomas de clorose internerval nas folhas mais jovens.

A cultivar Compack se destacou como a única entre as avaliadas que apresentou infecção baixa por ToALCV, com cerca de 30% de plantas infectadas, mesmo sem possuir resistência relatada a begomovírus. Em contraste, as outras cultivares apresentaram taxas de infecção iguais ou superiores a 75%, mesmo aquelas com resistência intermediária relatada. Esses dados estão representados na Figura 9, que mostra a porcentagem de infecção nas cultivares comerciais avaliadas, considerando os dois ensaios de inoculação. No gráfico, cultivares sem resistência relatada a begomovírus estão indicadas em rosa, enquanto aquelas com resistência relatada a begomovírus aparecem em verde.



**Figura 9.** Porcentagem de infecção por ToALCV nas cultivares comerciais de tomateiro após dois ensaios de inoculação. Em verde, cultivares com resistência relatada a begomovírus e em rosa, cultivares sem resistência relatada.

#### Ensaio de transmissão do ToALCV pela cigarrinha *Agallia albidula*

Quatro ensaios de transmissão do ToALCV foram conduzidos com cigarrinhas da espécie *Agallia albidula* para avaliar a capacidade de transmissão (Tabela 3). Foram utilizadas diferentes quantidades de insetos por “clipcage”, incluindo adultos e insetos de diferentes ínstars (1º ao 5º). Os ensaios foram conduzidos com variações nos tempos de aquisição e transmissão: o período de

aquisição foi de 24 ou 48 horas, enquanto o período de inoculação variou entre 24 horas, 48 horas e 4 dias, conforme o delineamento experimental adotado em cada ensaio. O DNA total das plantas foi extraído 14 dias após a exposição às cigarrinhas e posteriormente testado por PCR com os primers específicos ToALCV\_303Fo e ToALCV\_939Re. Nenhuma planta apresentou sintomas ou resultado positivo, indicando ausência de infecção viral. Além disso, o DNA extraído das cigarrinhas não foi amplificado para ToALCV por PCR ou RCA nos ensaios após pelo período de inoculação do vírus, e não se tornaram virulíferos. Assim como nenhum dos insetos dos controles negativos apresentou amplificação.

**Tabela 3.** Avaliação da transmissão de ToALCV por cigarrinhas em condições controladas

Ensaio	Nº de plantas	Nº de plantas infectadas	Nº de insetos	Período de aquisição (PAI)	Período de inoculação (PAI)
1	15	0	30	24h	24h
2	14	0	70	48h	48h
3	5	0	10	48h	48h
4	6	0	17	48h	4d
Controle negativo	3	0	6	48h	48h

#### **Ensaio de transmissão do ToALCV pela mosca-branca *Bemisia tabaci***

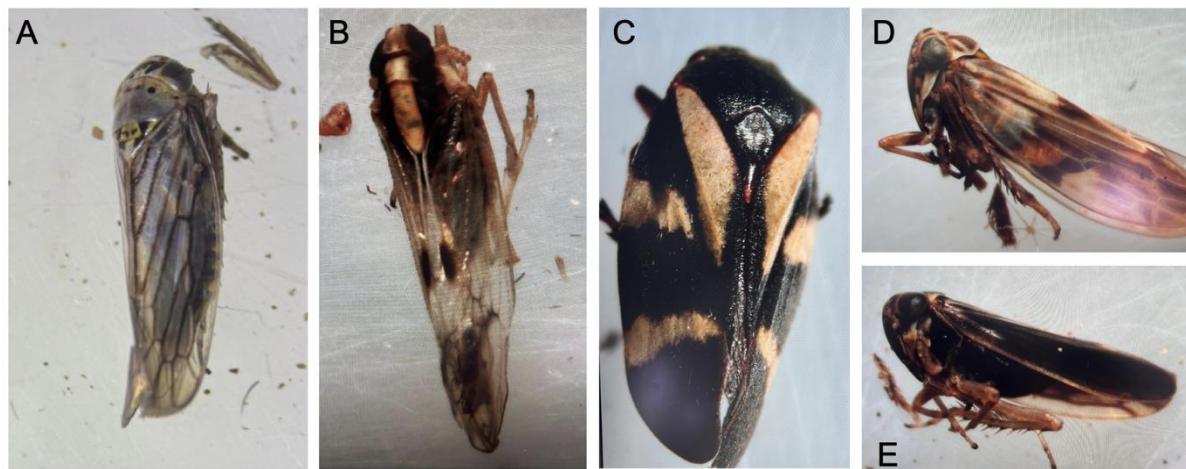
Nos ensaios de transmissão com a mosca-branca, *Bemisia tabaci* MEAM1, não foi detectada a transmissão do ToALCV para plantas de tomate sob as condições experimentais (Tabela 4). Após a exposição aos insetos, todas as plantas testadas apresentaram resultado negativo na PCR com os primers específicos ToALCV\_303Fo e ToALCV\_939Re. Nenhuma mosca-branca no ensaio testou positivo para o ToALCV no teste de detecção. Além disso, nenhuma delas desenvolveu sintomas característicos de infecção por viroses. O controle positivo, conduzido com mosca-branca em plantas infectadas com ToSRV, validou o protocolo experimental, já que as plantas inoculadas nesse grupo apresentaram amplificação positiva na PCR.

**Tabela 4.** Avaliação da transmissão de ToALCV por moscas brancas em condições controladas

Vírus	Nº de plantas	Nº de plantas infectadas	Nº de insetos - final	Período de aquisição (PAA)	Período de inoculação (PAI)
ToALCV	15	0	1.080	48h	48h
ToSRV	10	6	600	48h	48h
Controle negativo	2	0	120	48h	48h

#### **Detecção do ToALCV em insetos coletados em campo**

Foram analisados 26 insetos da ordem Hemiptera coletados em áreas de cultivo de tomate no Distrito Federal e região do entorno, com o objetivo de investigar a presença do ToALCV em potenciais vetores. O DNA total foi extraído individualmente e submetido à PCR utilizando os primers específicos ToALCV\_303Fo e ToALCV\_939Re. Do total de insetos testados, dois testaram positivo para ToALCV, indicando que continham DNA viral no corpo no momento da coleta. Esses indivíduos pertenciam ao grupo das cigarrinhas (Cicadellidae), embora não tenham sido identificados em nível de espécie. Esse resultado sugere que existem insetos em campo que se alimentaram de plantas infectadas por ToALCV.



**Figura 10.** Cigarrinhas coletadas em área de cultivo de tomateiro e vegetação adjacente. As cigarrinhas identificadas nas posições A e B testaram positivo para ToALCV por PCR. As demais (C, D e E) testaram negativo.

## Discussão

Os resultados obtidos neste estudo representam um passo inicial na ampliação do conhecimento sobre o tomato apical leaf curl virus. Apesar de já ter sido previamente relatado na Argentina e no Distrito Federal (Souza et al., 2020; Batista et al., 2019) as informações sobre seu potencial de disseminação e impacto agronômico permanecem limitadas. Por isso, os experimentos conduzidos buscaram aprofundar em aspectos como a suscetibilidade de cultivares comerciais, a possibilidade de transmissão mecânica e a tentativa de identificação do seu vetor.

Para confirmar a presença do ToALCV e possibilitar os experimentos, foi realizada a clonagem do genoma viral a partir de uma amostra coletada em campo. A amostra 10 foi selecionada com base no perfil de digestão obtido por RCA-RFLP, que indicou a presença de apenas um fragmento com aproximadamente 3,0 kb. Entre as enzimas testadas, a *Pst*I foi escolhida por gerar esse fragmento único, o que facilitou o isolamento do genoma viral. O DNA digerido foi clonado no vetor pBlueScript SK+ por meio de ligação enzimática. O sequenciamento do clone confirmou 99,3% de identidade com um dos isolados de ToALCV previamente relatado no Brasil, validando a clonagem e viabilizando a construção do clone infeccioso.

A construção do clone infeccioso foi realizada a partir de fragmentos do genoma viral utilizando a técnica de Gibson Assembly, o que possibilitou a avaliação da capacidade infectiva do isolado em diferentes cultivares de tomateiro. Ao todo, 15 cultivares foram selecionadas para os ensaios, incluindo variedades utilizadas no cultivo comercial. Dentre elas as cultivares Atari, Candieiro, Dominador, Lampião, Matinella, Parma, BRS Sena e Tyson possuem resistência intermediária a begomoviroses, possivelmente mediada pelo gene de resistência *Ty-1*, conhecido por conferir proteção contra diversos geminivírus (Voorburg et al., 2020). No entanto, os resultados obtidos demonstraram que todas as cultivares avaliadas foram suscetíveis à infecção por ToALCV. Embora algumas plantas tenham apresentado sintomas mais intensos que outras, todas exibiram sintomas, principalmente enrolamento das folhas do topo e clorose internerval. No Brasil, já foram relatadas evidências de que isolados de begomovírus podem superar a resistência conferida pelo gene *Ty-1* (Reis et al., 2020), o que também pode ocorrer com outros geminivírus. Voorburg et al. (2020) relataram que a resistência conferida por *Ty-1* pode ser ampla, incluindo os begomovírus e outros geminivírus, como foi observado para beet curly top virus, um

curtovírus. Os resultados aqui obtidos podem indicar que essa resistência potencialmente não é observada contra o ToALCV. É possível também que o método de inoculação adotado resultou em uma pressão de inóculo excessivamente alta, não permitindo a discriminação de materiais com algum nível de resistência. Além disso, é preciso verificar se as cultivares avaliadas apresentam o gene *Ty-1* ou outro gene de resistência. Entre as cultivares avaliadas, a cultivar Compact se destacou por apresentar a menor porcentagem de infecção, demonstrando um comportamento diferente em comparação com as demais cultivares. Na sua descrição comercial não há dados sobre a presença de genes de resistência a begomoviroses. A cultivar é classificada como altamente resistente ao tomato mosaic virus (ToMV), pertencente ao gênero *Tobamovirus* (família *Virgaviridae*), e de resistência intermediária ao tomato spotted wilt virus (TSWV), um *Orthotospovirus* responsável pelo "vira-cabeça" do tomateiro. Uma vez determinado o vetor, será importante repetir os testes de inoculação para confirmação de resistência com o método de inoculação natural. Vale a pena também avaliar outras cultivares de tomateiro disponíveis.

Para avaliar a possibilidade de transmissão mecânica do isolado de ToALCV, foram realizadas inoculações em 75 plantas da cultivar Santa Clara utilizando extrato macerado de plantas previamente infectadas da mesma cultivar. Nenhuma das plantas inoculadas apresentou sintomas até 30 dias após a inoculação, nem testou positivo por PCR aos 14 dias, indicando ausência de infecção. Ao contrário do controle positivo com ToMV que apresentou sintomas típicos a partir do sétimo dia após a inoculação e todas as plantas testaram positivo no teste de ELISA, confirmando a eficiência da metodologia utilizada. Embora existam relatos de que alguns vírus da família *Geminiviridae* podem ser transmitidos mecanicamente, como citado por Chang et al. (2023), os resultados desse estudo indicam que esse isolado de ToALCV não foi transmitido mecanicamente nas condições experimentais adotadas.

Insetos da ordem Hemiptera, em sua maioria cigarrinhas, foram coletados em áreas de cultivo de tomateiro e na vegetação próxima, com o objetivo de investigar a possível associação desses insetos com o ToALCV. Os insetos foram testados por PCR para verificar a presença do vírus. Dois indivíduos testaram positivo para ToALCV, no entanto, esse resultado não permite concluir que esses insetos atuam como vetores do vírus. A presença do vírus pode estar associada apenas à

alimentação em plantas infectadas e com retenção do vírus no aparelho bucal, sem que ocorra replicação ou transmissão.

Entre os insetos avaliados quanto ao potencial vetor do ToALCV, foi incluída a mosca-branca *Bemisia tabaci* MEAM1 (também conhecida como biótipo B). Essa espécie é reconhecida como vetor do maior número de vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* (Brown et al., 2015). Além de transmitir vírus do gênero *Crinivirus* (família *Closteroviridae*), como o tomato chlorosis virus (ToCV). Na cultura do tomateiro no Brasil, a alta densidade populacional da mosca-branca no campo é um problema recorrente, associado a perdas econômicas não apenas pela transmissão viral, mas também pelos danos diretos à planta (Gilbertson et al. 2015).

Dada sua importância epidemiológica, ensaios de transmissão foram realizados com *Bemisia tabaci* MEAM1 para verificar sua capacidade de transmitir o ToALCV. No entanto, os resultados mostraram que sob as condições testadas, a mosca-branca não foi capaz de transmitir o vírus. Foi observado que embora as moscas tenham se alimentado de plantas infectadas com ToALCV, o vírus não foi detectado após o período de inoculação em plantas sadias, o que pode indicar que, após um determinado tempo, o corpo do inseto é “limpo”, resultando na não detecção do vírus. Para validar a metodologia utilizada, foi incluído um controle positivo com o tomato severe rugose virus (ToSRV), um begomovírus conhecido por ser transmitido por *B. tabaci* MEAM1. Como esperado, o controle positivo confirmou a eficácia do protocolo, indicando que a ausência de transmissão de ToALCV não se deve ao método experimental, mas provavelmente ao fato de que *B. tabaci* MEAM1 não é o vetor desse vírus.

Dentro do gênero *Topilevirus*, duas espécies foram descritas até o momento: o tomato apical leaf curl virus (ToALCV), cuja espécie é *Topilevirus solani*, e o tomato geminivirus 1 (TGV1), cuja espécie é *Topilevirus lycopersici*, também conhecido como topilevirus geminivirus associated virus 1. Este último é transmitido pela cigarrinha *Agallia albidula* (comunicação pessoal, Juliana Osse de Souza). Com base nessa informação e que ambos os vírus pertencerem ao mesmo gênero, foi realizado um ensaio de transmissão para verificar se *A. albidula* também poderia atuar como vetor de ToALCV.

Os testes foram conduzidos com diferentes abordagens experimentais, utilizando tanto adultos quanto ninfas da cigarrinha e distintos períodos de aquisição e de inoculação. Inicialmente, os protocolos foram semelhantes aos utilizados para *B.*

*tabaci*, com períodos de 48 horas de alimentação em plantas infectadas, seguidos para a transferência em plantas sadias. Nenhum caso de transmissão foi observado. Considerando a possibilidade de que *A. albidula* necessite de um período mais longo para a aquisição e posterior transmissão do vírus, os insetos foram mantidos por quatro dias se alimentando em plantas sadias após exposição ao vírus. Ainda assim, nenhuma planta apresentou sintomas e os testes moleculares indicaram ausência de infecção por ToALCV. Esses resultados indicam que, nas condições avaliadas, *A. albidula* não é vetor do ToALCV, apesar de transmitir outro vírus do mesmo gênero. Até o momento, o vetor sugerido por Vaghi Medina et al. (2018), o membracídeo *Micrualis malleifera*, ainda não foi encontrado nas áreas de coleta. No entanto, as buscas em campo continuam em andamento, com o objetivo de identificar possíveis insetos vetores associados à transmissão do ToALCV.

A distribuição do ToALCV em diferentes regiões do Brasil tem sido evidenciada por análises de sequenciamento, incluindo sua detecção em amostras de tomate e pimentão de locais distintos do país (comunicação pessoal, Roberta Rúbia Pinto Nogueira Lima). Um ponto de destaque é a presença do vírus no Distrito Federal, uma região importante de produção de tomate do Brasil. A ocorrência do ToALCV em uma área com alta concentração de cultivo representa um risco à cultura, especialmente diante dos sintomas associados à infecção. Diante disso, a identificação do vetor responsável pela transmissão do ToALCV se torna essencial, pois vai o desenvolvimento de estratégias de controle direcionadas, que possam conter a disseminação do vírus e minimizar os prejuízos nas lavouras.

## Conclusão

Esse estudo identificou que os sintomas de enrolamento do topo do tomateiro, clorose internerval e nanismo em tomateiros estavam associados a um isolado do tomato apical leaf curl virus (ToALCV), confirmado após os postulados de Koch serem cumpridos. Nos ensaios de inoculação com cultivares comerciais, nenhuma apresentou resistência ao isolado, mesmo entre aquelas com resistência relatada a begomovírus. Por outro lado, a cultivar Compact, que não possui resistência descrita a geminivírus, se destacou por apresentar a menor taxa de infecção. Os testes de transmissão indicaram que a mosca-branca (*Bemisia tabaci* MEAM1) não é vetor do ToALCV, e que sob as condições avaliadas, a cigarrinha *Agallia albida* também não foi capaz de transmiti-lo, apesar de ser vetor de outro vírus do mesmo gênero. Os resultados reforçam a necessidade de aprofundar os estudos sobre os mecanismos de transmissão, potencial vetor, e estratégias de manejo para esse vírus emergente.

## Referências

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Batista JG, Melo FL, Melo RC, Pereira-Carvalho DMT, Alves-Freitas SG, Ribeiro SG. (2019). First report of Tomato Apical Leaf Curl Virus infecting tomato in Brazil. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1636-PD>

Beam K and Ascencio-Ibañez JT (2020) Geminivirus Resistance: A Minireview. *Front. Plant Sci.* 11:1131. doi: 10.3389/fpls.2020.01131

Bian, X. Y. et al. (2007). A recessive allele (tgr-1) conditioning tomato resistance to geminivirus infection is associated with impaired viral movement. *Phytopathology*, 97(8), 930-937.

Blawid R, Nagata T. (2015). Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a binary vector using one-step Gibson Assembly. *Journal of Virological Methods*, 222, 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.05.003>

Boiteux LS, Oliveira VR, Silva CH, Makishima N, Inoue-Nagata AK, Fonseca ME de N, et al. (2007) Reaction of tomato hybrids carrying the Ty-1 locus to Brazilian bipartite Begomovirus species. *Hortic Bras* [Internet]. 25(1):20–3. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362007000100005>

Boiteux LS, Fonseca MEN, Giordano LB, Melo PTC (2012) Melhoramento genético. Produção de tomate para processamento industrial. Embrapa p. 31–50

Chang H-H, Gustian D, Chang C-J, Jan F-J. (2023). Virus-virus interactions alter the mechanical transmissibility and host range of begomoviruses. *Frontiers in Plant Science*, 14:1092998. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1092998>

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. (2019). Tomate: Análise dos Indicadores da Produção e Comercialização no Mercado Mundial, Brasileiro e Catarinense. Compêndio de Estudos Conab, v. 21, Brasília.

Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16:6127–6145. <https://doi.org/10.1093/nar/16.13.6127>

Doyle JJ, Doyle LH (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus (Madison)* 12:13–15

Ferro MMM, Ramos-Sobrinho R, Xavier CAD, Zerbini FM, Lima GSA, Nagata T, Assunção IP. (2019) New approach for the construction of infectious clones of a circular DNA plant virus using Gibson Assembly. *J Virol Methods*. 263:20-23. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.10.017.

Fiallo-Olivé E, Lett J-M, Martin DP, Roumagnac P, Varsani A, Zerbini FM, Navas-Castillo J. (2021). ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae 2021. *Journal of General Virology*, 102:001696. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001696>

Fu Z, Song A, Zhao Q, Cao J, Li Y, Cheng H, Wang Q. (2021). Identification of Ty-1/Ty-3 and Ty-2 alleles and evaluation of begomovirus resistance in Chinese tomato germplasms. *Horticultural Plant Journal*, 7(6), 526–534.

Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, et al (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6:343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>

Gilbertson, R. L., Batuman, O., Webster, C. G., & Adkins, S. (2015). Role of the insect supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. *Annual Review of Virology*, 2(1), 67-93. doi: 10.1146/annurev-virology-031413-085410

Giordano, L.B., Silva-Lobo, V.L., Santana, F.M. et al. (2005). Inheritance of resistance to the bipartite Tomato chlorotic mottle begomovirus derived from *Lycopersicon*

esculentum cv. 'Tyking'. *Euphytica* 143, 27–33. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1685-1>

Hanssen IM, Thomma BP (2010) Pepino mosaic virus: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Mol Plant Pathol* 11:179–189. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00600.x>

IBGE (2022) Produção Agrícola Municipal: culturas temporárias e permanentes 2021. IBGE. Available at: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?edicao=34923&t=destaques>

Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T (2004) A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage φ29 DNA polymerase. *J Virol Methods* 116:209–211. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.11.015>

Inoue-Nagata AK, Ávila AC, Villas Bôas GL. (2009). Os geminivírus em sistema de produção integrada de tomate indústria. Circular Técnica, 56. Embrapa. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/782610/4/ct71.pdf>

Inoue-Nagata AK; Lima MF; Gilbertson RL. (2016). A review of geminivirus (begomovirus) diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Horticultura Brasileira* 34: 008-018. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620160000100002>

Lima MF, Michereff Filho M. (2015). Vira-cabeça do tomateiro: sintomas, epidemiologia, transmissão e medidas de manejo. Circular Técnica. Embrapa. Available at: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1026816/1/COT110.pdf>

Morais IJ, Ferreira YFM, Nakasu EYT, Nagata T, Inoue-Nagata AK (2024) Agroinoculation of Geminiviral Infectious Clones into Plants. In: Fontes EP, Mäkinen

K (eds) Plant-Virus Interactions. Methods in Molecular biology, vol 2724. Humana, New York, NY, pp 57-65. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3485-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3485-1_5)

Prabhandakavi, P. et al. (2020). Pyramiding Ty-1/Ty-3, Ty-2, ty-5 and ty-6 genes into tomato hybrid to develop resistance against tomato leaf curl viruses and recurrent parent genome recovery by ddRAD sequencing method. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 30(1), 74-85.

Ragunathan D, Prakash V, Kumar RV (2021) Molecular biology of antiviral arms race between plants and viruses. In: Gaur RK, Khurana SMP, Sharma P, Hohn T (eds) *Plant Virus-Host Interaction* (Second Edition). Academic Press, pp 331-358. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821629-3.00013-9>

Ramesh SV, Sahu PP, Prasad M, Praveen S, Pappu HR. (2017). Geminiviruses and Plant Hosts: A Closer Examination of the Molecular Arms Race. *Viruses*. 9(9):256. <https://doi.org/10.3390/v9090256>

Reis LNA, Fonseca MEdN, Ribeiro SG, Naito FYB, Boiteux LS, Pereira-Carvalho RC. (2020). Metagenomics of Neotropical Single-Stranded DNA Viruses in Tomato Cultivars with and without the Ty-1 Gene. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v12080819>

Souza TA, Silva JMF, Nagata T, Martins TP, Nakasu YET, Inoue-Nagata AK. (2020). A temporal diversity analysis of Brazilian Begomoviruses in tomato reveals a decrease in species richness between 2003 and 2016. *Frontiers in Plant Science*, 11:1201.

TOMATO NEWS. (2024). The top 50 tomato processing companies in 2024. Available at: [https://www.tomatonews.com/en/the-top-50-tomato-processing-companies-in-2024\\_2\\_2595.html](https://www.tomatonews.com/en/the-top-50-tomato-processing-companies-in-2024_2_2595.html). Acesso em: 22 jun. 2025.

Vaghi Medina CG, Teppa E, Bornancini VA, Flores CR, Marino-Buslje C, López Lambertini PM. (2018). Tomato apical leaf curl virus: a novel, monopartite Geminivirus detected in tomatoes in Argentina. *Frontiers in Microbiology*, 8:2665. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02665>

Verlaan MG, Hutton SF, Ibrahem RM, Kormelink R, Visser RGF (2013) The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Genes Ty-1 and Ty-3 Are Allelic and Code for DFDGD-Class RNA–Dependent RNA Polymerases. *PLOS Genetics* 9(3): e1003399. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003399>

Voorburg CM, Yan Z, Bergua-Vidal M, Wolters AMA, Bai Y, Kormelink R. (2020). Ty-1, a universal resistance gene against geminiviruses that is compromised by co-replication of a betasatellite. *Molecular Plant Pathology*, 21(2), 160–172. <https://doi.org/10.1111/mpp.12885>

Zhang J, Ma M, Liu Y, Ismayil A (2023) Plant defense and viral counter-defense during plant–geminivirus interactions. *Viruses* 15:510. <https://doi.org/10.3390/v15020510>