

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

CASSIELE ULIANA FACCO

Infecção simples e mista do *Cucumber mosaic virus* e do *Tobacco mosaic virus* em diferentes hospedeiras e detecção por RT-PCR multiplex e DAS-ELISA

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2013**

CASSIELE ULIANA FACCO

Infecção simples e mista do *Cucumber mosaic virus* e do *Tobacco mosaic virus* em diferentes hospedeiras e detecção por RT-PCR multiplex e DAS-ELISA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Eliezer Rodrigues de Souto.

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2013**

“Ouço e esqueço. Vejo e recordo. Faço e compreendo”.
“Confúcio (551-479 a.C.)”

Aos meus amados pais, Roque Uliana e Terezinha Fátima Uliana, pelo amor e carinho, pela educação que me deram e pelo apoio sempre.

Às minhas irmãs, Elaine Tebaldi e Gracieli Uliana, pelo carinho, apoio e incentivo.
Aos meus sobrinhos, Gustavo, Lucas, Airton e Gabriel, pela torcida e principalmente pelo carinho.

A toda minha família que, de alguma forma, sempre me apoiaram durante todos os momentos de minha vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por guiar e iluminar os meus passos e por tantas bênçãos concedidas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM) e à Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (Capes), pela bolsa de estudo concedida durante o Curso de Mestrado.

Ao professor doutor Eliezer Rodrigues de Souto, pela orientação, ensinamentos, dedicação e disponibilidade.

Às minhas amigas, Jaqueline Manzatti e Patrícia Rosin Carnellosi, pela ajuda na condução e análise dos experimentos e pela amizade e companheirismo.

À minha amiga, Ana Claudia Sossai, pela amizade e por não me deixar desistir nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos e companheiros de Laboratório, Marcelo H. S. Picoli, Betty C. Kuhn, Maikon Guerith, Taise Bijora e Noemi Pelisson, pela ajuda, companheirismo e importantes contribuições para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas, Ana Paula Nunes e Waniely T. Valenzuela, pelos momentos de descontração, e a tantos outros amigos que fiz durante todo o Curso de Mestrado. Sem as amizades que conquistamos e que conservamos as demais conquistas não têm o mesmo sabor.

BIOGRAFIA

CASSIELE ULIANA FACCO, filha de Roque Uliana e de Terezinha Fátima Uliana, nasceu aos dezoito dias do mês de dezembro de 1986, na cidade de Campo Erê, estado de Santa Catarina.

Em 1993, Iniciou o Ensino Fundamental, na Escola Adventista, no município Cruce Guarani, Departamento de Canindeyú, no Paraguai, permanecendo até o ano de 1998. Em 1999, transferiu-se para o Colégio Nuestra Señora de Betharann, município de Katueté, Canindeyú, onde concluiu o Ensino Fundamental em 2001.

Em 2002, Iniciou o Ensino Médio no Colégio Teresiano San Enrique de Ossó, em Katueté, Departamento de Canindeyú, Paraguai, concluindo esta etapa em 2004.

Ingressou no Curso de Engenharia Agrônômica, em fevereiro de 2005, na Faculdade Integrado de Campo Mourão, em Campo Mourão, estado do Paraná, obtendo o título de Engenheira Agrônoma em fevereiro de 2009.

Em março de 2011, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento (PGM), na Universidade Estadual de Maringá (UEM), em Maringá, estado do Paraná, Brasil.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Hospedeiras.....	3
2.1.1. Pimentão (<i>Capsicum annuum</i>).....	3
2.1.2. Tomate (<i>Solanum lycopersicum L.</i>)	4
2.1.3. Fumo (<i>Nicotiana tabacum</i>).....	5
2.1.4. <i>Gomphrena globosa</i>	6
2.2. Vírus.....	6
2.2.1. <i>Tobacco mosaic virus</i>	7
2.2.2. <i>Cucumber mosaic virus</i>	8
2.3. Infecção mista de vírus de plantas.....	9
2.4. Métodos de detecção e caracterização de vírus de plantas.....	11
2.4.1. Métodos sorológicos	12
2.4.2. Métodos moleculares.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Origem dos isolados	15
3.1.1. Origem do isolado de CMV	15
3.1.2. Origem do isolado de <i>Tobamovirus</i>	15
3.2. DAS-ELISA para determinação da espécie de <i>Tobamovirus</i>	16
3.3. RT-PCR e sequenciamento para confirmação da identificação do isolado de <i>Tobamovirus</i>	16
3.4. Clonagem e sequenciamento do produto de RT-PCR obtido	16

3.4.1. Seleção e estoque de clones positivos	17
3.4.2. Extração do DNA plasmidial	17
3.4.3 Sequenciamento do produto de amplificação por RT-PCR	18
3.5. Inoculações simples e mistas do TMV e do CMV em diferentes hospedeiras	18
3.6. Detecção do TMV e do CMV após as inoculações simples e mistas por meio do DAS-ELISA e análise dos resultados pelo teste de Tukey	19
3.7. Detecção do TMV e do CMV após as inoculações simples e mistas por meio da RT-PCR multiplex	20
3.7.1. Extração do RNA total das plantas inoculadas	20
3.7.2. Reação de Transcrição Reversa (RT)	21
3.7.3. Reações de PCR	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Inoculação do isolado do <i>Tobamovirus</i> em tomate.....	23
4.1.1. Identificação da espécie de <i>Tobamovirus</i> por meio do teste DAS-ELISA	23
4.1.2. Identificação da espécie de <i>Tobamovirus</i> por meio da RT-PCR e sequenciamento	25
4.2. Avaliações dos sintomas causados pelas inoculações simples e mistas do TMV e do CMV	26
4.2.1. <i>Nicotiana tabacum</i>	26
4.2.2. <i>Capsicum annuum</i>	27
4.2.3. <i>Gomphrena globosa</i>	28
4.2.4. <i>Solanum lycopersicum</i> L.	29
4.3. Detecção do TMV e do CMV nas infecções simples e mistas mediante utilização do DAS - ELISA e análise dos resultados pelo teste de Tukey ...	31
4.4. Detecção do TMV e do CMV nas infecções simples e mistas por meio da RT- PCR multiplex	33
5. CONCLUSÕES	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de RT-PCR	21
Quadro 2 – Percentuais de identidade do TMV isolado de <i>Solanum lycopersicum</i> da região de Marialva-PR com outras sequências do TMV depositadas no GenBank	26
Quadro 3 – Sintomas induzidos pelo TMV e CMV em infecções simples e mistas em pimentão, tomate, fumo e <i>G. globosa</i>	31
Quadro 4 – Análise estatística dos valores obtidos nas leituras do teste DAS-ELISA para as amostras testadas com o antissoro para o CMV.....	32
Quadro 5 – Análise estatística dos valores obtidos nas leituras do teste DAS-ELISA para as amostras testadas com o antissoro para o TMV	33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Diferentes variedades de tomate inoculadas com o TMV. 1: Gaúcho melhorado; 2: Alambra F1; 3: Santa Cruz; 4: Jumbo; 5: Bona F1. A: Plantas sadias; B: Plantas inoculadas. 23
- Figura 2 - Valores de absorvância (405nm) do teste DAS-ELISA com leitura após 1 hora da adição do substrato enzimático, utilizando antissoro para o TMV. Controle negativo: plantas sadias de *Solanum lycopersicum*..... 24
- Figura 3 - Valores de absorvância (405nm) do teste DAS-ELISA com leitura após 1 hora da adição do substrato enzimático, utilizando antissoro para o ToMV. Controle negativo: plantas sadias de *Solanum lycopersicum* 24
- Figura 4 - Produto de PCR em gel de agarose 1,2% de plantas de tomate. 1: Leader 1 kb ; 2: extratos de plantas sadias; 3: amplificação de aproximadamente 400 pb, obtida com o par de *primers* para TMV (Jacobi et al., 1998); 4: ausência de amplificação com o par de *primers* para o ToMV..... 25
- Figura 5 - Sintomas em plantas de fumo A: Plantas inoculadas com o TMV; B: Plantas inoculadas com o CMV; C: Plantas inoculadas com o TMV e o CMV simultaneamente; D: Plantas inoculadas com o TMV e após 10 dias inoculadas com o CMV; E: Plantas inoculadas com o CMV e após 10 dias inoculadas com o TMV; F: Planta sadia..... 27
- Figura 6 - Sintomas em plantas de pimentão. A: Plantas inoculadas com o TMV; B: Plantas inoculadas com o CMV; C: Plantas inoculadas com o TMV e o CMV simultaneamente; D: Plantas inoculadas com o TMV e após 10 dias inoculadas com o CMV; E: Plantas inoculadas com o CMV e após 10 dias inoculadas com o TMV; F: Planta sadia..... 28
- Figura 7 - Sintomas em plantas de *G. globosa*. A: Plantas inoculadas com o TMV; B: Plantas inoculadas com o CMV; C: Plantas inoculadas com o TMV e o CMV simultaneamente; D: Plantas inoculadas com o TMV e após 10 dias inoculadas com o CMV; E: Plantas inoculadas com o CMV e após 10 dias inoculadas com o TMV; F: Planta sadia..... 29

Figura 8 - Sintomas em plantas tomate. A: Plantas inoculadas com o TMV; B: Plantas inoculadas com o CMV; C: Plantas inoculadas com o TMV e o CMV simultaneamente; D: Plantas inoculadas com o TMV e após 10 dias inoculadas com o CMV; E: Plantas inoculadas com o CMV e após 10 dias inoculadas com o TMV; F: Planta sadia.....	30
Figura 9 - Valores de absorvância (405nm) do teste DAS-ELISA com leitura após 1 hora utilizando antissoro para o CMV. Controle negativo: plantas sadias de cada hospedeira, tomate, fumo, pimentão e <i>G. globosa</i>	32
Figura 10 - Valores de absorvância (405nm) do teste DAS-ELISA com leitura após 1 hora utilizando antissoro para o TMV. Controle negativo: plantas sadias de cada hospedeira, tomate, fumo, pimentão e <i>G. globosa</i>	33
Figura 11 - Produto de RT-PCR em gel de agarose 1,2% de plantas de fumo utilizando os <i>primers</i> específicos para TMV (Jacobi et al., 1998) e CMV (Chen et al., 2011). 1: Marcador molecular Ladder 1kb (Invitrogen®); 2: Controle negativo; 3: Amplificação de fragmento de aproximadamente 400 pb do TMV; 4: Amplificação de fragmento de aproximadamente 590 pb do CMV; 5: Amplificação de fragmento de aproximadamente 590 pb do CMV e de aproximadamente 400 pb do TMV em infecção mista simultânea; 6: Amplificação obtida a partir de plantas inoculadas com o TMV e 10 dias após, inoculadas com o CMV; 7: Amplificação obtida a partir de plantas inoculadas com o CMV e 10 dias após, inoculadas com o TMV.....	34
Figura 12 - Produto de RT-PCR em gel de agarose 1,2% de plantas de pimentão, utilizando os <i>primers</i> específicos para TMV (Jacobi et al., 1998) e CMV (Chen et al., 2011). 1: Marcador molecular Ladder 1kb (Invitrogen®); 2: Controle negativo; 3: Amplificação de fragmento de aproximadamente 400 pb do TMV; 4: Amplificação de fragmento de aproximadamente 590 pb do CMV; 5: Amplificação de fragmento de aproximadamente 590 pb do CMV e de aproximadamente 400 pb do TMV em infecção mista simultânea; 6: Amplificação obtida a partir de plantas inoculadas com o TMV e 10 dias após, inoculadas com o CMV; 7: Amplificação obtida a partir de plantas inoculadas com o CMV e 10 dias após, inoculadas com o TMV.....	35

Figura 13 - Produto de RT-PCR em gel de agarose 1,2% de plantas de *G. globosa* utilizando os *primers* específicos para TMV (Jacobi et al., 1998) e CMV (Chen et al., 2011). 1: Marcador molecular Ladder 1kb (Invitrogen®); 2: Controle negativo; 3: Amplificação de fragmento de aproximadamente 400 pb do TMV; 4: Amplificação de fragmento de aproximadamente 590 pb do CMV; 5: Amplificação de fragmento de aproximadamente 590 pb do CMV e de aproximadamente 400 pb do TMV em infecção mista simultâneas; 6: Amplificação obtida a partir de plantas inoculadas com o TMV e 10 dias após, inoculadas com o CMV; 7: Amplificação obtida a partir de plantas inoculadas com o CMV e 10 dias após, inoculadas com o TMV.....35

Figura 14 - Produto de RT-PCR em gel de agarose 1,2% de plantas de tomate utilizando os *primers* específicos para TMV (Jacobi et al., 1998) e CMV (Chen et al., 2011). 1: Marcador molecular Ladder 1kb (Invitrogen®); 2: Controle negativo; 3: Amplificação de fragmento de aproximadamente 400 pb do TMV; 4: Amplificação de fragmento de aproximadamente 590 pb do CMV; 5: Amplificação de fragmento de aproximadamente 590 pb do CMV e de aproximadamente 400 pb do TMV em infecção mista simultâneas; 6: Amplificação obtida a partir de plantas inoculadas com o TMV e 10 dias após, inoculadas com o CMV; 7: Amplificação obtida a partir de plantas inoculadas com o CMV e 10 dias após, inoculadas com o TMV.....36

RESUMO

FACCO, Cassiele Uliana, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2013. **Infecção simples e mista do *Cucumber mosaic virus* e do *Tobacco mosaic virus* em diferentes hospedeiras e detecção por RT-PCR multiplex e DAS-ELISA.** Orientador: Eliezer Rodrigues de Souto.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os sintomas da infecção simples e mista em quatro hospedeiras distintas de um isolado do *Cucumber mosaic vírus* e de um *Tobamovirus* de tomateiro, provenientes de Marialva - PR. Também foi avaliada a concentração relativa de cada vírus nestas hospedeiras, por meio do teste DAS-ELISA. Inicialmente, a espécie TMV foi identificada, utilizando antissoros para o TMV e ToMV, com os ensaios de DAS-ELISA. Nos testes de RT-PCR, foram obtidas amplificações de aproximadamente 400 pb com *primers* para o TMV. As análises de similaridade da sequência do TMV de Marialva-PR com outras seqüências depositadas no GenBank apontaram a identidade de 100% com um isolado procedente de Sapopema - PR (TMV-PR). Posteriormente, foram realizadas inoculações simples e mistas do TMV, com um isolado do CMV de *Catharanthus roseus*, cuja espécie viral havia sido determinada previamente. A infecção mista desses vírus resultou na expressão mais severa dos sintomas, evidenciando a interação sinérgica de ambos. Tanto o teste DAS-ELISA como a RT-PCR foram eficientes na detecção do TMV e CMV nas infecções simples e mistas em plantas de tomate, pimentão, fumo e de *Gomphrena globosa*. O protocolo de RT-PCR multiplex mostrou eficiência nas detecções em infecções mistas e com as amplificações específicas de cada vírus ficou demonstrada a aplicabilidade do método na diagnose de rotina, visando à certificação fitossanitária de hortaliças.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus*.

ABSTRACT

FACCO, Cassiele Uliana, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, February, 2013. **Single and mixed infection of *Cucumber mosaic virus* and *Tobacco mosaic virus* in different hosts and multiplex RT-PCR and DAS-ELISA detection.** Advisor: Eliezer Rodrigues de Souto.

The objective of this study was to evaluate the symptoms of single and mixed infections in four different hosts induced by an isolate of *Cucumber mosaic virus*, and by a tomato *Tobamovirus* isolate from Marialva-PR. We also evaluated the relative concentration of each virus in these hosts, by DAS-ELISA tests. Initially, the species of *Tobamovirus* was identified using antiserum specific to TMV and ToMV through DAS-ELISA assays, and through RT-PCR with the amplification of approximately 400 bp with primers for TMV. Analysis of the sequence similarity of TMV Marialva-PR with other sequences deposited in GenBank, showed a 100% identity with an isolate originating from Sapopema, Paraná (TMV-PR). Subsequently, simple and mixed inoculations were made with TMV and an isolate of CMV from *Catharanthus roseus*, whose viral species had been previously determined. Mixed infection of these viruses resulted in the most severe expression of symptoms, demonstrating the synergistic interaction of both viruses. DAS-ELISA tests, such as RT-PCR were efficient for TMV and CMV detection, in single and mixed infections in tomato, pepper, tobacco and *Gomphrena globosa*. The multiplex RT-PCR protocol was efficient for mixed infection detections, and specific amplifications of each virus demonstrated the applicability of the method for the routine diagnosis for phytosanitary certification of horticultural crops.

Key words: *Solanum lycopersicum*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus*.

1. INTRODUÇÃO

As plantas hospedeiras representam a principal forma de sobrevivência dos vírus. Existem na natureza diversas espécies cultivadas, daninhas e silvestres, que podem abrigar diversos vírus fitopatogênicos, funcionando como reservatórios de patógenos, atuando, portanto como fonte de inóculo (Bedendo, 1995).

As viroses são consideradas economicamente importantes e apresentam sintomas característicos, embora possam variar em intensidade e até mesmo se tornarem latentes, dependendo da espécie, da cultivar e do clima. Entre as viroses, duas foram estudadas neste trabalho, sendo uma causada pelo vírus do mosaico do pepino e a outra causada pelo vírus do mosaico do fumo.

O vírus do mosaico do pepino – *Cucumber mosaic virus* (CMV) - é de ocorrência mundial e está presente em países de diferentes regiões geográficas e de condições climáticas distintas (Palukaitis et al., 1992). Este vírus apresenta a maior gama de hospedeiras conhecida, mais de 1.200 espécies em 100 famílias de plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas, incluindo cereais, frutas, legumes, plantas ornamentais, medicinais e aromáticas bem como plantas daninhas (Samad et al., 2008). Devido à sua alta variabilidade genética, há um grande número de estirpes que podem ser classificadas em dois subgrupos, CMV-I e CMV-II, de acordo com as características moleculares e hospedeiras diferenciadoras (Palukaitis et al., 1992).

O vírus do mosaico do fumo – *Tobacco mosaic virus* (TMV) não possui vetor natural. Ele é transmitido com alta eficiência pelas sementes e, ainda, pelo contato mecânico entre plantas, durante as operações manuais de transplante, amarração e desbrota, e pelo contato de implementos agrícolas contaminados. Podem permanecer ativos por vários meses no solo em restos de folhas e raízes secas. Possuem amplo círculo de hospedeiras, porém quase restrito às solanáceas. Em ambientes de alta temperatura, a planta doente pode permanecer assintomática. Plantas jovens têm o crescimento retardado, o que pode comprometer a sua produção. Podem ocorrer infecções mistas com outros vírus, tornando as perdas ainda maiores (Lopes e Reis, 2007).

Diversos são os métodos desenvolvidos para a detecção e caracterização de vírus de plantas, pois as plantas infectadas podem apresentar sintomatologia

complexa e infecção mista, além de seus sintomas poderem ser confundidos com deficiência nutricional. Uma diagnose eficiente possibilita correta identificação do agente causal da doença e, conseqüentemente, contribui para o estabelecimento de medidas eficientes ao seu controle. (Lima, 2009).

Os objetivo deste trabalho foi avaliar os sintomas da infecção simples e mista em quatro hospedeiras distintas de um isolado do *Cucumber mosaic vírus* e de um *Tobamovirus* de tomateiro, determinando a concentração relativa de cada vírus nas hospedeiras, utilizando os testes DAS-ELISA e de RT-PCR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Hospedeiras

Diversas plantas são hospedeiras comuns do CMV e TMV. Neste trabalho, foram utilizadas quatro hospedeiras distintas: o pimentão, o tomateiro, o fumo e a *Gonphrena globosa*, nas inoculações simples e mistas de cada vírus.

2.1.1. Pimentão (*Capsicum annuum*)

Cultivado em todo o mundo, o pimentão destaca-se como uma das dez hortaliças mais importantes economicamente no Brasil. De vasta distribuição geográfica, é cultivado em regiões tropicais e temperadas, possuindo uma ampla variabilidade genética (Pickersgill, 1997).

O pimentão pertence à família *Solanaceae* e ao gênero *Capsicum*. As espécies cultivadas do gênero *Capsicum* são *C. annuum* (pimentão, pimentas e pimentas ornamentais), *C. baccatum* (pimentas, como dedo-de-moça, cambuci e chapéu-de-frade), *C. chinense* (pimentas-de-cheiro ou pimenta-de-bode, como murici, murupi e pimenta-de-bico), *C. frutescens* (pimentas malagueta e tabasco) e *C. pubescens*, que não é cultivada comercialmente no Brasil (Pickersgill, 1997).

O número de espécies classificadas nesse gênero é variável, compreendendo cerca de 20 a 25 espécies, normalmente classificadas de acordo com o nível de domesticação. O centro de diversidade de formas cultivadas de *Capsicum annuum* é o México (Casali e Couto, 1984).

As doenças mais importantes e mais complexas para as espécies do gênero *Capsicum* são as viroses, que podem afetar a produtividade e resultar em grandes prejuízos na produção. A severidade de sintomas, assim como as perdas, é mais pronunciada quando a planta é infectada ainda no estágio de mudas. A intensidade dos sintomas em plantas afetadas depende da espécie e do nível de resistência da variedade, assim como a idade da planta na época em que ocorre a infecção, nível de virulência da estirpe do vírus, ocorrência de mais de um vírus infectando a planta, condições ambientais e nutrição da planta (Lima et al., 2010).

Existem cerca de vinte vírus que infectam essa espécie, sendo os mais importantes pertencentes aos gêneros *Begomovirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Tospovirus* e *Cucumovirus* (Moura et al., 2012). Dentre os *Potyvirus*, os mais importantes são o *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) e o *Potato virus Y* (PVY). Entre os *Tospovirus*, os mais importantes são o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), o *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e o *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV). O *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) é o mais importante entre os *Tobamovirus* e o *Cucumber mosaic vírus* (CMV) entre os *Cucumovirus* (Inoue-Nagata et al., 2002; Pernezny et al., 2003). Os sintomas ocasionados pelas diferentes espécies de vírus são variados e a diagnose no campo é bastante difícil, principalmente quando ocorrem as infecções mistas (Moura et al., 2012).

2.1.2. Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

O tomateiro foi classificado por Miller em 1754 como *Lycopersicon esculentum* Mill e renomeado por Child, em 1990, e por Peralta e Spooner, em 2006, como *Solanum lycopersicum* L., nome científico utilizado atualmente (Diez; Nuez, 2007). O tomate pertence à ordem *Tubiflorae*, família *Solanaceae* e ao gênero *Solanum* (Santos, 2009). É originário da zona andina de América do Sul, mas foi domesticado no México e introduzido na Europa em 1544. Mais tarde, disseminou-se para a Ásia meridional e oriental, África e Oriente Médio (Naika et al., 2006).

O tomateiro é uma das hortaliças mais plantadas e consumidas no Brasil e no mundo, depois da batata. No mundo, foram produzidas em 2010 cerca de 145,75 milhões de toneladas, segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Os principais países produtores de tomate são: China (29% da produção mundial), Estados Unidos (9%), Índia (8%) e Turquia (7%). O Brasil é o nono maior produtor, produzindo em 2010 quase 3% da produção mundial de tomates (FAO, 2012). Segundo o IBGE, em 2011, o Brasil produziu cerca de 3.753.961 t. Segundo dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - LSPA/IBGE (2012), o estado de São Paulo é o maior produtor de tomate, alcançando uma produção aproximada de 651 mil toneladas, com área produtiva de 10 mil hectares, na safra de 2012.

Esta cultura está sujeita a várias doenças que, dependendo do nível de

resistência genética da cultivar usada, podem limitar sua produção. A importância de uma ou mais doenças em uma dada região depende de vários fatores, entre eles a temperatura, a umidade, a época do ano, as variedades e/ou híbridos cultivados, as condições de cultivo (campo aberto ou plasticultura) e o manejo da cultura. Várias destas doenças só podem ser controladas eficientemente quando se adota um programa de manejo integrado adequado, envolvendo o uso de cultivares resistentes e a adoção de medidas de exclusão, erradicação e proteção (Kurozawa et al., 1997).

O tomateiro é muito susceptível a doenças causadas por vírus. O sintoma mais importante de infecções de vírus é a cor clara (branca ou amarela) das folhas ou o padrão de mosaico de tonalidades verdes claras e escuras nas folhas. Em muitos casos, uma doença viral leva a um crescimento retardado e deformações de caules e folhas. Alguns vírus encontrados na cultura do tomateiro são: vírus do mosaico do fumo (*Tobacco mosaic virus*, TMV); vírus do mosaico do tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV); vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV); vírus Y da batateira (*Potato virus-Y*, PVY); vírus do enrolamento da batateira (*Potato leafroll virus*, PLRV); vírus do vira-cabeça do tomateiro (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) (Naika et al., 2006).

2.1.3. Fumo (*Nicotiana tabacum*)

O fumo pertence à família *Solanaceae*, gênero *Nicotiana*, espécie botânica *Nicotiana tabacum*. O gênero *Nicotiana* compreende cerca de 60 espécies que, dependendo de sua morfologia, distribuição geográfica e do número de cromossomos, tem sido agrupadas em três subgêneros, *Rustica*, *Tabacum* e *Petunoides* (Company, 1981).

Atualmente, as viroses são os principais problemas da cultura do tabaco, destacando-se o *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Valle, 2008). O TMV encontra-se amplamente distribuído por todas as regiões onde o fumo é cultivado. A redução na produção de plantas individuais infectadas usualmente é menor que 15%. No entanto, as altas incidências desse vírus tornam a doença uma das mais importantes da cultura. O TMV já foi relatado em 199 espécies de 30 famílias, sendo as solanáceas as fontes de inóculo mais importantes. Os sintomas surgem em plantas de qualquer idade, podendo variar em função da estirpe do vírus presente e

da reação a cultivares. Geralmente, causam redução da área foliar, acompanhada de rugosidade e malformação das folhas, que se apresentam mais afiladas e espessas. No limbo foliar, observa-se a presença de mosaico típico, ou seja, áreas verde-claras ao lado de áreas normais. As plantas com mosaico podem apresentar o dobro de nicotina que as plantas sadias da mesma variedade (Godoy e Salgado, 1997).

O CMV também se encontra amplamente distribuído por todas as regiões produtoras e, em condições de campo, é extremamente difícil distinguir seus sintomas daqueles causados pelo TMV. Possui uma ampla faixa de hospedeiros e os sintomas variam de acordo com a estirpe do vírus e a cultivar do fumo. O sintoma mais comum é o mosaico típico. A transmissão no campo é feita por mais de 60 espécies de afídeos, de forma não-persistente. A transmissão por sementes tem sido relatada em várias espécies, mas não em fumo (Godoy e Salgado, 1997).

2.1.4. *Gomphrena globosa*

Gomphrena globosa pertence à família *Amaranthaceae*. Conhecida vulgarmente no Brasil como gonfrena, imortal, manto-de-cristo, perpétua e sempre-viva, é uma erva anual ramificada que é cultivada em jardins. É nativa da América do Norte, América do Sul, Mianmar e Índia. De um total de 80 espécies do gênero catalogadas na América do Sul, 54 são encontradas no Brasil, sendo que *G. globosa*, diferentemente das demais espécies encontradas no país, é considerada exótica (Siqueira, 1985).

Correa e Bernal (1989) relatam ser uma espécie cultivada em muitas regiões do mundo e que, apesar de ter sido descrita na Índia, sugerem ser nativa da América.

A *G. globosa* é amplamente utilizada em jardins e cultivada para fins ornamentais e medicinais, servindo de forração em canteiros a pleno sol. Sua utilização tem sido relatada dentro do aspecto medicinal para enfermidades cardíacas (Correa e Bernal, 1989).

2.2. Vírus

Os Vírus são agentes infecciosos simples que apresentam seu genoma constituído por uma ou mais moléculas de ácidos nucléicos (DNA ou RNA),

envolvidos por uma capa protetora, constituída por um ou mais tipos de proteínas, estando associados a doenças em diversas culturas agrícolas (Zerbini, 2006).

2.2.1. Tobacco mosaic virus

O TMV pertence à família *Virgaviridae*, gênero *Tobamovirus* e à espécie *Tobacco mosaic virus*. Seu genoma é composto por um RNA de fita simples, sentido positivo, contendo aproximadamente 6.400 bases. O vírus é um bastonete rígido (18 nm x 300 nm), consistindo de aproximadamente 2.130 subunidades idênticas na capa protéica, organizadas em torno de uma hélice, revestindo a fita simples de RNA. O genoma do TMV codifica pelo menos quatro proteínas (Goelet et al., 1982). A primeira e a segunda, fase aberta de leitura (*open reading frame*, ORF), codificam as proteínas 126K e a 183K, responsáveis pela replicação do RNA, a qual inclui a produção de RNAs subgenômicos. Três RNAs podem ser detectados em células infectadas pelo TMV: o RNA I₁, cuja função, embora tenha sido encontrado por diferentes pesquisadores, ainda é desconhecida; O RNA I₂, responsável pela produção da proteína 30K, tem a função de promover o movimento célula a célula do vírus; e o RNA subgenômico da proteína capsidial 17K, cuja função é de formar o capsídeo. Além disso, a proteína capsidial está envolvida no fenômeno de proteção cruzada e, possivelmente, no movimento do vírus em longa distância (Citovsky et al., 1992, Meshi et al., 1987). O grande número de hospedeiras de alguns isolados incluem *Nicotiana tabacum* L., *Petunia* sp, tomate e espécies de *Zinnia* (Carner et al., 1990; Bastos et al., 1999; Maritan e Gaspar, 2001; Moreira et al., 2001).

O TMV é conhecido por infectar pelo menos 199 espécies de 30 famílias de plantas. Causa prejuízos, devido à redução da área foliar, rugosidade e má formação. Além disso, plantas de fumo doentes podem apresentar maiores teores de nicotina, comparadas a plantas saudáveis (Valle, 2008). Causam graves doenças nas culturas do tomate e os sintomas incluem folhas com manchas amarelas e verdes, folhas enroladas, crescimento retardado (nanismo) e descoloração dos frutos. (Naika et al., 2006).

Não possui o TMV vetores conhecidos e é normalmente transmitido mecanicamente ou por contato pessoal, ou seja, plantas saudáveis podem ser infectadas

por máquinas ou com mãos humanas que tiveram contato plantas doentes. (Naika et al., 2006).

2.2.2. *Cucumber mosaic virus*

O CMV pertence à família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus* e à espécie *Cucumber mosaic virus* (Francki et al., 1979). Apresenta grande número de hospedeiras e sua distribuição é bastante ampla, ocorrendo pelo mundo inteiro, tanto nas zonas temperadas como tropicais. É transmitido por várias espécies de afídeos, de uma forma não-persistente. Existe uma variedade de isolados que diferem em relação à gama de hospedeiras e patogenicidade (Francki et al., 1979; Palukaitis, 1992). O vírus do mosaico do pepino (CMV) é o membro tipo do gênero *Cucumovirus*. É um vírus de partículas isométricas, com diâmetro variando de 28 a 30 nm. O capsídeo é composto por 180 subunidades protéicas com massa molecular de 24 kDa. (Palukaitis et al., 1992). O CMV causa grandes perdas em hortaliças, plantas ornamentais e frutas e é destrutivo devido à sua rápida disseminação por mais de 60 espécies de afídeos no campo.

O genoma do CMV é de RNA fita simples, positivo e dividido em três partículas: RNA 1, RNA 2 e RNA 3. O primeiro, contendo 3.350 nucleotídeos, codifica a proteína 1^a, necessária para a replicação do genoma do vírus. O RNA 2, com nucleotídeos, codifica duas proteínas: 2a e 2b. A primeira proteína está envolvida na replicação do vírus e a segunda está relacionada à supressão do mecanismo de silenciamento gênico do hospedeiro e é responsável pela disseminação sistêmica e pela virulência do vírus. A partícula RNA 3, com 1.030 nucleotídeos, possui variação no número de nucleotídeos na região 3', não traduzível em estirpes diferentes e ainda possuiu um RNA 4 (691 nucleotídeos), que é subgenômico e sintetizado a partir do RNA 3 e contém a ORF (Open Reading Frame, ou fase aberta de leitura) da proteína capsidial (Palukaitis et al., 1992). O RNA 3 codifica duas proteínas, a proteína 3a e a proteína da capa proteica. A proteína 3a, proteína de movimento (MP), é requerida para o movimento do vírus de célula a célula e à longa distância. E a proteína da capa protéica está associada à partícula viral e é determinante para a transmissão por afídeos (Palukaitis et al., 1992).

Alguns isolados do CMV podem apresentar um pequeno RNA de 335 a 390 nucleotídeos, denominado RNA satélite (satRNA), geralmente presente no subgrupo II, também chamado de RNA5, o qual depende do vírus para a sua replicação e encapsidação (Aranda et al., 1993). Este RNA satélite não codifica proteínas, mas pode alterar os sintomas induzidos pelo vírus (Kaper e Waterworth, 1977). A presença do RNA satélite geralmente atenua os sintomas causados pelo CMV, por afetar seu nível de replicação (Palukaitis et al., 1992), fato com apenas uma exceção relatada na França. Um RNA satélite, chamado CARNA 5, encontrado em isolados do CMV de tomateiro, causou danos severos e necrose nas plantas infectadas (Kaper e Waterworth, 1977).

2.3. Infecção mista de vírus de plantas

Sabe-se que a concentração de um vírus na planta indica a capacidade que ele tem de se replicar dentro do hospedeiro. De acordo com os resultados de Wintermantel et al. (2008), isso pode variar em função do hospedeiro e dos vírus envolvidos em infecções simples ou mistas.

Nas infecções mistas entre dois ou mais vírus, podem acontecer relações sinérgicas, causando aumento ou decréscimo na concentração dos vírus na planta, modificação nos sintomas da doença e/ou alteração na movimentação sistêmica dos vírus, onde a severidade dos sintomas é maior que a adição dos efeitos do vírus isoladamente (Oliveira et al., 2000; Jadão et al., 2004).

Muitos casos de sinergismo envolvem espécies do gênero *Potyvirus*. Exemplos clássicos incluem a interação do *Potato virus X* (PVX) com vários *Potyvirus*, entre eles o *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) e *Tobacco etch virus* (TEV), infectando espécies de *Nicotiana* e diversas outras solanáceas. Nesses casos, o aumento da severidade dos sintomas é relacionado com um aumento do acúmulo do PVX, não havendo aumento ou decréscimo da concentração do *Potyvirus* (Jadão et al., 2004).

Wintermantel et al. (2008), usando Real-time RT-PCR, compararam *N. benthamiana*, inoculadas com *Tomato chlorosis virus* (ToCV), e *Tomato infectious chlorosis virus* e observaram que a concentração do TICV aumentou, enquanto a do ToCV diminuiu na infecção mista, em comparação com a infecção dos dois vírus separadamente. García-Cano et al. (2006) relataram um aumento do título viral e da

expressão dos sintomas em plantas de tomate cvs Moneymaker e Anastasia F1 (Seminis) duplamente infectadas com o ToCV e o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), quando comparadas às plantas infectadas com esses dois vírus isoladamente. Essas plantas foram inoculadas primeiramente com o ToCV e, após 10 dias, foram inoculadas com o TSWV. Durante os 15, 20 e 25 dias após a inoculação, houve um grande aumento do título do ToCV e as variedades de tomateiro, contendo o gene de resistência Sw-5 para o TSWV, tiveram sua resistência quebrada com a interação sinérgica desses vírus. Quando plantas susceptíveis foram inoculadas, concomitantemente, com esses dois vírus, elas morreram rapidamente.

Wintermantel (2005) observaram o sinérgismo entre *Beet mosaic virus* (BtMV), *Beet yellow virus* (BYV) e *Beet western yellow virus* (BWYV) em plantas de beterraba, que ocasionou aumento no título dos três vírus no tecido foliar das plantas testadas e o conseqüente aumento na severidade dos sintomas. Foi observada a acentuação do nanismo nas infecções mistas com o BYV e o BtMV, comparado às infecções simples destes vírus, sendo mais pronunciado nas variedades suscetíveis de beterraba. Os sintomas decorrentes da infecção pelo BWYV desenvolveram muito mais rapidamente quando em coinfeção com BtMV que na infecção simples.

Walkey e Payne (1990), observando a infecção mista envolvendo o *Lettuce mosaic virus* (LMV), CMV e BWYV em alface, constataram a ocorrência de sintomas mais severos nas combinações que incluíam o LMV.

A risca do tomateiro ocorre geralmente em tomate quando infectados com TMV e PVX, e apresenta sintomas como mosaico severo, distorção foliar, lesões necróticas, nanismo, e até mesmo a morte prematura das plantas infectadas muito jovens (Balogun et al., 2002).

Diferentes mecanismos têm sido relatados para o aumento dos vírus nas infecções mistas. O aumento de PVX por PVY ou por TMV em tabaco resultou em aumento da concentração viral por célula, e não a partir de um aumento no número de células infectadas pelos vírus (Balogun et al., 2002). Por outro lado, na infecção mista envolvendo CMV e o *Turnip mosaic virus* (TuMV), o aumento do CMV foi largamente atribuído a um aumento no número de células infectadas pelo vírus (Ishimoto et al., 1990 apud Balogun et al., 2002).

Trabalhos de Malapi-Nelson et al. (2009) relatam que o nível de acumulação de *Alfalfa mosaic virus* (AMV) foi significativamente maior na infecção mista, em comparação com a infecção simples. Por outro lado, o nível de *Soybean mosaic virus* (SMV) foi significativamente menor na infecção mista, quando comparado ao nível de acumulação do vírus em plantas com infecção simples. Estas observações sugerem que, em soja, o AMV interage sinergisticamente com SMV numa forma não específica.

Castillo-Urquiza et al. (2006), trabalhando com feijões, relataram que os tratamentos em que a inoculação do *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) precedeu à do *Bean common mosaic virus* (BCMV), em dois intervalos (7 e 21 dias) e levaram a reduções de 82,5% e 88,5% no número médio de vagens por planta em relação à testemunha. Os tratamentos nos quais o BCMV precedeu ao BRMV apresentaram reduções de 64,3% e 48,5% (7 e 21 dias, respectivamente).

A maioria dos estudos de infecções virais mistas se refere a exemplos onde a gravidade dos sintomas é maior quando estão presentes dois vírus. Por exemplo, em plantas infectadas, separadamente, com o PVX e o TEV, estas apresentaram menores índices de doença. No entanto, em combinação, houve um agravamento de sintomas de forma devastadora, correlacionado à acumulação acentuada do PVX. Neste caso, o *Potyvirus* suprimiu as defesas da hospedeira, facilitando a infecção por outros vírus (Vance et al., 1995).

Murphy e Kyle (1995) relatam que Avelar, uma cultivar de pimenta resistente ao *Pepper mottle virus* (PepMoV), deixou de ser resistente quando coinfectedada com o CMV. Em plantas coinfectedadas com o TuMV e o vírus do mosaico da couve-flor (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV), houve acúmulo do TuMV 77% maior que em infecções simples, enquanto o acúmulo do CaMV foi 56% menor. Este resultado demonstra que o TuMV leva à exclusão competitiva do CaMV (Martin e Elena, 2009).

2.4. Métodos de detecção e caracterização de vírus de plantas

Diversos são os métodos desenvolvidos para a detecção e caracterização de vírus de plantas, os quais são importantes, pois as plantas infectadas podem apresentar sintomatologia complexa e infecção mista, além de seus sintomas poderem ser confundidos com deficiência nutricional, outros patógenos, ou com

fatores abióticos. A ocorrência de infecção latente é outro fator a ser considerado, pois propicia a disseminação de vírus quando plantas apresentando este tipo de infecção são utilizadas como plantas matrizes (Lima, 2009).

Uma diagnose eficiente, com uma identificação correta do agente causal da doença, é essencial para o estabelecimento de medidas eficientes ao seu controle. Assim, métodos sorológicos e moleculares vêm sendo utilizados na detecção e caracterização de vírus de plantas (Lima, 2009).

2.4.1. Métodos sorológicos

Os métodos sorológicos são caracterizados por utilizarem anticorpos específicos, capazes de reconhecer proteínas capsidiais e o mais utilizado na detecção de vírus em plantas é o método ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). O primeiro registro da utilização deste método na detecção de vírus em material vegetal foi de Clark e Adams em 1977 (Lima, 2009).

O ELISA baseia-se no princípio clássico da sorologia que forma o complexo antígeno-anticorpo, onde o antígeno (Ag) é reconhecido pelo anticorpo (Ac) (Imunoglobulina), associado a propriedades colorimétricas (Almeida, 2001).

O método ELISA é considerado um teste que também serve para identificar e quantificar vírus de plantas. Porém, sua eficiência dependerá, além de outros fatores, da qualidade do antissoro produzido contra um antígeno específico, do suporte físico utilizado, da preparação do conjugado, das concentrações adequadas dos reagentes e do extrato vegetal que contém o vírus. Esse extrato vegetal, às vezes, pode conter substâncias que interferem nos resultados, podendo apresentar falsos positivos, mesmo em plantas sadias (Almeida, 2001).

Existem diversas variações do teste ELISA, mas todas elas necessitam de um princípio básico, que é a aderência de macromoléculas a vários tipos de suportes físicos, como: vidro, borracha, plástico, silicone, membranas de nitrocelulose ou náilon, por meio da adsorção. Esse teste pode ser basicamente classificado em ELISA direto e indireto. No Elisa direto, utiliza-se a Imunoglobulina (IgG) e o conjugado produzido em apenas um animal; no ELISA indireto, utilizam-se duas IgG, uma para reconhecer o antígeno e outra (anti-IgG), produzida em diferente espécie de animal, reconhece e se liga à primeira IgG (Almeida, 2001).

Segundo Clark e Bar-Joseph (1984), várias são as enzimas citadas para a obtenção de conjugados, sendo a fosfatase alcalina e a peroxidase as mais utilizadas na diagnose de vírus de plantas. A fosfatase alcalina apresenta a vantagem de se ligar facilmente à imunoglobulina Ig por meio do gluteraldeído e sua reação cinética com o substrato é linear. Quando a enzima conjugada à Ig é a fosfatase alcalina, o substrato utilizado é o p-nitrofenilfosfato dissódico que, inicialmente, é incolor e, ao ser transformado pela enzima em p-nitrofenolfosfato, torna-se uma solução amarela (Almeida, 2001). A avaliação é feita por meio da leitura da absorbância, em uma leitora de placas com filtro de 405 nm. São consideradas positivas as amostras que apresentarem leitura pelo menos duas vezes superior ao extrato de planta sadia, utilizado como controle negativo (Lima, 2009).

2.4.2. Métodos moleculares

O método molecular baseia-se na detecção de ácido nucléico (Mullis et al., 1986). A amplificação e a detecção de material genético do vírus são realizadas por meio da RT-PCR, no caso de vírus de RNA, ou apenas PCR para vírus de DNA (Lima, 2009).

O processo de RT-PCR envolve as enzimas transcriptase reversa e *Taq* DNA polimerase, sendo a reação automatizada pela incubação em um termociclador programado para executar a transcrição reversa do RNA em DNA complementar e os múltiplos ciclos da PCR, visando a produzir um grande número de cópias do fragmento alvo deste DNA. Dessa forma, a amplificação seletiva de um fragmento do genoma do vírus, compreendido entre dois oligonucleotídeos (*primers*), é realizada a partir do RNA do vírus utilizado como molde (Lima, 2009).

A reação de PCR é composta por ciclos repetitivos, geralmente 30 a 40 ciclos, cada qual composto por três etapas com temperaturas e tempos distintos: (1) desnaturação das fitas duplas de DNA, que fazem com que o DNA molde, originalmente dupla fita, e separe-se em fitas simples, devido ao rompimento das pontes de hidrogênio que garantem as ligações entre as bases nitrogenadas; (2) pareamento, no qual os dois oligonucleotídeos se ligam a regiões complementares do DNA fita simples; (3) Extensão das cadeias de DNA, na qual a *Taq* DNA polimerase se liga aos oligonucleotídeos correspondentes e utiliza os

nucleotídeos livres para completar a síntese dos fragmentos de DNA (Almeida, 2001).

Uma dificuldade para seu uso em larga escala são os frequentes falsos positivos, causados pela contaminação de pipetas e reagentes, e a sensibilidade da enzima utilizada nas reações diante da presença de substâncias inibidoras em determinados extratos vegetais (Almeida, 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem dos isolados

3.1.1. Origem do isolado de CMV

O isolado do CMV foi obtido de vinca (*Catharanthus roseus*), cultivada em Marialva-PR, e foi identificado previamente por Pelison et al., (2011), no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, tendo parte da região codificadora de sua capa proteica sequenciada (GenBank JQ894820).

3.1.2. Origem do isolado de *Tobamovirus*

O isolado de *Tobamovirus* foi obtido de tomateiro (*Solanum lycopersicum*), proveniente de Marialva-PR. Os trabalhos para identificação do vírus se iniciaram com a semeadura de sementes de cinco variedades de tomate (Gaúcho melhorado, Santa Cruz, Jumbo, Bona F1 e Alambra F1), em bandejas de isopor com 128 células, com substrato Plantmax®. Posteriormente, foram transplantadas para vasos de plástico n.º 3, contendo uma mistura de terra, areia e substrato comercial. Quando apresentavam o terceiro par de folhas, foi realizada a inoculação. O inóculo foi preparado, macerando-se folhas de plantas de tomate, naturalmente infectadas com vírus, em almofariz, com solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, contendo sulfato de sódio 0,01 M, na proporção de 1:10 (1g de folha para 10 mL de tampão). O extrato obtido foi friccionado, manualmente, em folhas novas e sadias das plantas-teste, polvilhadas com carvão vegetal moído (Almeida, 2009). Em seguida, as folhas foram lavadas com água, para remoção do excesso de inóculo e do abrasivo, e as plantas foram mantidas em casa de vegetação para observação de sintomas e para aplicação dos testes de DAS-ELISA e RT-PCR.

Os trabalhos foram conduzidos em casa de vegetação e no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá e, para o sequenciamento, as amostras foram enviadas para o Setor de Sequenciamento de DNA, Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo – USP. Foi identificada a espécie TMV,

após a realização de ensaios DAS-ELISA e de RT-PCR, e o sequenciamento parcial da região genômica codificadora da proteína de movimento viral.

3.2. DAS-ELISA para determinação da espécie de *Tobamovirus*

Os testes DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich - Enzyme Lynked Immunosorbent Assay) foram realizados, utilizando antissoros comerciais para o ToMV e TMV e seguindo as recomendações do fabricante (Agdia®), a partir de folhas inoculadas de tomate da cv. Santa Cruz, apresentando sintomas característicos de infecção viral. Para o controle negativo, utilizou-se folhas sadias da mesma cultivar.

3.3. RT-PCR e sequenciamento para confirmação da identificação do isolado de *Tobamovirus*

Para a confirmação da identificação da espécie como sendo TMV, foram realizados testes de RT-PCR com *primers* específicos para o ToMV e TMV. Foram utilizados os *primers* ToMV (F) (5' CATCTGTATGGGCTGAC 3') e ToMV (R) (5' GAGGTCCARACCA AMCCAG 3'), que amplificam um produto de 421 pb (Chen et al., 2011), e os *primers* TMV-1 (5' GACCTGACAAAATGGAGAAGATCT 3') e TMV-2 (5' GAAAGCGGACAGAAACCCGCTG 3'), que amplificam um produto de 422 pb (Jacobi et al., 1998).

3.4. Clonagem e sequenciamento do produto de RT-PCR obtido

O produto de amplificação obtido por RT-PCR foi ligado ao vetor de clonagem do Kit pGem[®]-T Easy Vector Systems (Promega), na proporção de 1 µL de água DEPC, 5 µL de 2x Rapid Ligation Buffer, 2 µL do PCR, 1 µL de pGem[®]-T Easy Vector (50ng) e 1 µL de T4 DNA Ligase com volume final de 10 µL. Os tubos, contendo as reações de ligação foram mantidos em temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, os plasmídios foram inseridos em células competentes de *Escherichia coli* da linhagem DH5α, mediante utilização de choque térmico. Dois µL da reação de ligação foram adicionados em 50 µL de bactérias competentes e mantidos em gelo por 30 minutos. Em seguida, foram transferidos para o banho-maria a 42°C, por 2 minutos, e colocados imediatamente no gelo, permanecendo por 2 minutos em câmara de fluxo laminar. Em todos os tubos, foram adicionados

450 µL de meio SEC [1 mL de meio LB (Luria Broth Base, Invitrogen) líquido, 10 µL de MgCl₂ 1 M, 10 µL de MgSO₄ 1 M, 20 µL de glicose 1M]. As células foram mantidas em agitador a 37°C e agitação de 65 rpm por 1 hora para reestruturação das células competentes. Na sequência, foram adicionados 50 µL da cultura de células em placas, contendo meio LB sólido [20 mL de meio LB sólido, 40 µL de X-gal (20 mg/mL), 200 µL de ampicilina (5 mg/mL) e 7 µL de IPTG 20 mg/mL] e estas foram colocadas em estufa a 37°C por 16 horas.

3.4.1. Seleção e estoque de clones positivos

As colônias foram escolhidas, levando em consideração a coloração. Os clones que apresentaram coloração branca, indicativo da presença do inserto no plasmídeo, foram coletados, com o auxílio de palitos de madeira esterilizados, e transferidos para tubos Falcon, contendo 5 mL de meio LB líquido e 50 µL de ampicilina (5 mg/mL). Os tubos foram mantidos a 37°C, por 16 horas, sob agitação para a multiplicação das células. Para o estoque dos clones positivos, foram adicionados, em cada microtubo, 150 µL de glicerol e 850 µL da cultura, os quais foram posteriormente estocados em freezer a -80°C. Com o restante da cultura, foi realizada a extração do DNA plasmidial.

3.4.2. Extração do DNA plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial, foi utilizado o Kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Seiscentos µL da cultura de bactéria em meio LB foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL, adicionando-se 100 µL de Cell Lysis Buffer, invertendo o tubo por 6 vezes, seguindo com a adição de 350 µL de solução neutralizante e centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para uma microcoluna acoplada a um novo tubo, seguido de uma centrifugação a 14.000 rpm por 15 segundos.

Descartado o que efluiu da microcoluna, foram adicionados 200 µL de “Endotoxin Removal Wash” e novamente foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 15 segundos, seguindo com a adição de 400 µL de “Column Wash solution” e centrifugação a 14.000 rpm por 30 segundos. A microcoluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e foram adicionados 30 µL de “Elution Buffer” e, na sequência,

incubou-se em temperatura ambiente por 1 minuto, seguido de uma centrifugação a 14.000 rpm, por 15 seg, para eluir o DNA plasmidial.

3.4.3 Sequenciamento do produto de amplificação por RT-PCR

Os fragmentos clonados foram submetidos ao sequenciamento automático. Para cada amostra, foram utilizados 5 µL de DNA plasmidial e 2 µL do *primer* TMV 1 ou TMV 2, uma vez que não houve amplificação com *primers* ToMV (F) e ToMV (R).

As amostras foram enviadas para o Setor De Sequenciamento de DNA, Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, na Universidade de São Paulo (USP). O sequenciamento de DNA foi realizado utilizando o sequenciador ABI 3730 DNA Analyser, um sistema de análise de DNA de 48 capilares, com a tecnologia Applied Biosystems. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (código 4337456). As sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analyses 5.3.1, utilizando o Base Caller KB.

Foi utilizado o Programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), do National Center for Biotechnology Information (NCBI), para analisar a identidade por comparação com sequências de outros *Tobamovirus* depositadas no GenBank.

3.5. Inoculações simples e mistas do TMV e do CMV em diferentes hospedeiras

Para a realização das análises, foram utilizadas quatro hospedeiras, o tomate, o fumo, o pimentão e a *G. globosa*. O experimento consistiu de seis tratamentos sendo estas plantas inoculadas com TMV e CMV separadamente, plantas inoculadas com ambos os vírus simultaneamente, plantas inoculadas primeiramente com TMV e após 10 dias com CMV, plantas inoculadas primeiramente com CMV e após 10 dias com TMV e, por fim, foram utilizadas plantas sadias como controle. Cada tratamento consistiu de cinco repetições e em cada repetição era inoculada uma planta por vaso. O experimento foi repetido duas vezes.

As inoculações foram efetuadas com inóculos preparados por meio da maceração de tecidos vegetais infectados de tomate com a adição de tampão fosfato de potássio pH 7,5, na proporção 1:10 (g/mL). O extrato obtido foi friccionado manualmente com as mãos, na face superior das folhas novas e sadias das plantas

teste (tomate, pimentão, fumo e *G. globosa*), e polvilhadas com carvão vegetal moído, conforme Almeida, (2001). Em seguida, as folhas foram lavadas com água para remoção do excesso de inóculo e do abrasivo e as plantas foram mantidas em estufa plástica para observação de sintomas.

Nos tratamentos constituídos da inoculação com as duas espécies virais, estas foram efetuadas isoladamente em folhas diferentes, na mesma ocasião e após 10 dias da primeira inoculação.

A evolução dos sintomas nas plantas inoculadas nos diferentes tratamentos foi acompanhada periodicamente, comparadas e fotografadas. Para a confirmação da presença dos vírus nas plantas inoculadas com vírus individuais ou em inoculações simultâneas com ambos os vírus, foram conduzidos, vinte e cinco dias após as inoculações, testes DAS-ELISA e de RT-PCR multiplex.

3.6. Detecção do TMV e do CMV após as inoculações simples e mistas por meio do DAS-ELISA e análise dos resultados pelo teste de Tukey

Os testes DAS-ELISA utilizados para a detecção do TMV e do CMV foram conduzidos após vinte e cinco dias das inoculações. O teste foi realizado conforme recomendações do fabricante (Agdia®), utilizando folhas de tomate, pimentão, fumo e *G. globosa* que apresentavam sintomas de infecção viral. As amostras foram maceradas em almofariz, com tampão de carbonato de sódio, pH 9,6, na proporção de 1:10 (g/ml). Amostras de plantas sadias foram utilizadas como controle negativo.

Primeiramente, adicionou-se aos orifícios da placa 100 µL de antissoros policlonais específicos para o TMV e CMV, diluídos a 1:200 em tampão de cobertura (1,59 g de Na₂CO₃, 2,93 g de NaHCO₃, 0,2 g de NaN₃, pH 9,6). Em seguida, a placa foi incubada dentro de um saco plástico com papel toalha umedecido a 4°C por 18 horas e, após esse período, foram realizadas três lavagens sucessivas de 3 minutos com PBS 1X-Tween (tampão PBS 10X – 80 g de NaCl, 2,0 g de KH₂PO₄, 11 g de NaHPO₄, 2,0 g de KCL, pH 7,4 – diluído para 1X e acrescido de 0,5 mL de Tween 20%).

As amostras de folhas, em seguida, foram maceradas na presença de tampão de cobertura na diluição 1:10 (g/mL). Após, 100 µL de cada amostra foram aplicados nos orifícios da placa, com três repetições por amostra. A placa foi incubada em temperatura ambiente, por 2 horas, dentro de um saco plástico com

papel toalha umedecido e, após esse período, foram realizadas três lavagens sucessivas de 3 minutos com PBS 1X-Tween.

Na sequência, 100 µL do conjugado da Agdia® diluído na proporção 1:200 em tampão ECI (PBST 1X + 20,0 g PVP; 0,2 g NaN₃; 2,0 g soro albumina bovina BSA) foram aplicados em cada orifício, promovendo, novamente, a incubação em temperatura ambiente por 2 horas e a tríplice lavagem com PBS 1X-Tween.

Decorrido o período de 2 horas, 100 µL do substrato p-fosfato de nitrofenil (Agdia®), diluído em tampão substrato (97 mL de dietanolamina e 0,2 g de NaN₃, pH 9,8), foram aplicados nos orifícios. Por fim, a placa foi incubada em temperatura ambiente por 1 hora e procedeu-se à leitura em leitor de ELISA VERSA max tunable, Microplate reader (Molecular Device®) no comprimento de onda de 405 nm. De acordo com o critério adotado para as análises, foram consideradas positivas as médias das leituras que correspondiam ao dobro das médias dos valores de absorbância registrados para os extratos de plantas saudáveis, usadas como testemunha.

Após as leituras, os dados foram submetidos à análise estatística pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3.7. Detecção do TMV e do CMV após as inoculações simples e mistas por meio da RT-PCR multiplex

3.7.1. Extração do RNA total das plantas inoculadas

A extração do RNA total foi realizada, utilizando o reagente Trizol® e seguindo o protocolo do fabricante.

Foram maceradas, em nitrogênio líquido, 100 mg de folhas frescas de tomate, de pimentão, de fumo e de *G. globosa*, até a obtenção de um pó fino, que foi depositado em microtubos de 1,5 mL, adicionando-se 1 mL de Trizol®. As amostras foram homogeneizadas no vortex, por 1 minuto, procedendo-se em seguida a uma incubação em temperatura ambiente, por 5 minutos.

Posteriormente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados, prosseguindo com a homogeneização em vortex, por 15 segundos, e com a centrifugação a 12.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado em novo tubo, adicionando 500 µL de isopropanol, incubando em temperatura ambiente, por 10 minutos, e centrifugando, em seguida, a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C.

O sobrenadante foi descartado e o pellet de RNA lavado com 1 mL de álcool 75%, homogenizando em vortex, seguindo com centrifugação a 7.500 rpm, por 5 minutos, a 4°C. O pellet foi seco, por 10 minutos, e em seguida dissolvido em 20 µL de água tratada com dietil pirocarbonato de sódio (DEPC) e incubado a 55°C, por 10 minutos.

3.7.2. Reação de Transcrição Reversa (RT)

Para a realização da RT-PCR, foram utilizados de cada amostra: 2 µL do RNA total, 3 µL do oligonucleotídeo iniciador CMV I (R) (Quadro 1) (Chen et al., 2011) e 3 µL do oligonucleotídeo iniciador TMV-2 (Quadro 1) (Jacobi et al., 1998). As amostras foram aquecidas a 70°C, por 10 minutos, e imediatamente resfriadas em gelo. Acrescentou-se 2 µL de First-strand Buffer 10X; 2 µL MgCl₂ (25 mM), 1 µL de dNTPs (dGTP, dATP, dCTP, dTTP) a 10Mm, 2 µL de DTT (ditiotreitól) a 0,1M e 7 µL de água DEPC. As amostras foram aquecidas a 42°C, por 5 minutos, e imediatamente resfriadas em gelo. Acrescentou-se 1 µL da enzima transcriptase reversa (M-MLV-RT - Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (200 U) e submeteu-se a um ciclo de 42°C, por 50 minutos.

Quadro 1 – Sequência dos *primers* utilizados nas reações de RT-PCR

Vírus	Código	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')	pb	Autores
CMV	CMV I (F)	GCCACCAAAAATAGACCG	593	Chen et al., 2011
	CMV I (R)	ATCTGCTGGCGTGGATTTCT		
ToMV	ToMV (F)	CATCTGTATGGGCTGAC	421	Chen et al., 2011
	ToMV (R)	GAGGTCCARACCAAMCCAG		
TMV	TMV (F)	CGATGATGATTCGGAGGC	512	Chen et al., 2011
	TMV (R)	GAGGTCCARACCAAMCCAG		
TMV	TMV-I (F)	GACCTGACAAAATGGAGAAGATCT	422	Jacobi et al., 1998
	TMV-2 (R)	GAAAGCGGACAGAAACCCGCTG		

F: forward (senso viral) R: reverse (anti-senso).

3.7.3. Reações de PCR

Para as reações de PCR, foram coletadas alíquotas de 2 µL do cDNA, 5 µL do 10x PCR Buffer (200mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 50% (v/v) glicerol), 3 µL de MgCl₂ (25mM), 1 µL de dNTP mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 10 mM, 3 µL

do *primer* CMV I (F) 10 mM, 3 μ L do *primer* CMV I (R) 10 mM, que amplificam um produto de aproximadamente 590 pb (Chen et al., 2011); 3 μ L do *primer* TMV-2 (R), 3 μ L do *primer* TMV-1 (F), que amplificam um produto de aproximadamente 400 pb (Jacobi et al., 1998) (Quadro 1) e 1 μ L da *Taq* DNA polimerase e 22 μ L de água DEPC. As ampliações foram realizadas em termociclador, programado com 1 ciclo a 94°C, por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C, por 30 segundos, a 62°C, por 45 segundos, a 72°C, por 1 minuto, e um ciclo final a 72°C, por 20 minutos. Os resultados das ampliações foram avaliados por meio de eletroforese em géis de agarose 1,2%, corados com syber-green e visualizados sob luz ultravioleta.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Inoculação do isolado de *Tobamovirus* em tomate

O isolado viral encontrado na região de Marialva-PR foi inoculado em cinco cultivares de tomate (Figura 9). A cultivar Gaúcho melhorado apresentou sintomas de nanismo, afilamento foliar e mosaico. As cultivares mais afetadas foram Alambra F1 e Bona F1, apresentando nanismo intenso, morte de ponteiros, deformação e redução foliar, mosaico, lesão necrótica e clorose. Por último, as cultivares menos afetadas foram a Santa cruz e Jumbo, com sintomas de nanismo, mosaico, bolhosidade e redução foliar.

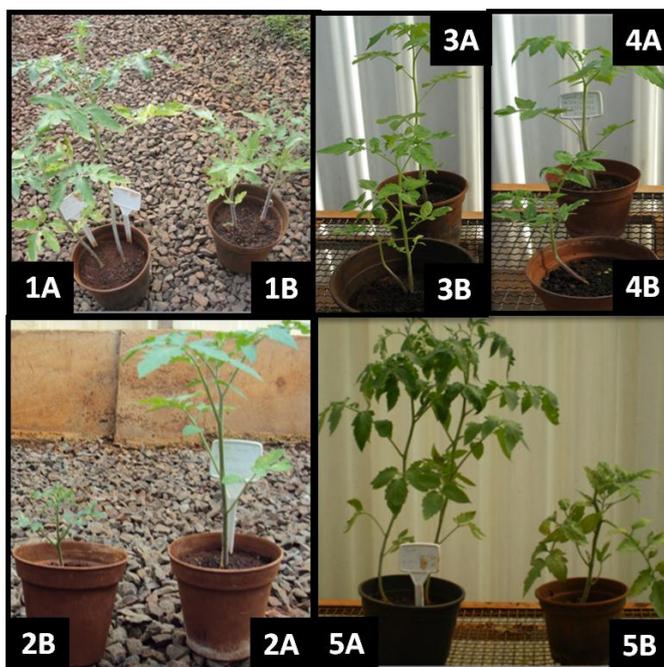


Figura 1 – Diferentes variedades de tomate inoculadas com o TMV. 1: Gaúcho melhorado; 2: Alambra F1; 3: Santa Cruz; 4: Jumbo; 5: Bona F1. A: plantas saudáveis; B: plantas inoculadas.

4.1.1. Identificação da espécie de *Tobamovirus* por meio do teste DAS-ELISA

No teste sorológico DAS-ELISA, nas leituras das placas com o antissoro para o TMV (Figura 2), foi obtido um valor de absorbância de 3,5 e de aproximadamente 0,5 nas leituras com o antissoro para o ToMV (Figura 3). A existência de regiões antigênicas comuns aos dois vírus poderia explicar a reação

observada com o antissoro para o ToMV, embora com leitura de absorvância 6 vezes menor. De acordo com Pfitzner (2006), o TMV está intimamente relacionado ao ToMV e, embora os dois vírus tenham sido historicamente considerados como sinônimos, ou seja, pertencentes à mesma espécie, o ToMV foi separado do TMV no início de 1971, passando a ser considerado uma espécie distinta, de acordo com sua relação sorológica e sequência de nucleotídeos. Utilizando o método ELISA, Jacobi et al. (1998) não diferenciaram de forma confiável o TMV do ToMV, devido à reação cruzada entre os dois vírus.

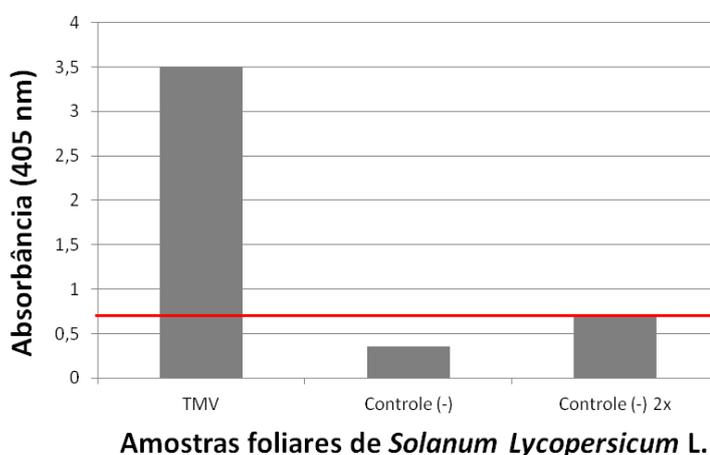


Figura 2 – Valores de absorvância (405nm) do teste DAS-ELISA, com leitura após 1 hora da adição do substrato enzimático, utilizando antissoro para o TMV. Controle negativo: plantas saudias de *Solanum lycopersicum*.

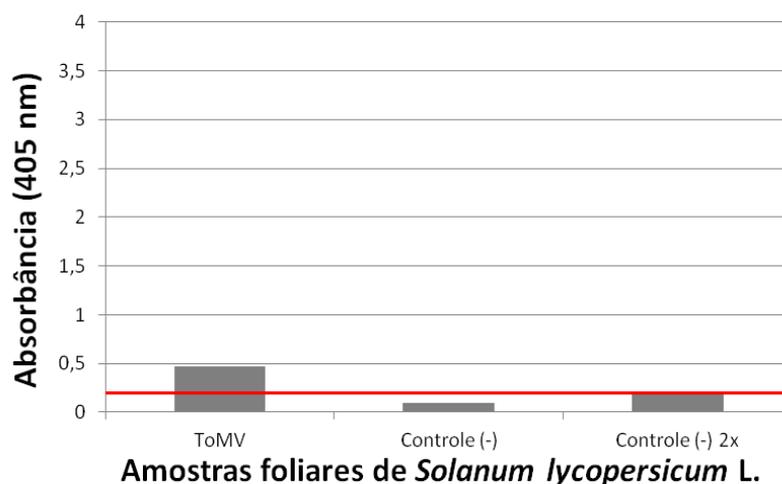


Figura 3 – Valores de absorvância (405nm) do teste DAS-ELISA com leitura após 1 hora da adição do substrato enzimático, utilizando antissoro para o ToMV. Controle negativo: plantas saudias de *Solanum lycopersicum*.

4.1.2. Identificação da espécie de *Tobamovirus* por meio da RT-PCR e sequenciamento

Mediante utilização da RT-PCR, foi amplificado um fragmento de aproximadamente 400 pb (Figura 4) com os *primers* específicos para o TMV. Com os *primers* para o ToMV, não foram obtidas ampliações.

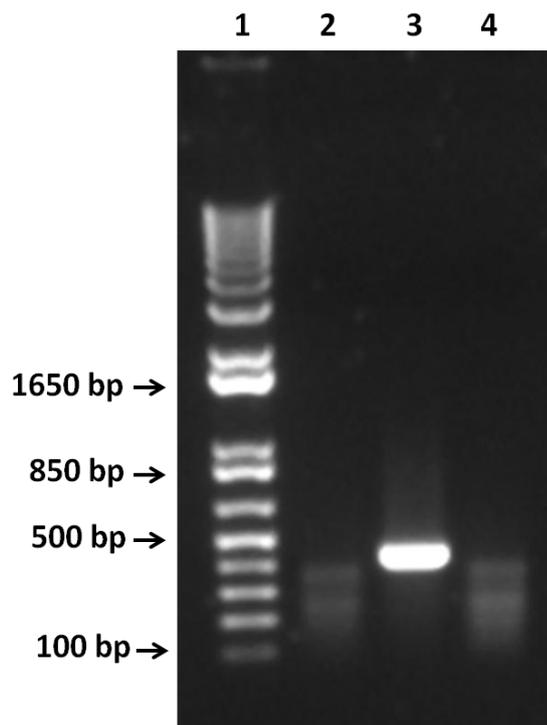


Figura 4 – Produto de PCR em gel de agarose 1,2% de plantas de tomate. 1: Ladder 1 kb ; 2: extratos de plantas saudáveis; 3: amplificação de aproximadamente 400 pb, obtida com o par de *primers* para TMV (Jacobi et al., 1998); 4: ausência de amplificação com o par de *primers* para o ToMV.

Foi realizada a clonagem e o sequenciamento do produto de amplificação, obtido em uma das reações de RT-PCR, para confirmação da espécie de *Tobamovirus* envolvida, uma vez que as propriedades biológicas, sorológicas e moleculares do TMV e do ToMV são semelhantes e para confirmar o resultado preliminar obtido no DAS-ELISA.

Após o sequenciamento, o *Tobamovirus* proveniente de Marialva-PR apresentou valores de identidade que variaram de 97% a 100%, quando comparado a outras sequências do TMV depositadas no GenBank. Apresentou identidade de 100% com o isolado TMV-PR da região de Sapopema-PR e de 99% com o isolado

Tobacco mosaic virus isolado Beipiao da China (Quadro 2). A maioria das identidades foi de 97 e 98% para isolados da China, Coréia do Sul, Espanha, Finlândia, e Canadá.

Quadro 2 – Percentuais de identidade do TMV isolado de *Lycopersicum esculentum* da região de Marialva-PR com outras sequências do TMV depositadas no GenBank

Acesso GenBank	Origem	% Identidade TMV
DQ173945	PR-Brasil	100
HE818426	China	99
HE818412	China	98
HE818458	China	98
AB369275	Coréia do Sul	98
AJ509081	Espanha	98
AF546184	Finlândia	98
JX971629	Canadá	97
AF042033	Canadá	97
HE818419	China	97
HE818430	China	97

4.2. Avaliações dos sintomas causados pelas inoculações simples e mistas do TMV e do CMV

O quadro sintomatológico para as quatro hospedeiras evoluiu com o passar dos dias, prejudicando por completo o desenvolvimento normal das plantas. A maioria das plantas de tomate e pimentão não chegaram a produzir frutos ou, quando isto ocorreu, estes tiveram severa deformação, com tamanho bastante reduzido e endurecidos.

4.2.1. *Nicotiana tabacum*

Nas inoculações individuais de cada vírus, o principal sintoma observado foi de bolhosidade para o TMV e de mosaico para o CMV. Na inoculação mista, os sintomas apresentaram-se mais severos, exibindo desde o início sintomas como mosaico, bolhosidade intensa, deformação, afilamento e redução foliar (Figura 5).

Segundo Godoy e Salgado (1997), o TMV geralmente causa uma redução da área foliar, acompanhada de rugosidade e malformação das folhas, que se apresentam mais afiladas e espessas. No limbo foliar, observa-se a presença de

mosaico típico, ou seja, áreas verde-claras ao lado de áreas normais. Para o CMV, o sintoma mais comum é o mosaico típico, também observado neste trabalho.

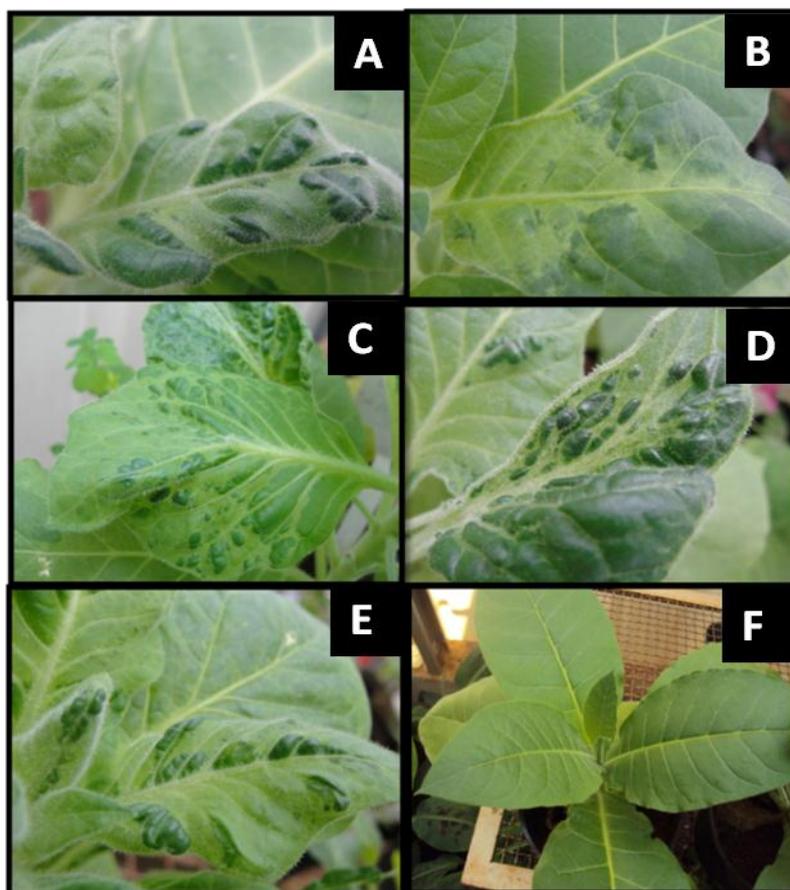


Figura 5 - Sintomas em plantas de fumo. A: plantas inoculadas com o TMV; B: plantas inoculadas com o CMV; C: plantas inoculadas com o TMV e o CMV simultaneamente; D: plantas inoculadas com o TMV e, após 10 dias, inoculadas com o CMV; E: plantas inoculadas com o CMV e, após 10 dias, inoculadas com o TMV; F: planta sadia.

4.2.2. *Capsicum annuum*

Nas inoculações simples do TMV em pimentão, ocorreram sintomas de mosaico, nanismo e de redução foliar. Nas inoculações simples do CMV, além destes sintomas, foi observado afilamento foliar. Ao se tratar da infecção simultânea de ambos os vírus, a intensidade dos sintomas foram mais severos, causando mancha clorótica, mosaico intenso, clorose de nervuras, afilamento nanismo e redução foliar (Figura 6).

Paulus et al. (1962) relatam que os sintomas provocados pelo CMV em pimentão, em geral, são os de mosaico foliar, folhas filiformes e atrofia da planta,

sendo mais severos quando a infecção ocorre nas primeiras folhas verdadeiras da planta. Segundo Atencio et al. (1997), podem ocorrer também sintomas como malformação, atrofia de frutos, manchas e desenhos necróticos em folhas e frutos.

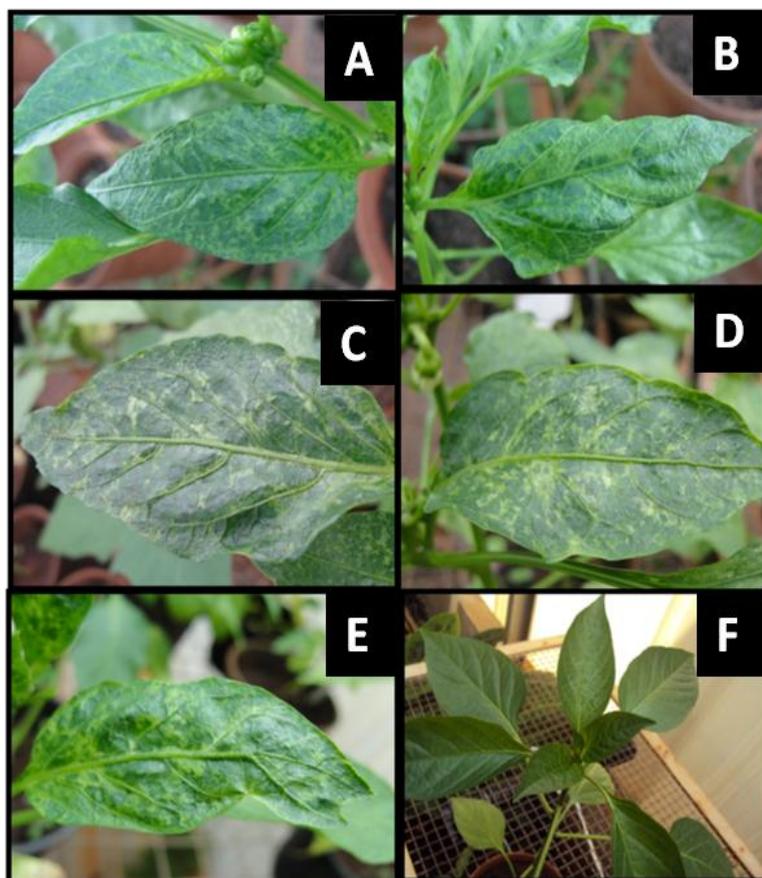


Figura 6 – Sintomas em plantas de pimentão. A: plantas inoculadas com o TMV; B: plantas inoculadas com o CMV; C: plantas inoculadas com o TMV e o CMV simultaneamente; D: plantas inoculadas com o TMV e, após 10 dias, inoculadas com o CMV; E: Plantas inoculadas com o CMV e, após 10 dias, inoculadas com o TMV; F: planta sadia.

4.2.3. *Gomphrena globosa*

As plantas de *G. globosa* foram muito afetadas pelos vírus, tanto nas infecções simples como nas mistas. Os sintomas de infecção simples apresentaram-se na forma de mosaico, mancha clorótica e redução foliar para o TMV. Com o CMV, ocorreu deformação, bolhosidade, mancha necrótica, nanismo e redução foliar. Na infecção mista, sintomas na forma de bolhosidade, mosaico, nanismo, mancha necrótica, deformação e redução foliar se manifestaram (Figura 7).

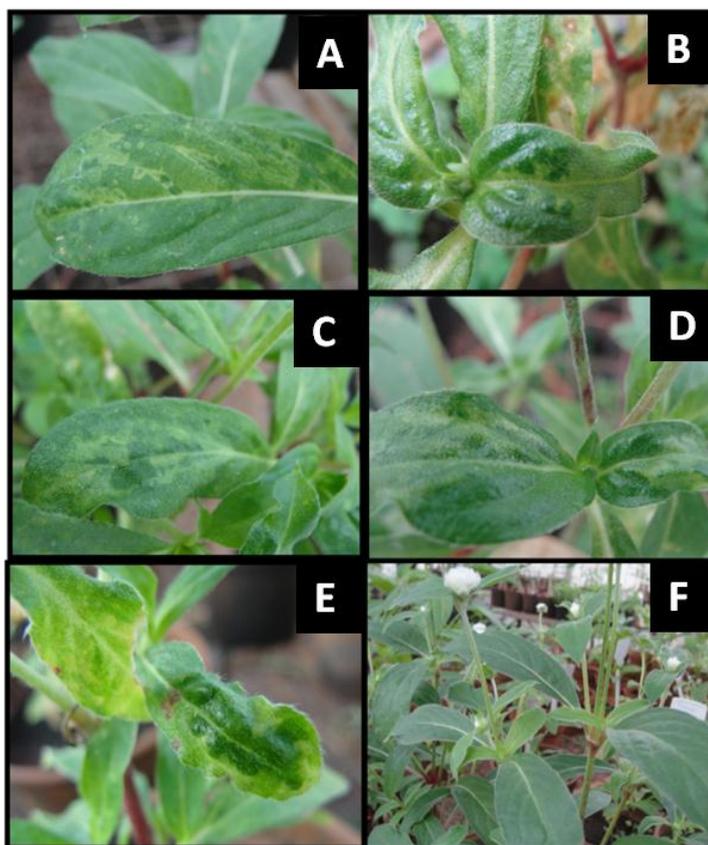


Figura 7 – Sintomas em plantas de *G. globosa*. A: plantas inoculadas com o TMV; B: plantas inoculadas com o CMV; C: Plantas inoculadas com o TMV e o CMV simultaneamente; D: plantas inoculadas com o TMV e, após 10 dias, inoculadas com o CMV; E: plantas inoculadas com o CMV e, após 10 dias, inoculadas com o TMV; F: planta sadia.

4.2.4. *Solanum lycopersicum* L.

As plantas de tomate apresentaram sintomas bastante intensos. Na infecção simples, ocorreu mosaico, bolhosidade e deformação foliar, tanto para o TMV como para o CMV. Para o CMV, houve também afilamento e redução foliar.

Os sintomas indetificados nas infecções mistas foram de mosaico, bolhosidade, redução e deformação foliar, ressaltando-se que as plantas inoculadas com o CMV e, após 10 dias, inoculadas com o TMV, apresentaram, além destes sintomas, nanismo e epinastia severos (Figura 8).

Segundo Lopes e Reis (2007), os sintomas típicos da virose causada por TMV são de mosaico ou mosqueado, alternando de verde-claro a verde-escuro nas folhas. Eventualmente, as folhas podem tomar forma alongada e retorcida. Plantas

jovens têm o crescimento retardado, o que pode comprometer a sua produção. A ocorrência de infecções mistas com outros vírus torna as perdas ainda maiores.

De acordo com Naika et al. (2006), o CMV causa nanismo dos tomateiros. Nas folhas, pode aparecer um ligeiro mosqueado verde ou sintomas de afilamento, com redução da superfície foliar.

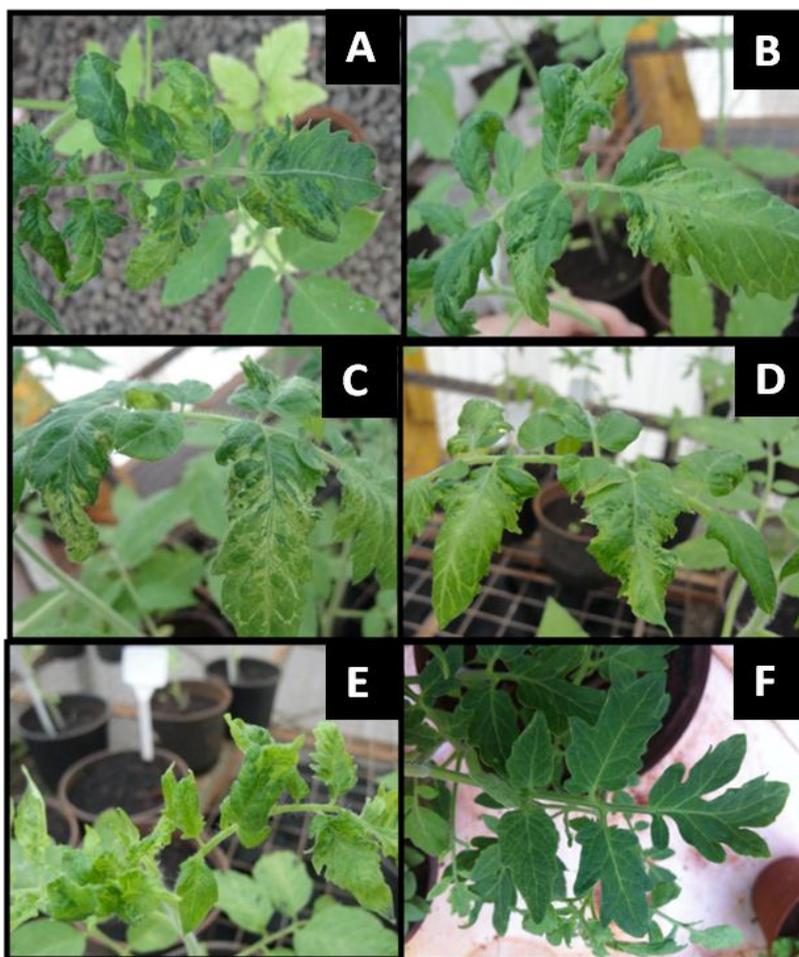


Figura 8 – Sintomas em plantas de tomate. A: plantas inoculadas com o TMV; B: plantas inoculadas com o CMV; C: plantas inoculadas com o TMV e o CMV simultaneamente; D: plantas inoculadas com o TMV e, após 10 dias, inoculadas com o CMV; E: plantas inoculadas com o CMV e, após 10 dias, inoculadas com o TMV; F: planta sadia.

Os sintomas induzidos pelo TMV e CMV em pimentão, em tomate, em fumo e em *G. globosa* foram muito severos, tanto nas infecções simples como nas infecções mistas, com prejuízos ao desenvolvimento das plantas infectadas (Quadro 3).

Quadro 3 – Sintomas induzidos pelo TMV e CMV em infecções simples e mistas em pimentão, tomate, fumo e *G. globosa*

Família	Espécie	Sintomas				
		TMV	CMV	TMV+CMV	TMV+CMV*	CMV+TMV*
Solanaceae	<i>Capsicum annuum</i>	m, rf, na	af, na, m, rf	mi, na, mc, cn, rf	mi, na, cn, mc, rf	mc, mi, na, af, cn, rf
	<i>Solanum lycopersicum</i>	m, b, df	m, b, df, af, rf	m, df, b, rf	m, df, b, rf	na, m, b, df, ep, rf
	<i>Nicotiana tabacum</i>	m, df, bi, rf	m, df	m, bi, df, rf	m, bi, df, af, rf	bi, cl, df, rf
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i>	m, mc, na, rf	df, b, mn, na, rf	df, m, na, rf	m, df, na, b, rf	b, m, na, mn, df, rf

Os sintomas são representados por: **af**, afilamento foliar; **b**, bolhosidade; **bi**, bolhosidade intensa; **cl**, clorose; **cn**, clorose de nervuras; **df**, deformação foliar; **ep**, epinastia; **m**, mosaico; **mc**, mancha clorótica; **mi**, mosaico intenso; **mn**, mancha necrótica; **na**, nanismo; **rf**, redução foliar. * TMV+CMV (inoculação com o TMV e, após 10, dias inoculação com o CMV); CMV+TMV (inoculação com o CMV e após 10 dias inoculação com o TMV).

4.3. Detecção do TMV e do CMV nas infecções simples e mistas mediante utilização do DAS ELISA e análise dos resultados pelo teste de Tukey

Nos testes de DAS-ELISA com antissoro para o CMV (Figura 9), não houve diferença significativa na detecção do vírus em plantas de fumo e de *G. globosa*, nas diferentes inoculações (Quadro 4). Porém, houve diferença significativa quando comparado às plantas sadias.

Nas plantas de pimentão e de tomate, ocorreram diferenças significativas na detecção do vírus entre os diferentes tratamentos. Para o pimentão, plantas inoculadas, primeiramente com o TMV e após 10 dias com o CMV, diferiram das demais. Neste caso, poderíamos afirmar que o TMV, inoculado primeiramente, talvez tenha suplantado a resistência inicial da hospedeira, favorecendo a infecção pelo CMV, inoculado posteriormente.

Vírus relacionados e não relacionados, muitas vezes, podem replicar-se nas mesmas células e podem interagir sinergicamente ou antagonisticamente, enquanto a concentração de um ou de ambos podem aumentar significativamente. Vance (1991) relata em seu trabalho que, em uma infecção mista envolvendo o PVX e o PVY, o PVX teria aumentado a sua concentração, enquanto para o PVY a sua concentração teria permanecido inalterada.

Para o tomate, houve diferença significativa para as plantas que foram inoculadas com o CMV isoladamente e para as que foram inoculadas primeiramente com o CMV e após 10 dias com o TMV, demonstrando, dessa forma, o rápido estabelecimento do CMV nesta hospedeira.

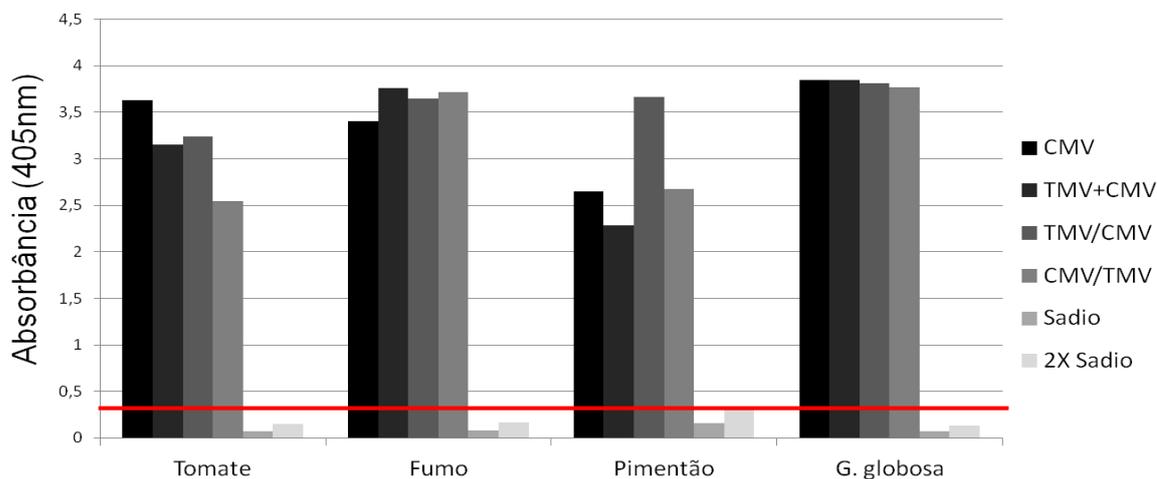


Figura 9 – Valores de absorbância (405nm) do teste DAS-ELISA com leitura após 1 hora, utilizando antissoro para o CMV. Controle negativo: plantas sadias de cada hospedeira, tomate, fumo, pimentão e *G. globosa*.

Quadro 4 - Análise estatística dos valores obtidos nas leituras do teste DAS-ELISA para as amostras testadas com o antissoro para o CMV

Tratamentos	Tomate	Pimentão	Fumo	<i>G. globosa</i>
Sadio	0,15 a	0,31 a	0,16 a	0,13 a
CMV	3,63 c	2,65 b	3,39 b	3,84 b
TMV+CMV	3,15 bc	2,28 b	3,75 b	3,84 b
TMV/CMV	2,72 bc	3,66 c	3,64 b	3,81 b
CMV/TMV	2,54 b	2,67 b	3,71 b	3,76 b

*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente de acordo com Tukey ($p=0,05$). CMV (plantas inoculadas com o CMV), TMV+CMV (plantas inoculadas com ambos os vírus simultaneamente), TMV/CMV (plantas inoculadas primeiramente com TMV e, após 10 dias, inoculadas com CMV), CMV+TMV (plantas inoculadas primeiramente com CMV e, após 10 dias, inoculadas com TMV).

Nos testes com o antissoro para o TMV (Quadro 5 e Figura 10), não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos em plantas de tomate, pimentão, fumo e *G. globosa*. Porém, como esperado, houve diferença quando comparado às plantas sadias.

Quadro 5 - Análise estatística dos valores obtidos nas leituras do teste DAS-ELISA para as amostras testadas com o antissoro para o TMV

Tratamentos	Tomate	Pimentão	Fumo	<i>G. globosa</i>
Sadio	0,26 a	0,60 a	0,18 a	0,08 a
TMV	3,17 b	2,42 b	2,84 b	1,69 b
TMV+CMV	2,97 b	2,31 b	2,66 b	2,17 b
TMV/CMV	2,99 b	1,93 b	2,61 b	1,99 b
CMV/TMV	2,88 b	2,49 b	2,57 b	1,74 b

*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente de acordo com Tukey ($p=0,05$). TMV (plantas inoculadas com o TMV), TMV+CMV (plantas inoculadas com ambos os vírus simultaneamente), TMV/CMV (plantas inoculadas primeiramente com TMV e, após 10 dias, inoculadas com CMV), CMV+TMV (plantas inoculadas primeiramente com CMV e, após 10 dias, inoculadas com TMV).

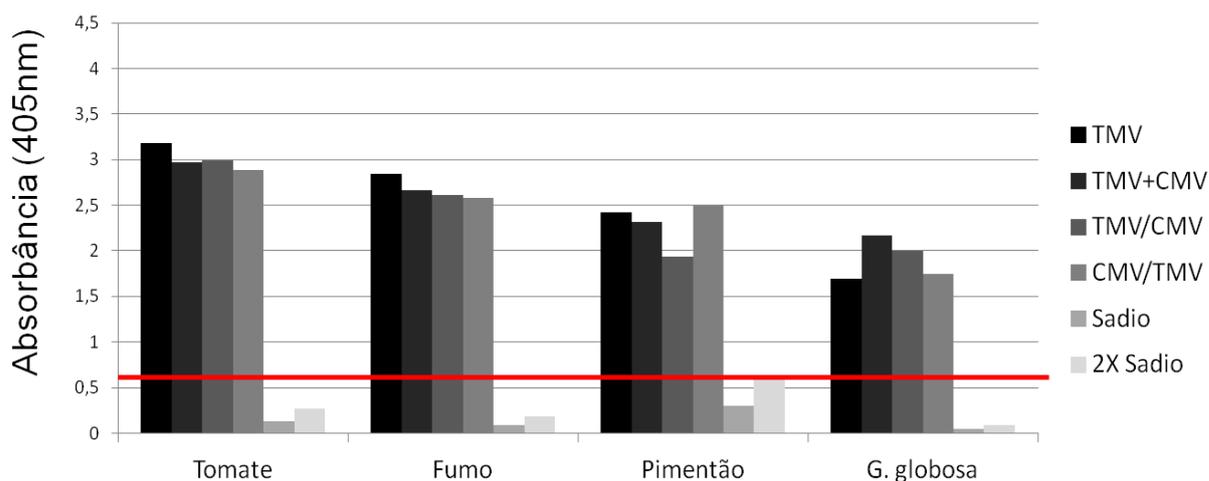


Figura 10 – Valores de absorbância (405nm) do teste DAS-ELISA com leitura após 1 hora, utilizando antissoro para o TMV. Controle negativo: plantas sadias de cada hospedeira, tomate, fumo, pimentão e *G. globosa*.

4.4. Detecção do TMV e do CMV nas infecções simples e mistas por meio da RT-PCR multiplex

Após a amplificação por RT-PCR multiplex, utilizando os *primers* TMV 1 - TMV 2 e CMV I (F) - CMV I (R), foram obtidos fragmentos amplificados de aproximadamente 400 pb para o TMV e de 590 pb para o CMV (Figuras 9, 10, 11 e 12). Essas bandas foram observadas nas amostras com infecções simples e mistas, confirmando a infecção de ambos os vírus nas plantas testadas.

Chen et al. (2011) utilizaram um protocolo de RT-PCR multiplex para a detecção simultânea do CMV, TMV e do ToMV, assim como na diferenciação dos subgrupos CMV I e CMV II, em plantas de tomate cultivadas na China.

O protocolo de Chen et al. (2011) foi utilizado como referencial para a condução desse trabalho de detecção do TMV e do CMV. Todavia, os *primers* para detecção do TMV não produziram qualquer amplificação, mesmo após várias tentativas e, portanto, foram substituídos por outros, que foram usados na detecção do TMV, conforme sugerido por Jacobi et al. (1998), para detecção do TMV e ToMV em infecções mistas em plantas de pinheiro, por meio de RT-PCR multiplex. O fato dos *primers* de Chen et al. (2011) não terem amplificado o isolado de TMV do Paraná, talvez esteja relacionado à existência de ligeiras variações existentes nas sequências de nucleotídeos entre isolados do TMV que, de algum modo, possam interferir no anelamento satisfatório desses *primers* com determinados isolados.

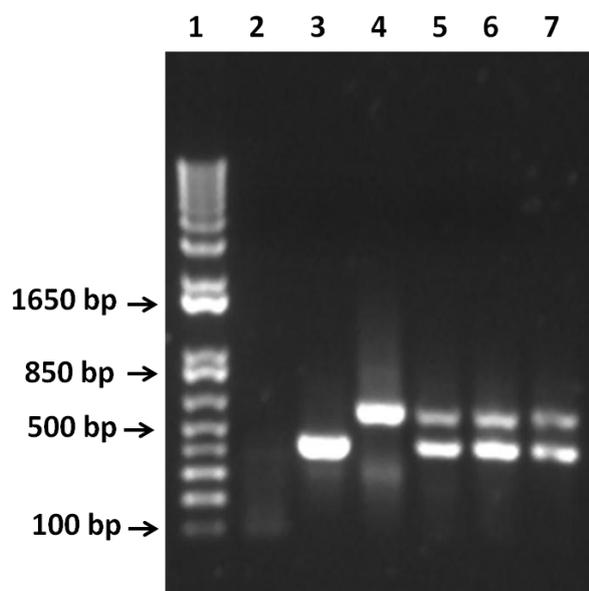


Figura 11 – Produto de RT-PCR em gel de agarose 1,2% de plantas de fumo, utilizando os *primers* específicos para o TMV (Jacobi et al., 1998) e CMV (Chen et al., 2011). 1: marcador molecular Ladder 1kb (Invitrogen®); 2: controle negativo; 3: amplificação de fragmento de aproximadamente 400 pb do TMV; 4: amplificação de fragmento de aproximadamente 590 pb do CMV; 5: amplificação de fragmento de aproximadamente 590 pb do CMV e de aproximadamente 400 pb do TMV em infecção mista simultânea; 6: amplificação obtida a partir de plantas inoculadas com o TMV e, 10 dias após, inoculadas com o CMV; 7: amplificação obtida a partir de plantas inoculadas com o CMV e, 10 dias após, inoculadas com o TMV.

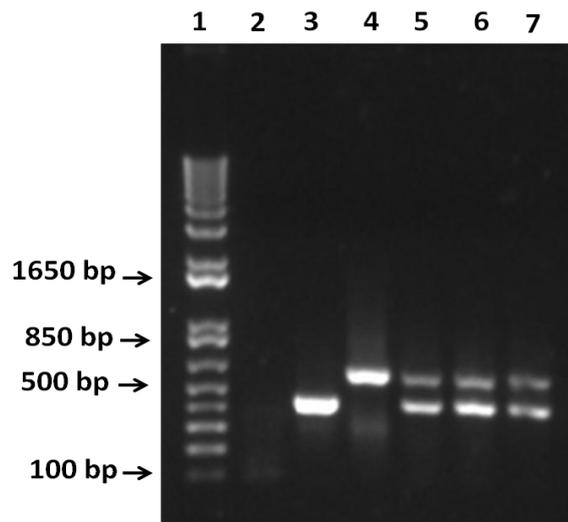


Figura 12 – Produto de RT-PCR em gel de agarose 1,2% de plantas de pimentão, utilizando os primers específicos para o TMV (Jacobi et al., 1998) e CMV (Chen et al., 2011). 1: marcador molecular Ladder 1kb (Invitrogen®); 2: controle negativo; 3: amplificação de fragmento de aproximadamente 400 pb do TMV; 4: Amplificação de fragmento de aproximadamente 590 pb do CMV; 5: amplificação de fragmento de aproximadamente 590 pb do CMV e de aproximadamente 400 pb do TMV em infecção mista simultânea; 6: amplificação obtida a partir de plantas inoculadas com o TMV e, 10 dias após, inoculadas com o CMV; 7: amplificação obtida a partir de plantas inoculadas com o CMV e, 10 dias após, inoculadas com o TMV.

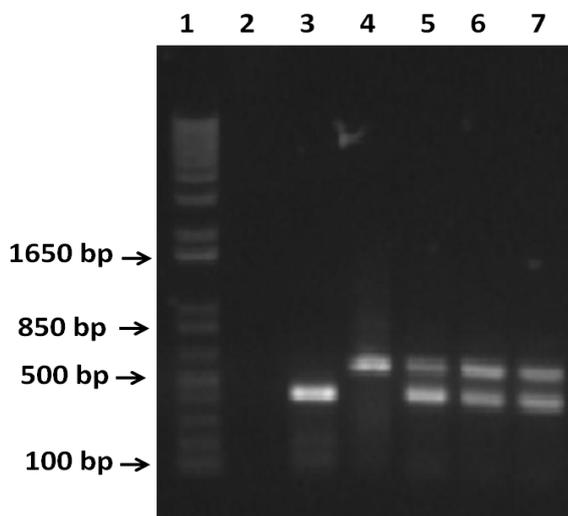


Figura 13 – Produto de RT-PCR em gel de agarose 1,2% de plantas de *g. globosa*, utilizando os primers específicos para TMV (jacobi et al., 1998) e CMV (chen et al., 2011). 1: marcador molecular ladder 1kb (invitrogen®); 2: controle negativo; 3: amplificação de fragmento de aproximadamente 400 pb do TMV; 4: amplificação de fragmento de aproximadamente 590 pb do CMV; 5: amplificação de fragmento de aproximadamente 590 pb do CMV e de aproximadamente 400 pb do TMV em infecção mista simultânea; 6: amplificação obtida a partir de plantas inoculadas com o TMV e, 10 dias após, inoculadas com o CMV; 7: amplificação obtida a partir de plantas inoculadas com o CMV e, 10 dias após, inoculadas com o TMV.

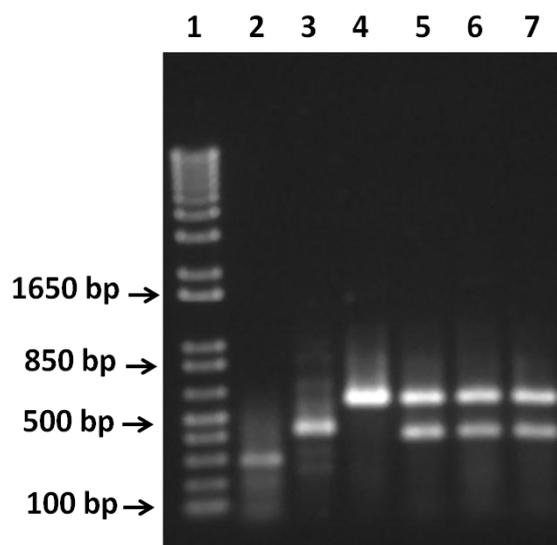


Figura 14 – Produto de RT-PCR em gel de agarose 1,2% de plantas de tomate, utilizando os *primers* específicos para TMV (Jacobi et al., 1998) e CMV (Chen et al., 2011). 1: marcador molecular Ladder 1kb (Invitrogen®); 2: controle negativo; 3: Amplificação de fragmento de aproximadamente 400 pb do TMV; 4: Amplificação de fragmento de aproximadamente 590 pb do CMV; 5: amplificação de fragmento de aproximadamente 590 pb do CMV e de aproximadamente 400 pb do TMV em infecção mista simultânea; 6: Amplificação obtida a partir de plantas inoculadas com o TMV e, 10 dias após, inoculadas com o CMV; 7: Amplificação obtida a partir de plantas inoculadas com o CMV e, 10 dias após, inoculadas com o TMV.

A RT-PCR multiplex é uma técnica útil para detectar dois ou mais vírus, pois utilizando mais de um par de *primers* na mesma reação, possibilita a amplificação simultânea de diferentes sequências de cDNAs (Chen et al., 2011; Tang e Persing, 1999). O multiplex agiliza o processo de identificação desses agentes infecciosos por realizar o diagnóstico completo com apenas uma reação, além de ser menos oneroso.

Nie e Singh (2001) desenvolveram um protocolo de RT-PCR multiplex, utilizando *primers* aleatórios para a detecção simultânea do *Potato leafroll virus* (PLRV), PVX, *Potato virus A* (PVA), PVY, *Potato virus S* (PVS) e *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) em plantas de batata, sendo de grande valia para os programas de certificação sanitária de batata-sementes.

Figueiredo e Brioso (2007) também desenvolveram um protocolo de RT-PCR multiplex para ser utilizado na indexação do BSV e do CMV em mudas de bananeiras, obtidas por meio da cultura de meristemas, e com este método foi possível abreviar o trabalho de avaliação de um grande número de plantas.

Gunson et al. (2008) relataram a importância das reações de PCR multiplex na rotina de laboratório. Uma reação bem padronizada aumenta a velocidade do trabalho e otimiza a utilização dos termocicladores e o preparo das reações de PCR. Este método se mostrou muito eficaz na detecção do TMV e do CMV em infecções mistas, conforme avaliado neste trabalho e, portanto, poderá representar uma ferramenta muito útil na detecção desses patógenos em trabalhos diagnósticos de rotina, na determinação da sanidade de hortaliças como o pimentão e tomate, que são altamente susceptíveis a estes vírus nas diversas áreas de produção do nosso país.

Recentemente, um RT-PCR multiplex foi desenvolvido para a detecção simultânea do *Potato yellow vein virus* (PYVV), *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) e *Tobacco rattle virus* (TRV), utilizando folhas de batata (Wei et al., 2009).

5. CONCLUSÕES

O *Tobamovirus* encontrado na região de Marialva, estado do Paraná, é o TMV, de acordo com os testes sorológicos e moleculares e conforme o sequenciamento realizado.

A infecção mista do TMV e do CMV resultou no agravamento de sintomas em todas as hospedeiras testadas.

O teste sorológico de DAS-ELISA e o teste molecular de RT-PCR multiplex se mostraram eficientes na detecção do TMV e do CMV nas plantas de pimentão, tomate, fumo e *G. Globosa*, inoculadas mecanicamente.

O RT-PCR multiplex demonstrou ser uma ferramenta sensível e muito eficiente na detecção simultânea deste vírus e de grande potencial para aplicação na diagnose viral de rotina em hortaliças.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.M.R. Detecção e quantificação de vírus pelo teste de ELISA. In: ALMEIDA, A.M.R.; LIMA, J.A.A. (eds.) **Princípios e técnicas de diagnose aplicadas em fitovirologia**. Fortaleza: SBF, 2001. p. 63-94.

ARANDA, M.A.; FRAILE A.; GARCÍA-ARENAL, F. Genetic Variability and Evolution of the Satellite RNA of *Cucumber Mosaic Virus* during Natural Epidemics. **Journal of Virology**, 67:5896-5901, 1993.

ARAUJO, T.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, E.C. Desenvolvimento de um PCR multiplex para detecção simultânea de vírus e fitoplasma em mandioca (*Manihot esculenta*). **6ª JORNADA CIENTÍFICA**. Bahia, 2012. **Resumos...** Bahia: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2012. Disponível em CD ROM.

ATENCIO, F.A.; GRACIA, O.; MENDONZA, E.E.A. Detection of both subgroups I and II of *Cucumber mosaic cucumovirus* and their satellite RNAs on pepper in Argentina. **Plant Disease**, 81:695, 1997.

BALOGUN, O.S.; XU, L.; TERAOKA, T.; HOSOKAWA, D. Effects of single and double infections with *Potato virus X* and *Tobacco mosaic virus* on disease development, plant growth and virus accumulation in tomato. **Fitopatologia Brasileira**, 27:241-248, 2002.

BASTOS, H.B.; PAVAN, M.A.; SILVA, N. Estirpes do vírus do mosaico do tomateiro presentes em regiões produtoras de tomate do Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, 1:14-16, 1999.

BEDENDO, I.P. Vírus. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: CERES, 1995. p. 132-158.

CARNER, J.; COLARICCIO, A.; CHAGAS, C.M.; ALBA, A.P.C.; VICENTE, M. Identificação de um isolado do vírus do mosaico do tomateiro (ToMV) no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, 15:347-350, 1990.

CASALI, V.W.D.; COUTO, F.A.A. Origem e botânica de *capsicum*. **Informe Agropecuário**, 10:8-10, 1984.

CASTILLO-URQUIZA, G.P.; MAIA, F.G.M.; CARVALHO, M.G.; PINTO, C.M.F.; ZERBINI, F.M. Caracterização de um isolado do *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) de Minas Gerais e estimativa de perdas em feijoeiro em infecção simples ou em conjunto com o BCMV. **Fitopatologia Brasileira**, 31:455-461, 2006.

CHEN, S.; GU, H.; WANG, X.; CHEN, J.; ZHU, W. Multiplex RT-PCR detection of *Cucumber mosaic virus* subgroups and *Tobamoviruses* infecting tomato using 18S rRNA as an internal control. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 43:465-471, 2011.

CITOVSKY, V.; WONG, M.L.; HAW, A.L.; PRASAD, B.; ZAMBRYSKI, P. Visualization and characterization of *Tobacco mosaic virus* movement protein binding to single-stranded nucleic acids. **Plant Cell**, 4:397-411, 1992.

CLARK, M.F.; BAR-JOSEPH, M. Enzyme linked immunosorbent assay in plant virology. **Methods in Virology**, 7:51-85, 1984.

COMPANY, M.L. **El tabaco. Manual tecnico para cultivo y curado**. Madrid: Mundi-Presa, 1981. 305p.

CORREA, J.E.; BERNAL, H.Y. **Especies vegetales promisorias de los paises del convenio Andrés Bello**. Bogotá: Guadalupe, 1989. 507p.

DIEZ, M.J.; NUEZ, F. Tomato. In: PROHENS, J.; NUEZ, F. **Vegetables II - Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae**. New York: Springer, 2007. 249-323p.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 21, junho, 2012.

FIGUEIREDO, D.V.; BRIOSO, P.S.T. PCR multiplex para a detecção do BSV e do CMV em bananeiras micropropagadas. **Summa Phytopathologica**, 33:229-232, 2007.

FRANCKI, R.I.B.; MOSSOP, D.W.; HATTA T. *Cucumber mosaic virus*. CMI/AAB. **Descriptions of Plant Viruses**, 213:4, 1979.

GARCIA-CANO E.; RESENDE R.O.; FERNANDEZ-MUNOZ R.L.; MORIONES, E. Synergistic interaction between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* results in breakdown of resistance in tomato. **Phytopathology**, 96:1263-1269, 2006.

GODOY, C.V.; SALGADO, C.L., Doenças do fumo (*Nicotiana tabacum* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia. Doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 387-395.

GOELET, P.; LOMONOSSOFF, G.P.; BUTLER, P.J.G.; AKAM, M.E.; GAIT, M.J.; KARN, J. Nucleotide sequence of *Tobacco mosaic virus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 79:5818–22, 1982.

GUNSON, R.N.; BENNETT, S.; MacLEAN, A.; CARMAN, W.F. Using multiplex real time PCR in order to streamline a routine diagnostic service. **Journal of Clinical Virology**, 43:372-375, 2008.

INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; RESENDE, R.O.; BOITEUX, L.S.; MONTE, D.C.; DUSI, A.N.; ÁVILA, A.C.; VAN DER VLUGT, R.A.A. *Pepper yellow mosaic virus*, a new potyvirus in sweet pepper *Capsicum annuum*. **Archives of Virology**, 147:849-855, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. **IBGE**, 24:76-77, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. **IBGE**, 25:1-88, 2012.

JACOBI, V.; BACHAND, G.D.; HAMELIN, R.C.; CASTELO, J.D. Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of tomato

and tobacco mosaic tobamoviruses. **Journal of Virological Methods**, 74:167-178, 1998.

JADÃO, A.S.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; ZERBINI, F.M. Efeitos na fotossíntese e área foliar de cultivares de alface inoculadas mecanicamente com patótipos do *Lettuce mosaic virus* e *Lettuce mottle virus*. **Fitopatologia Brasileira**, 29:011-015, 2004.

KAPER, J.M.; WATERWORTH, H.E. *Cucumber mosaic virus associated RNA 5*: causal agent for tomato necrosis. **Science**, 196:429-431, 1977.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia**. Doenças de plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 641-669.

LIMA, M.F. **Detecção e controle de viroses em videira**. Disponível em: <www.cpatsa.embrapa.br>. Acesso em: 17, dezembro, 2009.

LIMA, M.F.; MELO, W.F.; VALE, L.S.R.; MORGADO, H.S.; INOUE-NAGATA, K.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Detecção e incidência de vírus em 89 acessos de pimenta (*Capsicum* spp.) no Município de Ceres, Goiás. **Horticultura Brasileira**, 28:1187-S1194, 2010.

LOPES, C.A.; REIS, A. **Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007. 12p. (Circular técnica n. 53).

MALAPI-NELSON, M.; WEN, R.H.; OWNLEY, B.H.; HAJIMORAD, M.R. Co-infection of soybean with *Soybean mosaic virus* and *Alfalfa mosaic virus* results in disease synergism and alteration in accumulation level of both viruses. **Plant Disease**, 93:1259-1264, 2009.

MARITAN, A.C.; GASPAR, J.O. Infecção de *Zinnia elegans* pelo *Tobacco mosaic virus* resultante da interação com um *Potyvirus*. **Fitopatologia Brasileira**, 26:533, 2001.

- MARTIN, S.; ELENA, S.F. Application of game theory to the interaction between plant viruses during mixed infections. **Journal of General Virology**, 90:2815-2820, 2009.
- MESHI, T.; WATANABE, Y.; SAITO, T.; SUGIMOTO, A.; MAEDA, T.; OKADA, Y. Function of the 30-kd protein of *tobacco mosaic virus*: involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. **EMBO Journal**, 6:2557–63, 1987.
- MOREIRA, S.R.; COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A.L.R. Caracterização molecular do *Tomato mosaic virus* isolado de tomateiro no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, 26:515, 2001.
- MOURA, M.F.; NOZAKI, D.N.; FERREIRA, F.Z.; PAVAN, M.A.P.; KRAUSE-SAKATR, R. Ocorrência de infecção viral mista em pimentão no estado de São Paulo. **Summa Phytopathology**, 38:170, 2012.
- MULLIS, K.F.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Quantitative Biology**, 51:263-273, 1986.
- MURPHY, J.F.; KYLE, M.M. Alleviation of restricted systemic movement of *pepper mottle potyvirus* in *Capsicum annuum* cv. 'Avelar' by coinfection with a *cucumovirus*. **Phytopathology**, 85:561-566, 1995.
- NAIKA, S.; JEUDE, J.V.L.; GOFFAU, M.; HILMI, M.; DAM, B.V. **A cultura do tomate. Produção, processamento e comercialização**. Wageningen: Fundação Agromisa e CTA, 2006. 104p.
- NIE, X.; SINGH, R.P. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves and tubers. **Journal of Virological Methods**, 91:37-49, 2001.
- OLIVEIRA, V.B.; LIMA, J.A.A.; VALE, C.C.; PAIVA, W.O. Caracterização biológica e sorológica de isolados de *Potyvirus* obtidos de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, 25:628-636, 2000.
- PALUKAITIS, S.P.; ROSSINK, M.J.; DIETZGEN, R.G.; FRANCKI, R.I.B. *Cucumber mosaic virus*. **Advances in Virus Research**, 41:281-348, 1992.

PAULUS, A.O.; KENDRICK, J.B. Jr.; WEATHERS, L.G. *Cucumber mosaic virus* on pepper in California. **Phytopathology**, 52:25, 1962.

PERNEZNY, K.; ROBERTS, P.D.; MURPHY, J.F.; GOLDBERG, N.P. (eds.) **Compendium of pepper diseases**. St. Paul: APS Press, 2003. 63p.

PFITZNER, A.J.P. Resistance to *tobacco mosaic virus* and *tomato mosaic virus* in Tomato. In: LOEBENSTEIN, G.; CARR, J.P. (eds.). **Natural resistance mechanisms of plants to viruses**. Netherlands: Springer, 2006. p. 399–413.

PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica**, 96:129-133, 1997.

SAMAD, A.; AJAYAKUMAR, P.V.; GUPTA, M.K.; SHUKLA, A.K.; DAROKAR, M.P.; SOMKUWAR, B.; ALAM, M. Natural infection of periwinkle (*Catharanthus roseus*) with *Cucumber mosaic virus*, subgroup IB. **Australian Plant Disease Notes**, 3:30-34, 2008.

SANTOS, F.F.B. **Obtenção e seleção de híbridos de tomate visando a resistência ao *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV)**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2009. 86p. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia).

SIQUEIRA, J.C. **Contribuição ao conhecimento taxonômico das espécies do gênero *Gomphrena* L. (*Amaranthaceae*) que ocorrem nas regiões sudeste e centro-oeste do Brasil**. São Leopoldo: Instituto Anchieta de Pesquisas, 1985. 111p.

TANG, Y.; PERSING, D. Molecular detection and identification of microorganisms. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of clinical microbiology**. Washington, D.C.:ASM, 1999. p. 215-244.

VALLE, R.K.D. **Desenvolvimento de um marcador molecular para Resistência a *Tobacco mosaic virus* e herança da resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3 em tabaco**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2008. 55p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia).

VANCE, V.B. Replication of *potato virus X* RNA is altered in coinfections with *potato virus Y*. **Virology**, 182:486-494, 1991.

VANCE, V.B.; BERGER, P.H.; CARRINGTON, J.C.; HUNT, A.G.; SHI, X.M. 5' proximal potyviral sequences mediate *potato virus X* potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. **Virology**, 206:583-590, 1995.

WALKEY, D.G.A.; PAYNE, C.J. The reaction of two lettuce cultivars to mixed infection by *Beet western yellow virus*, *Lettuce mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus*. **Plant Pathology**, 39:156-160, 1990.

WEI, T.; LU, G.; CLOVER, G.R.G. A multiplex RT-PCR for the detection of *Potato yellow vein virus*, *Tobacco rattle virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in potato with a plant internal amplification control. **Plant Pathology**, 58:203-209, 2009.

WINTERMANTEL, W.M. Co-infection of *Beet mosaic virus* with *Beet yellowing viruses* leads to increased disease severity on sugar beet. **Plant Disease**, 89:325-331, 2005.

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**, 98:1340-1345, 2008.

ZERBINI JR, F.M.; CARVALHO, M.G.; ZAMBOLIM, E.M. **Introdução à virologia vegetal**. Viçosa: UFV, 2006. 145p.