



ANDERSON DE JESUS SOTERO

**DESENHO DE PRIMERS E CLONAGEM DO
GENE DO CAPSÍDEO DE FITOVÍRUS PARA
USO COMO CONTROLES POSITIVOS NA
DIAGNOSE POR RT-PCR**

LAVRAS - MG

2011

ANDERSON DE JESUS SOTERO

**DESENHO DE PRIMERS E CLONAGEM DO GENE DO CAPSÍDEO DE
FITOVÍRUS PARA USO COMO CONTROLES POSITIVOS NA
DIAGNOSE POR RT-PCR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Antonia dos Reis Figueira

LAVRAS - MG

2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Sotero, Anderson de Jesus.

Desenho de primers e clonagem do gene do capsídeo de fitovírus para uso como controles positivos na diagnose por RT-PCR / Anderson de Jesus Sotero. – Lavras: UFLA, 2010.

58 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Antonia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. Plasmídeo. 2. Pragas quarentenárias. 3. Detecção molecular. 4. Oligonucleotídeos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.8

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade concedida para realização do Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Antonia dos Reis Figueira pela orientação, paciência, amizade e ensinamentos.

Aos meus pais: Alice de Jesus Sotero e Luíz Cláudio Sotero e à minha avó Joana pelo apoio, amor e constante exemplo de caráter e moral, bem como a meus irmãos, Neylison e Fernando, pelo incentivo e companheirismo.

À Gabriela Martucci por ser uma pessoa singular e amiga e por ter tido uma participação importantíssima no meu ingresso na pós-graduação.

Aos professores componentes da banca de avaliação pela disponibilidade e bom ânimo, assim como aos professores do Departamento de Fitopatologia, por compartilhar sua vasta experiência demonstrando indubitável prazer e aptidão em lecionar e aos

Aos companheiros do Mestrado, sem os quais esta jornada não teria sido tão proveitosa e satisfatória e aos amigos do Laboratório de Virologia Molecular e Centro de Indexação: Romário, Nara, Silvia, Douglas, Bárbara, Priscila, Aurivan, João, Thiago, Carlos, Maurício, Jaciara, Wellington, Luciana, Luciana Cassetari e Elizângela, sempre presentes e prontos a ajudar.

À Stefane, bem como aos seus pais Jorge e Vani e às suas irmãs Meriluce e Mara, que sempre acreditaram no meu potencial e atuaram como um porto seguro durante grande parte desta jornada.

Enfim, a todos os meus amigos, porque ninguém conquista nada sozinho e nenhuma conquista tem valor sem que haja alguém para compartilhá-la.

RESUMO

O constante intercâmbio de materiais vegetais para propagação, apesar de proporcionar um bom desempenho da atividade agrícola no Brasil, expõe o país ao risco de introdução de patógenos indesejados. Para evitar que isso aconteça, a diagnose precoce de fitopatógenos, tanto dos quarentenários como dos não quarentenários regulamentados é indispensável. No caso dos vírus, o estabelecimento de técnicas eficientes, para a sua diagnose, tem sido um grande desafio, pois, compõem um grupo de patógenos de plantas com elevada importância, em decorrência das perdas de produção que podem causar e, também, da ausência de métodos de controle curativos. Uma das maiores limitações, para o desenvolvimento desses métodos, é a falta de controles positivos, para checar a confiabilidade da técnica diagnóstica empregada, pois, sempre existe a possibilidade de obtenção de falsos negativos e/ou falsos positivos. Neste trabalho objetivou-se contribuir para a formação de um banco de controles positivos para vírus, por meio da clonagem do gene da proteína do capsídeo em plasmídeos e do desenho de *primers* para serem empregados na sua diagnose por RT-PCR. Foram clonados fragmentos genômicos de 3 vírus quarentenários e de 8 vírus não quarentenários. Todos os plasmídeos contendo os fragmentos genômicos virais e os *primers* foram testados e se comportaram como controles positivos confiáveis para serem empregados na diagnose dos respectivos vírus.

Palavras-chave: Plasmídeo. Pragas quarentenárias. Detecção molecular. Oligonucleotídeos.

ABSTRACT

The frequent exchange of plant material for propagation, provides a good performance of agriculture in Brazil, but exposes the country to the risk of introducing unwanted pathogens. To prevent this, the early diagnosis of pathogens of both quarantine and the non-quarantine viruses is essential. Regarding to viruses, the establishment of efficient techniques for its diagnosis has been a great challenge, due to the high yield losses they can induce and also because there is no curative methods of controlling these pathogens. One of the major constraints to the development of these methods is the lack of positive controls to check the reliability of the diagnostic technique employed, since there is always the possibility of false negatives and/or false positives results. This study aimed to contribute for the formation of a bank of positive controls for the virus diagnosis, by cloning the gene of viral capsid in plasmid and design the *primer* to be used in virus diagnosis by RT-PCR. Genomic fragments of 3 quarantine viruses and 8 non-quarantine viruses were cloned and sequenced. All the plasmids with the genomic viral fragments and the designed *primers* were tested as positive controls and worked as a secure method for using in the diagnosis of viruses tested.

Keywords: Plasmid. Quarantine pests. Molecular detection. Oligonucleotides.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Comercialização internacional e introdução de patógenos	12
2.2	Vigilância sanitária brasileira	13
2.3	Técnicas de diagnose	14
2.4	Breve descrição dos vírus	20
2.4.1	Vírus Quarentenários	20
2.4.1.1	<i>Arabid mosaic virus</i> (ArMV)	20
2.4.1.2	<i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV)	21
2.4.1.3	<i>Potato virus A</i> (PVA)	22
2.4.2	Não quarentenários	23
2.4.2.1	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	23
2.4.2.2	<i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV)	24
2.4.2.3	<i>Potato leafroll virus</i> (PLRV)	24
2.4.2.4	<i>Potato virus X</i> (PVX)	25
2.4.2.5	<i>Potato virus Y</i> (PVY)	26
2.4.2.6	<i>Squash mosaic virus</i> (SqMV)	26
2.4.2.7	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	27
2.4.2.8	<i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV)	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Obtenção dos isolados virais	29
3.2	Desenho dos <i>primers</i>	29
3.3	Extração do RNA total	30
3.4	RT-PCR	31
3.5	Preparo das células competentes para a realização da clonagem	31
3.6	Clonagem e sequenciamento dos fragmentos genômicos virais ..	32
3.7	Extração de DNA plasmidial e restrição enzimática	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Desenho dos <i>primers</i>	35
4.2	Síntese dos cDNAs e amplificação do genoma via RT-PCR	37
4.3	Clonagem e verificação da clonagem	38
4.4	Sequenciamento dos fragmentos amplificados	41
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
6	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Os grandes avanços tecnológicos observados no mundo têm trazido consigo características e ferramentas que o tornam cada vez mais conectado, transformam processos antes altamente onerosos em procedimentos que hoje são corriqueiros, ocasionando consequências que podem ser tanto positivas como negativas. Este progresso possibilitou ao Brasil um considerável crescimento e estabelecimento no mercado agrícola mundial e, também, um fortalecimento no cenário interno, fazendo com que houvesse um desenvolvimento em todos os segmentos da cadeia produtiva.

O desenvolvimento da agricultura como um todo tem proporcionado uma facilitação dos processos envolvidos na produção, porém, uma etapa que é de crucial importância e que deve ser observada com atenção é a aquisição de materiais vegetais destinados à propagação. Tanto na aquisição de material vegetal de diferentes regiões dentro do país como no intercâmbio internacional de produtos vegetais, deve-se observar com cuidado a qualidade fitossanitária destes, pois, este processo de troca representa um alto risco de introdução de patógenos em áreas produtoras anteriormente isentas, trazendo riscos desconhecidos de prejuízos (TRIBUNAL DE CONTAS DA UNIÃO - TCU, 2006).

Diferentes tipos de agentes podem causar doenças em plantas, como os fungos, as bactérias, os nematoides e os vírus, com grande potencial de indução de perdas significativas de produção. Dentre os fitopatógenos, os vírus se destacam em importância pela sua capacidade de induzir perdas significativas na qualidade e quantidade de produção, ocasionando prejuízos consideráveis em todo o mundo. Eles podem infectar os mais diversos tipos de plantas e os danos podem ser mais ou menos severos, dependendo das condições do ambiente, da planta hospedeira e do patógeno. Os sintomas exibidos pelas plantas infectadas

são variáveis, podendo, inclusive, ocorrer infecções assintomáticas capazes de causar perdas no rendimento da cultura sem que a presença do vírus seja, sequer, detectada (AGRIOS, 2005).

Os vírus podem ser disseminados de diversas maneiras, por meio das sementes e gametas e pelo contato com plantas próximas, mas o método mais importante é por meio de vetores (insetos, ácaros, nematoides e fungos) (HULL, 2002). Isso significa que, uma vez introduzidos numa região, os vetores se encarregam de disseminá-los para outras hospedeiras e a sua erradicação da área se torna, praticamente, impossível. Como não existem medidas de controle curativo para doenças viróticas (HULL, 2002), a melhor forma de controle é a utilização de medidas baseadas no princípio de exclusão, que evitam a chegada do patógeno nas áreas de cultivo. Deste modo, o estabelecimento de normas relativas ao trânsito de materiais vegetais adquire uma importância crescente e tem merecido uma atenção especial dos órgãos de defesa fitossanitária em todo o mundo.

Com a vasta área de cultivo do território brasileiro e as constantes atividades de importação e exportação de materiais vegetais, torna-se imprescindível que sejam estabelecidas técnicas de diagnoses confiáveis e com boa reprodutibilidade, para que a sanidade desses materiais seja adequadamente testada. Países com acordos comerciais, como no caso daqueles incluídos no Mercosul, que faculta o livre trânsito de materiais vegetais entre países, fizeram com que as normas correntes fossem revisadas e adaptadas. Entretanto, ficou estabelecido na convenção internacional de proteção fitossanitária que, para que um país exija determinados padrões, para importação de material vegetal, este país será obrigado a adotar padrões internos iguais. Com isto a demanda por laboratórios de diagnose para a manutenção dos níveis de controle interno nos setores de produção de mudas e sementes cresceu rapidamente (TCU, 2006). De forma semelhante, houve um aumento da demanda por diagnose de

patógenos quarentenários. Entretanto, a necessidade de obtenção de controles positivos, que dão confiabilidade aos diagnósticos gerados para avaliação da ocorrência de determinados patógenos, aumenta o seu risco de introdução no país. O controle positivo é uma ferramenta diagnóstica que assegura ao avaliador a certeza da presença do patógeno em uma amostra conhecida que atua como fator comparativo para as demais, dando suporte ao resultado diagnóstico final. Entretanto, para vírus, a manutenção dos vírus seria feita *in vivo* em virtude da impossibilidade de multiplicação destes em sistemas *in vitro*, não sendo, portanto, a melhor medida a ser tomada. A manutenção de controles positivos na forma purificada e/ou liofilizada, também seria uma opção, entretanto, este material necessitaria ser constantemente readquirido e mesmo que a aquisição fosse realizada com frequência, a praticidade da utilização deste material para a diagnose em testes de rotina seria limitada.

Visando solucionar este impasse, a Coordenação de Laboratório Vegetal (CLAV), o Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal (DDIV) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), convocaram todos os laboratórios já atuantes em sistemas estaduais de certificação, para se credenciarem. Cerca de 20 laboratórios em todo o país foram credenciados para realizar a diagnose de fitopatógenos, devendo estes atender a IR no. 24 de 07/06/2001, que fixa as normas gerais de credenciamento e reconhecimentos de laboratórios da área animal e vegetal. Todos eles devem se adequar à norma da ABNT NBR ISO/IEC 17025 (requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração). Entretanto, o MAPA possui limitações quanto ao desenvolvimento de técnicas que sejam aptas a serem utilizadas na diagnose de fitovírus quarentenários por não possuir um sistema de referência que possa testar e aprovar as técnicas empregadas, promovendo a sua validação, nem para inovar e introduzir novas tecnologias mais precisas e eficientes.

Com este trabalho pretende-se contribuir para oferecer uma alternativa viável aos laboratórios, iniciando a formação de um banco de controles positivos a partir da clonagem de fragmentos genômicos, contendo o gene do capsídeo de três vírus quarentenários e oito vírus não quarentenários em plasmídeos, que poderão ser multiplicados *in vitro* e transportados para os diversos laboratórios sem incorrer em riscos de disseminação e contaminação ambiental. Os resultados obtidos são aqui apresentados e discutidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Comercialização internacional e introdução de patógenos

O agronegócio no Brasil tem destacada importância por ser um dos setores econômicos mais proeminentes do país. Este setor já se destacou em anos anteriores por representar cerca de 1/3 do PIB nacional (R\$564 bilhões), valor este que vem diminuindo. Entretanto, considerando-se que em 2008 o PIB do país chegou a US\$1,57 trilhão (BRASIL, 2009b) e que cerca de R\$500 bilhões são oriundos da agricultura (INSTITUTO CNA, 2010), fica evidente a sua importância para o país.

O Brasil é um grande importador de material vegetal, tanto na forma de sementes verdadeiras como na de unidades de propagação vegetativa como tubérculos, bulbos e estacas. Em 2009, o Brasil importou de janeiro a outubro, mais de 7,5 mil toneladas de sementes de cereais e quantidades superiores a 3,5 mil toneladas de sementes de espécies hortícolas, leguminosas, raízes e tubérculos, que, somadas a outras importações de sementes, totalizaram quase 14 mil toneladas, a um custo total de US\$82.302.489 (BRASIL, 2009a). A importação de plantas vivas e produtos de floricultura, também ocorre e, de acordo com Nascimento, Nascimento e Cardozo (2008), o volume das importações destes materiais tem crescido de forma significativa, uma vez que no ano de 1997 o valor total referente à importação era de cerca de US\$5,88 milhões e no ano 2007 este montante chegou a US\$10,79 milhões. A tendência de aumento foi contínua e em 2009 a quantidade relativa às importações destes produtos foi de cerca de 2,5 mil toneladas, significando um valor superior a US\$17 milhões (BRASIL, 2009a). Esses números indicam a quantidade significativa de material vegetal que tem entrado no país que, embora demonstre

um crescimento da atividade agrícola, representa, também, um alto risco de introdução de patógenos, quarentenários ou não.

Fica evidente o risco de entrada de novos agentes etiológicos, quando se toma conhecimento dos diversos patógenos que têm sido introduzidos no país nos últimos anos, como é o caso de alguns fitovírus de batata constatado por Figueira (2009), Galvino (2008) e Ribeiro (2007), bem como viroses de outras plantas, a exemplo do *Turnip mosaic virus* (TuMV), reportado pela primeira vez no Brasil no ano de 2010 infectando plantas de agrião (COSTA; VENTURA, 2010). Quando se trata de fitoviroses, a atenção deve ser redobrada com relação à sua introdução, visto que não existem métodos de controle curativo, devendo estes ser de caráter essencialmente preventivo (LÓPEZ et al., 2003). Para se ter ideia da importância de evitar a entrada de vírus de plantas no país, podem-se citar os danos causados por *Barley yellow dwarf virus* (BYDV), infectando a cultura do trigo e por *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) que infecta plantas de abobrinha, em que as perdas na produção chegaram a 60,8% e 78,5%, respectivamente (GIAMPAN; REZENDE; PIEDADE, 2009; LANZARINI et al., 2007). Estes exemplos ajudam a compreender como a introdução de um novo fitovírus no país tem possibilidade de causar grandes danos à economia nacional e deve ser evitada.

2.2 Vigilância sanitária brasileira

No Brasil o órgão responsável pela vigilância sanitária dos produtos vegetais destinados à importação ou exportação é o MAPA. Em 30 de março de 2006, o Decreto N°5.741 que regulamenta os arts. 27-A, 28-A e 29-A da Lei n° 8.171, de 17 de janeiro de 1991, que dispões sobre a política agrícola, proveu a organização do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, que a partir da sua data de formação tornou-se o responsável pela vigilância

fitossanitária nacional. Baseado em um manual fornecido pelo próprio MAPA, as medidas fitossanitárias pertinentes, bem como aspectos legais e operacionalização das unidades de fiscalização fitossanitárias, foram estabelecidas. Ficou definido que a importação de qualquer material vegetal, destinado à multiplicação e que tenha padrões estabelecidos pelo MAPA, devem ser amostrados e analisados em laboratório oficial, de acordo com os métodos e procedimentos oficializados, visando à comprovação de que estão dentro dos padrões de identidade e qualidade requeridos. O Acordo de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias abordou alguns aspectos de grande importância para o estabelecimento do comércio internacional, como regionalização, equivalência, harmonização, transparência e análise de risco. Todos esses assuntos foram discutidos, para possibilitar uma comercialização mais confiável entre países, mas problemas de ordem fitossanitária têm sido utilizados cada vez mais para promover a formação de barreiras à importação de produtos. Como o Brasil atua neste setor como importador e exportador de produtos vegetais, este fato deve ser visto com cuidado, em consequência de sua importância para o agronegócio nacional.

Embora o MAPA seja o responsável pela fiscalização fitossanitária, o desenvolvimento de novas técnicas de detecção de fitopatógenos é uma limitação para o órgão, que delega essa responsabilidade a instituições responsáveis pelo desenvolvimento de pesquisas e validação de técnicas capazes de promover uma fiscalização mais precisa e eficiente para o fim desejado.

2.3 Técnicas de diagnose

Entre as medidas de controle preventivo, as de exclusão, como o uso de material propagativo sadio, que visam impedir a entrada do patógeno na lavoura, são as mais importantes. Para isso, é necessário que existam métodos de

diagnose eficientes e que possibilitem a detecção desses patógenos o mais precocemente possível.

Diferentes técnicas podem ser empregadas para a detecção de fitovírus, podendo ser classificadas como técnicas sorológicas, biológicas e moleculares. Tratando-se de técnicas sorológicas o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) é o método mais utilizado, por causa de sua praticidade e rapidez, podendo ser, ainda, realizado em grande escala. O método apresenta, também, boa sensibilidade na diagnose de fitovírus (BERIAN, 1985; DANIELS, 1994; FIGUEIRA, 2000). Apesar desta técnica ser eficiente para grande parte dos vírus, existem algumas limitações, uma vez que o método é incapaz de detectar a presença dos vírus, quando estes estão presentes, porém, em baixa concentração no tecido vegetal. Um exemplo deste fato ocorre com o vírus *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), o qual tem a sorologia como método padrão de diagnose (NOLASCO, 2003), entretanto, em virtude da presença do vírus de forma latente em determinadas épocas do ano (ROWHANI; WALKER; ROKNI, 1992; WALTER; ETIENNE, 1987), novos métodos mais sensíveis que o ELISA, com o objetivo de evitar possíveis falsos-negativos, necessitam ser estabelecidos. Também não podem ser detectados por ELISA viroides, pois a técnica sorológica é baseada na reação de anticorpos com a capa proteica, que é ausente neste caso (ALMEIDA; LIMA, 2001).

Os métodos biológicos, para a diagnose de fitovírus, são mais simples e relativamente fáceis de serem empregados. Para a sua realização necessita-se, basicamente, de uma estrutura para o crescimento das plantas que serão utilizadas e de espécies vegetais capazes de demonstrar sintomas que servirão de subsídio para a tomada de decisão com relação à diagnose realizada. As grandes limitações deste método são o tempo gasto para o crescimento das plantas e aparecimento dos sintomas, bem como a imprecisão dos resultados, visto que podem variar de acordo com o observador. Além destes problemas, o emprego

destas técnicas necessita da inoculação do vírus em novas plantas, o que no caso de patógenos exógenos não é interessante.

Mediante as limitações das técnicas citadas e com as possibilidades de que as técnicas moleculares para diagnose fornecem, a utilização destas se faz mais indicada para uma diagnose de forma sensível, precisa e rápida. Embora as técnicas clássicas de PCR e RT-PCR, para detecção de vírus, também, apresentem algumas limitações, quando comparadas a técnicas mais modernas e sofisticadas (ENGEL et al., 2009), de forma geral, estas vêm se mostrando promissoras para diagnose, visto que são bastante seguras e eficientes para a realização dos testes em tecidos vegetais (BOONHAM et al., 2002; FIGUEIRA; DOMIER; ARCY, 1997; FIRRAO; LOCCI, 1994; GLAIS; TRIBODET; KERLAN, 2005; HENSON; FRENCH, 1993; LORENZEN et al., 2008; LOUWS; RADEMAKER; BRUIJN, 1999; MCSPADDEN-GARDENER et al., 2001; MONTERO-ASTU et al., 2008; PROSEN et al., 1993; RASMUSSEN; WULF, 1991; SCHAAD et al., 1995; SCHAAD; JONES; CHUN, 2001; WANG et al., 1999).

A técnica de PCR foi desenvolvida há mais de trinta anos e tem se tornado cada vez mais utilizada na diagnose de doenças de plantas, tornando-se muito comum em laboratórios com esta finalidade. Esta técnica apresenta grandes vantagens para a detecção de patógenos incluindo rapidez, especificidade e sensibilidade. A sensibilidade do método foi constatada por Hadidi et al. (1993), trabalhando com a detecção do vírus *Potato leafroll virus* (PLRV) em batata. Estes autores verificaram que é possível se detectar a presença do vírus a partir de 100fg de RNA viral purificado. Em testes realizados por Figueira, Domier e Arcy (1997), visando à comparação de três técnicas para detecção de estirpes de *Barley yellow dwarf virus* (BYDV), a saber, TAS-ELISA, hibridização com cDNA e RT-PCR, os autores concluíram que a técnica da PCR foi a mais sensível na detecção de estirpes deste vírus,

sendo capaz de detectar quantidades na ordem de 0,1pg de vírus em preparações purificadas e 0,5pg em tecidos vegetais infectados. Resultados que representam uma importante característica para a realização de testes nos quais a detecção de determinado patógeno é imprescindível, assim como ocorre para a diagnose de fitovírus quarentenários ou mesmo os vírus não quarentenários regulamentados.

A utilização da RT-PCR tem sido válida não apenas para detecção de espécies de vírus, mas também tem tido eficiência para detecção de estirpes viróticas proximamente relacionadas (BOONHAM et al., 2002; BORJA; PONZ, 1992; FIGUEIRA; DOMIER; ARCY, 1997; LORENZEN et al., 2006, 2008; SING; NIE, 2001; SINGH; SINGH, 1998). O uso da PCR na detecção de gêneros ou mesmo famílias de vírus de plantas, por meio da utilização de *primers* desenhados especificamente para este fim foi outro aspecto observado. Exemplos de trabalhos neste sentido foram realizados recentemente para a detecção de vírus do gênero *Potyvirus* e da família *Bromoviridae* (HA et al., 2008; UNTIVEROS; PEREZ-EGUSQUIZA; CLOVER, 2010).

Com o crescente desenvolvimento técnico-científico, novos métodos baseados em técnicas moleculares têm surgido. Multiplex PCR, Nested PCR, Co-operational PCR, Real-Time PCR, dentre outras variações, têm provido cada vez mais rapidez, sensibilidade e precisão nos resultados e isto é uma tendência evidente e que ainda deve evoluir muito mais no campo da diagnose de fitovírus. Price et al. (2010) padronizaram a metodologia de detecção do *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) e *Triticum mosaic virus* (TriMV), por intermédio de Multiplex Real-Time PCR. A técnica de microarranjos também representa um avanço para a diagnose, dada a sua eficiência e capacidade de detecção simultânea de diferentes patógenos. De acordo com Lopez et al. (2010), a padronização da metodologia para a diagnose de fitopatógenos quarentenários já tem sido requisitada na União Europeia com certa urgência.

Ainda vários exemplos de técnicas moleculares mais sensíveis que a RT-PCR podem ser apresentados, entretanto, a eficiência da RT-PCR para fins diagnósticos é evidente e, embora não seja o método mais preciso dentre os existentes, pode perfeitamente ser aplicado em testes de rotina para a diagnose de fitovírus. As vantagens acima citadas dão indícios de sua possível utilização como método laboratorial rotineiro, entretanto, também, é fundamental salientar a existência de fatores adversos que podem representar limitações ao emprego desta técnica, mas estes, certamente, não superam em importância as vantagens apresentadas.

A utilização da técnica de RT-PCR carece de uma padronização e otimização para a sua aplicabilidade em testes de rotina realizados em laboratórios (LOPEZ et al., 2010). Alvarez (2004) discute que os principais problemas estão relacionados às técnicas de amostragem utilizadas, bem como ao manuseio das amostras que podem facilmente serem contaminadas. Também é feita a afirmação de que a realização de testes laboratoriais rotineiros, baseados na técnica de PCR, frequentemente têm uma precisão menor que a esperada, em virtude da presença de inibidores enzimáticos presentes nas amostras, o que requer a utilização de novos componentes na reação, visando suprimir a atividade inibidora presente. Além disso, o sucesso da PCR depende, também, de importantes fatores como o tecido utilizado para a análise ou mesmo as condições fisiológicas da amostra (MAES; GARBEVA; CREPEL, 1996). Uma preocupação com relação à utilização rotineira da RT-PCR é o custo de sua utilização, entretanto, quando comparado com outras técnicas os valores despendidos para a realização das análises foram medianos. Nesta mesma comparação outros parâmetros como sensibilidade, especificidade, rapidez e viabilidade das técnicas para detecção de vírus e bactérias, também, foram avaliados, sendo que o PCR clássico obteve classificação intermediária comparado com técnicas mais recentes (LÓPEZ et al., 2010).

Outro possível problema que pode ocorrer na PCR é o falso resultado negativo, que pode ser atribuído à presença de componentes inibidores da polimerase, à degradação do DNA alvo e, também, a problemas com os reagentes utilizados na reação (LOUWS; RADEMAKER; BRUIJN, 1999). Neste caso, a solução para este problema é a utilização de amostras extras, com a presença comprovada do patógeno, que atuarão como controles positivos das reações, permitindo assim, um diagnóstico, tanto negativo como positivo mais seguro.

Os controles positivos têm grande importância para a diagnose, visto que dão suporte ao resultado obtido. Entretanto, também, é necessário se aperfeiçoar a utilização destes controles através da integração da sua utilização com técnicas de diagnose mais modernas para auxiliar o processo de detecção no sentido de promover um aumento na sua eficiência, bem como na segurança fitossanitária dos testes diagnósticos. Para isso a utilização de controles positivos compostos de plasmídeos contendo fragmentos genômicos dos vírus a serem diagnosticados é uma ferramenta de grande importância, uma vez que não permite a presença da forma infectiva do vírus. Esta característica é importante visto que a dispersão de vírus, ainda, tem ocorrido de forma significativa, mesmo com todos os aparatos tecnológicos disponíveis na atualidade. Um exemplo deste fato foi constatado recentemente por Costa e Ventura (2010), reportando pela primeira vez a presença do vírus *Turnip mosaic virus* (TuMV) em plantas de agrião no Brasil. Outro exemplo que pode dar uma boa visão dos riscos que a introdução de um vírus representa é ilustrado pelo que ocorreu com o *Pepino mosaic virus* (PepMV). No ano de 1999, ainda, não se tinha conhecimento do vírus PepMV infectando plantas de tomate na Europa e hoje, depois de uma década, este vírus representa a principal doença que afeta tomate em estufas do mundo todo, incluindo vários países europeus e de outros continentes, dentre estes Canadá e Estados Unidos. Pesquisas conduzidas de

2001 a 2003 em estufas demonstraram que os danos causados pelo vírus podem chegar a 38%, que representa um valor altamente significativo (COTILLON; GIRARD; DUCOURET, 2002; FRENCH et al., 2001; HANSSEN et al., 2008; HASIÓW; BORODYNKO; POSPIESNY, 2008; LING et al., 2008; MAROON-LANGO et al., 2005; MUMFORD; METCALFE, 2001; PAGÁN et al., 2006; VLUGT et al., 2000). Por isso a precisão nos testes diagnósticos deve ser sempre otimizada e mantida no mais alto padrão possível, uma vez que a entrada de um vírus pode causar danos de proporções econômicas elevada.

Com todas estas evidências fica clara a necessidade de métodos diagnósticos confiáveis e que a técnica de PCR/RT-PCR é perfeitamente passível de ser empregada para a diagnose de vírus quarentenários em material vegetal oriundo de importação pelo Brasil e, também, para avaliar quanto à presença de vírus, os produtos brasileiros a serem exportados.

2.4 Breve descrição dos vírus

2.4.1 Vírus Quarentenários

2.4.1.1 *Arabid mosaic virus* (ArMV)

Descrito por Smith e Markham (1994), o ArMV é um vírus que possui como material genético RNA na forma de uma partícula isométrica com cerca de 30nm de diâmetro e pertencente ao gênero *Nepovirus* da família *Secoviridae*. A sua gama de plantas hospedeiras é vasta (MURANT, 1981) e dentre as principais plantas atacadas pode-se citar a videira, framboesa, morango, oliveira, beterraba e lúpulo. A infecção por meio de sementes de várias plantas, também, é realizada. De acordo com o trabalho realizado por Schmelzer (1963), mais de 93 espécies pertencentes a 28 famílias de dicotiledôneas foram infectadas por

este vírus. A sua transmissão pode ser feita pelo fitonematóide *Xiphinema diversicaudatum* (TRUDGILL et al., 1983) e, também, de forma mecânica.

As doenças causadas pela infecção por ArMV são nanismo amarelo da framboesa, mosaico e crestamento amarelo de morango, enfezamento mosqueado de cucurbitáceas, enfezamento clorótico em alface e, também, causa necrose em aipo, dentre outras (LOUDES et al., 1995; WETZEL et al., 2002). É um vírus de ocorrência na Europa, mas atualmente há relatos de sua ocorrência no Japão.

2.4.1.2 Pepino mosaic virus (PepMV)

Este vírus foi descrito por Jones, Koenig e Lesemann (1980) infectando plantas de melão de árvore (*Solanum muricatum*) no Peru. PepMV pertence ao gênero *Potexvirus* da família *Alphaflexiviridae*, possui RNA fita simples positivo como material genético em formato de partículas flexuosas filamentosas de 508nm de comprimento e 12,5nm de diâmetro. É transmitido por intermédio de inoculação mecânica em muitas espécies de solanáceas e nenhum vetor é conhecido para a disseminação deste vírus, entretanto, abelhas polinizadoras podem disseminar o vírus. A transmissão oriunda do contato planta a planta ocorre facilmente e sua alta estabilidade pode estar contribuindo para sua rápida dispersão. A disseminação por meio de sementes, também, pode ocorrer, mas em pequena escala, visto que o vírus não estaria associado ao endosperma ou embrião (KRINKELS, 2001). Dentre os sintomas exibidos em folhas jovens de plantas de tomate pode-se citar mosaico, distorções, embolhamento e enfezamento. Em batata a infecção por PepMV produziu mosaico atenuado e mosqueado.

No ano de 1999 este vírus foi encontrado em cultivos de tomate na Europa (JORD'A et al., 2001a, 2001b; MUMFORD; METCALFE, 2001;

ROGGERO; MASENGA; LENZI, 2001; VLUGHT et al., 2000) e também foi reportado na América do Norte (FRENCH et al., 2001). Com isto, a sua importância como fitopatógeno cresceu, fazendo com que o PepMV fosse temido também em outros continentes devido aos potenciais danos que a sua infecção pode causar.

Já foi reportada a presença de PepMV no Perú, nas regiões Andina Central e Sul, na Europa, em países como Alemanha, Itália, Espanha, Holanda, França e Reino Unido, no Canadá, EUA e China. Mais recentemente o PepMV foi relatado na Bélgica e Polônia (HANSSEN et al., 2008; HASIÓW; BORODYNKO; POSPIESZNY, 2008).

2.4.1.3 *Potato virus A (PVA)*

Descrito por Murphy e McKay (1932), o PVA é um vírus com RNA fita simples, contendo partículas filamentosas com tamanho em torno de 730nm. Possui hospedeiros apenas em solanáceas e está distribuído na maioria dos países produtores de batata. Dentre os sintomas causados em solanáceas estão: mosaico, clorose das nervuras, mosqueado, necrose, encarquilhamento e enfezamento, dependendo da estirpe viral. Nos híbridos de batata A6 e SdA, o vírus causa várias lesões locais (BARTELS, 1970; COCKERHAM, 1957; KÖHLER, 1953). Plantas infectadas com PVA podem apresentar perdas de rendimento na ordem de 40%.

A transmissão pode ser realizada por sete diferentes tipos de afídeos de maneira não persistente, dentre estes ocorre de forma mais notável por *Aphis frangulae*, *A. nasturtii* e *Myzus persicae* (MACLACHLAN; LARSON; WALKER, 1954).

2.4.2 Não quarentenários

2.4.2.1 *Cucumber mosaic virus* (CMV)

Descrito por Doolittle (1916) e Jagger (1916), o CMV é um membro da família *Bromoviridae* e é um dos mais importantes vírus distribuído pelo mundo, infectando mais de 1200 espécies de plantas distribuídas em 100 famílias diferentes (DOUINE et al., 1979; EDWARDSON; CHRISTIE, 1991). Possui estrutura isométrica com cerca de 30nm e seu genoma é constituído de três RNAs fita simples positiva e um RNA subgenômico, oriundo do RNA3, o qual é responsável pela síntese da capa proteica. A transmissão pode ser feita por mais de 80 espécies de afídeos e *Myzus persicae* e *Aphis gossypii* são os mais importantes (EDWARDSON; CHRISTIE, 1991). A transmissão por meio de sementes, também, foi constatada e a eficiência por esse meio de disseminação varia de 1 a 50% (PALUKAITIS et al., 1992), na semente o vírus pode estar associado ao endosperma, embrião ou tegumento. A transmissão, por intermédio do pólen, também, foi verificada. As sementes de plantas daninhas infectadas com o vírus representam grande importância epidemiológica (QUIOT; LABONNE; QUIOT-DOUINE, 1983).

Os sintomas apresentados por plantas infectadas com CMV são variáveis de acordo com o hospedeiro e com a estirpe viral e abrangem: lesões locais cloróticas e necróticas, mosaico e enfezamento, dentre outros. A sua distribuição é ampla por todo o mundo tanto em países situados em zonas temperadas como nas tropicais (GIBBS; HARRISON, 1970; PALUKAITIS et al., 1992).

2.4.2.2 *Lettuce mosaic virus (LMV)*

O LMV, descrito por Jagger (1921), pertence à família *Potyviridae* e está classificado dentro do gênero *Potyvirus*. É um vírus que possui ssRNA+ encapsulado em uma partícula única, de formato alongado e flexível, medindo cerca de 750nm de comprimento por 13nm de diâmetro.

A gama de hospedeiro é ampla e abrange diversas famílias de dicotiledôneas, particularmente, dentro da família *Asteraceae* várias espécies são suscetíveis (COSTA; DUFFUS, 1958). Os sintomas de LMV em alface caracterizam-se por mosaico esbranquiçado, mosqueado, distorções foliares, amarelecimento e, principalmente, pela redução do crescimento. Isolados mais agressivos do vírus podem ocasionar manchas necróticas nas folhas e morte da planta (CHUNG; AZEVEDO; COLARICCIO, 2004; STANGARLIN, 1995; TOMLINSON, 1970).

A epidemiologia do LMV está associada à transmissão por sementes de plantas infectadas, à rápida disseminação pelos afídeos vetores e à ocorrência de grande número de espécies da vegetação espontânea como hospedeiras naturais do vírus. Além disso, a prática de plantios consecutivos propicia perdas de até 100% na cultura (DINANT; LOT, 1992; ZERBINI, 1995).

O vírus é amplamente distribuído em locais em que ocorre o cultivo de alface (KRAUSE-SAKATE et al., 2002).

2.4.2.3 *Potato leafroll virus (PLRV)*

Descrito por Quanjier, Lek e Botjes (1916), o PLRV é um vírus do gênero *Polerovirus* pertencente à família *Luteoviridae*. Seu genoma é constituído de RNA e a estrutura da partícula viral possui formato isométrico com 24nm de diâmetro. Das espécies infectadas por este vírus as mais

conhecidas estão dentro da família *Solanaceae*. Têm-se como hospedeiros fora de *Solanaceae*: *Amaranthus caudatus*, *Celosia argentea* e *Gomphrena globosa*, *Nolana lanceolata*, *Capsella bursa-pastoris* (THOMAS, 1984) e *Montia perfoliata* (NATTI; KIRKPATRICK; ROSS, 1953; TAMADA; HARRISON; ROBERTS, 1984; THOMAS, 1984). O vírus é transmitido de maneira persistente por afídeos dos quais *Myzus persicae* tem maior importância e eficiência na disseminação (HARRISON, 1984). As plantas infectadas com PLRV apresentam: clorose internerval sistêmica, folhas com enrolamento e enfezamento. A distribuição geográfica do vírus é ampla e sua presença é comumente verificada em regiões produtoras de batata. Alguns autores verificaram a ocorrência de doenças relacionadas à presença do vírus na América do Norte, América do Sul e proximidades da Austrália e Nova Guiné, entretanto há possibilidade de que outros vírus estejam envolvidos no processo infectivo (ALTSTATT; IVANOFF, 1945; COSTA, 1949; SUTTON, 1955).

2.4.2.4 Potato virus X (PVX)

Descrito por Smith (1931), o vírus X da batata pertence à família *Alphaflexiviridae* e está situado dentro do gênero *Potexvirus*. É um vírus que possui partículas filamentosas com 515nm de comprimento e 13nm de diâmetro. Seu genoma é formado de uma fita simples de RNA e senso positivo. Este vírus é capaz de infectar mais de 240 espécies de plantas em 16 famílias diferentes. A maior parte dos hospedeiros está dentro da família *Solanaceae* (PURCIFULL; EDWARDSON, 1981). O PVX, também, é facilmente transmitido de uma geração para outra por tubérculos infectados e embora a principal forma de disseminação no campo seja de forma mecânica, há relatos de que a transmissão pode ser realizada pelo fungo *Synchytrium endobioticum* (NIENHAUS; STILLE, 1965) e pelas cigarrinhas *Melanoplus differentialis* (WALTERS, 1952)

e *Tettigonia viridissima* (SCHUMUTTERER, 1961). Os sintomas da infecção por este vírus em espécies diagnósticas são: mosaico atenuado em plantas de batata causa e anéis sistêmicos necróticos, mosaico e mosqueado em diversos hospedeiros. O vírus tem ampla distribuição, sendo encontrado na maioria das áreas de cultivo de batata (SOUZA-DIAZ; IMAUTI, 1997).

2.4.2.5 Potato virus Y (PVY)

Descrito pela primeira vez na Inglaterra por Smith em 1931 (BOKX; HUTTINGA, 1981; BRUNT et al., 1996). O PVY pertence ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae* e é transmitido na natureza por diferentes afídeos vetores, principalmente *Myzus persicae*, de modo não persistente ou estiletar (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994), entretanto a principal forma de disseminação deste vírus ocorre por meio de tubérculos infectados destinados à propagação (SOUZA-DIAZ; IMAUTI, 1997). Seu genoma é composto por uma única molécula de RNA de cerca de 10kb, linear, senso positivo, possuindo apenas uma ORF. Este vírus é um importante patógeno em solanáceas, principalmente, em batata, pimentão, tomate e fumo (BOKX; HUTTINGA, 1981; GLAIS; KERLAN; ROBAGLIA, 2001). Em plantas de batata o PVY causa mosaico geralmente visível em folhas mais novas, com os sintomas iniciando nas nervuras (BOKX; BUS, 1996; ELLIS; STACE-SMITH; VILLIERS, 1997).

2.4.2.6 Squash mosaic virus (SqMV)

Este vírus descrito por Freitag (1941, 1956) e Lindberg, Hall e Walker (1956) é um membro do gênero *Comovirus* dentro da família *Comoviridae*. É um vírus que pode ser transmitido pelas sementes e por besouros crisomelídeos (*Diabrotica* spp. and *Acalymma* spp.) (FREITAG, 1956; LASTRA, 1968;

SITTERLY, 1960; STONER, 1963), um besouro coccinelídeo (COHEN; NITZANY, 1963) e uma cigarrinha (STONER, 1963), infectando a maioria das plantas no gênero *Cucurbita* e *Cucumis* (HAUDENSHIELD; PALUKAITIS, 1998; NELSON; KNUHTSEN, 1973). Assim como outros comovírus, o SqMV tem um genoma de RNA bipartido senso positivo com RNA1 e RNA2, os quais estão separadamente encapsidados em partículas isométricas de 28nm de diâmetro. Os sintomas produzidos em abobrinha (*Cucurbita pepo*) são o mosaico severo e deformações foliares. Em *Cucumis sativus* ocorre clorose sistêmica nas nervuras e manchas amareladas (RAMOS; LIMA; GONÇALVES, 2003).

2.4.2.7 Tobacco mosaic virus (TMV)

Descrito por Mayer em 1886, o TMV é um vírus pertencente ao gênero *Tobamovirus* dentro da família *Virgaviridae* que contém como material genético RNA fita simples, senso positivo e as partículas virais se apresentam em formato de bastões rígidos com 300nm de comprimento e 9nm de espessura. A gama de hospedeiros é vasta, este vírus afeta pelo menos 199 espécies de plantas distribuídas em 30 famílias diferentes (SHEW; LUCAS, 1991). Os sintomas exibidos pelas plantas infectadas por TMV incluem clorose nas nervuras, mosaico, necrose, nanismo e distorções foliares (TANZI; BETTI; CANOVA, 1986). A transmissão ocorre eficientemente de forma mecânica, visto que o vírion possui grande estabilidade (CHITRA et al., 1999; GULSER; KUTLUK; CANDEMIR, 2008; PARES; GUNN; KESKULA, 1996). Como os demais *Tobamovirus*, o TMV pode ser veiculado pelas sementes, ficando as suas partículas aderidas na parte externa da mesma, uma vez que não são capazes de infectar os tecidos do embrião (BROADBENT, 1965; JOHANSEN; EDWARDS; HAMPTON, 1994; TAYLOR; FROGAN; KIMBLE, 1961). O

TMV é um vírus amplamente distribuído no mundo (REGENMORTEL et al., 2000).

2.4.2.8 *Tomato mosaic virus (ToMV)*

Descrito por Clinton (1909), o ToMV é um vírus pertencente ao gênero *Tobamovirus* situado dentro da família *Virgaviridae* que contém como material genético RNA fita simples, senso positivo e as partículas virais se apresentam em formato de bastões rígidos com 300nm de comprimento e 18nm de espessura. É um vírus amplamente distribuído no mundo e que causas importantes perdas econômicas na cultura do tomate em vários países. A sua transmissão é realizada apenas mecanicamente. O maior agente responsável pela disseminação deste vírus é o próprio homem, introduzindo o vírus por meio de sementes contaminadas e ou mudas infectadas com o vírus (BROADBENT, 1965). Os sintomas causados pelo ToMV incluem lesões necróticas locais, clorose e enfezamento e ainda podem ocorrer manchas necróticas e distorções foliares (JONES et al., 1991). A distribuição deste vírus no mundo provavelmente acompanha a presença de área de cultivo do tomate (REGENMORTEL et al., 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Virologia Molecular da Universidade Federal de Lavras (UFLA), situado no Departamento de Fitopatologia (DFP).

3.1 Obtenção dos isolados virais

Os vírus enquadrados na categoria de pragas não quarentenárias regulamentadas (PNQR) foram oriundos do Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais (CIV-MG) e da empresa Sakata, que forneceu o isolado de ToMV. Foram escolhidos por serem vírus transmissíveis pelas sementes (ToMV, TMV, LMV, SqMV e CMV) e por serem considerados pragas não quarentenárias regulamentadas (PNQR) na cultura da batata (PVX, PVY e PLRV). Os vírus quarentenários foram provenientes da Holanda, tendo sido doados pelo Dr. Dick Peters e pelo Dr. René van der Vlugt, na forma de RNA total extraído de plantas infectadas.

3.2 Desenho dos *primers*

Os pares de *primers* foram desenhados flanqueando o gene do capsídeo dos vírus eleitos, tomando-se como base as sequências disponíveis no GenBank. Para a seleção das regiões mais conservadas, as sequências genômicas dos isolados virais selecionados foram alinhadas com o auxílio do programa ClustalW. Após a clonagem e sequenciamento do fragmento amplificado, foi desenhado um segundo par de *primers*, na região interna do gene do capsídeo, com a finalidade de amplificar um fragmento contendo de 300 a 800 pb, para ser empregado nos testes diagnósticos. Foram escolhidas as regiões mais

conservadas do genoma e os *primers* foram analisados com relação a sua capacidade de formação de homodímeros, heterodímeros, proporção de CG e a formação de *hairpin*, com o auxílio do programa OligoAnalyzer. Os *primers* foram, ainda, submetidos a uma comparação com os genomas depositados no GenBank por meio do programa BLAST (BLAST..., 2010), visando observar a sua especificidade com o genoma viral alvo.

3.3 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído por meio do método do Trizol (AUSTRALIA FOOD AND GROCERY COUNCIL - AFGC, 2005). Nesta metodologia folhas jovens, infectadas (1g), foram maceradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido e ao pó obtido, foram adicionados 5mL da solução de Trizol (380 mL/L de Fenol insaturado; 118,16g de Guanidina tiocianato, 0,8M; 76,12g de Amônia tiocianato, 0,4M; Acetato de sódio 33,4mL, 01M; Glicerol 50mL e água ultra pura). Após homogeneização, os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 5 minutos e submetidos à centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo e o pellet descartado. Em seguida foram adicionados 300µL de clorofórmio em cada tubo, estes foram agitados em vórtex e deixados em temperatura ambiente por 3 minutos. Para finalizar a separação das fases, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Cuidadosamente a fase aquosa foi pipetada e transferida para outro tubo, onde foram adicionados isopropanol e 0,8M de citrato de sódio/1,2M de NaCl, na quantidade de ½ do volume da fase aquosa, misturando-se gentilmente por inversão e deixando-se em temperatura ambiente por 10 minutos, para a precipitação do RNA. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 300µL de etanol a 70%. Após centrifugação a 12.000 rpm

por 10 minutos a 4°C e descarte do sobrenadante, o pellet foi secado a vácuo por 2 minutos e ressuspendido em 25µL de água ultra-pura, tratada com dietil pirocarbonato (DEPC). Ao final da extração, os RNAs foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,7%.

3.4 RT-PCR

O cDNA foi sintetizado utilizando-se os *primers* antisense, listados no quadro 1 e a enzima transcriptase reversa M-MLV RT da Promega, por meio da seguinte mistura: 5µL de tampão da enzima (5x), 2µL de dNTP, 10mM, 1µL de DTT, 1µ do *primer* antisense 10pM, 0,8µL de M-MLV RT, 5µL do RNA total e água ultrapura com DEPC para completar o volume total de 20µL. A reação foi realizada mediante a incubação da mistura em termociclador por 60 minutos a 42°C e 5 minutos a 95°C, após esta etapa os tubos foram transferidos para um recipiente contendo gelo.

Para a PCR foram utilizados 1µL do cDNA, 10µL do tampão da enzima (5x), 2µL de MgCl₂, 25mM, 1µL de dNTP, 10mM, 1,5µL de *primer*, 0,25µL da enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) e 32,75µL de água ultrapura tratada com DEPC. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,7%.

3.5 Preparo das células competentes para a realização da clonagem

As células competentes (DH5α) foram mantidas no gelo até descongelarem totalmente. Com uma alça de repicagem estéril, as células foram estriadas em placa Petri contendo meio LB sólido sem ampicilina. A placa foi, então, incubada a 37°C por cerca de 15 horas. Das colônias crescidas, três delas foram selecionadas e transferidas para um erlenmeyer de 500mL, contendo 100mL

de meio SOB e colocado sob agitação (150rpm) a 37°C por duas horas e reduziu-se a temperatura para 18°C até que a $OD_{600}=0,600$ fosse atingida, o que leva em torno de 30 horas. Após atingir o valor desejado, as células foram incubadas no gelo por 10 minutos, seguido por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao pellet resultante foram adicionados 30mL de meio TB resfriado em gelo. Os tubos contendo as células ressuspensas em meio TB foram então incubadas em gelo por 10 minutos. Novamente foi realizada uma centrifugação a 4000 rpm e 4°C por 10 minutos. O pellet foi ressuspendido em 8 mL de meio TB e a adição e 7% de DMSO gelado foi feita, seguida por incubação por 10 minutos em gelo. As células foram então aliqüotadas em microtubos de 1,5mL, colocando-se 100µL por microtubo. Após a adição das células os microtubos foram imediatamente transferidos para recipiente contendo nitrogênio líquido seguido por armazenagem em ultra freezer a -80°C.

3.6 Clonagem e sequenciamento dos fragmentos genômicos virais

Os produtos frescos de PCR foram purificados, empregando-se os kits comerciais de purificação de DNA a partir de gel de agarose e, também, diretamente do produto de PCR (Promega: Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System e NORGEN: PCR Purification Kit e DNA Gel extraction kit) e clonados no plasmídeo pGen T-easy (Promega). A reação de ligação dos fragmentos genômicos ao vetor de clonagem e todo o processo de clonagem foram realizadas seguindo-se a recomendação do fabricante. Após a transformação das células competentes de *Escherichia coli* estas foram plaqueadas em meio LB sólido e em seguida multiplicadas em meio LB líquido contendo ampicilina. Após a multiplicação das bactérias os plasmídeos foram purificados empregando-se a técnica de lise alcalina (SAMBROOK; FRITSCH;

MANIATIS, 1989). Os plasmídeos contendo os fragmentos de interesse foram liofilizados e enviados para a empresa coreana MacroGen, onde foi realizado o sequenciamento genômico. As sequências obtidas tiveram suas identidades confirmadas por meio de comparação com sequências depositadas no GenBank por meio da utilização do programa BLAST.

3.7 Extração de DNA plasmidial e restrição enzimática

Para a extração do DNA plasmidial, as bactérias transformadas crescidas em meio líquido foram decantadas por meio de centrifugação (12000 x RPM por 10'') em microtubos de 1,5 mL, após a decantação o sobrenadante foi descartado, deixando-se de 50 a 100µL necessários para a ressuspensão do pellet por meio de vórtex. Às células ressuspendidas foram adicionados 300µL do tampão TENS (0,5mL de Tris-HCl pH8 a 1M, 0,5mL de NaOH a 10N, 1,25 mL de 20% SDS e completou-se o volume para 50mL com água ultra pura), seguido por homogeneização por vórtex. Na etapa seguinte adicionou-se 150µL de NaOAc pH5,2 a 3M e a mistura foi homogeneizada novamente. Um spin a 12000 rpm por 5' minutos foi realizado para decantação dos restos celulares e DNA cromossomal. O sobrenadante resultante foi transferido para outro microtubo, no qual foram adicionados 5µL de RNase A, seguido por incubação por 25 minutos a 37°C. Após incubação foram adicionados 200µL de PCI (50 µL de fenol saturado, 50 µL de clorofórmio e 1,2mL de álcool isoamílico), posteriormente, os tubos foram novamente centrifugados (12000 rpm por 5') e 200µL do sobrenadante foram adicionados em um novo tubo. A adição de 900µL de etanol gelado foi realizada, bem como a homogeneização (vortex por 5segundos) e centrifugação (12000 rpm por 5') desta mistura. O pellet gerado foi enxaguado em 400µL de etanol a 70% por meio de uma breve centrifugação (12000 rpm por 10''). A etapa final consistiu de secagem do pellet e

ressuspensão deste em 40 μ L de água ultra pura. 1 μ L do produto final foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,7%.

A restrição enzimática foi realizada com a enzima EcoRI em um mix de reação contendo 1 μ L de tampão 10x, 1 μ L da enzima, 2 μ L da amostra e 6 μ L de água ultra pura, totalizando um volume final de 10 μ L. Após a mistura dos componentes da reação, esta foi incubada a 37°C por duas horas. Ao final deste período de incubação 1 μ L da amostra foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,7%. Para efeito comparativo, juntamente com a amostra submetida à restrição, o produto de PCR, o produto de PCR purificado e o plasmídeo íntegro contendo o fragmento, também foram aplicados no mesmo gel.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenho dos *primers*

O trabalho foi conduzido utilizando-se onze vírus diferentes. Para cada um dos vírus foram desenhados dois pares de *primers* com o objetivo de amplificar total e parcialmente o gene da capa proteica. Os *primers* foram desenhados contendo de 15 a 19 nucleotídeos. Para todos os *primers* a amplificação ocorreu da forma esperada. Os fragmentos genômicos amplificados, abrangendo completamente o gene da capa protéica, produziram bandas variando de 782pb a 1794pb e os fragmentos contidos dentro da capa foram de 335 a 642pb. As temperaturas de anelamento foram variáveis, entretanto, não houve grande discrepância em torno da média de 46°C. Os desenhos foram realizados baseados em sequências genômicas depositadas no GenBank. Gaspar et al. (2008), utilizaram o mesmo método para o desenho de um *primer* degenerado apto à detecção de espécies de *Carlavirus* e obtiveram sucesso. No trabalho citado, as sequencias foram obtidas no GenBank, alinhadas utilizando-se o programa ClustalW e a comparação final foi feita por meio do programa BLAST, assim como foi feito neste trabalho. Outros programas poderiam ser utilizados para este fim, entretanto os selecionados foram eficientes. Lemoine, Combes e Crom (2009), avaliaram a utilização de diversos programas para a confecção de *primers* e proveram, em seu trabalho, suporte para a escolha daquele mais adequados, considerando-se sempre o tipo de *primer* e o objetivo para o qual foi designado. As sequências dos *primers* desenhados neste trabalho estão descritos no quadro 1.

Quadro 1 Lista de *primers* especificamente desenhados

Vírus	Sentido	<i>Primers</i>
<i>Primers que flanqueiam a capa proteica</i>		
PLRV	Forward	5' GGAAGTTCAAGCCTCG 3'
PLRV	Reverse	5' TCTGGGGAGTTGGAG 3'
CMV	Forward	5' TCATGGATGCTTCTCC 3'
CMV	Reverse	5' GCTGGATGGACAACC 3'
LMV	Forward	5' CCAGCAAGGAAGCCAG 3'
LMV	Reverse	5' GGGAGAGAATACTAACGG 3'
PVX	Forward	5' CAACGGMAAGAACGCAGC 3'
PVX	Reverse	5' CATACAATCAAACCAG 3'
PVY	Forward	5' CAGGAAGGRAARGCTCC 3'
PVY	Reverse	5' GCCAAAATACTTACTGC 3'
SqMV	Forward	5' TTTGACGGCATGGTC 3'
SqMV	Reverse	5' GGAAAGAAGCCACAAC 3'
TMV	Forward	5' GTTGATGAGTTCATGG 3'
TMV	Reverse	5' GTGGAGGAAAAACAC 3'
ToMV	Forward	5' CCAATGTCGGTTAGACTCG 3'
ToMV	Reverse	5' CGCTCCAAGACACTAC 3'
PVA	Forward	5' GGGATAGATCACATG 3'
PVA	Reverse	5' CCCACTCAAACCTCAC 3'
PepMV	Forward	5' CAGGYCATCATTGAC 3'
PepMV	Reverse	5' TAGAAAACCCCACTC 3'
ArMV	Forward	5' TGGCATGGGARAATG 3'
ArMV	Reverse	5' GTCCAACAAGGCAAG 3'
<i>Primers amplificando dentro da capa protéica</i>		
CMV-C 499F	Forward	5' ACTATTAACCACCCAACC 3'
CMV-C 499R	Reverse	5' ACTGGGAGCACYCCAG 3'
LMV-C 594F	Forward	5' CAAAGGCAATCACACAG 3'
LMV-C 594R	Reverse	5' TTCTCTCCTGGGTG 3'
PVY-C 552F	Forward	5' CCAAAATGAGAATGCC 3'
PVY-C 552R	Reverse	5' TCCAACCCGAAAAGTCG -3'
PVX-C 519F	Forward	5' ACMAATGAGGACCTC 3'
PVX-C 519R	Reverse	5' GCATCTAGGCTGGCAAAG 3'
ToMV-C 430F	Forward	5' CTCCATCGCAATTTGTG -3'
ToMV-C 430R	Reverse	5' CCCAGACATACTTTC -3'
ArMV-C 628F	Forward	5' CCACTGGAATATGAC -3'
ArMV-C 628R	Reverse	5' CCACTGGAATATGAC -3'
SqMV-C 404F	Forward	5' GGATGGTTCGYACGCC -3'
SqMV-C 404R	Reverse	5' TCTATGGCAATTTCC -3'
PLRV-C 601F	Forward	5' TGAGTACGGTCGTGG -3'
PLRV-C 601R	Reverse	5' CCTGATGGTGACTCTG -3'
PepMV-C 579F	Forward	5' ATCCYAATACAGCTCC -3'
PepMV-C 579R	Reverse	5' CCCATGTGWCCACGT -3'

Quadro 1, conclusão

PVA-C 642F	Forward	5' GACTCATTTCAGTACC -3'
PVA-C 642R	Reverse	5' ACATCCGTTGCTGTGTG -3'
TMV-C 355F	Forward	5' TCAAACACARCAAGC -3'
TMV-C 355R	Reverse	5' AGGTCCARACCCAMCCCAG -3'

4.2 Síntese dos cDNAs e amplificação do genoma via RT-PCR

Os cDNAs foram sintetizados a partir da reação de transcrição reversa, seguindo as recomendações do fabricante e os resultados obtidos na reação de RT-PCR estão expostos na figura 1.

Os *primers* empregados permitiram a amplificação das bandas esperadas para os vírus e o número de pares de bases correspondente e a temperatura de anelamento adequada para cada vírus foram: CMV= 872pb e 50°C, ToMV= 783pb e 49°C, PVX= 1050pb e 45°C, PVY= 1013pb e 45°C, PLRV=839pb e 50°C, LMV=1049pb e 45°C, TMV=782 e 49°C, SqMV=822pb e 49°C, PepMV=905pb e 50°C, PVA=1025pb e 50°C e ArMV=1794pb e 48°C (Figura, 1).

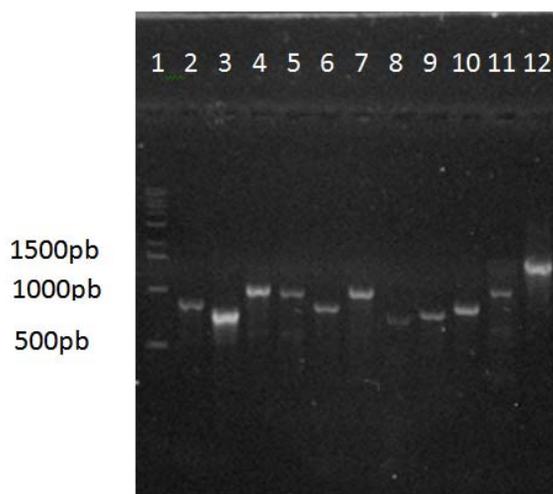


Figura 1 Análise eletroforética em gel de agarose referente aos produtos de RT-PCR. 1=marcador 1kb, 2-12= CMV, ToMV, PVX, PVY, PLRV, LMV, TMV, SqMV, PepMV, PVA e ArMV

O tamanho do *amplicon* gerado foi variável de acordo com a espécie viral, em decorrência das diferentes extensões do gene do capsídeo e em função da disponibilidade de regiões conservadas nos genomas virais para o procedimento do desenho dos *primers*. O programa utilizado no termociclador para a PCR foi o seguinte: 95°C por 2', 95°C por 45", temperatura de anelamento por 1', 72°C por 1', 72°C por 5' e 4° por tempo indeterminado. A única exceção foi com relação ao vírus ARMV, para o qual o tempo de extensão foi acrescido em vinte segundos.

4.3 Clonagem e verificação da clonagem

As clonagens dos fragmentos nos plasmídeos foram realizadas com sucesso, tendo o fragmento clonado sido checado por restrição enzimática com EcoRI (Figura, 2) e, também, por PCR realizado diretamente dos plasmídeos (Figura, 3). Para fins comparativos, além do marcador de 1kb utilizado no

primeiro poço, cada gel teve a presença do produto de PCR e/ou produto de PCR purificado para que seja verificada a coincidência entre as bandas geradas por meio da restrição. O plasmídeo íntegro, contendo o fragmento dos respectivos vírus, também, foi observado na eletroforese, sempre no penúltimo poço à direita. O poço mais à direita contém o produto gerado pela reação de restrição enzimática.

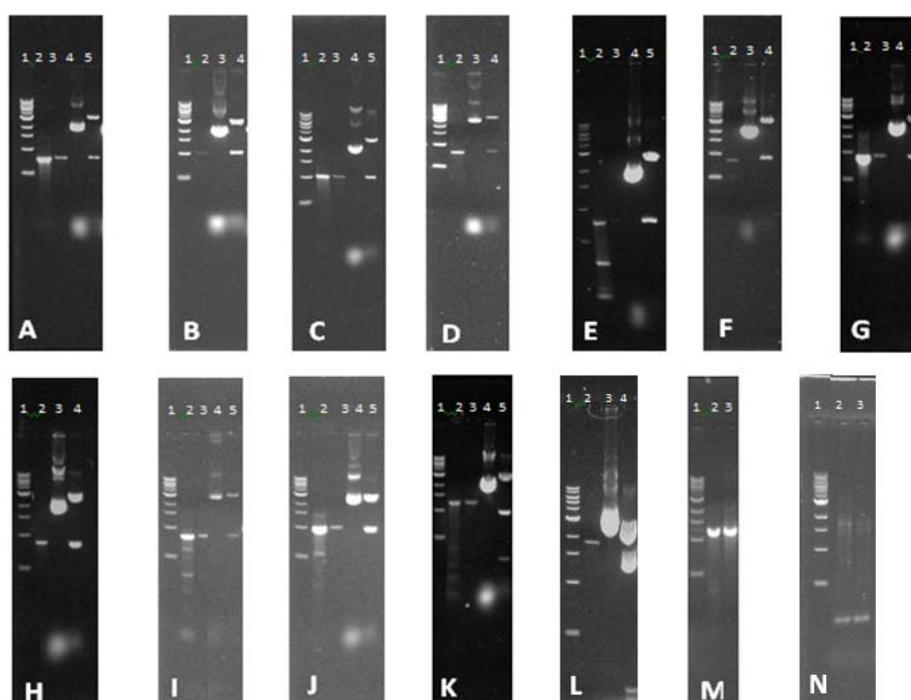


Figura 2 Restrição enzimática dos plasmídeos contendo o fragmento de interesse. A a L corresponde aos vírus TMV, PVY, LMV, ToMV, PMMoV, SqMV, PepMV, CMV, PLRV, PVX, PVA, ArMV, respectivamente. 1=marcador 1Kb, em seguida produto de RT-PCR e/ou produto de RT-PCR purificado, plasmídeo íntegro e plasmídeo clivado por EcoRI. M e N) PCR realizado diretamente dos plasmídeos contendo os fragmentos dos vírus PVA e ArMV, respectivamente

Foi realizada, também, uma PCR diagnóstica com o intuito de testar os plasmídeos como controles positivos. Para isto, folhas de plantas infectadas com os vírus foram coletadas e o RNA total foi extraído. Estes RNAs foram submetidos à transcrição reversa e a PCR. A reação foi realizada utilizando-se dois tubos para cada um dos vírus, em um tubo foi adicionado o cDNA obtido por meio da transcrição reversa do material coletado e no outro tubo o plasmídeo contendo o fragmento genômico correspondente ao vírus, que atuou como controle positivo da reação. A coincidência da altura entre as bandas indica o sucesso do processo diagnóstico (Figura 3).

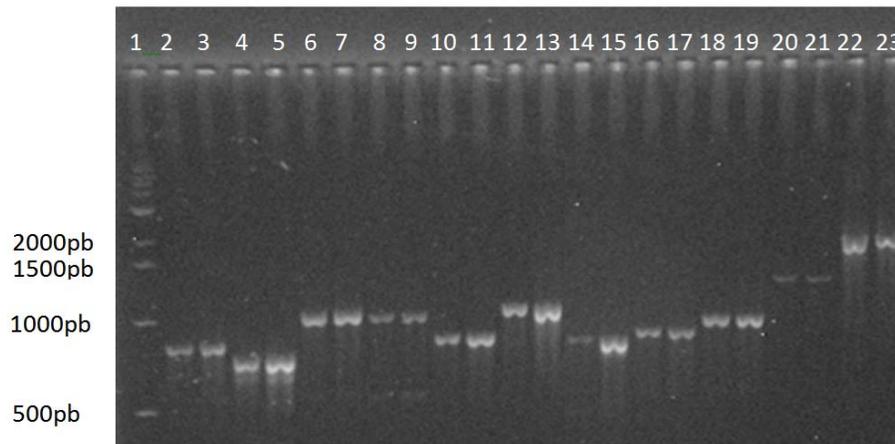


Figura 3 Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR gerados a partir da utilização de cDNA e realizados diretamente dos plasmídeos contendo fragmentos virais. 1= marcador 1kb, 2-23= correspondem aos vírus CMV, ToMV, PVX, PVY, PLRV, LMV, TMV, SqMV, PepMV, PVA e ArMV, respectivamente, sendo que para cada vírus dois poços foram utilizados, o primeiro contendo produto de PCR gerado por cDNA e o segundo poço feito com plasmídeos

4.4 Sequenciamento dos fragmentos amplificados

Os onze plasmídeos contendo o gene da proteína capsial dos vírus foram sequenciados e comparados com os genomas disponíveis no GenBank, tendo apresentado altos valores de identidade com os respectivos vírus empregados. Novos *primers*, baseados nas sequências obtidas foram, então, desenhados.

Uma PCR foi realizada para verificar a aptidão dos novos pares de *primers* que amplificam um fragmento genômico situado dentro do gene da capa proteica dos respectivos vírus. Para todos os 11 vírus já clonados em plasmídeos os novos pares de *primers* amplificaram os fragmentos no tamanho esperado (Figura, 4). A PCR de todos os vírus foi realizada, de acordo com a seguinte programação em termociclador: 95°C por 2', 95° por 45'', temperatura de anelamento por 1', 72' por 1', 72° por 5' e 4° por tempo indeterminado. O segundo, o terceiro e o quarto passo, correspondentes ao ciclo, foram realizados 35 vezes. A temperatura de anelamento foi diferente para alguns pares de *primers* empregados. As temperaturas utilizadas para os vírus CMV, LMV, PVY, PVX, ToMV, SqMV, PLRV, PepMV, PVA, TMV e ArMV, foram respectivamente (em °C): 49, 46, 46, 46, 50, 42, 46, 46, 42, 46 e 47. Os fragmentos gerados foram do seguinte tamanho: CMV= 499pb, LMV= 594pb, PVY= 552pb, PVX= 519pb, ToMV= 430pb, SqMV= 404pb, PLRV= 601pb, PepMV= 579pb, PVA= 642pb, TMV= 335pb e ArMV= 628pb.

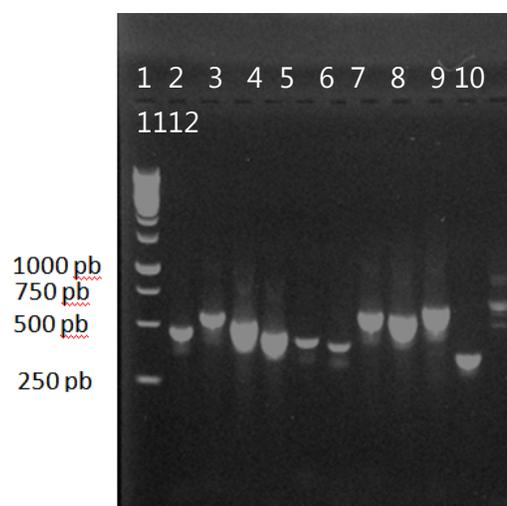


Figura 4 Análise de reação de PCR em gel de agarose (0,7%) utilizando os primers que amplificam fragmento dentro do gene da capa protéica dos vírus clonados em plasmídeos. Os números de 1 a 12 correspondem respectivamente aos vírus: CMV, LMV, PVY, PVX, ToMV, SqMV, PLRV, PepMV, PVA, TMV e ArMV

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta deste trabalho foi iniciar a formação de um banco de plasmídeos para fins diagnósticos e, embora seja possível citar diversos trabalhos em que a clonagem de fragmentos genômicos em plasmídeos foi feita, existem poucos relatando sobre o uso de vetores de clonagem como ferramenta para utilização direta na detecção de fitopatógenos. Ha et al. (2008) utilizaram a clonagem como forma de preservar fragmentos genômicos para posterior averiguação da aptidão de seus *primers* na detecção de *Potyvirus* por PCR. Na área clínica o desenvolvimento de novas metodologias para detecção de vírus em humanos, por meio de qPCR, também, tem feito o uso de plasmídeos, como descrito no trabalho de Gavrilova et al. (2010), que visaram padronizar uma técnica eficiente, rápida e específica para a detecção do *Cowpox virus* (CPXV). E, em um exemplo mais próximo do uso de plasmídeos para diagnose de fitopatógenos, a clonagem, também, foi utilizada por Wang et al. (1999) com o objetivo de expressar o gene da capa proteica do *Lily symptomless virus* (LSV) e prover subsídio para o desenvolvimento de novas tecnologias relativas à detecção de fitovírus. Entretanto, as formas utilizadas nestas pesquisas diferem do objetivo principal deste trabalho.

A detecção rápida e eficiente de fitovírus é uma preocupação mundial, especialmente, tratando-se de fitopatógenos quarentenários. Este cenário é preocupante e traz à tona a necessidade de medidas preventivas. Uma opção já levada em consideração por países da união europeia é a realização de um diagnóstico, não apenas baseado em uma técnica de detecção, mas sim gerado considerando a integração de técnicas sorológicas e moleculares, proporcionando um suporte mais confiável para o resultado final obtido (LÓPEZ et al., 2010). Porém, esta integração no caso de vírus quarentenários seria sem sentido, baseado no propósito deste trabalho, pois, a utilização de outra técnica

além da molecular, necessitaria da presença do patógeno íntegro para servir como controle positivo para outros métodos que atuariam como suporte. Entretanto, este impedimento não ocorre para vírus não quarentenários, em que esta integração certamente seria vantajosa do ponto de vista diagnóstico.

Ainda é necessário dar continuidade a este trabalho e padronizar de forma mais específica a utilização dos plasmídeos construídos como método diagnóstico, bem como adquirir novos vírus e formar um banco de controles positivos mais amplo e representativo, entretanto, o objetivo proposto foi cumprido e uma ferramenta a ser utilizada em testes diagnósticos por RT-PCR, dando um suporte de forma eficiente e prática, com a possibilidade de emprego em testes rotineiros, foi disponibilizada. Além das facilidades referentes aos testes em si, a manutenção dos controles positivos providos é pouco trabalhosa e relativamente barata, sendo, portanto, uma opção altamente recomendável para a utilização proposta. A metodologia provê auxílio pra uma diagnose mais eficiente de vírus quarentenários e de importantes vírus já presentes no Brasil e a sua utilização certamente se refletirá em uma maior segurança relativa à diagnose de fitovírus.

6 CONCLUSÃO

A utilização de plasmídeos contendo o gene do capsídeo dos seguintes vírus: ArMV, PepMV, PVA, PLRV, PVY, PVX, ToMV, TMV, SqMV, CMV e LMV para emprego em testes de diagnose por meio da técnica RT-PCR, revelou-se uma eficiente ferramenta para uso como controle positivo. Além da possibilidade de multiplicação e armazenamento indefinidos, eliminando o risco de acidentes laboratoriais que resultam na disseminação do patógenos em áreas isentas, dispensa o trabalho de manutenção do patógeno em plantas infectadas sob condições de casa-de-vegetação.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Oxford: Academic, 2005. 922 p.
- ALLSTATT, G. E.; IVANOFF, S. S. Yellow top of tomatoes. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 29, p. 29-30, 1945.
- ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. Técnicas sorológicas aplicadas a fitopatologia 3.4.2: difusão dupla em angar. In: _____. **Princípios e técnicas de diagnose aplicada em virologia**. Londrina: EMBRAPA Soja, 2001. p. 45-50.
- ALVAREZ, A. M. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 339-366, Sept. 2004.
- AUSTRALIA FOOD AND GROCERY COUNCIL. **AFGC protocols trizol RNA isolation method**. Disponível em: <http://afgc.stanford.edu/afgc_html/site2Rna.htm#isolation>. Acesso em: 1 set. 2005.
- BARTELS, T. Symptomausbildung von Viren der Kartoffel-Y-Gruppe auf A-6 Blätter. **Potato Research**, Orono, v. 13, p. 119-128, 1970.
- BERIAN, L. O. S. A serologia como método auxiliar no controle de fitovírus. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 1, n. 2, p. 121-126, mar. 1985.
- BLAST assembled refseq genomes. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 10 out. 2010.
- BOKX, J. A.; BUS, C. B. Mottling, crinkling, stipple streak and eye disease (*Potato virus Y*). In: ZAAG, D. E. et al. (Ed.). **Potato diseases: diseases, pest and defects**. Den Haag: NIVAA, 1996. p. 72-74.
- BOKX, J. A.; HUTTINGA, H. **Potato virus Y**. Kew: CMI/AAB, 1981. 6 p. (Descriptions Plant Viruses, 242).
- BOONHAM, N. et al. The detection of tuber necrotic isolates of *Potato virus Y*, and the accurate discrimination of PVY^O, PVY^N, and PVY^C strains using RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, New York, v. 102, n. 1/2, p. 103-112, Apr. 2002.

BORJA, M. J.; PONZ, F. An appraisal of different methods for the detection of walnut strain of Cherry leafroll virus. **Journal of Virological Methods**, New York, v. 36, n. 1, p. 73-83, Jan. 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Importações do agronegócio brasileiro**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/>>. Acesso em: 1 dez. 2009a.

_____. **Intercâmbio comercial do agronegócio**: principais mercados de destino. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/>>. Acesso em: 28 nov. 2009b.

BROADBENT, L. The epidemiology of tomato mosaic, XI: seed-transmission of TMV. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v. 56, p. 177-205, 1965.

BRUNT, A. et al. **Viruses of plants**: descriptions and lists from the vide data base. Cambridge: CABI International, 1996. 1484 p.

CHITRA, T. R. et al. Infection of tomato and bell pepper by ToMV and at different growth stages and establishment of virus in seeds. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 81, n. 2, p. 123-126, Apr. 1999.

CHUNG, R. M.; AZEVEDO, F. J. A.; COLARICCIO, A. Reação de genótipos de alface ao vírus do mosaico da alface patotipo IV. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 37., 2004, Gramado. **Anais...** Brasília: SBF, 2004. p. 107.

CLINTON, G. P. Tomato calico, lima bean, string bean, and muskmelon chlorosis: peach yellows, tobacco and tomato mosaic. **Report of the Connecticut Agricultural Experimental Station**, Cunnecticut, n. 854, p. 1907-1908, 1909.

COCKERHAM, G. Experimental breeding in relation to virus resistance. In: CONFERENCE POTATO VIRUS DISEASES, 3., 1957, Wageningen. **Proceedings...** Wageningen: Veenman & Zonen, 1957. p. 199-203.

COHEN, S.; NITZANY, F. E. Identity of viruses affecting cucurbits in Israel. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 53, p. 193-196, 1963.

COSTA, A. S. Duas novas moléstias de vírus do tomateiro em São Paulo. **Biológico**, São Paulo, v. 15, p. 79-81, 1949.

COSTA, A. S.; DUFFUS, J. E. Observations on lettuce mosaic in California. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 42, p. 583-586, 1958.

COSTA, H.; VENTURA, J. A. First report of *Turnip mosaic virus* on watercress in Brazil. **Plant Disease**, Chicago, v. 94, n. 8, p. 1066-1070, Aug. 2010.

COTILLON, A. C.; GIRARD, M.; DUCOURET, S. Complete nucleotide sequence of genomic RNA of a French isolate of *Pepino mosaic virus* (PepMV). **Archives of Virology**, Amsterdam, v. 147, n. 11, p. 2231-2238, Nov. 2002.

DANIELS, J. Produção de batata-semente no Rio Grande do Sul. **Horti Sul**, Pelotas, v. 3, n. 1, p. 12-15, 1994.

DINANT, S.; LOT, H. Lettuce mosaic virus. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 41, n. 5, p. 528-542, Oct. 1992.

DOOLITTLE, S. P. A new infectious mosaic disease of cucumber. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 6, p. 145-147, 1916.

DOUINE, L. et al. Rt-censement des especes vegetales sensibles au virus de la mosaïque du concombre (CMV), etude bibliographique. **Antiales de Phytopathologie**, Paris, v. 11, p. 439-441, 1979.

EDWARDSON, J. R.; CHRISTIE, R. G. **The potyvirus group**. Gainesville: University of Florida, 1991. 1244 p. (Florida Agricultural Experiment Station, Monograph, 16).

ELLIS, P.; STACE-SMITH, R.; VILLIERS, G. Identification and geographic distribution of serotypes of potato virus Y. **Plant Disease**, Quebec, v. 81, n. 5, p. 481-484, Sept. 1997.

ENGEL, E. A. et al. A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses. **Journal of Virological Methods**, New York, v. 163, n. 2, p. 445-451, Feb. 2009.

FIGUEIRA, A. R. **Manejo de doenças viróticas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 99 p.

FIGUEIRA, A. R.; DOMIER, L. L.; ARCY, C. J. Comparison of the techniques for detection of Barley Yellow Dwarf Virus PAV-IL. **Plant Disease**, Quebec, v. 81, n. 11, p. 1236-1240, Nov. 1997.

FIGUEIRA, A. R. et al. Presence of PVY^{N-Wi} and NE-11 isolates of *Potato virus Y* (PVY) in Brazil. In: PAA ANUAL MEETING, 93., 2009, Fredericton. **Proceedings...** Fredericton: PAA, 2009. p. 62.

FIRRAO, G.; LOCCI, R. Identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* using polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, n. 2, p. 148-151, Feb. 1994.

FREITAG, J. H. Bettle transmission, host range and properties of Squash Mosaic Virus. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, p. 73-81, 1956.

_____. Insect transmission, host range and properties of Squash Mosaic Virus. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 31, p. 8, 1941. Abstract.

FRENCH, C. J. et al. First report of *Pepino mosaic virus* in Canada and the United States. **Plant Disease**, Quebec, v. 85, n. 10, p. 11-21, Oct. 2001.

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

GASPAR, J. O. et al. A degenerate primer allows amplification of part of the 3'-terminus of three distinct carlavirus species. **Journal of Virological Methods**, New York, v. 148, n. 1/2, p. 283-285, Mar. 2008.

GAVRILOVA, E. V. et al. Development of real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus. **Journal of Clinical Virology**, New York, v. 49, n. 1, p. 37-40, Jan. 2010.

GIAMPAN, J. S.; REZENDE, J. A. M.; PIEDADE, S. M. S. Danos causados pelo Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV) sobre a produção de frutos comerciais de abobrinha de moita Caserta. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 3, p. 223-225, 2009.

GIBBS, A. J.; HARRISON, B. D. Cucumber mosaic virus. **Description Plant Viruses**, Kew, v. 45, n. 1, p. 116-119, 1970.

GLAIS, L.; KERLAN, K.; ROBAGLIA, C. **Variability and evolution of potato virus Y, the types species of Potyvirus genus**. New York: The Haworth, 2001. 253 p.

GLAIS, L.; TRIBODET, M.; KERLAN, C. Specific detection of the PVY^{N-W} variant of *Potato virus Y*. **Journal of Virological Methods**, New York, v. 125, n. 2, p. 131-136, May 2005.

GÜLSER, C.; KUTLUK, N.; CANDEMIR, F. Accumulation of Tobacco Mosaic Virus (TMV) at different depths clay and loamy sand textural soils due to tobacco waste application. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 146, n. 1, p. 235-242, Jan. 2008.

HA, C. et al. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. **Archives of Virology**, New York, v. 153, n. 1, p. 25-36, 2008.

HADIDI, A. et al. Detection of potato leafroll and strawberry mild yellow-edge luteoviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. **Plant Disease**, Quebec, v. 77, n. 6, p. 595-601, June 1993.

HANSSSEN, I. M. et al. Genetic characterization of *Pepino mosaic virus* isolates from Belgian greenhouse tomatoes reveals genetic recombination. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 121, n. 2, p. 131-146, June 2008.

HARRISON, F. P. Observations on the infestation of corn by fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) with reference to plant maturity. **Florida Entomologist**, Davis, v. 67, n. 3, p. 333-335, Sept. 1984.

HASIÓW, B.; BORODYNKO, N.; POSPIESZNY, H. Complete genomic RNA sequence of the Polish *Pepino mosaic virus* isolate belonging to the US2 strain. **Virus Genes**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 209-214, Feb. 2008.

HAUDENSHIELD, J. S.; PALUKAITIS, P. Diversity among isolates of squash mosaic virus. **Journal of General Virology**, London, v. 79, n. 2, p. 2331-2341, Feb. 1998.

HENSON, J. M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 81-109, Sept. 1993.

HULL, R. **Matthew's plant virology**. London: Academic, 2002. 1001 p.

INSTITUTO CNA. **Balanços e perspectivas 2009-2010**. Disponível em: <<http://www.canaldoprodutor.com.br/>>. Acesso em: 10 set. 2010.

JAGGER, I. C. Experiments with the cucumber mosaic disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 6, p. 148-151, 1916.

_____. Transmissible mosaic disease of lettuce. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 20, p. 737-741, 1921.

JOHANSEN, E.; EDWARDS, M. C.; HAMPTON, R. O. Seed transmission of viruses: current perspectives. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 363-386, Sept. 1994.

JONES, J. B. et al. **Compendium of tomato diseases**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1991. 73 p.

JONES, R. A. C.; KOENIG, R.; LESEMANN, D. E. Pepino mosaic virus a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 94, n. 1, p. 61-68, Feb. 1980.

JORD'A, C. et al. First report of *Pepino mosaic virus* on natural hosts. **Plant Disease**, Quebec, v. 85, n. 12, p. 1292, Dec. 2001a. Abstract.

_____. First report of *Pepino mosaic virus* on tomato in Spain. **Plant Disease**, Quebec, v. 85, n. 12, p. 1292, Dec. 2001b. Abstract.

KÖHLER, E. Der *Solanurn demissurn* Bastard "A 6" als testpflanze verschiedener Mosaicviren. **Züchter**, Berlin, v. 23, p. 173-176, 1953.

KRAUSE-SAKATE, R. et al. Molecular and biological characterization of *Lettuce mosaic virus* (LMV) isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-most. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 5, p. 563-572, May 2002.

KRINKELS, M. **Pepino mosaic virus causes sticky problem**. *Prophyta: The Annual*, 2001. 33 p.

LANZARINI, A. C. et al. Avaliação de danos causados pelo *Barley yellow dwarf virus*: PAV em cultivares de trigo no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 512-517, nov./dez. 2007.

LASTRA, T. Occurrence of cucurbit viuses in Venezuela. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 53, p. 171-174, 1968.

LEMOINE, S.; COMBES, F.; CROM, S. An evaluation of custom microarray applications: the oligonucleotide design challenge. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, n. 6, p. 1726-1739, Dec. 2009.

LINDENBERG, G. D.; HALL, D. H.; WALKER, J. C. A study of melon and squash mosaic viruses. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 46, p. 489-495, June 1956.

LING, Q. Z. et al. Molecular characters and expression analysis of a new isoform of the myocyte enhancer factor 2 gene from the silkworm, *Bombyx mori*. **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 7, n. 20, p. 3587-3592, 2008.

LÓPEZ, M. M. et al. Are molecular tools sobing the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Current Issues in Molecular Biology**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 13-46, Jan. 2010.

_____. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. **International Microbiology**, London, v. 6, n. 4, p. 233-243, Dec. 2003.

LORENZEN, J. H. et al. A multiplex PCR assay to characterize *Potato virus Y* isolates and identify strain mixtures. **Plant Disease**, Quebec, v. 90, n. 7, p. 935-940, July 2006.

_____. NE-11 represents a new strain variant class of Potato virus Y. **Archives of Virology**, New York, v. 153, n. 1, p. 517-525, Jan. 2008.

LOUDES, A. M. et al. The 119 kDa and 124 kDa polyproteins of arabis mosaic nepovirus (isolate S) are encoded by two distinct RNA2 species. **Journal of General Virology**, London, v. 76, n. 4, p. 729-1072, Apr. 1995.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, Nov. 1999.

MACLACHLAN, D. S.; LARSON, R. H.; WALKER, J. C. Potato virus A. **Research Bulletin Agricultural**, Wisconsin, v. 31, n. 3, p. 67-72, Mar. 1954.

MAES, M.; GARBEVA, P.; CREPEL, C. Identification and sensitive endophytic detection of the fireblight pathogen *Erwinia amylovora* with 23S ribosomal DNA sequences and the polymerase chain reaction. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 45, n. 6, p. 1139-1149, Dec. 1996.

MAROON-LANGO, C. J. et al. Two unique US isolates of *Pepino mosaic virus* from a limited source of pooled tomato tissue are distinct from a third (Europeanlike) US isolate. **Archives of Virology**, New York, v. 150, n. 6, p. 1187-1201, June 2005.

MCSPADDEN-GARDENER, B. B. et al. A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere populations of 2,4-diacetylphloroglucinolproducing bacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 1, p. 44-54, Jan. 2001.

MONTERO-ASTU, A. M. et al. Incidence, distribution and association of *Spongospora subterranea* and Potato mop-top virus in Costa Rica. **Plant Disease**, Quebec, v. 92, n. 8, p. 1171-1176, Aug. 2008.

MUMFORD, R. A.; METCALFE, E. J. The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate of *Pepino mosaic virus* and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru. **Archives of Virology**, New York, v. 146, n. 12, p. 2455-2460, Dec. 2001.

MURANT, A. F. **Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis**. Amsterdam: Elsevier, 1981. 256 p.

MURPHY, P. A.; MCKAY, R. **A comparison of some European and American virus diseases of the potato**. Dublin: Royal Dublin Society, 1932. 358 p.

NASCIMENTO, K. L.; NASCIMENTO, C. A.; CARDOZO, S. A. A dependência crescente do agronegócio para os saldos de comércio exterior brasileiro: 1998 a 2007. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 46., 2008, Rio Branco. **Anais...** Rio Branco: SBEASR, 2008. p. 1-21.

NATTI, J. J.; KIRKPATRICK, C.; ROSS, A. F. Host range of potato leaf-roll virus. **American Potato Journal**, Berlin, v. 30, n. 3, p. 55-54, Sept. 1953.

NELSON, M. R.; KNUHTSEN, H. Squash mosaic virus variability: epidemiological consequences of differences in seed transmission frequency between strains. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, n. 7, p. 918-920, July 1973.

NIENHAUS, F.; STILLE, B. Übertragung des Kartoffel-X-Virus durch Zoosporen von *Synchytrium endobioticum*. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 54, p. 335-337, 1965.

NOLASCO, G. Diagnosis: recent developments and routine implementation. In: EXTENDED ABSTRACTS MEETING OF ICVG, 14., 2003, Locorotondo. **Proceedings...** Locorotondo: ICVG, 2003. 1 CD-ROM.

PAGAN, I. et al. Genetic structure of the population of *Pepino mosaic virus* infecting tomato crops in Spain. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 3, p. 274-279, Mar. 2006.

PALUKAITIS, P. et al. Cucumber mosaic virus. **Advances in Virus Research**, San Diego, v. 41, n. 2, p. 281-341, 1992.

PARES, R. D.; GUNN, L. V.; KESKULA, E. N. The role of infective plant debris, and its concentration in soil, in the ecology of tomato mosaic tobamovirus - a non- vectored plant virus. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 3, p. 147-150, Mar. 1996.

PRICE, D. R. G. et al. Sugar transporters of the major facilitator superfamily in aphids: from gene prediction to functional characterization. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 97-112, Mar. 2010.

PROSEN, D. et al. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 9, p. 965-970, May 1993.

PURCIFULL, D. E.; EDWARDSON, J. R. Potexviruses. In: KURSTAK, E. (Ed.). **Plant virus infections: comparative diagnosis**. Amsterdam: Elsevier, 1981. p. 627-694.

QUANJER, H. M.; LEK, H. A. A. van der; BOTJES, J. G. O. Aard, verspreidingswijze en bestrijding van phloemnecrose (bladroll) en verwante ziekten, sereh, meded. **Landbouwhogeschool**, Wageningen, v. 10, n. 3, p. 1-138, Mar. 1916.

QUIOT, J. B.; LABONNE, G.; QUIOT-DOUINE, L. The comparative ecology of cucumber mosaic virus in Mediterranean and tropical regions. In: PLUMB, R. T.; TRESH, J. M. (Ed.). **Plant virus epidemiology**. Oxford: Blackwell Scientific, 1983. p. 177-183.

RAMOS, N. F.; LIMA, J. A. A.; GONÇALVES, M. F. B. Efeitos da interação de potyvirus em híbridos de meloeiro, variedades de melancia e abobrinha. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 199-203, mar./abr. 2003.

RASMUSSEN, O. F.; WULF, B. S. Detection of *P.s.pisi* using PCR. In: INTERNATIONAL WORKING GROUP ON PSEUDOMONAS SYRINGE PATHOVARS, 4., 1991, Florence. **Proceedings...** Florence: Stamperia Granducale, 1991. p. 369-376.

REGENMORTEL, M. H. V. et al. **Virus taxonomy**: classified nomenclature of viruses. San Diego: Academic, 2000. 1162 p.

RIBEIRO, S. R. P. **Caracterização de isolados de *Potato virus S* (PVS) no Brasil e seu efeito na produção de batata**. 2007. 108 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

ROGGERO, P.; MASENGA, V.; LENZI, R. First report of *Pepino mosaic virus* in tomato in Italy. **New Disease Report**, New York, v. 24, n. 3, 2001. Disponível em: <<http://www.bspp.org.uk/ndr/jul2001-24.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2010.

ROWHANI, A.; WALKER, M. A.; ROKNI, S. Sampling strategies for the detection of grapevine fanleaf virus and the grapevine strain of tomato ringspot virus. **Vitis**, Siebeldingen, v. 31, n. 1, p. 35-44, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 1659 p.

SCHAAD, N. W. et al. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 2, p. 243-248, Mar. 1995.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Saint Paul: APS, 2001. 373 p.

SCHMELZER, K. Investigations on viruses of ornamental and wild woody plants: 2nd part, viroses of *Forsythia*, *Lonicera*, *Ligustrum* and *Laburnum*. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 46, p. 105-138, 1963.

SCHUMUTTERER, H. Zur kenntnis der beissinsekten als überträger pflanzlicher viren: teil I, teil II. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, Berlin, v. 47, n. 1/4, p. 277-301, 1961.

SHEW, H. D.; LUCAS, G. B. **Compendium of tobacco diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1991. 68 p.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The Potyviridae**. Cambridge: Centre for Agriculture and Biosciences International, 1994. 101 p.

SING, R. P.; NIE, X. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. **Journal of Virological Methods**, New York, v. 91, n. 1, p. 37-49, Jan. 2001.

SINGH, R. P.; SINGH, M. Specific detection of potato virus A in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 2, p. 230-234, 1998.

SITTERLY, W. R. A new vector of squash mosaic virus. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 44, n. 1, p. 134-135, 1960.

SMITH, K. M. Studies on potato virus diseases: on a ringspot virus affecting solanaceous plants. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 18, p. 1-15, 1931.

SMITH, M.; MARKHAM, R. Two new viruses affecting tobacco and other plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 34, n. 2, p. 324-329, 1994.

SOUZA-DIAS, J. A. C.; IAMAUTI, M. T. Doenças da batateira (*Solanum tuberosum* L.). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 135-175.

STANGARLIN, O. S. **Identificação dos vírus causadores de mosaico em cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) resistente ao vírus do mosaico da alface nas regiões produtoras do Estado de São Paulo**. 1995. 91 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1995.

STONER, W. N. A mosaic virus transmitted by beetles and a grasshopper. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 53, p. 890-890, 1963.

SUTTON, W. S. Yellow top disease of tomatoes. **Agricultural Gazette of New South Wales**, Sydney, v. 66, p. 655-658, 1955.

TAMADA, T.; HARRISON, B. D.; ROBERTS, I. M. Variation among British isolates of potato leafroll virus. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 104, n. 1, p. 107-116, 1984.

TANZI, M.; BETTI, L.; CANOVA, A. Analysis of growth and yield in some commercial pepper varieties infected by different TMV pepper strains. In: MEETING ON GENETICS AND BREEDING ON CAPSICUM AND EGGPLANT, 6., 1986, Zaragoza. **Proceedings...** Zaragoza: EUCARPIA, 1986. p. 204.

TAYLOR, R. H.; FROGAN, R. G.; KIMBLE, K. A. Transmission of tobacco mosaic virus in tomato seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 51, p. 837-842, 1961.

THOMAS, P. Radiation preservation of foods of plant origin: I., potato and other tuber crops. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 19, p. 327-330, 1984.

TOMLINSON, J. A. **Lettuce mosaic virus**. Kew: Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biology, 1970. 334 p. (CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, 9).

TRIBUNAL DE CONTAS DA UNIÃO. **Avaliação das ações de vigilância e fiscalização no trânsito internacional de produtos agropecuários**. Brasília, 2006. 43 p. (Sumários Executivos. Nova Série, 12).

TRUDGILL, D. L. et al. Effect of the nematicide oxamyl on the multiplication of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* and on the haulm growth and yield of six potato cultivars with different levels of resistance and tolerance. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 103, p. 477-484, 1983.

UNTIVEROS, M.; PEREZ-EGUSQUIZA, Z.; CLOVER, G. R. G. Generic PCR assays for the detection of members of the *Ilarvirus* genus and *Bromoviridae* family. **Journal of Virology Methods**, New York, v. 165, n. 1, p. 97-104, Apr. 2010.

VLUGHT, R. A. A. van der et al. First report of *Pepino mosaic virus* on tomato. **Plant Disease**, Quebec, v. 84, n. 1, p. 103-106, Jan. 2000.

WALTER, B.; ETIENNE, L. Detection of the Grapevine fanleaf viruses away from the period of vegetation. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 120, n. 4, p. 355-364, Aug. 1987.

WALTERS, H. J. Grasshopper transmission of three plant viruses. **Science**, New York, v. 113, p. 36-37, 1952.

WANG, Z. K. A. et al. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 48, n. 2, p. 245-252, Apr. 1999.

WETZEL, T. et al. Simultaneous RT/PCR detection and differentiation of arabis mosaic and grapevine fanleaf nepoviruses in grapevines with a single pair of primers. **Journal of Virology Methods**, New York, v. 101, n. 1/2, p. 63-69, 2002.

ZERBINI, F. M. Transmissão e controle de vírus em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Org.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: Suprema, 2005. v. 1, p. 135-161.