

**ESTABELECIMENTO E ADAPTAÇÃO DE  
MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE VÍRUS EM  
SEMENTES DE PIMENTÃO, TOMATE,  
ALFACE E FEIJÃO**

**JOÃO EDUARDO MELO DE ALMEIDA**

**2009**

**JOÃO EDUARDO MELO DE ALMEIDA**

**ESTABELECIMENTO E ADAPTAÇÃO DE MÉTODOS PARA  
DETECÇÃO DE VÍRUS EM SEMENTES DE PIMENTÃO, TOMATE,  
ALFACE E FEIJÃO**

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

Orientadora  
Profª. Dra. Antônia dos Reis Figueira

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

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

Almeida, João Eduardo Melo de.

Estabelecimento e adaptação de métodos para detecção de vírus em sementes de Pimentão, Tomate, Alface e Feijão / João Eduardo Melo de Almeida. – Lavras : UFLA, 2009.

47 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Antônia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. Diagnose. 2. Vírus. 3. Semente. 4. RT-PCR. 5. DAS-ELISA.  
6. Teste biológico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.8  
631.521

**JOÃO EDUARDO MELO DE ALMEIDA**

**ESTABELECIMENTO E ADAPTAÇÃO DE MÉTODOS PARA  
DETECÇÃO DE VÍRUS EM SEMENTES DE PIMENTÃO, TOMATE,  
ALFACE E FEIJÃO**

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

APROVADA em 30 de Julho de 2009

Prof. Dr. José da Cruz Machado

UFLA

Prof. Dr. Luiz Antonio Augusto de Lima

UFLA

Profª. Dra. Antônia dos Reis Figueira

UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

Primeiramente a Deus, por proporcionar saúde, paz e sabedoria para condução dos trabalhos.

A minha família: Fábiana minha esposa, meu filho que esta chegando, meu pai João Hugo, minha mãe Maria, meus irmãos Carlos, Guim, José, Carolina, Daniel, aos meus avós e avôs, meus sogros, meus cunhados e cunhadas, aos amigos Junim e Dani, enfim, a toda minha família que de certa forma me auxiliaram nessa etapa de minha vida.

### **OFEREÇO**

Ao meu avô Feliciano Resende de Melo (In memória), com quem tive muitos ensinamentos.

A meus pais, a minha esposa Fábiana, meu filho Vítor, meus irmãos, meus tios, avos e primos.

### **DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal de Lavras e Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade em realizar o curso de Mestrado.

A Coordenação de aperfeiçoamento pessoal de nível superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

A minha estimada orientadora Profa. D<sup>ra</sup>. Antonia dos Reis Figueira, pela qual tenho grande admiração, pois já são cinco anos, em que estamos trabalhando juntos, e nesse período, muito aprendi, pois, tive muito apoio, incentivo e muitos ensinamentos.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos e experiências, muito importantes na minha formação profissional.

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia, que contribuíram para realização desse trabalho.

Aos amigos, Esdras, Pio Goiaba, Anselmo, Adriano, Carolina, Glauco, Cleilson, Elen, Flavio, Rejane, Julim, Irene, Sandy, Saulo, Bruno Ribeiro, Carlos Avelar, pela amizade e ajuda no decorrer do curso.

Aos amigos da Virologia, Mauricio, Carlão, José Romário, Douglas Cubano, Suellen, Priscilla, Bruno, Silvia, Carzim, Luciene, Jaciara, Samuka, Anderson e Nara, MUITO OBRIGADO A TODOS.

Aos meus pais João Hugo e Maria, por todo apoio, incondicional.

A minha esposa Fábria, que sempre me auxiliou nas decisões tomadas, por me dar amor, carinho, e principalmente ter paciência, nos momentos difíceis.

E a todos que, de certa forma contribuíram para realização deste trabalho, eu agradeço.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1 Características do <i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV).....	04
2.2 Características do <i>Bean common mosaic virus</i> (BCMV).....	05
2.3 Características do gênero <i>Tobamovirus</i> .....	06
2.4 Mecanismo de transmissão dos <i>Tobamovirus</i> através das sementes.....	07
2.5 Mecanismo de transmissão de vírus através do embrião.....	08
2.5.1 Infecção direta do embrião.....	09
2.5.2 Infecção indireta do embrião.....	10
2.6 Técnicas utilizadas para detecção de vírus.....	11
2.6.1 Técnicas sorológicas.....	12
2.6.2 Técnicas moleculares.....	14
2.6.3 Técnicas biológicas.....	15
2.7 Protocolos recomendados para detecção de vírus em sementes.....	15
2.7.1 Protocolos para detecção de <i>Tobamovirus</i> em sementes.....	15
2.7.2 Detecção de vírus presente nos tecidos internos das sementes.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Produção de sementes.....	17
3.1.1 Sementes contaminadas naturalmente.....	17
3.1.2 Produção de sementes contaminadas artificialmente com <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV).....	18
3.2 Processamento da amostra para obtenção do antígeno e/ou RNA.....	19

3.2.1 Obtenção do antígeno e/ou RNA para diagnose do TMV.....	19
3.2.2 Obtenção do antígeno e/ou RNA para diagnose do <i>Bean commom mosaic virus</i> (BCMV).....	20
3.2.3 Obtenção do antígeno e/ou RNA para diagnose do <i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV).....	21
3.3 Métodos diagnósticos.....	22
3.3.1 Teste biológico.....	22
3.3.2 Método sorológico.....	22
3.3.2.1 DAS-ELISA.....	22
3.3.2.2 PTAS-ELISA.....	23
3.3.3 RT-PCR.....	24
3.3.3.1 Extração do RNA.....	24
3.3.3.2 RT-PCR.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 Produção de sementes contaminadas.....	26
4.2 Produção de sementes contaminada artificialmente com TMV.....	29
4.3 Detecção do TMV em plântulas e sementes de tomate e pimentão.....	31
4.4 Detecção do BCMV em plântulas de feijão.....	34
5 CONCLUSÕES.....	39
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47

## RESUMO

ALMEIDA, João Eduardo Melo. **Estabelecimento e adaptação de métodos para detecção de vírus em sementes de pimentão, tomate, alface e feijão.** 2009. 47 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Apesar de já se ter indicações de diversas técnicas que podem ser utilizadas para a diagnose de vírus em sementes, não existem metodologias estabelecidas e otimizadas, para essa finalidade, nos laboratórios brasileiros. Assim sendo, esse trabalho foi realizado com o objetivo, primeiramente, de produzir sementes das seguintes plantas contaminadas com os respectivos vírus: sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) com o *Bean common mosaic virus* (BCMV), sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*) e de pimentão (*Capsicum annum*) contaminadas com o *Tobacco mosaic virus* (TMV) e de alface (*Lactuca sativa*) contaminadas com o *Letuce mosaic virus* (LMV). Considerando-se o mecanismo de transmissão do TMV, foi também desenvolvido um método para a contaminação artificial das sementes, mergulhando-se as mesmas no extrato de folhas de fumo infectadas pelo vírus, por períodos de tempo variando de 1 a 270 segundos, com posterior secagem à sombra. A sua contaminação foi confirmada pelo teste sorológico ELISA e por inoculação em plantas indicadoras. Em uma segunda etapa, foram testadas e otimizadas as técnicas biológica, sorológica (PTAS e DAS ELISA) e molecular (RT-PCR), envolvendo alguns procedimentos diferentes, para detectar cada um desses vírus nas sementes contaminadas. Para tomate e pimentão, além dos protocolos desenvolvidos, foi testada a sensibilidade dos mesmos para diagnosticar diferentes índices de infecções do TMV nas sementes. Foi possível a obtenção de sementes de pimentão e de tomate contaminadas com TMV, tanto pelo método natural como pelo artificial. As sementes de tomate e pimentão foram 100% contaminadas quando deixadas no extrato foliar contendo o vírus, a partir de um segundo de exposição. Também foram obtidas sementes de feijão contaminadas com o BCMV, mas nenhuma semente contaminada foi obtida de plantas de alface infectadas precocemente e que apresentavam sintomas bem evidentes. Isso, provavelmente, ocorreu porque os isolados utilizados não foram transmissíveis pelas sementes das cultivares empregadas. Nos testes efetuados para a diagnose de vírus nas sementes, as técnicas DAS-ELISA e RT-PCR foram capazes de detectar uma semente contaminada em um lote de 1.000 sementes (0,1%), quando feita diretamente das sementes de tomate e de pimentão, contaminadas natural e artificialmente. Do mesmo modo, no teste biológico, em que as sementes contaminadas de tomate e pimentão foram plantadas e as plântulas originadas avaliadas visualmente, não foi

---

\*Orientadora: Profa. Dra. Antônia dos Reis Figueira - UFLA

possível observar o aparecimento de sintomas que indicassem a infecção das plântulas pelo TMV. Isso deve ter ocorrido porque a contaminação pelo TMV é externa às sementes, de modo que nem sempre chega a infectar a planta. É provável que essas sejam contaminadas não no processo de germinação, mas no de transplante. Em plântulas de feijão, obtidas de sementes coletadas de plantas infectadas com o BCMV, o teste biológico detectou infecção em 15% delas. No teste sorológico PTAS-ELISA, foi encontrado resultado positivo em uma média de 48 das 91 combinações feitas com as 1.000 sementes analisadas. Por meio da técnica RT-PCR, utilizando-se *primers* específicos para o BCMV, o vírus foi detectado em 6 das 30 combinações feitas com as 1.000 sementes. Apesar de o teste biológico ter sido eficiente para a detecção do BCMV em sementes de feijão, não foi adequado para a detecção de TMV em sementes de fumo e de pimentão, indicando que as técnicas sorológicas ELISA (PTAS ou DAS) e RT-PCR, utilizando sementes, são as mais recomendadas para essa finalidade.

## ABSTRACT

ALMEIDA, João Eduardo Melo. **Establishment and adaptation of methods for virus detection in seeds of sweet pepper, tomato, lettuce, and bean.** 2009. 47 p. Dissertation (Master in Plant pathology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

In spite of existing indications of several techniques which can be utilized for virus diagnosis in seeds, there are no methodologies established and optimized for that purpose in the Brazilian laboratories. So, that work intended firstly to produce seeds of the following plants contaminated with the respective viruses: bean (*Phaseolus vulgaris*) with *Bean common mosaic virus* (BCMV), tomato (*Solanum lycopersicum*) and sweet pepper (*Capsicum annum*) contaminated with *Tobacco mosaic virus* (TMV) and lettuce (*Lactuca sativa*) contaminated with *Lettuce mosaic virus* (LMV). Considering the transmission mechanism of TMV, a method for the artificial contamination of seeds was also developed, by dipping them into the tobacco leaf extract infected with the virus for time periods, varying from 1 to 270 seconds, with later shade drying. Its contamination was confirmed by the ELISA serologic test and by inoculation on indicator plants. In a second step, the biological, serologic (PTAS and DAS ELISA) and molecular (RT-PCR), techniques were tested and optimized involving some different procedures to detect each of these viruses in the contaminated seeds. For both tomato and sweet pepper, in addition to the developed protocols, the sensitivity of them to diagnose different infection indices of TMV in seeds was tested. Obtaining sweet pepper and tomato seeds contaminated by TMV both by the natural and artificial methods was possible. The tomato and sweet pepper seeds were 100% contaminated when left in the leaf extract containing the virus from 1 second's exposition on. Also, BCMV-contaminated bean seeds were obtained, but no contaminated seed was obtained from early infected lettuce plants, which presented quite evident symptoms. That likely must have occurred because the isolates utilized were not transmissible by the seeds of the utilized cultivars. In the tests conducted for virus diagnosis on the seeds, the DAS-ELISA and RT-PCR techniques were capable of detecting one contaminated seed in a lot of 1,000 seeds (0.1%), when undertaken directly from the tomato and sweet pepper seeds, contaminated both naturally and artificially, but not from the seedlings. In the very way, in the biological test, in which the contaminated tomato and sweet pepper seeds were planted and the originated seedlings visually evaluated, it was not possible to observe the appearance of symptoms which indicated the infection. That must have occurred because the TMV-contamination is external to the seeds, so that it does not even arrive to infect

---

\* Adviser: Prof. Dra. Antônia dos Reis Figueira - UFLA

the plant. It is likely that those be contaminated not in the germination process, but rather in the transplanting one. In bean seedlings obtained from seeds collected from BCMV-infected plants, the biological test detected infection in 15% of them. In the PTAS-ELISA serologic test, positive result was found on a mean of 48 out of the 91 combinations out of the 1,000 analyzed seeds. Through the RT-PCR technique by utilizing primers specific to BCMV, the virus was detected in 6 out of the 30 combinations done with the 1,000 seeds. Despite of the biological test having been efficient to the detection of BCMV in bean seeds, was not adequate for TMV detection in tobacco and sweet pepper seeds, pointing out that the ELISA (PTAS or DAS) and RT-PCR serologic techniques utilizing seeds is the most recommend for that purpose.

## 1 INTRODUÇÃO

Com a abertura do comércio entre os países que compõem o Mercosul, materiais vegetais transitam facilmente de uma nação para outra. Nesse processo patógenos e pragas, considerados quarentenários e não quarentenários, transitam facilmente. Diante dessa situação as barreiras fitossanitárias se tornam cada vez mais rigorosas. No caso de material importado, é imprescindível que o Brasil evite a introdução de patógenos e pragas quarentenárias e estabeleça índices dos não-quarentenários. Por outro lado, o material exportado deve merecer igual atenção, para que nenhum material possa ser devolvido por não se encaixar dentro dos índices de doenças e pragas exigidos pelo país importador.

As doenças viróticas merecem cuidado especial, pois além de não possuírem controle curativo são capazes de causar grandes perdas econômicas, nas mais diversas culturas. Essas perdas tanto podem ser diretas, reduzindo a qualidade e a quantidade da produção, como podem ser indiretas, devidas aos altos custos das medidas de controle (Albrechtsen, 2006). Assim sendo, o uso de medidas de controle preventivas, como comprovar a sanidade das sementes, visando impedir a introdução precoce do vírus na lavoura, é prioritário. Isso porque a veiculação das partículas virais pelas sementes faz com que o inóculo esteja presente desde o início do ciclo de vida da planta, quando esta é mais suscetível, levando à perdas maiores (Kaiser & Mossahebi, 1974; Makkouk & Kumari, 1990; Bwyte et al., 1994; Walkey, 1991).

Os vírus são transmitidos na natureza por meio de propagação vegetativa da planta, vetores e raramente através do contato (transmissão mecânica). Embora seja considerada mais uma exceção do que uma regra, mais de 100 espécies de vírus, distribuídos em 25 gêneros, podem ser transmitidas pelas sementes verdadeiras, podendo infectar o embrião ou permanecerem como contaminantes no tegumento da semente (Hull, 2002).

A transmissão através do embrião pode ocorrer de forma direta, invasão essa que se dá após a fertilização, verificada no patossistema *Pea seed-borne mosaic virus* x Ervilha (*Psium sativum*) ou indiretamente, onde o vírus infecta os gametas antes de ocorrer a fecundação comum para o *Bean commom mosaic virus* (BCMV) em sementes de feijão e *Letucce mosaic virus* (LMV) em sementes de alface (Medina & Grogan, 1961; Provvidenti & Cobb, 1975; Hoch & Provvidenti, 1978) e *Letucce mosaic virus* (LMV) (Dinant & Lot, 1992; Ryder, 1964;1973; Hunter & Bowyer, 1994a, 1994b, 1993; Beserra Júnior, 2008).

Além desses mecanismos citados, alguns vírus podem apenas contaminar o tegumento das sementes (Bos, 1977). Este tipo de transmissão ocorre somente quando os vírus são bastante estáveis, podendo permanecer por muito tempo como contaminantes sobre o tegumento da semente, como é o caso de *Tomato mosaic virus* (ToMV), o *Tobacco mosaic virus* (TMV) e o *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), que são espécies de *Tobamovirus* bastante importantes (Taylor et al., 1961; Broadbent, 1965; Johansen et al., 1994).

A taxa de transmissão dos vírus pelas sementes, em geral, é bastante variável e pode chegar a 100%, dependendo da suscetibilidade e da época em que a planta foi infectada, da espécie/estirpe do vírus e das condições ambientais, principalmente da temperatura (Morales & Castaño, 1987; Albrechtsen, 2006; German-Retana et al., 2008; Zerbini, 2005). A transmissão do LMV via sementes, em cultivares suscetíveis de alface, pode variar de 1,9 a 18% (Dinant & Lot, 1992; German-Retana et al., 2008; Krause-sakate et al., 2002); a do mosaico comum do feijoeiro (BCMV) pode chegar a 83% (Schippers, 1963; Morales & Castaño, 1987), enquanto que em sementes de tomate, o ToMV pode chegar a 94% (Winckel & Gcypens, 1965; Broadbent, 1965).

O limite de tolerância para infecções virais em semente depende do vírus, da sua relação com a hospedeira, do ambiente e do vetor. Entretanto, no Brasil esse limite nunca foi determinado, e o uso de limites de tolerância

estabelecidos para outros países, principalmente os de clima temperado, se extrapolados para o Brasil podem levar a resultados desastrosos. O limite de tolerância para vírus transmissíveis por vetores geralmente tende a ser mais restritivo, pois, se as condições forem favoráveis, certamente a chance de ocorrerem epidemias serão bem maiores. Nos Estados Unidos o limite permitido para o LMV é uma semente contaminada em 30.000 sementes (Wisler & Duffus, 2000), enquanto que na Europa é de uma em cada 2.000 sementes.

Vários métodos biológicos, sorológicos e moleculares têm sido utilizados para detectar, diagnosticar e classificar os vírus vegetais nessas últimas décadas (Almeida, 1995; Zerbini Júnior et al., 2002; Figueira, 2000; Almeida & Lima, 2001). Entretanto, apesar dos esforços que têm sido feitos no sentido de se estabelecer um método padrão para a diagnose dos diferentes patógenos, notadamente os de etiologia viral, não existe, no momento, nenhum que esteja sendo empregado em âmbito nacional e/ou internacional (Albrechtsen, 2006). Resultados de grupos de trabalho formados por pesquisadores de todo o mundo, têm gerado algumas metodologias validadas pela International Seed Federation – ISF (2009) e International Seeds Testing Association – ISTA (2009). Ainda assim, no Brasil, os esforços para padronização de metodologias para a detecção de vírus ainda são incipientes, de modo que existe a necessidade de se iniciar um movimento no sentido de desenvolver, adaptar e padronizar essas técnicas o mais rápido possível. Atendendo a essa demanda, no presente trabalho foram empregadas três técnicas (RT-PCR, ELISA e Biológico) para diagnose dos seguintes vírus em sementes: *Bean common mosaic virus* em sementes de feijão, *Letuce mosaic virus* em sementes de alface e *Tobacco mosaic virus* em sementes de tomate e pimentão. Foram empregados diversos procedimentos para determinar a sensibilidade e repetibilidade de cada uma das técnicas experimentadas, em sementes infectadas natural e artificialmente.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Características do *Lettuce mosaic virus* (LMV)

O LMV possui ssRNA<sup>+</sup> encapsulado em uma partícula única, alongada e flexível, medindo 750nm de comprimento por 13nm de diâmetro. É transmitido de um modo não-persistente ou estiletar por diversas espécies de afídeos, como *Acyrtosiphon scariolae*, *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Nasonovia ribisnigri*, *Rhopalosiphum pseudobrassicae*, etc. Os sintomas apresentados pela planta de alface infectada dependem da cultivar e da época de infecção, mas os mais comuns são mosaico, enrugamento, embolhamento, deformação foliar e necrose, além de uma drástica diminuição no crescimento quando plantas jovens são infectadas. O vírus é capaz de infectar todos os tecidos da semente, seja ele embrionário ou não. A taxa de transmissão do LMV pode variar de 1,9 a 17%, dependendo da combinação entre isolados do LMV e cultivar. Existem dois grupos de isolados de LMV que podem infectar plantas de alface, e que são filogeneticamente distintos, sendo que apenas um grupo é capaz de infectar sementes. O grupo de isolados de LMV transmitido por semente pode ser divididas em duas estirpes “Common” e “most”. A estirpe “most” é capaz de infectar cultivares de alface com alelo recessivo  $mol^1$  e  $mol^2$  e a taxa de transmissão desses isolados pode chegar a 1,9%. Por outro lado isolados desse grupo quando infectam cultivares que não são portadoras destes alelos recessivos, apresentam uma taxa de transmissão de 16,5% (Jadão et al., 2002). A estirpe “Common” não tem capacidade de infectar plantas de alface que possuem os alelos  $mol^1$  e  $mol^2$ , entretanto pode infectar outras cultivares e pode ocorrer infecção das sementes. Estudos realizados por Krause-sakate et al. (2002), demonstraram a capacidade de um isolado espanhol denominado por LMV-E não pertencente à estirpe “most” em infectar plantas de alface com o alelo recessivo  $mol^1$  e  $mol^2$ , porem não foi detectado o potencial deste isolado para

infectar sementes. No Brasil estudos com dois isolados LMV-AF199 do grupo “most” e LMV-E, foram realizados na cultivar Salinas 88, que possui o alelo recessivo *mol*<sup>2</sup> e o autor verificou que apenas o isolado AF199 foi capaz infectar a semente. Entretanto o isolado E não foi capaz de infectar nenhum tecido da semente (Beserra Júnior, 2008). O autor verificou que a não transmissão deste isolado, esta totalmente relacionada à capacidade do vírus em movimentar-se dos tecidos vegetativos aos tecidos do óvulo e não a mecanismos relacionados com a planta, como ocorre para *Pea seed-born mosaic virus* (PSbMV). No patossistema PSbMV x ervilha Wang & Maule, (1992) demonstraram, em testes realizados com um isolado e duas cultivares de ervilha, e verificaram que o vírus foi somente capaz de infectar a semente de uma delas. Os autores concluíram neste patossistema que a não transmissão a uma das cultivares, esteja relacionado a fatores ligados a resistência da planta, e não a capacidade do vírus em movimentar-se ate a semente.

## **2.2 Características do *Bean common mosaic virus* (BCMV)**

O BCMV é um vírus com ssRNA+, pertencente à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, com 760nm de comprimento e de 12 a 15nm de diâmetro. Pode ser transmitido por diversos afídeos, principalmente pelo *A. pisum*, *Aphis fabae* e *M. persicae*. Outros vetores como *A. gossypii*, *A. medicaginis*, *A. rumicis*, *Hyalopterus atriplicis*, *Macrosiphum ambrosiae*, *M. pisi* e *M. solanifolii* também podem transmiti-lo. Os sintomas nas plantas dependem da suscetibilidade da cultivar, da estirpe do vírus e da época em que ela for infectada. Infecções precoces pela estirpe comum induzem mosaico severo, deformações foliares, enrugamento embolhamento e encarquilhamento, além de subdesenvolvimento da planta. Algumas estirpes podem também induzir necroses severas. Morales & Castaño (1987) observaram que quanto mais precoce ocorrer à infecção das plantas, maiores serão os níveis de transmissão para semente. A transmissão do BCMV da planta a semente ocorre antes de ocorrer à fecundação, de forma indireta,

podendo o vírus infectar tecidos do eixo embrionário formados pela radícula e caulículo, assim como os cotilédones e tegumento (Medina & Grogan, 1961; Provvidenti & Cobb, 1975; Hoch & Provvidenti, 1978; Schippers, 1963; Morales & Castaño, 1987). A porcentagem de transmissão do BCMV pelas sementes varia com a estirpe e a cultivar, podendo em alguns casos chegar a mais de 83%.

### **2.3 Características do gênero *Tobamovirus***

Os *Tobamovirus* são vírus de distribuição mundial e podem ocorrer em variados ambientes, sejam eles de clima temperado ou tropical. O gênero comporta em torno de 17 espécies, divididas em três subgrupos, de acordo com o número de nucleotídeos presente entre as ORFs, análise filogenética e hospedeiro. O primeiro subgrupo comporta os vírus que infectam as solanáceas, dentre os quais se destacam o *Tobacco mosaic virus* (TMV), o *Tomato mosaic virus* (ToMV), o *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV), o *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) e o *Pepper mild mottle virus* (PMMoV). O subgrupo 2 comporta os vírus das crucíferas e o 3 os das cucurbitáceas, tendo como membro-tipo o TMV, o *Turnip vein-clearing virus* (TVCV) e o *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV).

No Brasil, até o presente momento, somente há relatos da presença dos vírus que pertencem ao subgrupo 1. Os vírus desse grupo, em sua maioria, são transmitidos através do contato mecânico decorrente do manejo nas lavouras, porém até então não há relatos na literatura da presença de vetor. Devido à sua alta estabilidade os *Tobamovirus* podem permanecer viáveis por longos períodos em restos culturais, no solo (Pares et al., 1996; Gülser et al., 2008; Chitra et al., 1999). Uma outra forma eficiente de transmissão ocorre através das sementes onde as partículas virais contaminam os seus tegumentos (Broadbent, 1965).

Como os outros *Tobamovirus*, o TMV possui um fita de ssRNA<sup>+</sup>, com partículas tubulares rígidas, medindo 300nm de comprimento por 9

nm de diâmetro. Podem infectar o tomateiro, a pimenta (*Capsicum baccatum*), o pimentão (*Capsicum annuum*), *Nicotiana* spp., *Petunia* sp., *Zinnia* sp. e muitas outras espécies, causando um sintoma típico de mosaico, deformação foliar e nanismo (Tanzi et al., 1986). Além de causar essa série de sintomas, no tomateiro, os frutos também podem apresentar sintomas de mosaico. Em plantas de *Nicotiana tabacum* cvs. Turksh NN e que confere reação de hipersensibilidade esse patógeno, pode causar sintomas de lesão local, 48 horas após a inoculação (Taylor et al., 1961; Broadbent, 1965).

O ToMV possui partícula que mede 300 nm de comprimento por 18nm de diâmetro. A principal cultura infectada por esse patógeno é o tomateiro, porém os sintomas variam amplamente com a cultivar e as condições ambientais, entretanto os mais comuns são mosaico verde escuro, distorção foliar das folhas jovens, nanismo e redução no crescimento dos frutos (Johansen et al., 1994).

Um outro vírus de grande importância para as solanáceas é o PMMoV, que possui partícula com 300 nm de comprimento por 18 nm de diâmetro. O vírus foi detectado no Brasil infectando plantas de pimenta (*Capsicum baccatum* L.) e pimentão (*C. annuum* L.) desde 2001 (Cezar, 2003) no quais os sintomas mais comuns são o amarelecimento suave das folhas, deformações dos frutos e o subdesenvolvimento das plantas.

#### **2.4 Mecanismo de transmissão dos *Tobamovirus* através das sementes**

Os *Tobamovirus* não têm a capacidade de infectar o embrião ou o endosperma das sementes, de modo que permanecem apenas aderidos ao tegumento da semente (Johansen et al., 1994; Broadbent, 1965; Taylor et al., 1961). Dentre os membros deste gênero o *Tobacco mosaic virus* (TMV) e o *Tomato mosaic virus* (ToMV) podem infectar plantas de diferentes espécies da família *Solanaceae*, destacando-se o tomate *Lycopersicon esculentum* e plantas do gênero *Capsicum* spp. Em sementes de tomate as partículas virais desse grupo de vírus ficam imersas no líquido placentário que recobre a

semente denominada por sarcotesta. A porcentagem de sementes contaminadas varia com a severidade da doença no fruto, mas já foram encontradas até 94% de sementes contendo o vírus. (Taylor et al., 1961; Broadbent, 1965). As plantas de pimenta (*Capsicum baccatum*) e pimentão (*Capsicum annuum*) podem ser severamente contaminadas pelos vírus que infectam o tomate e pelo *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) no qual as partículas virais permanecem aderidas ao tegumento da semente. A taxa de sementes contaminadas pode chegar a 22% para *C. frutescens* (McKinney, 1952) e em torno de 29% para a espécie *C. annuum* (Tosic et al., 1980).

A transmissão da semente para a plântula ocorre através do manejo das mudas em viveiros, pois plântulas de tomate e pimentão após a germinação permanecem com parte da casca aderida ao primeiro par de folhas, e é nesse momento que pode ocorrer à infecção por transmissão mecânica. No solo, após a germinação a raiz pode sofrer algum ferimento, entrar em contato com o tegumento da semente e assim ser infectada (Broadbenet, 1965). Além desse mecanismo a infecção pode ocorrer através de restos culturais contaminados e que são incorporados ao solo. Nesse mecanismo as raízes das plântulas podem sofrer ferimento, entrar em contato com os restos culturais e serem infectadas (Gülser et al., 2008).

## **2.5 Mecanismo de transmissão de vírus da planta ao embrião da semente**

A transmissão do vírus através do embrião pode ocorrer num elevado numero de vírus, distribuídos em diferentes gêneros, dentre os quais incluem as espécies *Peanut mottle virus* (PMV), *Alfafa mosaic virus* (AMV), *Soybean mosaic virus* (SMV), *Barley stripe mosaic virus* (BSMV), *Bean commom mosaic virus* (BCMV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRV), *Tobacco streak virus* (TSV), *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Letucce mosaic virus* (LMV) e muitos outros. A forma como o vírus se movimenta dos tecidos vegetativos aos tecidos reprodutivos embrionários ainda não foi bem elucidado, porém a

transmissão por sementes depende da capacidade do vírus em penetrar, replicar e sobreviver nos tecidos reprodutivos. Dois são os mecanismos pelos quais os vírus podem infectar os tecidos do embrião: infecção viral direta e indireta (Maule & Wang, 1996).

### **2.5.1 Infecção direta do embrião**

O mecanismo de infecção direta do embrião ocorre após a fecundação, de modo que, nesse mecanismo, as partículas virais podem ocorrer no embrião, cotilédone (ervilha e feijão), hilo, testa, micrópila das sementes e também nos órgão florais (sépalas, pétalas, anteras e carpelos). Uma tentativa clássica para explicar o movimento do vírus em direção aos tecidos maternos da semente foi proposto por Maule & Wang (1996), quando estudaram o PSbMV em sementes de ervilha (*Pisum sativum*). Nesse mecanismo os autores demonstraram que o movimento do vírus se inicia nos órgãos vegetativos e se estende a uma dos tecidos formadores das sementes de ervilha, denominado por micrópila. Em seguida as partículas virais atingem o tecido denominado suspensor, (carreador de nutrientes durante as fases de desenvolvimento do embrião), antes de chegarem ao embrião (Wang & Maule, 1994). O suspensor fica presente na semente até o final do processo de maturação do embrião, entretanto, à medida em que a semente completa o seu ciclo de desenvolvimento, ele é degradado. Uma segunda explicação para esse mesmo mecanismo de transmissão do PSbMV, foi proposto por Roberts et al. (2003), postularam que as partículas virais alcançariam o embrião, através do movimento que se daria a partir da testa em direção à micrópila, alcançando em seguida o suspensor. Nesta rota, os autores examinaram os tecidos entre a testa e a micrópila e detectaram a presença de partículas virais. Apesar de todas essas tentativas para explicar a rota de infecção do PSbMV, não se sabe, até então o motivo das baixas taxas de transmissão, podendo ocorrer valores entre 0 a 100%. Wang & Maule, (1992) observaram em algumas cultivares de ervilha suscetíveis ao PSbMV, a não transmissão do vírus por semente. Os autores atribuíram essa não

transmissibilidade à resistência da planta e não à inabilidade do vírus em se translocar de um para outro tecido. O PSbMV pode infectar todos os tecidos da semente de ervilha, entretanto quando presente nos cotilédones, da planta oriunda dessa semente será sadia. Isso se deve a inabilidade do PSbMV em movimentar-se dos tecidos cotiledonares, para a plântula (Wang & Maule, 1994).

### **2.5.2 Infecção indireta do embrião**

É um processo que ocorre através da infecção dos gametas masculino e/ou feminino, ou seja, todo processo de movimentação do vírus, dos tecidos vegetativos aos tecidos reprodutivos, ocorrem durante o processo de formação dos gametas, antes da fertilização, podendo o vírus infectar células que darão origem ao óvulo e/ou grão de pólen.

Segundo Mink (1993), cerca de 40 espécies de vírus, distribuídos em diversos gêneros e famílias podem ser transmitido através do grão de pólen. Nesse mecanismo a infecção ocorre durante o processo de diferenciação e formação das células que darão origem ao grão de pólen. As partículas virais através do plasmodesma movimentam-se das células vegetativas as células do grão de pólen. Entretanto esse mecanismo de movimentação pode ser impedido durante o processo de maturação do grão de pólen, pois nessa fase o plasmodesma vai sendo degenerado. Pode também ocorrer no processo de maturação do grão de pólen, a formação de calos protetores denominados de intina e exina, e que também podem impedir o movimento do vírus (Johansen et al., 1994). No patossistema *Lactuca sativa* x *Letucce mosaic virus*, partículas virais foram encontradas em anteras do grão de pólen, precisamente em células das camadas interna dos tecidos, denominadas por células do tapete, como em células externas denominadas de endotécias (Hunter & Bowyer, 1993, 1994a, 1994b). Para o *Tobacco ringspot virus* (TRV) foi verificada a presença de partículas virais em células pré-meióticas do grão de pólen de plantas de tomate. Foi também comprovado a presença de partículas virais do AMV no citoplasma do grão de pólen de plantas de

alfafa (Johansen et al., 1994).

Através do processo de polinização dois mecanismos de infecção via grão de pólen são descritos (Mink, 1993). O primeiro tipo denominado por transmissão horizontal é aquele onde o grão de pólen infectado, no momento da fertilização, é capaz de infectar a semente e a planta mãe receptora. Esse mecanismo é relatado em um número pequeno de vírus, entretanto, já foi demonstrado para *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) em plantas de batata (Singh, et al., 1992). O segundo tipo denominado por transmissão vertical, ocorre quando o grão de pólen infectado tem a capacidade de apenas infectar a semente, e a planta permanece sadia. Assis Filho & Sherwood (2000) demonstraram, em experimentos com plantas de *Arabidopsis thaliana* e o *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV), o processo de transmissão vertical. Nesse experimento os autores realizaram cruzamento entre plantas doadoras de pólen contaminada e sadia, com plantas receptoras infectadas e sadias. Os autores verificaram que plantas sadias e polinizadas com grãos de pólen infectados, permaneceram sadias e produziram semente infectada.

No processo de infecção do tecido reprodutor feminino, partículas virais podem ser encontradas no saco embrionário, na nucela, e até mesmo no óvulo. Em trabalhos realizados por Schippers (1963), o autor coletou óvulos antes da polinização e verificou que 80% estavam infectados com BCMV, entretanto após ocorrer a maturidade do embrião, as sementes foram coletadas e foram observados 15 % de sementes infectadas. Em trabalhos desenvolvidos por Bessera Júnior (2008), o autor coletou óvulos de plantas de alface infectadas com LMV e verificou que 20% dos óvulos estavam infectados. Após ter ocorrido a fecundação, ovos foram coletados e a porcentagem foi de 13%.

## **2.6 Técnicas utilizadas para detecção de vírus**

Nas últimas décadas diversas técnicas foram desenvolvidas para detecção de vírus, desde as mais simples, como a utilização de plantas indicadoras, às mais sofisticadas como é o caso das técnicas sorológicas e

moleculares. As técnicas devem apresentar alta repetibilidade e sensibilidade em distinguir o vírus de interesse dos demais fitopatógenos, evitando assim falso-positivo, apresentar alta sensibilidade na detecção de pequenas concentrações de partículas virais nas sementes, serem rápidas, de fácil manuseio e a baixo custo (Daniels, 1999).

### **2.6.1 Técnicas sorológicas**

Dentre as técnicas sorológicas aplicadas para detecção de vírus o ELISA tem sido a mais utilizada, devido a sua simplicidade, adaptabilidade, rapidez e sensibilidade, podendo ser utilizado em grande escala para diagnose de um grande número de amostras ao mesmo tempo (Berian, 1985; Daniels, 1994; Figueira, 2000). Devido à sensibilidade deste método na diagnose e quantificação de antígenos específicos, esta técnica foi muito utilizada para diagnosticar vírus em humanos e animais (Voller et al., 1974; Crowther & Abul-Ei-Zein, 1979). Na virologia vegetal a introdução da técnica ELISA iniciou-se com o trabalho pioneiro de Voller et al. (1974), seguido pelos estudos descritos por Clarck & Adams (1977). Mais tarde estendeu-se para as áreas de bacteriologia e micologia (Malin et al., 1985).

Basicamente o teste ELISA pode ser classificado em ELISA direto e indireto. O primeiro foi descrito por Clark & Adams (1977), denominado por DAS-ELISA (*Double antibody sandwich – Enzyme linked immunosorbent assay*), onde se utiliza a IgG (imunoglobulina G) e o conjugado produzido apenas por um animal. Este teste exige um IgG e um conjugado para cada antígeno que se deseja estudar (Zerbini Júnior et al., 2002). A técnica baseia-se no princípio clássico da sorologia, onde um antígeno é reconhecido pelo anti-soro (imunoglobulina-Ig), que lhe deu origem formando um complexo anticorpo-antígeno, associado à propriedades colorimétricas. A coloração do meio ocorre devida à ação de uma determinada enzima em contato com um substrato cromogênico. A enzima é previamente conjugada à imunoglobulina (IgG), e a intensidade da coloração será medida em um espectrofotômetro com filtros adequados para o comprimento da onda a

405nm (Clark & Adams, 1977). Várias enzimas podem ser usadas para a obtenção do conjugado, entretanto a fosfatase alcalina e a peroxidase são as mais utilizadas. (Clark & Bar-Joseph, 1984). Embora a fosfatase alcalina seja de elevado custo ela se apresenta mais vantajosa que a peroxidase, por ser uma enzima que se liga facilmente a IgG através do gluteraldeído e sua reação cinética com o substrato se torna linear (Almeida & Lima, 2001).

No teste ELISA indireto ou PTAS-ELISA (*Plate trapped antigen – enzyme linked immunosorbent assay*), o conjugado é preparado a partir de diferentes espécies de animais, que se utiliza duas IgG, uma para reconhecer o antígeno (vírus) e outra para reconhecer essa primeira IgG. A importância da aplicação deste teste é quando as concentrações virais estão baixas mesmo após a purificação, ou quando existe baixa concentração de vírus na planta (Torrance, 1980; Koenig, 1981; Bárbara & Clark, 1982).

A limitação dos testes sorológicos estão na disponibilidade de anti-soros produzido contra um antígeno específico (vírus, bactéria, fungo, etc.), no suporte físico utilizado, na padronização quanto à concentração adequada dos reagentes e do extrato vegetal que contem o vírus. O extrato vegetal pode conter substâncias que interferem nos resultados podendo originar falsos positivos, com tecidos sadios (Almeida & Lima, 2001). A técnica de ELISA não é suficientemente sensível na diagnose de alguns vírus, por exemplo, para aqueles que ocorrem em baixas concentrações nos tecidos das plantas. Da mesma forma, RNA satélites, encapsidados pela proteína capsidial dos vírus, ou viróides, que não possuem capa protéica, não podem ser detectados sorologicamente (Almeida & Lima 2001). Candresse et al. (2007) demonstraram a grande variabilidade existente dentro da espécie LMV oriundos de diversas regiões do mundo. Nesse trabalho os autores utilizaram 15 isolados e diversos anti-soros disponíveis no mercado e verificaram que nenhum anti-soro foi capaz de detectar todos os 15 isolados. Sendo assim, as técnicas moleculares vêm sendo amplamente utilizadas, não se restringindo apenas à diagnose mas também à determinação da concentração de vírus nos tecidos vegetais, a localização de partículas virais

a nível subcelular, além de permitir o estudo das interações vírus-hospedeiro, possibilitando o maior entendimento dos mecanismos de infecção (Almeida & Lima. 2001).

### **2.6.2 Técnicas moleculares**

De modo geral as técnicas moleculares são mais sensíveis que as sorológicas. Entre as técnicas moleculares utilizadas em estudos de viroses as mais utilizadas são as de hibridização dos ácidos nucleicos e RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction). A alta sensibilidade, aliada à especificidade e à rapidez, colocam a RT-PCR como uma técnica poderosa, que vem auxiliando os pesquisadores de diversas áreas, sendo para a virologia uma ferramenta importante para detecção de vírus em plantas (Colinet et al., 1994; Colinet & Kummert, 1993). A RT-PCR se baseia na síntese de inicial de um DNA complementar (cDNA) a um vírus cujo ácido nucleico é o RNA empregando uma transcriptase reversa. As mais utilizadas são as obtidas do *Avian myeloblastosis vírus* (AMV) e *Moloney murine leukemia vírus* (MmLV), sendo a primeira mais usada para síntese de cDNAs de fitas curtas e a segunda para cDNAs de fita longa, devido a sua baixa atividade de RNases H. Outra enzima que pode ser utilizada como transcriptase reversa é a *Tth* polimerase, enzima termoestável isolada de *Thermus thermophilus*, pode tanto ser usada como transcriptase reversa como DNA polimerase, bastando para isso ajustar as concentrações de manganês e magnésio.

Após a síntese do cDNA este é amplificado sucessivamente com o auxílio da Taq DNA polimerase, na reação denominada de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), empregando-se um par de oligonucleotides desenhados para uma região específica, de modo a gerar um fragmento de DNA de tamanho conhecido, que geralmente é analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida.

### **2.6.3 Técnicas biológicas**

Os testes biológicos são, aparentemente, mais fáceis, devido ao fato de não necessitarem de infraestrutura sofisticadas e/ou de equipamentos caros. Existe a necessidade apenas de um telado ou casa-de-vegetação, ou mesmo de uma câmara de crescimento com luz e temperatura controladas. O problema é que nem sempre apresentam a eficiência desejada. Esse método consiste em fazer a semeadura que se quer analisar, em bandejas adequadas, e esperar a germinação e o crescimento das plantas por um período aproximado de dez a quarenta dias, dependendo do vírus a ser diagnosticado. Geralmente esse tempo nem sempre é suficiente para avaliar se as plântulas apresentam ou não os sintomas da virose que se quer investigar. Esse teste tem como desvantagem o fato de que a observação visual nem sempre é absolutamente segura, de modo que se pode, nos casos de dúvida, submeter à planta suspeita a testes complementares, como o sorológico ou mesmo PCR. A segunda desvantagem seria o tempo gasto para a realização do teste, que pode se alongar nos casos em que a germinação das sementes for demorada.

## **2.7 Métodos recomendados para detecção de vírus em sementes**

O sucesso da diagnose de vírus em semente depende da escolha da técnica a ser adotado, assim como a escolha do melhor método de preparo da amostra de acordo com a posição do vírus no tecido da semente. A Federação Internacional de Semente (ISF) e a Associação internacional de testes de sementes (ISTA) disponibilizam e recomendam alguns protocolos para detecção do LMV em sementes de alface, Tobamovirus em sementes de tomate, pimentão e pimenta, PSbMV em semente de ervilha e PepMV em sementes de tomate.

### **2.7.1 Métodos para detecção de *Tobamovirus* em sementes**

Para a detecção de vírus que não tem a capacidade de infectar os tecidos interno das sementes, ou seja, que ficam sobre o tegumento,

contaminando a semente, como é o caso do ToMV, TMV e PMMoV em sementes de tomate, pimenta e pimentão, a International Seed Federation (ISF) recomenda macerar amostras composta por 500 sementes e inocular em plantas de *Nicotiana* spp. que produzem reação de hipersensibilidade a infecção de tobamovirus. Segundo a ISF a sensibilidade do método é alta, capaz de detectar uma semente contaminada em 500.

### **2.7.2 Detecção de vírus presente nos tecidos internos das sementes**

A ISF e ISTA disponibilizam protocolos para detecção de LMV em sementes alface, PSbMV em sementes de ervilha e PepMV em sementes de tomate, sendo o teste sorológico ELISA o recomendado. Para cada espécie e vírus a ser diagnosticado os protocolos apresentam modificações quanto a tamanho da amostra a ser analisada e parte da semente para obtenção do antígeno. No caso do PSbMV em sementes de ervilha, os testes são realizados exclusivamente do embrião da semente, descartando-se cotilédones, tegumento e raiz. Somente o vírus presente no embrião é que pode originar uma planta infectada. Caso o tegumento ou cotilédone estejam infectados, a planta originada dessa semente não apresentara sintomas, pois o PSbMV, não é capaz de movimentar desses tecidos a planta. Sendo assim caso seja feito teste da semente inteira será gerado um falso positivo. No caso da alface com LMV, a IFS e ISTA recomendam empregar o teste sorológico DAS-ELISA para diagnose. O método empregado para obtenção do extrato pode ser tanto de plântulas como diretamente das sementes.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação, no Laboratório de Virologia Vegetal e no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais, todos lotados no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA).

#### **3.1 Produção de sementes**

##### **3.1.1 Sementes contaminadas/infectadas naturalmente**

Para produção de sementes infectadas naturalmente, foram empregadas plantas de tomate cultivar Santa Clara, pimentão cultivar Ikeda, feijão cultivar Preto Campinas e alface cultivar Regina 71. Plantas de tomate e pimentão foram inoculadas mecanicamente com o TMV, as de feijão com o BCMV e alface com dois isolados de LMV (LMV-Cf e LMV-F), mantidos no DFP/UFLA.

As plantas de tomate, pimentão e alface, foram obtidas a partir de semeadura em bandejas, juntamente com substrato contendo terra, areia e esterco, na proporção 3:2:1 e que posteriormente foram transplantadas para vasos com capacidade para 3 kg, utilizando-se o mesmo substrato empregado nas bandejas. Para obtenção das plantas de feijão, as sementes foram semeadas diretamente em vasos e em canteiros, dentro da casa de vegetação. Na fase de 2 a 3 folhas, as plantas foram inoculadas mecanicamente, empregando-se o extrato de plantas infectadas, testadas por DAS-ELISA, para comprovação dos respectivos vírus. Na inoculação as folhas infectadas foram coletadas e trituradas na presença de solução tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio na mesma molaridade, e os extratos obtidos foram friccionados nas folhas das plantas receptoras previamente polvilhadas com carborundo (CSi). Em seguida as folhas inoculadas foram lavadas e as plantas foram mantidas em casa de vegetação

até a colheita, quando foram encaminhadas para o laboratório para serem submetidas aos testes diagnósticos.

### **3.1.2. Produção de sementes contaminadas artificialmente com *Tobacco mosaic virus* (TMV)**

Esse método somente foi empregado em sementes de pimentão e de tomate. Os experimentos foram compostos por 11 tratamentos para cada espécie, constituídos por diferentes tempos de imersão das sementes em extrato de folhas de fumo contaminadas com o TMV: 0, 1, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 e 270 segundos, com 2 repetições. O tempo 0 referiu-se ao controle, constituído por sementes não tratadas e, no período de 1 segundo, as sementes foram apenas mergulhadas no extrato e retiradas rapidamente. O extrato para a imersão das sementes foi obtido pela trituração de folhas de fumo *Nicotiana tabacum* cv. Turksh, infectadas com TMV, em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio na mesma molaridade (Figura 1). Para comprovar a eficiência da inoculação, após o tratamento, as sementes foram submetidas ao teste sorológico DAS-ELISA e inoculação em plantas de fumo, que apresentam reação de hipersensibilidade ao TMV. Os resultados de absorvância obtidos em teste sorológico DAS-ELISA foram submetidos a análises estatísticas utilizando-se o programa Sisvar® (Ferreira, 2000), e as médias comparadas pelo teste de **Scott-Knott** ( $P \leq 5\%$ ).

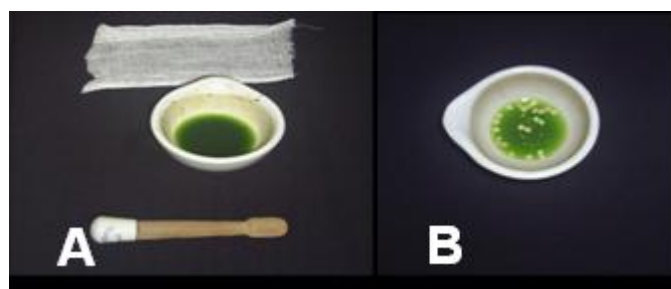


FIGURA 1 A: Preparo do extrato contendo *Tobacco mosaic virus* (TMV) para inoculação das sementes de tomate e pimentão. B: Sementes submetidas a inoculação.

### 3.2 Processamento da amostra para obtenção do antígeno e/ou RNA

O número de sementes empregadas em cada experimento para cultura do feijão, tomate e pimentão foi de 1000, com três repetições. Para economizar o número de testes sorológicos processados e tornar o teste menos oneroso, cada amostra foi processada em combinações, sendo montadas sub-amostras de 11 sementes cada. Assim sendo, apenas uma microplaca foi empregada, deixando-se dois orifícios para os controles positivos e três para os controles negativos. Dos 91 orifícios restantes, um continha apenas 10 sementes e, as demais, 11 sementes cada, para compor o total de 1000 sementes da amostra.

#### 3.2.1 Obtenção do antígeno e/ou RNA para diagnose do TMV

No caso do TMV, que contamina as sementes de pimentão e tomate externamente, foi investigado o limite de detecção de sementes positivas nas amostras em teste molecular, sorológico e biológico. Para isso foi gerado um nível de infecção de 0,1%, ou seja, 1 semente contaminada em 1000 sementes. Foi também verificado através do DAS-ELISA a porcentagem de sementes contaminadas com TMV em lotes colhidos de plantas infectadas. Para obtenção do antígeno, as sementes mergulhadas na solução tampão de extração, específica para o vírus, na proporção de 11 sementes/150  $\mu$ L, para remover as partículas virais contidas em volta do tegumento da semente

(Figura 2). Após ficarem em agitação por 30 minutos, as sementes foram removidas e o tampão com as partículas, supostamente em suspensão, empregado como antígeno.

Para RT-PCR as sementes foram combinadas de 50 em 50 de modo que foram realizados 20 testes. Para essa técnica as sementes foram maceradas e o extrato obtido empregado para extração do RNA.



FIGURA 2 Tubos Elisa com sementes pimentão sendo preparadas para obtenção do antígeno.

### **3.2.2 Obtenção do antígeno e/ou RNA para diagnose do *Bean common mosaic virus* (BCMV)**

Para diagnose do BCMV, tanto o antígeno, como o RNA foram obtidos a partir de plântulas de feijão, empregando-se apenas o par de folhas primárias da semente, excluindo-se os cotilédones, o caulíolo e a raiz (Figura 3). Cada sub-amostras de 11 plântulas atingiu um peso médio de 0,13g e a proporção tecido/volume da solução extratora no teste PTAS-ELISA foi de 100:1. Foi também verificado através do PTAS-ELISA a porcentagem de sementes infectadas com BCMV em lote colhidos de plantas infectadas.

Devido a RT-PCR ser mais sensível, as 1000 sementes foram divididas em 30 sub-amostras, sendo 20 delas com 33 plantas e 10 com 34 plântulas.

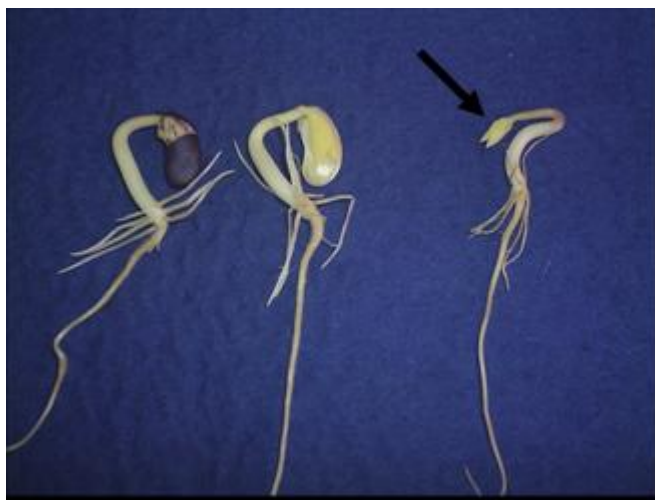


FIGURA 3 Plântulas de feijão com 3 dias de idade. A seta indica o tecido utilizado para obtenção do antígeno e/ou RNA.

### 3.2.3 Obtenção do antígeno e/ou RNA para diagnose do *Lettuce mosaic virus* (LMV)

Os métodos empregados para obtenção do antígeno e/ou RNA para diagnose do LMV em sementes de alface foram os propostos pela ISH e ISTA.

**Método 1:** consistiu em obter o extrato a partir da maceração das sementes. Para isso cada repetição composta por 10.000 sementes, foi dividida em sub-amostras de 500 sementes. As sementes foram adicionadas em almofariz, na presença da solução tampão de extração, na proporção de 20ml por grama de semente. O extrato obtido foi então transferido para tubos Eppendorf e centrifugados por 1 minuto, a 12000rpm e o sobrenadante empregado como antígeno no teste sorológico DAS-ELISA.

**Método 2:** foram semelhantes à descrita anteriormente para outros vírus, utilizando as plântulas oriundas de sementes germinadas em papel de filtro,

entretanto com amostras compostas por 2000 plântulas, sendo montadas sub-amostras de 100 e a proporção de tecido/tampão de extração foi a mesma descrita anteriormente (1g/20mL). Como as plântulas de alface são menores, toda a plântula foi macerada, tanto para a obtenção do antígeno para o teste ELISA como para extração do RNA para realização da RT-PCR.

### **3.3 Métodos diagnósticos**

#### **3.3.1 Teste Biológico**

Nesse teste, 1000 sementes, feijão, pimentão e tomate e 2000 sementes de alface foram semeados em bandejas limpas, medindo 50 x 30 cm, contendo substrato devidamente esterilizado, com os nutrientes necessários. Em todos os casos cada amostra foi distribuída em 10 bandejas. Essas bandejas foram mantidas em casa de vegetação até um período aproximado de 30 dias após a germinação, com avaliação visual diária das plântulas. As plântulas que mostraram qualquer alteração morfológica foram testadas com os antissoros para os respectivos vírus, para detectar uma possível infecção.

#### **3.3.2 Método Sorológico**

Foram empregadas duas variações da técnica sorológica ELISA, sendo que o DAS-ELISA empregado para a diagnose dos vírus LMV e TMV e PTAS-ELISA empregado para o BCMV, devido à disponibilidade dos antissoros no mercado, que foram provenientes da Bioreba e da Agdia. O protocolo seguido foi o recomendado pelo fabricante, utilizando-se diferentes metodologias para a obtenção do material vegetal empregado como antígeno.

### **3.3.2.1 DAS-ELISA**

Para a diagnose do TMV e do LMV foi empregada a técnica DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) utilizando-se o antissoro policlonal da Bioreba, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Nessa técnica, fez-se a cobertura inicial com o antissoro, depois adicionou-se o antígeno, seguido pelo anticorpo conjugado com a enzima fosfatase alcalina e revelação final com o p-nitrofenilfosfato, com os devidos descartes e lavagens da placa entre cada uma dessas etapas. As soluções tampões foram preparadas no laboratório. Os tampões utilizados foram: tampão de cobertura (0,293% de bicarbonato de sódio 0,025M, 0,159% de carbonato de sódio, pH 9,6, contendo 0,02 % de azida sódica); tampão de extração do vírus ( 0,24% de Tris-HCl, pH 7,4, contendo 0,8% de cloreto de sódio, 1% de PVP, 0,02% de cloreto de potássio, 0,05% de Twen 20 e 0,02% de azida sódica); tampão do conjugado (0,24% de Tris-HCl, pH 7,4, contendo 0,8% de cloreto de sódio, 2% de PVP, 0,2% de bovine serum albumin, 0,02% de cloreto de magnésio, 0,02% de cloreto de potássio, 0,02% de azida sódica, 0,05% de Tween 20); tampão do substrato (9,7% de dietanolamina, pH 9,8, contendo 0,02 de azida sódica) e tampão de lavagem (0,8% de cloreto de sódio, pH 7,4, contendo, 0,02% de fosfato de potássio monobásico anidro, 0,115% fosfato de sódio diabásico anidro, 0,02% de cloreto de potássio, 0,02% de azida sódica, 0,05% de Tween 20).

### **3.3.2.2 PTAS-ELISA**

A diagnose do BCMV foi feita empregando-se a técnica PTAS-ELISA (plate trapped antigen – enzyme linked immunosorbent assay). Nessa técnica, o antígeno (extrato vegetal) foi primeiramente colocado na placa, e depois colocado o anticorpo policlonal específico. Na etapa seguinte é empregado o anticorpo monoclonal anti-imunoglobulina de coelho (“anti-rabbit IgG”) conjugado com fosfatase alcalina e finalmente o substrato, também com os devidos descartes e lavagens.

Os tampões utilizados foram: tampão de extração (0,293% de Bicarbonato de sódio 0,025M, 0,159% de Carbonato de sódio, 2% PVP, pH 9,6, contendo 0,02 % de azida sódica); tampão do conjugado ( 0,2% de Bovine serum albumin, pH 7,4, contendo 2% de PVP, 0,02% de azida sódica); tampão do substrato (9,7% de dietanolamina, 0,02% de Cloreto de magnésio, pH 9,8, contendo 0,02 de azida sódica) e tampão de lavagem (0,8% de Cloreto de sódio, pH 7,4, contendo, 0,02% de fosfato de potássio monobásico anidro, 0,115% fosfato de sódio diabásico anidro, 0,02% de Cloreto de potássio, 0,05% de Tween 20).

### 3.3.3 RT-PCR

A diagnose do BCMV em sementes de feijão, LMV em sementes de alface e TMV em sementes de tomate e pimentão foi feita empregando-se os primers discriminados na Tabela 1.

TABELA 1 *Primers* empregados para a detecção do *Bean common mosaic vírus* em sementes de feijão, e o *Lettuce mosaic vírus* em sementes de alface infectadas naturalmente e do *Tobacco mosaic vírus* em sementes de tomate e pimentão infectadas natural e artificialmente.

<b>Primer</b>	<b>Seqüência</b>	<b>Região do genoma/ Tamanho do fragmento</b>
LMV F	GGAGAAAGGAAGTGGTTCTG	9121 a 9868
LMV R	CAC GCC TTT AGT GCA ACC	748 pB
BCMV F	TTG GAC AGC CAC AGC CAC	8944 a 9797
BCMV R	CTG CGG AGG ACC CAT GCC	854 pB
TMV 5592F	GTCAGTGCCGAACAAG	5592 a 6191
TMV 6191R	TCAAGTTGCTGGACTAG	600 pB

### 3.3.3.1 Extração do RNA

A extração do RNA seguiu o protocolo do Trizol (AFGC Protocols, 2002). Após a maceração das plântulas em almofariz, na presença de nitrogênio líquido, o pó obtido foi homogeneizado em solução de Trizol (solução aquosa contendo 38% de fenol saturado, 0,8M de guanidina tiocianato, 0,4M de amônio tiocianato e 0,1M de acetato de sódio, pH5, 5% de glicerol), na proporção de 1 g/15mL. Posteriormente, os microtubos foram incubados em banho-maria por 5 minutos, à temperatura constante de 60°C, e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outros microtubos, o precipitado descartado, e adicionados 300µL de clorofórmio a cada microtubo. Após agitação em vortex, eles foram deixados à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugados em seguida a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para outro microtubo, e a ela foi adicionada ½ do volume da solução contendo 0,8M de Citrato de Sódio e 1,2M de Cloreto de Sódio e ½ volume de isopropanol. Essa mistura foi homogeneizada cuidadosamente por inversão dos tubos e deixada à temperatura ambiente por 10 minutos, para a precipitação do RNA. Posteriormente os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol a 70%, gelado. Após a secagem a vácuo, o RNA foi ressuscitado em 25µL de água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O RNA total extraído foi analisado em gel de agarose a 0,7%.

### 3.3.3.2 RT-PCR

O cDNA foi sintetizado utilizando-se a enzima M-MLV da Promega, juntamente com o *primer* antisense, listado na (Tabela 1). A reação foi preparada para um volume final de 20µL contendo: 5 µL do tampão da enzima (5 X); 1 µL do DTT; 2 µL de dNTPs 10mM; 5,2µL de

água com DEPC (Dietilpirocarbonato); 1 µL do *primer* antisense 10 pM; 0,8µL M-MLV RT e 5 µL do RNA total extraído. Os tubos foram incubados a 42°C por 60 minutos e depois a 95°C por 5 minutos, após o que foram imediatamente colocados em um recipiente com gelo.

Na reação de PCR a composição básica foi: 27,75µL de água ultrapura previamente tratada com DEPC, 10,0 µL do tampão da enzima (5x), 3,0 µL de MgCl<sub>2</sub> ; 25mM; 1,0 µL de DNTPs 10mM; 2,5 µL dos *primers* senso e antisense; GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega); 3 µL do cDNA, para um volume final de 50 µL. Na reação de amplificação do DNA foi empregado o programa básico, específico para o BCMV: 94° C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos: 94° C por 1 minuto, 54,5°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguidos por uma elongação final de 72°C por 5 minutos. Para TMV foi de 46,6°C. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 0,7%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Produção de sementes contaminadas/infectadas naturalmente

Tanto as plantas da cultivar de tomate Santa Clara, quanto a de pimentão Ikeda, quando inoculadas com o TMV mostraram sintomas típicos de mosaico nas folhas e os frutos de tomate também apresentaram um mosaico típico. Os frutos de tomate e de pimentão oriundos de plantas infectados com TMV produziram 98% e 100% de sementes infectadas, respectivamente, diagnosticado em teste sorológico. Os índices de infecção obtidos nesse trabalho, para tomate, são praticamente semelhantes aos encontrados por outros autores. Winckel, (1965) verificou a presença do *Tomato mosaic virus* (ToMV), em 94% das sementes coletadas de frutos produzidos por plantas infectadas. Entretanto, os níveis de sementes de pimentão contaminadas com TMV ficaram bem acima dos encontrados para outro *Tobamovirus* o *Pepper mild motle vírus* (PMMoV). Tosic et al. (1980) verificaram a presença do PMMoV em 29% das sementes oriundas de plantas infectadas. McKinney (1952) verificou que apenas 22% das sementes de plantas de *Capsicum frutescens*, infectadas com PMMoV, mostraram a presença do vírus.

Na produção de sementes de alface, da cultivar Regina 71, a reação da planta variou de acordo com o isolado utilizado. As plantas de alface infectadas com o isolado LMV-Cf, apresentaram um mosaico leve nos estágios iniciais de desenvolvimento, entretanto conforme a planta foi se desenvolvendo, os sintomas foram ficando mais drástico, as folhas foram se juntando, e a planta atingiu um formato de cabeça fechada. Quando infectadas com o segundo isolado, o LMV-F, os sintomas iniciais foram drásticos, se comparados com o LMV-Cf, entretanto as plantas apresentaram um mosaico severo, uma grave deformação foliar, seguido de encarquilhamento das folhas, sendo que algumas plantas morreram. Mesmo

assim, das sementes colhidas das plantas infectadas com esses dois isolados, não foi evidenciado a presença de nenhuma semente infectada com LMV.

As causas da não contaminação das sementes provavelmente estejam relacionadas a fatores ligados tanto ao vírus quanto à planta. Dentro da espécie *Letuce mosaic virus*, Krause-Sakate et al. (2002), verificaram a existência de dois grupos de isolados: os transmitidos por semente e os não transmitidos. Em análise filogenética os isolados com capacidade de infectar a semente foram agrupados em um ramo da árvore filogenética e os incapazes de infectar a semente foram agrupados em um outro ramo. Certamente os isolados testados nesse trabalho, fazem parte desse grupo não transmitido por semente.

Um outro fator poderia estar ligado a mecanismos relacionados a resistência da cultivar Regina 71, em não permitir a movimentação das partículas virais dos tecidos vegetativos aos tecidos reprodutivos. Esse mecanismo foi evidenciado no patossistema *Pea seed-born mosaic virus* x Ervilha (Wang & Maule, 1994) e *Bean common mosaic virus* x feijão (Morales & Castaño, 1987), entretanto ainda não se sabe qual o mecanismo que confere esse caráter de resistência.

As plantas de feijão cv. Preto-Campinas, infectadas com BCMV, produziram um pequeno número de sementes, devido à agressividade do vírus. Elas mostraram mosaico severo, seguido por deformação foliar, embolhamento e nanismo, o que prejudicou muito a produção. Plantas sadias produziram em torno de 60 sementes, já as plantas infectadas produziram em média 5 sementes, sendo assim para produção de 10.000 sementes foram necessário o cultivo de 2000 plantas. Foi verificado por PTAS-ELISA a presença do BCMV em 15% das sementes colhidas de plantas infectadas. Além disso foi evidenciado nas sementes oriundas de plantas infectadas, um enrugamento que nas sementes sadias foram ausentes (Figura 4B). Além dessa sintomatologia apresentada, algumas sementes apresentaram uma coloração creme, que não é característico da cultivar, que produz grão preto (Figura 4A).

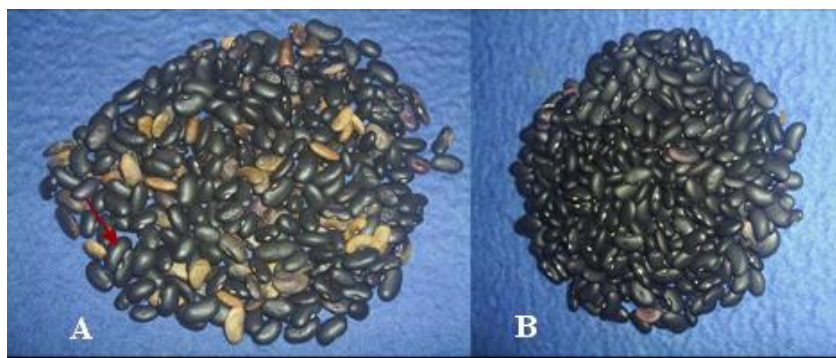


FIGURA 4 A: sementes de feijão com BCMV. As setas indicam a presença os sintomas de enrugamento e despigmentação. B: lote de semente da cultivar Preto Campinas sadia.

Entretanto, sintoma não se correlacionou com a presença do vírus, já que sementes enrugadas, cremes e normais produziram plantas infectadas e saudas. Resultado semelhante a esses foram encontrados no patossistema soja (*Glycine max*) X *Sobean mosaic virus* (SMV) (Koshimizu & Iizuka, 1963). Nesse trabalho, os autores selecionaram apenas sementes apresentando sintomas de mancha-café, e verificaram que as plantas originadas dessas sementes em sua maioria não apresentavam sintoma de mosaico comum. Essa falta de correlação entre a presença de sintomas nas sementes e a ausência de plantas infectadas, ainda não foi explicado, entretanto podem estar ligados a fatores relacionados ao vírus, à planta e ao meio ambiente.

#### **4.2 Produção de sementes contaminada artificialmente com TMV**

A contaminação das sementes de pimentão e de tomate, inoculadas artificialmente foi checada por DAS-ELISA, sendo que os dados médios das absorvâncias obtidas em cada tratamento se encontram discriminados na Tabela 2 Não foi evidenciada diferença estatística na absorvância de todos os tratamentos, indicando que para obtenção de semente de pimentão e tomate contaminada artificialmente com TMV, a imersão no extrato contendo o vírus, por apenas 1 segundo, já foi suficiente para que a partícula viral ficasse aderida às mesmas.

O fato de ocorrer uma maior absorvência nas sementes de tomate contaminadas em relação às de pimentão, provavelmente esteja relacionados à presença de estruturas denominadas por tricomas, que somente está presente na semente de tomate (Figura 5A).

Essas estruturas certamente propiciam maior aderência das partículas virais em sua superfície. Este trabalho foi pioneiro no desenvolvimento desta metodologia para inoculação e produção de sementes contaminadas artificialmente, podendo auxiliar futuras pesquisas com TMV em sementes de tomate e pimentão.

TABELA 2 Absorvência média obtida no teste DAS-ELISA, com as sementes de pimentão e tomate artificialmente inoculadas com *Tobacco mosaic virus*.

<b>Tratamento</b> Tempo(s) de imersão no extrato com TMV	<b>Absorvência Média</b> <b>em Sementes de</b> <b>pimentão Tratadas</b>	<b>Absorvência Média</b> <b>em Sementes de</b> <b>tomate Tratadas</b>
0 (não inoculado)	0,119 a	0,110 a
1	0,344 b	0,524 b
30	0,288 b	0,570 b
60	0,279 b	0,769 b
90	0,242 b	0,580 b
120	0,257 b	0,622 b
150	0,354 b	0,659 b
180	0,466 b	0,667 b
210	0,423 b	0,549 b
240	0,424 b	0,627 b
270	0,511 b	0,600 b
CV.	23,59%	17,63%

As médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de **Scott-Knott** ( $P \leq 0,05$ ).



FIGURA 5 A: semente de tomate. A seta indica a presença de tricomas. B: semente de pimentão, ausência de tricomas.

#### 4.3 Detecção do TMV em plântulas e sementes de tomate e pimentão

Através da técnica DAS-ELISA, foi possível diagnosticar a presença de uma semente contaminada em 1000 sadias, tanto em tomate quanto em pimentão. Em teste biológico utilizando lote de semente com níveis de 0,1% de infecção não foi possível observar o aparecimento de sintomas que denunciasses a infecção nas plântulas. Isso deve ter ocorrido porque a contaminação pelo TMV é externa às sementes, e nem sempre chega a infectar a planta. Para que ocorra infecção, a raiz tem que sofrer ferimento (Rast, 1973; Broadbent, 1965; Gusler et al., 2008) ou as mudas sofrerem danos mecânicos (Broadbent, 1965; Broadbent, 1976; Broadbent & Fletcher, 1966). Esse segundo tipo de infecção pode ocorrer em virtude do manejo em viveiro de produção de mudas, pois após a germinação a casca permanece aderida ao primeiro par de folhas, de onde o vírus pode ser transmitido para a plântula (Figura 6).



FIGURA 6 Plântulas de tomate. As setas indicam a presença do tegumento aderido ao primeiro par de folhas.

Para confirmar esse mecanismo de transmissão, sementes contaminadas naturalmente com TMV, foram semeadas em bandeja contendo substrato adequado, e foram acompanhadas até que ocorresse a germinação. Após esse período, as cascas que estavam aderidas ao primeiro par de folhas, foram então recolhidas, maceradas e inoculadas em plantas de fumo cv. TNN, que são plantas suscetíveis ao TMV. Com dois dias após ter ocorrido à inoculação, foi observado a presença de lesões locais nas folhas de fumo, reações essas típicas da presença do TMV. Esses resultados confirmaram, a grande estabilidade do TMV nas sementes de tomate e pimentão, mesmo após as sementes terem entrado em contato com microrganismos diversos no solo durante o processo de germinação, e que mesmo assim permaneceram infectivos.

Através da utilização da Técnica RT-PCR, foi possível a detecção do TMV em sementes de tomate e pimentão, apenas quando o extrato foi obtido através da maceração da semente. Em análise eletroforética em gel de agarose 0,7%, foi gerado uma banda de aproximadamente 600 pares de bases, conforme o esperado. Com essa técnica também foi possível a detecção de 1 semente contaminada em 1000 sadia (Figura 7 e 8).

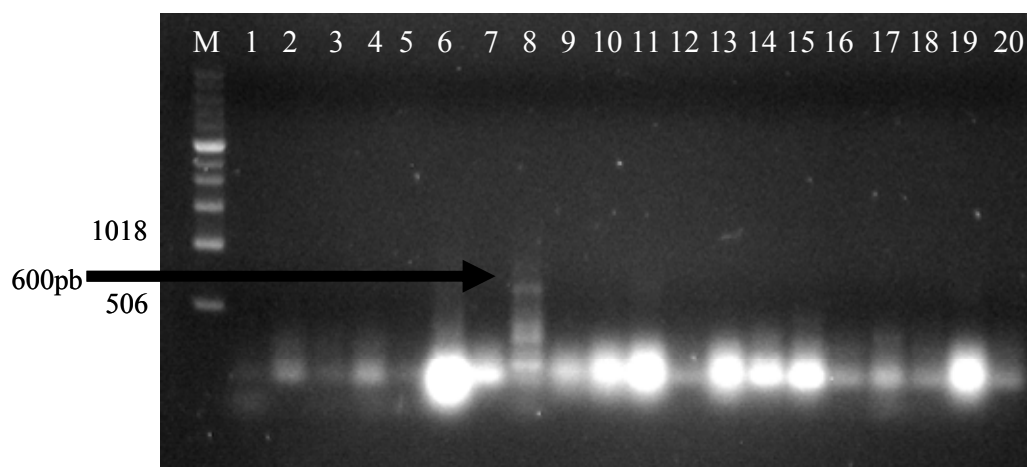


FIGURA 7 Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos da PCR. M = 1Kb ladder; 1 ao 20 = amostras compostas por 50 sementes de tomate, oriundas de lotes com 0,001% de infecção. A banda obtida com *primers* desenhado indicam a presença do *Tobacco mosaic virus*.

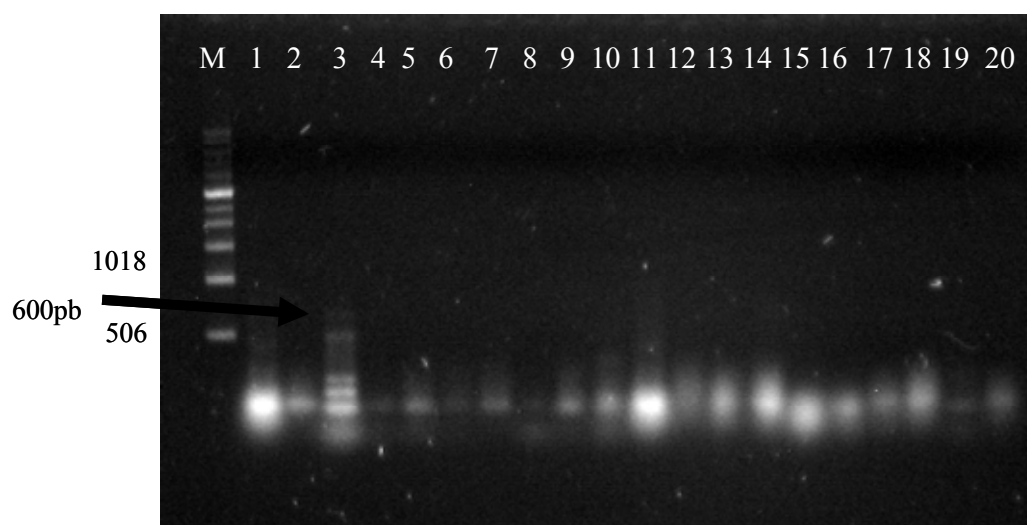


FIGURA 8 Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos da PCR. M = 1Kb ladder; 1 ao 20 = amostras compostas por 50 sementes de pimentão, oriundas de lotes com 0,001% de infecção. A banda obtida com *primers* desenhado indicam a presença do *Tobacco mosaic virus*.

#### 4.4 Detecção do BCMV em plântulas de feijão

Em teste biológico onde as sementes foram semeadas em bandeja, as avaliações foram realizadas diariamente. Entretanto somente aos 10 dias após a germinação é que foi possível observar um mosaico leve no primeiro par de folhas, típico do BCMV. Aos 15 dias após a germinação, foram observados sintomas mais severos na primeira folha trifoliada, mais fáceis de serem visualizados, pois as folhas apresentaram deformação foliar, embolhamento e um mosaico severo. A taxa média de transmissão nessa cultivar foi de 14,9% em todas as repetições e avaliações realizadas.

Em teste sorológico empregando-se a técnica PTAS-ELISA, foi possível diagnosticar em média 15,0% de sementes infectadas. Quando avaliou-se as sementes combinadas em 90 grupos de 11 e um grupo de 10 sementes, foi possível detectar uma média de 48 grupos infectados, empregando-se o par de folhas primária do eixo embrionário das plântulas obtidas por germinação das sementes em papel de filtro. O protocolo desenvolvido, onde se empregaram apenas as folhas primárias do eixo embrionário das sementes de feijão, descartando-se os cotilédones, raiz e casca, mostrou ser o tecido ideal para diagnose do BCMV. Isso porque os resultados encontrados representaram a real taxa de plantas infectadas em teste biológico, não ocorrendo assim um falso-positivo. No patossistema *Pea seed-born mosaic virus x Pisium sativum* a ISTA e ISH recomendam que as análises sejam realizadas apenas no eixo embrionário da semente, descartando-se os cotilédones e tegumento. Essas recomendações são realizadas em virtude do PSbMV ter a capacidade de infectar todos os tecidos da semente de ervilha, entretanto somente o vírus presente no eixo embrionário é que será capaz de originar uma planta infectada (Wang & Maule, 1992). Caso o vírus esteja presente em tecidos externos ao eixo embrionário, ou seja, nos cotilédones, testa, ou tegumento, certamente essas partículas não terão a capacidade de movimentar-se até o embrião e originar uma planta infectada, e se realizado análise desses tecidos, serão originados um falso-positivo.

A porcentagem de sementes infectadas nos lotes analisados, seja ela por teste biológico ou teste ELISA, foi em média 15,0%, o que se encontra dentro dos níveis encontrados por diversos autores. Morales & Castaño (1987), conseguiram níveis de transmissão entre 3 e 57%. Segundo os autores a taxa de transmissão variou devido a diversos fatores, dentre eles a combinação entre cultivar e isolado de BCMV. Em testes com diferentes isolados de BCMV (US1, US5, US2, NL3 E NL4) na cultivar Dubbele Witte, a taxa de sementes infectadas foi de 43,5%, 57,5%, 20,23%, 43,20% e 37,1% respectivamente. Esses mesmos isolados testados na cultivar Readlands greenleaf C, somente foi identificado transmissão para o isolado US5, a uma taxa de 12,3%, e os demais não foram capazes de infectar o embrião.

Schippers (1963), estudando o BCMV em sementes de feijoeiro, verificou que óvulos coletados antes da fertilização apresentavam 80% de infecção. Após ocorrer a fecundação foi verificada apenas a presença de 15% sementes com embrião infectadas com o vírus. Bowers & Goodman (1979) estudando o patossistema *Soybean mosaic virus* x *Glycine max*, verificaram a presença de partículas virais apenas nos estágios iniciais do desenvolvimento do embrião. À medida que o embrião foi se desenvolvendo as partículas virais não foram mais detectadas.

Amari et al. (2007) verificaram que as causas das baixas taxas de sementes infectadas com PNRSV, estejam relacionadas a fatores ligados a mudanças fisiológicas, ocorridas durante o processo de maturação da semente. Segundo o autor durante a maturação compostos inibitórios como fenóis e quinonas podem aumentar, alguns nutrientes podem ser realocados e as atividades celulares cessadas, sendo assim as partículas virais não suportariam todas essas mudanças.

Apesar dos resultados obtidos em teste sorológicos assemelharem aos obtidos em teste biológico, a metodologia desenvolvida para diagnose do BCMV em sementes de feijão através

da técnica PTAS-ELISA mostrou-se promissora, em virtude do tempo gasto para emissão do laudo fitossanitário.

Em análise sorológica, com a utilização de kits comerciais, o tempo de detecção do patógeno foi de 4 dias, ao passo que em teste biológico, somente foi possível avaliar as plantas em torno de 15 dias após início dos testes. Esses resultados demonstraram que o protocolo desenvolvido para preparo das amostras e análise através do PTAS-ELISA pode ser empregado nos testes de rotina dos Laboratórios Brasileiros, pois é um teste rápido e sensível.

Em análise do DNA obtidos por RT-PCR, provenientes de folhas primárias, oriundos de plantas infectadas com *Bean common mosaic virus*, utilizando o par de *primers* desenhado com base no genoma do BCMV, foi verificado a presença do fragmento esperado de 854 pares de base. Das 30 combinações analisadas, foi verificada a presença de fragmentos em 6 delas (Figura 9 e 10). Esses resultados indicaram que a RT-PCR também possui a sensibilidade necessária para a diagnose eficiente de BCMV em sementes de feijão.

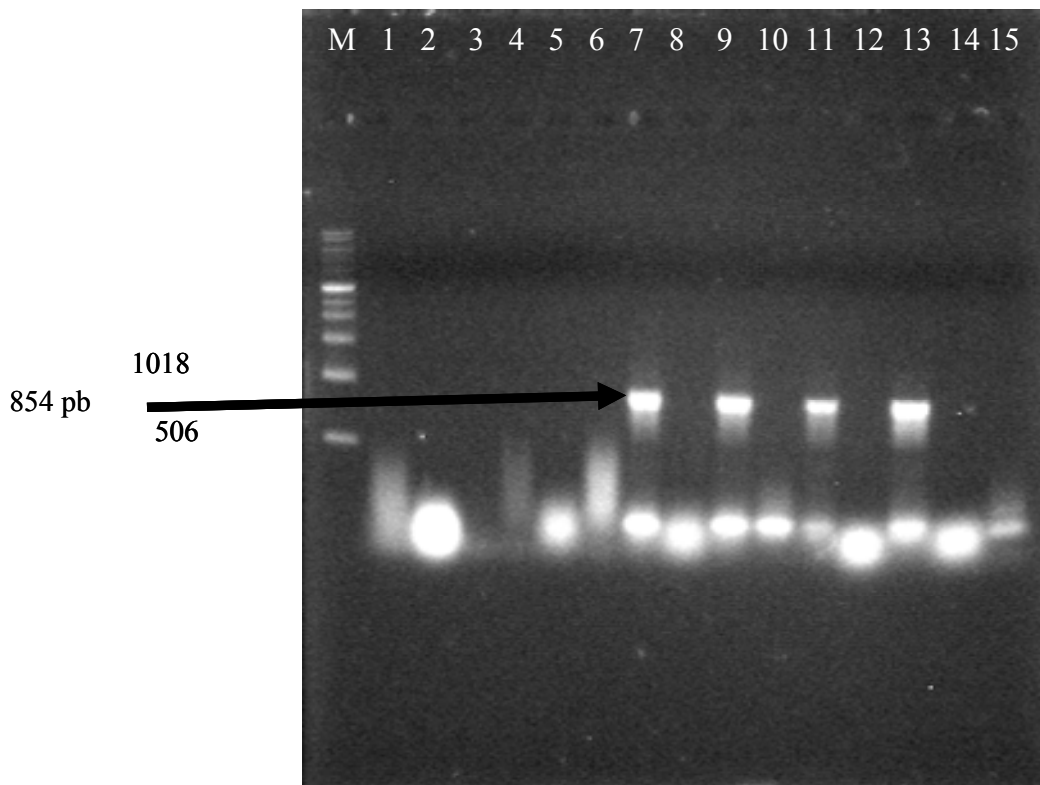


FIGURA 9 Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos da PCR. M = 1Kb ladder; 1 ao 15 = amostras compostas por 33 plântulas de feijão. As bandas obtidas com *primers* desenhado indicam a presença do *Bean commom mosaic virus*.

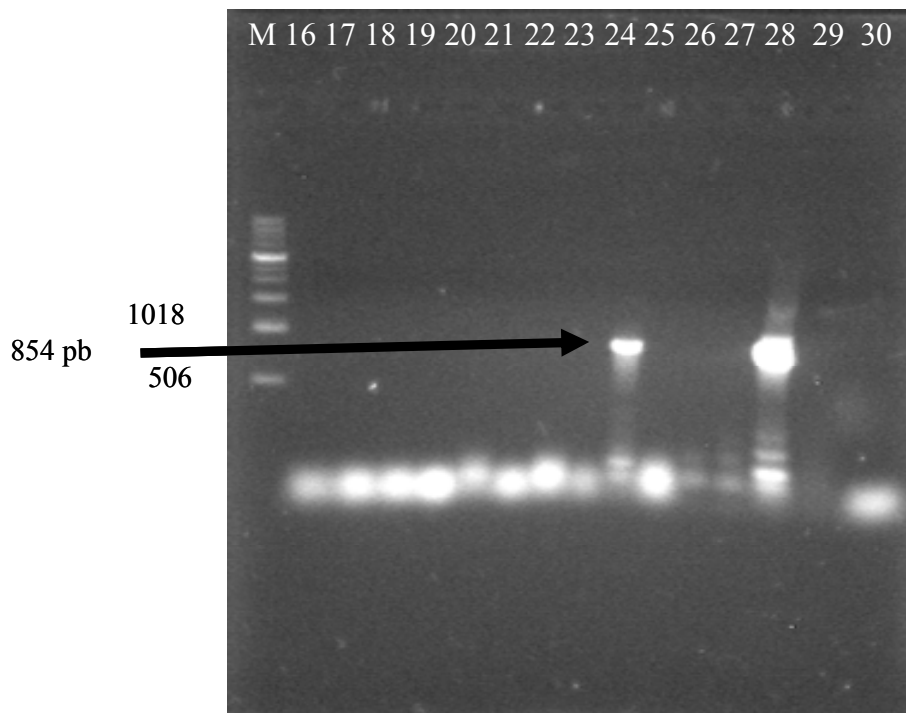


FIGURA 10 Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos da PCR. M = 1Kb ladder; 16 ao 20 = amostras compostas por 33 plântulas de feijão; 21 ao 30 amostras compotas por 34 plântulas. As bandas obtidas com *primers* desenhado indicam a presença do *Bean commom mosaic virus*.

## 5 CONCLUSÕES

1-Sementes produzidas por plantas de alface cv. Regina 71 não foram infectadas pelos dois isolados de *Lettuce mosaic virus* empregados.

2- Sementes de pimentão cv. Ikeda e de tomate cv. Sta Clara foram contaminadas artificialmente com TMV quando mergulhadas em extrato foliar contendo o vírus, por 1 ou mais segundos.

3-Plantas de pimentão cv. Ikeda e de tomate cv. Sta Clara, infectadas com TMV, produziram praticamente 100% de sementes contaminadas com *Tobacco mosaic virus* (TMV).

4- A técnica DAS-ELISA, utilizando antissoros policlonais, e RT-PCR foram eficientes para detectar incidência de 0,1% de TMV em lotes de sementes de pimentão e/ou de tomate, com o teste realizado diretamente nas sementes.

5 - A técnica PTAS-ELISA, utilizando antissoro policlonal, foi eficiente para detectar 15% de incidência de BCMV em lotes de sementes de feijão cv. Preto Campinas. A técnica RT-PCR foi eficiente para detectar a presença do BCMV em sementes de feijão cv. Preto Campinas.

6- O teste biológico foi eficiente apenas para detectar a infecção de sementes de feijão infectadas com BCMV.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFGC PROJECT. **Protocols**, Wisconsin, Aug. 2002. Disponível em: <  
<http://www.arabidopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm#isolation>>. Acesso em: 10 abr. 2009.

ALBRECHTSEN, S. E. **Testing methods for seed-transmitted viruses: principles and protocols**. Wallingford: Cabi, 2006. 268 p.

ALMEIDA, A. M. R. **Noções de sorologia aplicadas à fitovirologia**. Londrina: Embrapa Soja, 1995. 105 p.

ALMEIDA, M. R.; LIMA, J. A. A. Técnicas sorológicas aplicadas à fitopatologia 3.4.2: difusão dupla em anjar. In: ALMEIDA, M. R.; LIMA, J. A. A. **Princípios e técnicas de diagnose aplicada em virologia**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 45-50.

AMARI, K.; DIAZ-VIVANCOS, P.; VINCENTE, S. V. P.; SANCHEZ-PINA, M. A.; HERNANDEZ, J. A. Oxidative stress induction by *Prunus necrotic ringspot virus* infection in apricot seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 131, n. 2, p. 302-310, June 2007.

ASSIS FILHO, F. M.; SHERWOOD, J. L. Evaluation of seed transmission of *Turnip yellow mosaic virus* and *Tobacco mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 11, p. 1233-1238, Nov. 2000.

BARBARA, D. J.; CLARCK, M. F. A. A simple indirect ELISA using F (ab')<sub>2</sub> fragments of immunoglobulin. **Journal of General Virology**, London, v. 58, n. 2, p. 315-322, Feb. 1982.

BERIAN, L. O. S. A serologia como método auxiliar no controle de fitovirus. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 1, n. 2, p. 121-126, mar. 1985.

BESERRA JÚNIOR, J. E. A. **Determinantes virais associados às diferentes propriedades biológicas de dois isolados de *Lettuce mosaic virus* (LMV): cinética da infecção viral e infecção dos tecidos.** 2008. 78 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

BOS, L. Seedborne viruses. In: HEWITT, W. B.; CHIARAPPA, L. (Ed.). **Plant health and quarantine in international transfer of genetic resources**, Cleveland: CRC, 1977. p. 39-69.

BOWERS, G. R.; GOODMAN, R. M. Soybean mosaic virus: infection of soybean seed parts and seed transmission. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 6, p. 569-572, Nov. 1979.

BROADBENT, L. Epidemiology and control of *tomato mosaic virus*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 14, n. 1, p. 75-96, Jan. 1976.

BROADBENT, L. The epidemiology of tomato mosaic. XI: seed transmission of TMV. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 56, n. 2, p. 177-205, Feb. 1965.

BWYE, A. M.; JONES, R. A. C.; PROUDLOVE, W. Effects of sowing seed with different levels of infection, plant density and the growth stage at which plants first develop symptoms on cucumber mosaic virus infection of narrow-leafed lupins (*Lupinus angustifolius*). **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 45, n. 7, p. 1395-1412, Sept. 1994.

CANDRESSE, T.; LOT, H.; GERMAN-RETANA, S.; KRAUSE-SAKATE, R.; THOMAS, J.; SOUCHE, S.; DELAUNAY, T.; LANNEAU, M.; GALLI, O. L. Analysis of the serological variability of Lettuce mosaic virus using monoclonal antibodies and surface plasmon resonance technology. **Journal of General Virology**, London, v. 88, n. 9, p. 2605-2610, Sept. 2007.

CEZAR, M. A. **Caracterização biológica e molecular de isolados de vírus pertencentes ao gênero *Tobamovirus* provenientes de *Capsicum annuum* L.** 2003. 48 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu.

CHITRA, T. R.; PRAKASH, H. S.; ALBRECHTSEN, S. E.; SHETTY, H. S.; MATHUR, S. B. 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.

CLARCK, M. F.; BAR-JOSEPH, M. Enzyme immunosorbent assay in plant virology. **Methods in Virology**, Orlando, v. 7, n. 1, p. 51-85, 1984.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplante method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 34, n. 3, p. 475-483, Mar. 1977.

COLINET, D.; KUMMERT, J. Identification of a “*sweet potato feathery mottle virus*” isolate from China (SPFMV-CH) by the polymerase chain reaction with degenerate primers. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 149-159, Dec. 1993.

COLINET, D.; KUMMERT, J.; LEPOIVRE, P. Identification of distinct potyviruses in mildly infected sweet potato by the polymerase chain reaction with degenerate primers. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 1, p. 65-69, Jan. 1993.

CROWTHER, J. R.; ABU-EL-ZEIN, E. M. E. Detection and quantification of foot and mouth disease virus by enzyme labeled immunosorbent assay (Elisa). **Journal of General Virology**, London, v. 42, n. 3, p. 597-602, Mar. 1979.

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

DANIELS, J. **Utilização de técnicas sorológicas para detecção de vírus em batata-doce**. Brasília: EMBRAPA/CPACT, 1999. (Comunicado Técnico, 46).

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

ERKAN, S.; DELEN, N. Seed treatments to eliminate seed-borne tobacco mosaic virus in pepper seeds. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, Turim, v. 4, n. 2, p. 50, 1985.

FARAH, S. B. **DNA: segredos e mistérios**. São Paulo: Sarvier, 2000. 276 p.

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

GERMAN-RETANA, S.; WALTER, J.; GALLO, L. E. *Lettuce mosaic virus*: from pathogen diversity to host interactors. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 9, n. 2, p. 127-136, Mar. 2008.

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.

HOCH, H. C.; PROVVIDENTI, R. Ultrastructural localization of *Bean common mosaic virus* in dormant and germinating seeds of *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, n. 3, p. 327-330, Mar. 1978.

HULL, R. **Matthew's plant virology**. 4. ed. Londres: Academic, 2002. 1001 p.

HUNTER, D.G.; BOWYER, J. W. Cytopathology of anthers and pollen from lettuce plants infected by lettuce mosaic potyvirus. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 142, n. 2, p. 107-114, Feb. 1994a.

HUNTER, D. G.; BOWYER, J. W. Cytopathology of lettuce mosaic virus-infected seeds and seedlings. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 137, n. 1, p. 61-71, Jan. 1993.

HUNTER, D. G.; BOWYER, J. W. Cytopathology of mature ovaries from lettuce plants infected by lettuce mosaic potyvirus. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 140, n. 1, p. 11-18, Jan. 1994b.

INTERNATIONAL SEED FEDERATION. Disponível em: <<http://worldseed.org/sihis>>. Acesso em: 10 abr. 2009.

INTERNATIONAL SEEDS TESTING ASSOCIATION. <<http://www.seedtest.org/en/home.html>>. Acesso em: 10 abr. 2009.

JADÃO, A. S.; PAVAN, M. A.; SILVA, N.; ZERBINI, F. M. Transmissão via semente do *Lettuce mosaic virus* (LMV) patótipos II e IV em diferentes genótipos de alface. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 28, n. 1, p. 58-61, jan. 2002.

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

KAISER, W. J.; MOSSAHEBI, H. Natural infection of mungbean by Bean common mosaic virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, n. 11, p. 1209-1214, Nov. 1974.

KOENIG, R. Indirect Elisa methods for the broad specificity detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 55, n. 1, p. 53-62, Jan. 1981.

- KOENIG, R.; PAUL, H. L. Variants of Elisa in plant virus diagnosis. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 113-125, Oct. 1982.
- KOSHIMIZU, S.; IIZUKA, T. Studies on soybean virus transmission in Midwest soybeans. **Bulletin of Tohoku National Agricultural Experimental Station**, Morioka, v. 27, p. 1-104, 1963.
- KRAUSE-SAKATE, R.; LE GALL, O.; FAKHFAKH, H.; PEYPELUT, M.; MARRAKCHI, M.; VARVERI, C.; PAVAN, M. A.; SOUCHE, S.; LOT, H.; ZERBINI, F. M.; CANDRESSE, T. Molecular and biological characterization of *Lettuce mosaic virus* 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.
- MAKKOUK, K. M.; KUMARI, S. G.; BOS, L. Broad bean wilt virus: host range, purification, serology, transmission characteristics, and occurrence in faba bean in West Asia and North Africa. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 96, n. 5, p. 91-300, Sept. 1990.
- MALIN, E.; BELDEN, E. L.; ROTH, D. Evaluation of the radioimmunoassay, indirect enzyme linked immunosorbent assay, and dot blot assay for the identification of *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 7, n. 3, p. 217-222, Sept. 1985.
- MAULE, A. J.; WANG, D. Seed transmission of plant viruses: A lesson in biological complexity. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 154, n. 4, p. 153-158, Apr. 1996.
- MCKINNEY, H. H. Two strains of tobacco mosaic virus, one of which is seed-borne in an etch-immune pungent pepper. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 36, n. 2, p. 184-187, Feb. 1952.
- MEDINA, A. C.; GROAN, R. G. Seed transmission of bean mosaic viruses. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 51, n. 4, p. 452-456, Apr. 1961.
- MINK, G. J. Pollen and seed-transmitted viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, n. 4, p. 375-402, Apr. 1993.
- MORALES, F. J.; CASTAÑO, M. Seed transmission characteristics of selected *Bean common mosaic virus* strains in differential bean cultivars. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 71, n. 1, p. 51-53, Jan. 1987.

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.

PINK, D. A. C.; KOSTOVA, D.; WALKEY, D. G. A. Differentiation of pathotypes of lettuce mosaic virus. **Plant Pathology**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 5-12, Feb. 1992.

PROVVIDENTI, R.; COBB, E. D. Seed transmission of *Bean common mosaic virus* in tepary bean. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 59, n. 11, p. 966-969, Sept. 1975.

RAST, A. T. H. B. **Variability of tobacco mosaic virus in relation to control of tomato mosaic in glasshouse tomato crops by resistance breeding and cross protection**. 1975. 76 p. Tese (Doctor in Plant Pathology) – Wageningen University Dissertation, Wageningen.

ROBERTS, I. M.; WANG, D.; THOMAS, C. L.; MAULE, A. J. *Pea seed-borne mosaic virus* seed transmission exploits novel symplastic pathways to infect the pea embryo and is, in part, dependent upon chance. **Protoplasma**, New York, v. 222, n. 1/2, p. 31-43, Sept. 2003.

RYDER, E. J. Transmission of common *Lettuce mosaic virus* through the gametes of lettuce plants. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 48, n. 5, p. 522-523, May 1964.

RYDER, E. J. Seed transmission of *Lettuce mosaic virus* in mosaic resistant lettuce. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 98, n. 6, p. 610-614, July 1973.

SCHIPPERS, B. Transmission of *Bean common mosaic virus* by seed of *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Beka. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 433-497, Jan. 1963.

SINGH, R. P.; BOUCHER, A.; SOMERVILLE, T. H. Detection of the mild potato spindle tuber viroid in the pollen and various viroid-infected pollen. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, n. 9, p. 951-53, Sept. 1992.

TANZI, M.; BETTI, L.; CANOVA, A. Behaviour of two new commercial pepper cvs. With L<sup>1</sup>, L<sup>3</sup> genotype towards TMV pepper strain infection. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, Turim, v. 5, n. 2, p. 45, Feb. 1986.

TAYLOR, R. H.; GROGAN, R. G.; KIMBLE K. A. Transmission of *Tobacco mosaic virus* in tomato seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 51, n. 8, p. 837-842, Aug. 1961.

TORRANCE, L. Use of Clq to detect plant viruses in an enzyme-linked immunosorbent-type assay. **Journal General Virology**, London, v. 51, n. 1, p. 229-232, Nov. 1980.

TOSIC, M.; SUTIC, D.; PESIC, Z. Transmission of *Tobacco Mosaic Virus* through Pepper (*Capsicum annuum* L.) seed. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 97, n. 1, p. 10-13, Jan. 1980.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; HULDT, G.; ENGVALL, E. A. Microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. **Bulletin of the World Health Organization**, New York, v. 51, n. 2, p. 209-211, Feb. 1974.

WANG, D.; MAULE, A. J. Early embryo invasion as a determinant in pea of the seed transmission of pea seedborne mosaic virus. **Journal of General Virology**, London, v. 73, n. 7, p. 1615-1620, July 1992.

WANG, D.; MAULE, A. J. A model for seed transmission of a plant virus: genetic and structural analyses of pea embryo invasion by pea seed-borne mosaic virus. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 6, p. 777-787, June 1994.

WINCKEL, A. van; GCYPENS, M. Inactivering van Tabakmosaiekvirus in de grond. **Parasitica**, Bruxelles, v. 21, n. 2, p. 124-128, Feb. 1965.

WISLER, G. C.; DUFFUS, J. E. A century of plant virus management in the Salinas valley of California, 'East of Eden'. **Virus Research**, Amsterdam, v. 71, n. 1-2, p. 161-9, Nov. 2000.

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.

ZERBINI, F. M.; CARVALHO, G. C.; ZAMBOLIM, E. M. **Introdução a virologia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 143 p.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nessa dissertação foram estabelecidos protocolos para diagnose do *Bean common mosaic virus* em sementes de feijão e *Tobacco mosaic virus* em sementes de tomate e pimentão, utilizando-se as técnicas biológicas, sorológicas e moleculares. Os protocolos estabelecidos certamente serão de grande importância para os laboratórios credenciados pelo MAPA, que a partir desses dados poderão prestar serviço aos agricultores brasileiros.

Para patossistema *Lettuce mosaic virus* - alface, o fato de não ter ocorrido transmissão do vírus a semente, certamente deve estar relacionado aos isolados, assim à cultivar estudada. Desse modo, para o estabelecimento do protocolo para detecção do LMV em sementes de alface nos laboratórios brasileiros, existe a necessidade de se buscar novos isolados que comprovadamente são descritos na literatura como transmitidos por semente. Além disso, é de extrema importância estudar e testar diferentes isolados, de diversas estirpes e cultivares, para analisar a transmissão por semente.

Especificamente no patossistema *Bean common mosaic virus* - feijão, há a necessidade de se estudar o mecanismo de movimento do vírus da planta para a semente e estabelecer índices sanitários.