



JOÃO EDUARDO MELO DE ALMEIDA

**DETECÇÃO E TRANSMISSIBILIDADE DE
VÍRUS EM SEMENTES DE ABÓBORA,
PIMENTÃO E TOMATE**

**Lavras – MG
2013**

JOÃO EDUARDO MELO DE ALMEIDA

**DETECÇÃO E TRANSMISSIBILIDADE DE VÍRUS EM SEMENTES DE
ABÓBORA, PIMENTÃO E TOMATE**

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

Orientadora

Profa. Dra. Antônia dos Reis Figueira

**LAVRAS – MG
2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Almeida, João Eduardo Melo de.

Detecção e transmissibilidade de vírus em sementes de abóbora,
pimentão e tomate / João Eduardo Melo de Almeida. – Lavras :
UFLA, 2013.

102 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Antonia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. Sementes - Patologia. 2. Vírus - Mecanismos de transmissão.
3. Vírus - Detecção. 4. Sementes - Patógenos virais. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.8

JOÃO EDUARDO MELO DE ALMEIDA

**DETECÇÃO E TRANSMISSIBILIDADE DE VÍRUS EM
SEMENTES DE ABÓBORA, PIMENTÃO E TOMATE**

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

APROVADA, em 18 de outubro de 2013.

Dr. José da Cruz Machado	UFLA
Dr. Ricardo Magela de Souza	UFLA
Dra. Sttela Dellyzete Veiga F. Da Rosa	Embrapa
Dra. Elaine Aparecida de Souza	UFLA

Dra. Antônia dos Reis Figueira
UFLA
(Orientadora)

**LAVRAS – MG
2013**

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

À minha família: Fábيا, minha esposa; meu filho, Vitor; filha, Lara, que está a caminho; meu pai, João Hugo; minha mãe, Maria; meus irmãos, Carlos, Guim, José, Carolina e Daniel; meus avós e avôs, meus sogros, meus cunhados e cunhadas, aos amigos Juninho e Daniele, enfim, a toda a minha família que, de certa forma, me auxiliou nessa etapa de minha vida.

OFEREÇO

Ao meu avô, Feliciano Resende de Melo (em memória) e Geracina dos Reis Melo, com quem tive muitos ensinamentos.

A meus pais; à minha esposa, Fábيا; aos meus filhos, Vitor e Lara, e meus irmãos, tios, avós e primos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar o Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À minha estimada orientadora, professora doutora Antonia dos Reis Figueira, pela qual tenho grande admiração, pois já são 9 anos 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 a realização deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Fitopatologia, pela amizade e ajuda no decorrer do curso.

Aos amigos da UFLA, Mauricio, Carzim, Luciana Godinho, André, Nara, Jéssica, Julinho e Irene, MUITO OBRIGADO A TODOS.

Aos meus pais, João Hugo e Maria, pelo apoio incondicional.

À minha esposa, Fábiana, 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 a realização deste trabalho.

RESUMO GERAL

As sementes são consideradas insumos primários em todo cultivo de interesse agrícola, o que torna a sua qualidade fisiológica e sanitária fator prioritário. Ao adquirir a semente, o agricultor deve ter sempre a garantia de que esta se encontra dentro dos padrões sanitários exigidos pelo Ministério da Agricultura. Para a diagnose de patógenos virais em sementes, até o momento, não existem metodologias estabelecidas e otimizadas nos laboratórios brasileiros. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de produzir, primeiramente, sementes de abóbora (*Curcubita pepo*) contaminadas naturalmente com *Squash mosaic virus* e de tomate (*Solanum lycopersicum*) e de pimentão (*Capsicum annum*) contaminadas natural e artificialmente com *Tomato mosaic virus* (ToMV) e *Pepper mild motle virus* (PMMoV), respectivamente. Após a obtenção das sementes, foram empregados os testes IC-RT-PCR, DAS-ELISA, RT-PCR e teste biológico, para avaliar sua eficiência e sensibilidade na diagnose desses vírus nas sementes. Foram também investigados o mecanismo de transmissão do SqMV da planta para semente e da semente para planta e a distribuição do SqMV-LC2 nas sementes e nos órgãos florais das plantas de abóbora. As técnicas DAS-ELISA e IC-RT-PCR foram capazes de identificar o SqMV em 100% das amostras de sementes não germinadas, enquanto o RT-PCR não foi capaz de detectá-lo em nenhuma semente. Após a germinação, o IC-RT-PCR detectou o SqMV em 15% e o DAS-ELISA, em 1,33% das folhas primárias analisadas individualmente. Em amostras compostas de folhas primárias de sementes germinadas, não foi possível a detecção do SqMV, nem pelo DAS-ELISA nem pelo IC-RT-PCR. A porcentagem de transmissão do SqMV por sementes de abóbora encontrada no teste biológico foi de 14%. No teste de sensibilidade, o IC-RT-PCR foi eficiente para detectar uma semente produzida pela planta de abóbora infectada com SqMV em uma amostra de 500 sementes. O DAS-ELISA foi eficiente para identificar o SqMV até a incidência de uma semente proveniente de planta infectada em uma amostra de 150 sementes. Assim sendo, a diagnose do SqMV pode ser realizada utilizando-se os cotilédones das sementes, aplicando-se tanto o ELISA quanto IC-RT-PCR. Nos estudos visando determinar os mecanismos de transmissão do SqMV da planta para semente, foi verificado que o SqMV pode infectar as sementes de abóbora de forma direta e/ou indireta. O SqMV foi identificado em todos os tecidos florais das plantas e das sementes. Considerando-se que o vetor *Diabrotica speciosa* pode se alimentar nas sementes, os cotilédones infectados com SqMV

podem servir como fonte de inóculo no campo, sugerindo que somente a presença do SqMV nesse tecido é suficiente para iniciar o processo de disseminação do vírus na cultura. A produção de sementes de tomate com ToMV e pimentão com PMMoV foi eficiente tanto pelo método natural quanto artificial, tendo sido confirmado por DAS-ELISA. Para ambos os vírus, o DAS-ELISA e IC-RT-PCR foram capazes de identificar uma semente contaminada em um lote de 1.000 sementes (combinadas em 30 subamostras), entretanto, o RT-PCR não foi capaz de detectá-los. No teste de sensibilidade verificou-se que o DAS-ELISA foi capaz de detectar 1 semente de tomate contaminada com ToMV em uma amostra com 200 sementes e 1 semente pimentão contaminada com o PMMoV em uma amostra com 150 sementes. Pelo IC-RT-PCR, foi possível a detecção do ToMV até a proporção de 1 semente contaminada em 400 sementes de tomate e a detecção do PMMoV até a proporção de uma semente contaminada em 300 sementes de pimentão. No teste biológico, não foi possível observar o aparecimento de sintomas que indicassem a infecção das plântulas por ToMV e PMMoV, quando se empregaram amostras com 0,1% de sementes contaminadas. Esses resultados demonstraram que o DAS-ELISA e o IC-RT-PCR são as técnicas mais recomendadas para diagnose do ToMV e do PMMOV em sementes de tomate e de pimentão.

Palavras Chave: patologia de semente, vírus detecção, mecanismos de transmissão

ABSTRACT

Seeds are the primary inputs for crop production, which makes their physiological and phytosanitary qualities a high priority issue. When purchasing seeds, the farmer must always have a guarantee that they have the health standards required by the Ministry of Agriculture. Brazilian official laboratories have no longer established and optimized methodologies for diagnosis of viral pathogens in seeds. This study aimed firstly to produce pumpkin (*Curcubita pepo*) naturally infected with *Squash mosaic virus* (SqMV) and tomato (*Solanum lycopersicum*) and pepper (*Capsicum annum*) naturally and artificially contaminated with *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Pepper mild virus motlevirus* (PMMoV), respectively. After obtaining the seeds, were used the IC-RT-PCR, DAS-ELISA, RT-PCR and biological tests to investigate their efficiency and sensitivity for the diagnosis of these viruses in seeds. It were also investigated the mechanisms of SqMV transmission from plants to seed and from seeds to seedlings, and the distribution of SqMV-LC2 isolate in seeds and floral organs in the squash plants. The techniques DAS-ELISA and IC-RT-PCR were able to identify the SqMV in 100% of squash seeds, produced by SqMV infected plants, without germinating, while the RT-PCR failed to detect it in any seed. After germination, the IC-RT-PCR detected SqMV in 15% and DAS-ELISA in 1.33% of the primary leaves, when they were analyzed individually. Otherwise, in composite samples of primary leaves seeds was not possible to detect the SqMV neither by DAS-ELISA nor by IC-RT-PCR. The percentage of SqMV transmission by squash seeds found in biological tests was 14%. In the sensitivity test the IC-RT-PCR was efficient to detect one seed produced by the SqMV infected squash plant in a sample of 500 seeds. The DAS-ELISA was effective for identifying the SqMV up to one seed produced by infected plants in a sample of 150 seeds. Thus, the diagnosis of SqMV can be performed using the cotyledons of the seed, applying as both the ELISA IC-RT-PCR. In studies to determine the mechanisms of transmission SqMV from plant to seeds, it was verified that the SqMV can infect pumpkin seeds directly and/or indirectly. The SqMV was identified in all tissues of plants and flower seeds. Considering that the vector *Diabrotica speciosa* can feed the seeds, cotyledons infected with SqMV can serve as a source of inoculum in the field, suggesting that the presence of only one SqMV infected seed is sufficient to initiate the spread of the virus in the culture. Seed production of tomato and peppers with ToMV and PMMoV was efficient using both natural and artificial methods,

which was confirmed by DAS- ELISA. For both viruses, the DAS- ELISA and IC- RT - PCR were able to identify one seed in a contaminated batch of 1000 seeds (combined into 30 sub - samples), however the RT - PCR was unable to detect any of them. In the test sensitivity was found that DAS- ELISA was able to detect one tomato seed contaminated with ToMV in a sample of 200 seeds, and one pepper seed contaminated with PMMoV in a sample of 150 seeds. By IC- RT - PCR , it was possible to detect the ToMV to the proportion of one tomato contaminated seed in 400, and the detection of PMMoV to the proportion of one pepper contaminated seed in 300. In biological tests it was not possible to observe the appearance of symptoms that would indicate infection of the seedling, when employed seeds samples were contaminated with 0.1% of ToMV and PMMoV. These results demonstrated that the DAS- ELISA and IC- RT - PCR techniques are most recommended for diagnosis of the ToMV and PMMoV in seeds of tomato and pepper.

keywords: seed pathology, virus detection, transmission mechanisms

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	12
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 <i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV) e <i>Pepper mild mottle virus</i> (PMMoV).....	14
2.2 <i>Squash mosaic virus</i>	15
2.3 Transmissão de vírus por semente.....	16
2.3.1 Fatores que influenciam a transmissão do vírus da planta a semente	20
2.3.2 Mecanismo de infecção do vírus da planta para semente.....	23
2.4 Técnicas utilizadas para detecção de vírus em semente.....	27
2.5 Métodos recomendados para detecção de vírus em sementes.....	31
REFERÊNCIAS.....	32
SEGUNDA PARTE – ARTIGO CIENTIFICOS	37
ARTIGO 1: Detecção do <i>Squash mosaic virus</i> (SqMV) e estudo da sua transmissibilidade em sementes de Abóbora cv. Caserta.....	38
ARTIGO 2: Detecção do <i>Tomato mosaic virus</i> e <i>Pepper mild mottle virus</i> em sementes de tomate e pimentão, por IC-RT-PCR e DAS-ELISA.....	74

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção de hortaliças no Brasil tem se destacado como uma atividade de importância econômica, pois, além de gerar empregos no campo, pode gerar um rendimento por hectare que varia entre US\$ 2 mil a US\$ 25 mil (FAULIN; AZEVEDO, 2003).

Os principais problemas enfrentados pela horticultura estão relacionados à alta perecibilidade dos produtos, fazendo com que o tempo entre a colheita e a entrega seja pequeno. Fatores relacionados ao clima, como, por exemplo, o excesso de chuvas e as temperaturas, dentre outros, podem afetar negativamente a produtividade das hortaliças (FIGUEIRA, 2000).

Em plantas de tomate, pimentão e curcubitáceas, as doenças causadas por fitovírus são consideradas os principais problemas fitossanitários em todo o Brasil. Dentre as viroses, destacam-se as tobamoviroses do gênero *Tobamovirus*, as tospoviroses causadas por espécies virais do gênero *Tospovirus* e as geminiviroses causadas por vírus do grupo Geminivírus (EIRAS, 2004).

De modo geral, as fitoviroses não apresentam controle curativo e, dessa forma, as medidas preventivas são as mais indicadas no manejo. Dentre as medidas preventivas, a utilização de sementes com elevado padrão de sanidade é uma das principais medidas de controle de doenças. A utilização de sementes com baixo padrão sanitário pode causar sérios impactos epidemiológicos na ocorrência de uma doença virótica, uma vez que se terá uma fonte de inóculo presente na lavoura desde o início do ciclo da cultura (KRAUSE-SAKATE et al., 2002).

A transmissão de vírus por semente foi descrita, pela primeira vez, em tomate infectado com *Tobacco mosaic virus* (TMV), em 1910, por Westerdijk (BOS, 1977). Cerca de 20% das espécies virais descritas são

transmitidos por sementes, podendo a taxa de transmissão variar entre 0% e 100%. As partículas virais podem estar localizadas dentro do embrião ou permanecer como contaminantes sobre o tegumento das semente (ALBRECHTSEN, 2006).

A diagnose de patógenos virais em sementes não é considerada uma tarefa simples. Além de selecionar a técnica a ser empregada para a diagnose de vírus em semente, é necessário conhecer o mecanismo de transmissão do patógeno viral da planta para a semente e entender o local de acúmulo e a localização do vírus nas sementes. Todos esses fatores devem ser conhecidos para que o diagnóstico seja preciso, evitando-se, assim, o risco de se descartar sementes sadias e ou infectadas (FIGUEIRA, 2000).

Com a abertura do comércio internacional, a importação e a exportação de sementes foram bastante intensificadas. Nesse processo, o risco de trânsito de pragas e patógenos considerados quarentenários e não quarentenários, entre as nações, aumentou consideravelmente, exigindo que as barreiras fitossanitárias de controle da entrada e de saída de materiais vegetais também fossem intensificadas. Para isso, além de se evitar a introdução de pragas quarentenárias no Brasil, torna-se necessário o estabelecimento de índices de pragas não quarentenárias regulamentadas. Por outro lado, o material exportado deve merecer igual atenção, para que nenhum material seja rejeitado por não se enquadrar dentro dos índices de doenças e pragas exigidos pelo país importador.

Esse trabalho foi realizado visando testar métodos de diagnose e investigar mecanismos de transmissão de vírus pelas sementes, com a finalidade de oferecer subsídios para o sistema de defesa fitossanitária do país. Além de se estudar o mecanismo de transmissão do SqMZ por sementes de abóbora, foram testadas diversas metodologias para a sua detecção em sementes de abóbora e de *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) e *Tomato mosaic virus* (ToMV) em sementes de pimentão e de tomate, investigando a sua eficiência e a adequação para cada material analisado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Tomato mosaic virus* (ToMV) e *Pepper mild mottle virus* (PMMoV)

O ToMV e o PMMoV são espécies pertencentes ao gênero *Tobamovirus*, que são vírus de distribuição mundial e podem ocorrer em variados ambientes, sejam eles de clima temperado ou tropical (CHEN et al., 2013). O gênero tem cerca de 17 espécies, divididas em três subgrupos, de acordo com o número de nucleotídeos presente entre as ORFs, análise filogenética e hospedeira. O primeiro subgrupo é constituído pelos 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 é formado por vírus que infectam as crucíferas e o 3, por vírus que infectam as cucurbitáceas, tendo como membro-tipo o TMV: o *Turnip vein-clearing virus* (TVCV) e o *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) (GÜLSER; KUTLUK; CANDEMIR, 2008). O genoma viral dos *Tobamovirus* estão codificados em cinco ORF, sendo: ORF 1 - proteína responsável pela replicação da partícula viral; ORF 2 - proteína RNA polimerase; ORF 3 - proteína de movimento; ORF 4 - proteína da capa proteica e ORF 5 - proteína de origem desconhecida.

No estado de São Paulo, até o presente momento, somente há relatos da presença de isolados que pertencem ao subgrupo 1 (CESAR et al., 2009). Os vírus desse grupo, em sua maioria, são transmitidos por meio 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; GUNN; KESKULA, 1996). Outra forma eficiente de transmissão ocorre por meio das sementes, em

que as partículas virais contaminam os seus tegumentos (GÜLSER; KUTLUK; CANDEMIR, 2008).

O ToMV tem partícula que mede 300 nm de comprimento por 18 nm 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 (BHAT et al., 2013).

Outro vírus de grande importância para as solanáceas é o PMMoV, que tem partícula com 312 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 et al., 2009), nas quais os sintomas mais comuns são amarelecimento suave das folhas, deformações dos frutos e subdesenvolvimento das plantas.

2.2 Squash mosaic virus (SqMV)

O vírus do mosaico da abóbora SqMV ocorre praticamente no mundo todo, entretanto, no Brasil, está mais restrito ao Distrito Federal e às regiões norte e nordeste, sendo os estados do Ceará e do Rio Grande do Norte os que têm maiores incidência do patógeno (ALENCAR et al., 2012). O SqMV pertence à família *Secoviridae*, ao gênero *Comovirus* e tem, como ácido nucleico, RNA de fita simples positivo, além de genoma subdividido, com 28 a 30 nm de diâmetro. O RNA 1 tem entre 6 a 8 mil nt e o RNA 2, entre 4 a 7 mil nt. O RNA 1 codifica para proteína helicase, protease, VPG, RNA polimerase e uma proteína de 32 kDA com origem desconhecida. No RNA 2 são codificadas duas proteínas da capa proteica e uma proteína de movimento.

O SQMV tem como vetores, na natureza, os insetos mastigadores, dentre eles os besouros *Diabrotica speciosa*, *D. bivitula* (*Coleoptera, Cicadelide*), *Epilachna cacica* (*Coleoptera, Coccinelide*)

(COHEN; NITZANY, 1963) e, em alguns casos, os gafanhotos. Pode também ser transmitido por meio de sementes, inoculação mecânica e por contato entre as plantas. O SqMV pode infectar diversas espécies na família das curcubitáceas, dentre as quais destacam-se o melão, (*Cucumis melo*), o maxixe (*Cucumis anguria*), a melancia (*Citrullus lanatus*), a abobrinha (*Cucurbita pepo* var. caserta) e a bucha (*Luffa cylindrica*). Os sintomas são variáveis e dependem da combinação da virulência do isolado/estirpe, cultivar/espécie, da idade em que a planta foi infectada e de condições ambientais, como a temperatura. Os sintomas nas folhas podem variar desde um mosaico fraco a severo, manchas anelares, embolhamento, deformação foliar, nanismo e, até mesmo, matar a planta. As plantas infectadas podem apresentar florescimento precoce, redução do tamanho e do peso, além da baixa produtividade. As medidas de controle devem ser aquelas que minimizem ao máximo a entrada do vírus na lavoura, sendo mais importante utilizar sementes livres do vírus, aplicar inseticidas para controle do vetor, eliminar possíveis plantas que estejam apresentando o sintoma e utilizar cultivares resistentes (ALENCAR et al., 2012).

2.3 Transmissão de vírus por sementes

Apesar de infectarem sistemicamente a planta, a transmissão de vírus da planta infectada para as sementes e destas para as novas plântulas delas originadas é considerada mais uma exceção que uma regra, pois apenas cerca de 20% das espécies de fitovírus podem ser transmitidos por meio das sementes.

Geralmente, apenas as espécies capazes de infectar o embrião da semente são transmissíveis para a próxima geração (SASTRY, 2013). Diversos vírus são capazes de infectar o embrião ou tecidos que compõem a semente, como endosperma e tegumento, dentre outros. Esse mecanismo pode ocorrer num elevado número de vírus, distribuídos em diferentes famílias e gêneros, dentre os quais se incluem as espécies *Peanut mottle*

virus (PMV), *Alfafa mosaic virus* (AMV), *Soybean mosaic virus* (SMV), *Barley stripe mosaic virus* (BSMV), *Bean common mosaic virus* (BCMV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRV), *Tobacco streak virus* (TSV), *Pea seedborn mosaic virus* (PSbMV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Letucce mosaic virus* (LMV) e muitos outros.

O PSbMV pode infectar todos os tecidos da semente de ervilha, incluindo eixo embrionário, cotilédones e testa, entretanto, somente as sementes com as folhas primárias do eixo embrionário infectados é que darão origem a uma planta infectada. Em plantas de alface, as partículas de LMV foram encontradas em 20% dos óvulos, antes da fertilização, mas, após a fecundação, apenas 13% das sementes ficaram com embrião infectado (BESERRA JÚNIOR, 2008).

Domier et al. (2007) estudaram a transmissão do *Soybean mosaic virus* (SMV) da planta para as sementes de diferentes cultivares de soja suscetíveis, porém, em muitas delas, isso não ocorreu. Quando os embriões imaturos foram analisados, entre 58% e 94% das sementes estavam infectadas, entretanto, após a maturação das sementes, as porcentagens de embriões infectados foram de apenas 0,8% e 66%, respectivamente. Segundo os autores, durante o processo de desenvolvimento e maturação das sementes, deve ter ocorrido uma progressiva redução no acúmulo de partículas virais, levando à ausência de sementes infectadas. As possíveis causas dessa redução poderiam estar ligadas aos processos fisiológicos que ocorrem nas sementes durante a maturação, como a realocação de nutrientes, o cessar da atividade celular e o aumento dos níveis de inibidores, como fenóis e quinonas. Esses resultados demonstraram que a presença do vírus no embrião não garante a sua transmissão, podendo as partículas virais serem inativadas durante o processo de maturação.

Em pimentão (*Capsicum annum*), o CMV foi encontrado em 59,5% dos tegumentos e em 30% dos embriões testados (ALI; ROOSSINCK, 2010). Já no caso do SqMV, diversos estudos realizados por Alvarez e Campbell (1978), com vários tecidos de sementes de abóbora,

separadamente, como cotilédones, camada de reserva (perisperma e endosperma) e tegumento, demonstraram que o vírus estava presente em todos os tecidos testados. Entretanto, não houve correlação entre a infecção de um tecido e outro, ou seja, uma semente com cotilédone infectado não necessariamente apresentou o tegumento ou a camada de reserva infectada.

Nolan e Campbell (1984) empregaram a técnica sorológica ELISA para a detecção do SqMV em sementes de abóbora e a investigação da sua interação com os embriões. Para investigar a relação entre a presença desse vírus no embrião e a sua transmissibilidade, eles segmentaram o embrião em duas partes, uma para utilizar como antígeno e outra para o plantio e a obtenção da plântula. Eles observaram que a transmissão do SqMV pelas sementes variou de 0,4% a 12,1%, de acordo com a cultivar de abóbora e que o vírus estava presente nos diversos tecidos das sementes. Entretanto, mesmo quando o vírus estava presente nos tecidos do embrião de algumas sementes, nem sempre as plântulas delas originadas se tornaram infectadas. Observaram, ainda, que nenhuma das sementes que não tinham o vírus presente em seus embriões deu origem a plantas positivas. Estes autores levantaram a hipótese de que, apesar de se ter conhecimento de que o nível de transmissão embriônica em um lote de sementes diminui com o tempo, provavelmente, o antígeno detectável por ELISA permanece. E, ainda, que haveria a possibilidade de o SqMV se concentrar em partes localizadas do embrião, não se translocando de modo sistêmico em seus tecidos.

Apesar das evidências de que, para serem transmitidos, os vírus devem contaminar os tecidos internos das sementes, preferencialmente o embrião, uma exceção ocorre com as espécies do gênero *Tobamovirus*. Eles não têm a capacidade de infectar o embrião ou o endosperma das sementes, de modo que permanecem apenas aderidos ao tegumento (CEZAR et al., 2009). Dentre os membros deste gênero, o TMV e o ToMV podem infectar plantas de diferentes espécies da família *Solanaceae*, destacando-se o tomate (*Lycopersicon sculentum*) 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, denominado por sarcotesta. A porcentagem de sementes contaminadas varia com a severidade da doença no fruto, mas elas já foram encontradas até 94% de sementes contendo o vírus (BROADBENT, 1965). As plantas de pimenta (*Capsicum bacatum*) e pimentão (*Capsicum annum*) podem ser severamente contaminadas pelos vírus que infectam o tomate e pelo PMMoV, no qual as partículas virais permanecem aderidas ao tegumento da semente. A taxa de sementes contaminadas pode chegar a 22%, para *C. frutescense* e em torno de 29% para a espécie *C. annum* (TOSIC et al., 1980).

Uma exceção dentro do grupo dos Tobamovírus é o *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) que, além de permanecer como contaminante, pode infectar o embrião das sementes. O CGMMV está amplamente disseminado na Europa e na Ásia, entretanto, para o Brasil, é considerado um vírus quarentenário (KÖKLÜ; YILMAZ, 2006). Em pepino (*Cucumis sativum*), a transmissão por CGMMV pode chegar a até 8%, entretanto, quando as sementes são armazenadas em câmara fria, a porcentagem de sementes infectadas cai drasticamente para valores que podem chegar a 1%. Em melancia, a taxa de transmissão encontrada pode chegar a 5%, dependendo da cultivar e de outros fatores já citados anteriormente (BROADBENT, 1965; KÖKLÜ; YILMAZ, 2006).

A transmissão do ToMV, TMV e PMMoV da semente para a plântula ocorre por meio 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 a 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).

Outro vírus que também pode ser transmitido como os tobamovírus é o *Pepino mosaic virus* (PepMV), considerado de grande importância econômica para a cultura do tomate, principalmente na Europa. Em testes

realizados por Hanssen e Thomma (2010) foi encontrada uma taxa de transmissão de 0,026% do vírus, quando analisaram 87.000 sementes. Resultados semelhantes foram encontrados por Cordoba-Selles et al. (2007), que também relataram taxa de transmissão de 1,84%. Entretanto, as investigações sobre o mecanismo de transmissão do PepMV, por sementes de tomate, revelaram que esse vírus não estava presente nos tecidos internos das sementes (LING, 2008). Assim sendo, a possível explicação para o mecanismo de transmissão do PePMV por sementes de tomate poderia ser a de que ele seria semelhante ao dos tobamovírus, que contaminam apenas o tegumento das sementes.

2.3.1 Fatores que influenciam a transmissão do vírus da planta a semente

A transmissão do vírus da planta para a semente depende de alguns fatores que podem estar relacionados, principalmente, à espécie viral e à planta hospedeira (ALBRECHTSEN, 2006).

O *Pea early-browning virus* (PEBV) é um patógeno que pode ser transmitido por semente de ervilha, tem um genoma bipartido e pertence ao gênero *Tobravirus*. Wang, Macfarlane e Maule (1997) utilizaram diversos mutantes do PEBV e verificaram que o RNA 1 é a principal parte do ácido nucleico responsável pela transmissão do vírus da planta para a semente. Os mutantes que foram construídos sem a presença do gene 12-kDa do RNA1, quando inoculado em plantas de ervilha, apareceram em baixa concentração apenas no carpelo e no estigma das flores masculinas e não no grão de pólen. Esse estudo indicou que a proteína 12 k esta envolvida com a transmissão do PEBV da planta para os tecidos das sementes e que, provavelmente, essa proteína está envolvida no processo de infecção das células gaméticas.

Johansen, Edwards e Hampton (1994) demonstraram, em seu trabalho, que existem regiões no genoma do PSbMV, como os genes HC-Pro e da capa proteica (CP), que são fatores determinantes para a transmissão do

vírus da planta para a semente. A proteína HC-Pro é importante para o movimento do vírus a longa distância e está envolvido com o mecanismo de transmissão do vírus pelo pulgão. No genoma do *Barley streak mosaic virus* (BSMV) existe um gene que codifica uma proteína, denominada γb , que parece estar envolvida no processo de transmissão do BSMV da planta para a semente, semelhante ao que ocorre com HC-Pro. Estudos recentes com o SMV em plantas de soja comprovaram que os genes HC-PRO, CP e P1 estão envolvidos com a transmissão desse patógeno via semente de soja.

O SMV pode induzir sintomas variados, dependendo do isolado viral e da cultivar de soja. Com base apenas na sintomatologia desse isolados, em diferentes cultivares de soja, os isolados de SMV foram divididos em sete subgrupos, denominados de G1 a G7. Além da variabilidade de sintomas apresentados pelas cultivares, muitas delas não transmitem o vírus pelas sementes (BOWERS; GODMAN, 1979) e, quando transmitem, a taxa observada pode chegar a 43% (DOMIER et al., 2007). Domier et al. (2007) verificaram, em plantas de soja, que a transmissão do SMV da planta para semente está diretamente relacionada com a expressão de algumas regiões cromossômicas da planta, denominadas C1 e C2.

A taxa de transmissão do LMV pode variar de 1,9% a 17%, dependendo da combinação entre isolados do LMV e da cultivar. Existem dois grupos de isolados de LMV que podem infectar plantas de alface, e que são filogeneticamente distintos, e apenas um grupo é capaz de infectar sementes. O grupo transmitido por sementes pode ser dividido em duas estirpes, “Commom” 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 taxa de transmissão de 16,5% (JADÃO et al., 2002). A estirpe “Commom” não tem capacidade de infectar plantas de alface que têm os alelos mol^1 e mol^2 , entretanto, pode infectar outras cultivares e pode ocorrer infecção das sementes. Em estudos realizados por Krause-Sakate et al.

(2002) foi demonstrada a capacidade de um isolado espanhol, denominado LMV-E não pertencente à estirpe “most”, de infectar plantas de alface com os alelos recessivos mol^1 e mol^2 , porém, 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 tem o alelo recessivo mol^2 , tendo sido verificado que apenas o isolado AF199 foi capaz de 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 está totalmente relacionada à capacidade do vírus de movimentar-se dos tecidos vegetativos para os tecidos do óvulo e não a mecanismos relacionados com a planta.

Outro exemplo de variabilidade entre espécie viral e cultivar foi relatado por Morales e Castaño (1987), que estudaram o efeito de cinco estirpes do BCMV (US 1, US 5, US 2, NL 3, NL 4) em 14 cultivares diferentes de feijão. Eles observaram que a cultivar Dubbele Witte foi suscetível a essas cinco estirpes e a taxa de transmissão foi de 14,6, para a US1; 5,2, para US2; 19,7, para a US5; 19,3, para NL3 e 13,2, para NL 4. As cultivares Monroe e Red Mexican 35 foram inoculadas com todas as cinco estirpes e somente foram suscetíveis à estirpe NL 4, tendo sido verificadas taxas de transmissão de 52,2%, para ‘Monroe’ e 51,9%, para ‘Red Mexican 35’. Por outro lado, a cultivar Imuna foi infectada por quatro das cinco estirpes de BCMV, entretanto, não foi verificada transmissão dessas estirpes para a semente. A cultivar Great Northen 31 foi suscetível apenas à estirpe NL4, entretanto, não foi observada transmissão dessa estirpe para as sementes.

A transmissão de um mesma espécie viral em diferentes hospedeiras tem sido relatada por vários autores. Jones (2013) verificou que a taxa de transmissão do *Alfafa mosaic virus* (AMV), por exemplo, foi de 10% por sementes de *Melilotus indica*, de 2% por sementes de *Stachys arvensis* e de 0,1% por sementes de *Ornithopus compressus*, mostrando claramente a influência da planta hospedeira no processo de transmissão. Da mesma

forma, a taxa de transmissão do BSMV pelas sementes variou de 0% a 75%, quando foram testadas diferentes cultivares de cevada e a do CMV variou de 1% a 50% em vinte diferentes espécies de hospedeiras (BRITO et al., 2012).

Outro importante fator que influencia a transmissibilidade dos vírus pelas sementes é a fase do ciclo de vida em que a planta é infectada. Quanto mais jovens as plantas forem infectadas, maiores serão as percentagens de sementes com embrião infectado (MORALES; CASTAÑO, 1987).

Morales e Castaño (1987) inocularam mecanicamente o BCMV em 14 cultivares de feijão (*P. vulgaris*), em três diferentes épocas: aos 10, aos 20 e aos 30 dias após a emergência. Na cultivar Dubble Whitte foi verificada uma taxa de 41,8% de transmissão de vírus pelas sementes para as plantas inoculadas aos 10 dias, de 2,8% para as inoculadas aos 20 dias e de 0,1% para as inoculadas aos 30 dias após a emergência. Nesse mesmo experimento, a cultivar Puregold Wax apresentou taxas de transmissão de 17,4%, 11,2% e 3,1%, quando as inoculações foram feitas aos 10, 20 e 30 dias, respectivamente. Em plantas da cultivar Monroe inoculadas com BCMV, aos 10 dias após a emergência, a taxa de transmissão foi de 42,2%, entretanto, quando as plantas foram inoculadas aos 20 e aos 30 dias após a emergência, não foi verificada transmissão do BCMV para as semente.

2.3.2 Mecanismo de infecção do vírus da planta para semente

O embrião pode ser infectado por meio de dois mecanismos. No primeiro deles, o vírus se movimenta dos tecidos vegetativos da planta para o embrião já formado, ou seja, logo após a fertilização e é denominada de infecção direta. No segundo mecanismo, a transmissibilidade ocorre antes da fertilização, ou seja, o vírus é capaz de infectar os gametas masculinos e femininos, sendo, portanto, denominada como infecção indireta (JOHANSEN; EDWARDS; HAMPTON, 1994).

Um dos exemplos de infecção direta do embrião ocorre com o PSbMV em plantas de ervilha (*Pisum sativum*). Nas investigações realizadas foram encontradas partículas virais em tecidos florais (sépalas, pétalas, anteras e carpelos) de duas cultivares de ervilha, antes da fertilização. Entretanto, as partículas virais não foram encontradas nos grãos de pólen e nem nos óvulos (WANG; MAULE, 1992). Apesar de as partículas virais do PSbMV não terem sido encontradas no grão de pólen e no óvulo, logo após a fertilização, mesmo com embrião imaturo, foi verificada a presença do vírus, indicando que o mecanismo de transmissão do PSbMV da planta para semente ocorre diretamente.

Tentando explicar a transmissão do PSbMV por sementes de ervilha, Maule e Wang (1992) demonstraram que o movimento do vírus se inicia nos órgãos vegetativos e se estendem até os tecidos formadores das sementes de ervilha, denominado suspensor. Esse tecido é formado logo após a fertilização e liga a progênie ao embrião, tendo como função carrear nutrientes durante as fases de desenvolvimento do embrião. Existem plasmodesmas entre as células do suspensor e as do embrião, mas não entre o suspensor e as células da testa da semente de ervilha, o que faz com que esses tecidos não tenham conexão entre si. Com o processo de maturação da semente e, conseqüentemente, do embrião, o suspensor é degradado e o carregamento de nutrientes é cessado. Certamente, seria esta uma das causas da baixa taxa de transmissão do vírus para a semente.

Uma segunda explicação ou uma segunda hipótese para explicar a transmissibilidade do PSbMV da planta para a semente de ervilha foi descrita por Roberts et al. (2003). Estes autores postularam que as partículas virais alcançariam o embrião por meio 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. Entretanto, não se tem conhecimento da existência de plasmodesmas entre esses tecidos. Apesar de se conhecer a rota de transmissão do PSbMV, não se sabe, ainda, quais são

os motivos da baixa taxa de transmissão do vírus que pode ocorrer em alguns casos, podendo essa transmissão chegar a 100%.

Wang e Maule (1992) verificaram, em algumas cultivares de ervilha suscetíveis ao PSbMV, a não transmissibilidade do vírus para a 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.

A infecção indireta ocorre por meio 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 do grão de pólen e/ou óvulo, antes da fertilização. Segundo Mink (1993), cerca de 34 espécies de vírus, distribuídos nos gêneros Alphacryptovírus, Ilarvírus, Nepovírus ou Potyvírus e cinco viroides, são transmitidas através do grão de pólen.

A infecção do grão de pólen ocorre no processo de microsporogênese, que é o processo de formação do gameta masculino. Entre as células que compõem o grão de pólen existem os plasmodesmas, por meio dos quais ocorrem troca de materiais entre células e a movimentação das partículas e/ou do ácido nucleico viral de uma célula para outra. Durante o processo de maturação do grão de pólen, esses plasmodesmas são degradados e, com isso, é cessada a movimentação do vírus.

Durante o processo de maturação do grão de pólen, pode também ocorrer a formação de calos protetores denominados de intina e exina, que também podem impedir o movimento do vírus da planta às células do grão de pólen (JOHANSEN; EDWARDS; HAMPTON, 1994). Em plantas de alface foram encontradas partículas de LMV em anteras do grão de pólen, precisamente em células das camadas interna dos tecidos, denominadas células do tapete, e em células externas, denominadas de endotécias (RYDER, 1964). Em plantas de tomate foram encontradas partículas de TRSV em células pré-meióticas do grão de pólen e, em plantas de alfafa, as partículas do AMV foram observadas no citoplasma das células do grão de

pólen (JOHANSEN; EDWARDS; HAMPTON, 1994).

No caso do SqMV, foi observado que as partículas virais estavam presentes nas camadas externas do grão de pólen como contaminantes, não aparecendo nas células do grão de pólen (ALVAREZ; CAMPBELL, 1978; NOLAN; CAMPBELL, 1984). Esses mesmos autores fizeram teste de polinização cruzada entre plantas doadoras de pólen infectado e sadio e plantas receptoras sadias e infectadas. Quando as plantas sadias foram polinizadas com grão de pólen infectado, não ocorreu infecção das sementes. Somente foram obtidas sementes com embrião infectado quando as plantas receptoras do grão de pólen estavam infectadas.

Dois mecanismos de infecção via grão de pólen têm sido descritos (MINK, 1993). O primeiro tipo, denominado de transmissão “horizontal”, é aquele no qual 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 também para o viroide *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), em plantas de batata.

O segundo tipo, denominado de transmissão vertical, ocorre quando o grão de pólen infectado tem a capacidade de infectar apenas a semente, mas a planta permanece sadia. Assis Filho e Sherwood (2000) demonstraram, em experimentos com plantas de *Arabidopsis thaliana* vs. *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV), o processo de transmissão vertical. Nesse experimento, os autores realizaram cruzamento entre plantas doadoras de pólen infectadas e sadias, 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. Chung et al. (2008) estudaram o *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), em sementes de crisântemo e verificaram que a taxa de transmissão variou entre 1,5% a 96%. Plantas infectadas e polinizadas com grão de pólen infectado produziram sementes que apresentaram taxa de transmissão de 96%. Quando plantas sadias foram polinizadas com pólen infectado, foi verificada taxa de

transmissão de 6,7% e as plantas permaneceram sadias, comprovando, assim, a transmissão vertical. Os mesmos autores verificaram, ainda, que as plantas inoculadas e mantidas à temperatura de 20 °C produziram sementes que apresentaram taxa de transmissão de 6,9%, entretanto, quando as plantas foram mantidas à temperatura média de 30 °C, a taxa de transmissão foi de 1,5%.

Esse mecanismo de transmissão foi também determinado para o *Pelargonium zonate spot virus* (PZSV) em plantas de tomate. Plantas de tomate sadias polinizadas com pólen infectado produziram sementes com 29% de infecção. As plantas receptoras do grão de pólen permaneceram sadias, mostrando que o mecanismo de transmissão foi do tipo vertical (LAPIDOT et al., 2010).

No processo de infecção do tecido reprodutor feminino, as partículas virais podem ser encontradas no saco embrionário, no nucelo e, até mesmo, no óvulo. Schippers (1963) coletou óvulos antes da polinização e verificou que 80% estavam infectados com BCMV, entretanto, após ocorrer a maturação do embrião, apenas 15% das sementes coletadas estavam infectadas. De modo semelhante, Beserra Júnior (2008) coletou óvulos de plantas de alface infectadas com LMV e observou que 20% dos óvulos estavam infectados pelo vírus. Logo após a fecundação, embriões foram coletados e a porcentagem de infecção foi de 13%.

2.4 Técnicas utilizadas para detecção de vírus nas sementes

Os métodos para diagnose de vírus em sementes, por muitos anos, foram baseados em inoculações mecânicas dos extratos de tecidos da semente em plantas indicadoras, para observação visual dos sintomas característico do vírus. Essa técnica, além de morosa, é considerada pouco eficiente. Isso porque a concentração de alguns patógenos virais nas sementes, geralmente, é baixa, de modo que as plantas indicadoras inoculadas com extrato dessas sementes podem não apresentar sintomas.

Aliada ao tempo necessário para a visualização dos resultados, que pode ser de 15 a 30 dias, dependendo da espécie viral, essa técnica não é muito indicada (SASTRY, 2013). As técnicas sorológicas, como difusão dupla em ágar, também apresentam baixa sensibilidade, além de serem pouco práticas para a condução de um grande volume de amostra.

Clark e Adams (1977) desenvolveram o teste sorológico denominado *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), fazendo a conjugação de uma enzima ao anticorpo específico (SASTRY, 2013). O ELISA é considerada uma das técnicas mais utilizadas e aplicadas na detecção de vírus de plantas, pois apresenta simplicidade, adaptabilidade, rapidez e sensibilidade, podendo ser utilizado em grande escala para diagnose de um grande número de amostras ao mesmo tempo (FIGUEIRA, 2000; SASTRY, 2013). Devido à sensibilidade desse método na diagnose e na quantificação de antígenos específicos, esta técnica foi muito utilizada para diagnosticar vírus em humanos e animais (VOLLER et al., 1974). Na virologia vegetal, a introdução da técnica ELISA se deu com o trabalho pioneiro de Voller et al. (1974), seguido pelos estudos descritos por Clark e Adams (1977).

Basicamente, o teste ELISA pode ser classificado em direto e indireto. O primeiro foi descrito por Clark e Adams (1977), denominado DAS-ELISA (*Double antibody sandwich – Enzyme linked immunosorbent assay*), no qual se utilizam a IgG (imunoglobina G) simples e a IgG conjugada, ambas para o antígeno viral. A conjugação do anticorpo com a enzima tornou possível o desenvolvimento de uma coloração nas reações positivas, resultante da reação da enzima com o seu substrato, cuja intensidade pode ser medida em um espectrofotômetro, com filtros adequados para o comprimento de onda desejado (CLARK; ADAMS, 1977). Várias enzimas podem ser usadas na conjugação com o anticorpo, entretanto, a fosfatase alcalina e a peroxidase têm sido as mais empregadas (CLARK; BAR-JOSEPH, 1984).

A limitação dos testes sorológicos está na disponibilidade de antissoros produzidos 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 contém o vírus. O extrato vegetal pode conter substâncias que interferem nos resultados, podendo originar falsos positivos, com tecidos sadios. A técnica de ELISA não é suficientemente sensível na diagnose de alguns vírus, como, 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 viroides, que não possuem capa proteica, não podem ser detectados sorologicamente (LIMA et al., 2009).

De modo geral, as técnicas moleculares são mais sensíveis, quando comparadas com as técnicas sorológicas. Dentre as técnicas moleculares utilizadas em estudos de viroses, as mais empregadas são as de hibridização dos ácidos nucleicos e *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR). A alta sensibilidade, aliada à especificidade e à rapidez, coloca a RT-PCR como uma técnica muito valiosa, que vem auxiliando os pesquisadores de diversas áreas nos estudos e na diagnose de vírus em plantas. Nas diferentes áreas da virologia vegetal, o RT-PCR é uma ferramenta indispensável, seja na pesquisa como nos laboratórios de diagnose de vírus (LIMA et al., 2009).

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 enzimas mais utilizadas são as obtidas do *Avian myeloblastosis virus* (AMV) e do *Moloney murine leukemia virus* (MmLV), sendo a primeira mais usada para a síntese de cDNAs de fitas curtas e a segunda, para cDNAs de fita longa, devido à sua baixa atividade de RNAses. Outra enzima que pode ser utilizada como transcriptase reversa é a *Tth* polimerase, enzima termoestável isolada de *Thermus thermophilus*, que 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 reação da polimerase em cadeia (PCR), empregando-se um par de oligonucleotídeos 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 (SASTRY, 2013).

A IC-RT-PCR é uma técnica baseada na amplificação de um cDNA sintetizado a partir do RNA de partículas virais capturadas em um suporte sólido, que pode ser uma microplaca ou microtubo de polipropileno. Esse procedimento já foi utilizado com sucesso para a detecção de RNA patogênico de seres humanos, animais e plantas. É uma técnica que torna a preparação da amostra biológica mais simples, pois utiliza menos etapas para a obtenção do RNA viral que, em seguida, servirá como molde para ser processado na técnica de RT-PCR (UDAYASHANKAR et al., 2012).

A técnica de imunocaptura foi utilizada pela primeira vez em seres humanos (CHESS; MACDERMOTT; SCHLOSSMAN, 1974). Ao longo dos anos, a técnica sofreu várias adaptações para o isolamento de bactérias presentes no solo e em plantas (UDAYASHANKAR et al., 2012). Chess, Macdermott e Schlossman (1974) utilizaram a IC-RT-PCR para a detecção do vírus da hepatite A, a partir de espécimes de lodo de esgoto na Alemanha. Os resultados foram obtidos com dois dias, enquanto com o método tradicional de isolamento viral em cultivos de células, foram necessárias entre oito e dez semanas.

Em plantas, a técnica de IC-RT-PCR foi utilizada, pela primeira vez, em 1992, para diagnose de *Plum pox virus* em ameixeira (KHAN et al., 2012; WETZEL et al., 1992). A técnica demonstrou alta sensibilidade em detectar baixas concentrações do *Plum pox virus*, quando comparada com o ELISA (WETZEL et al., 1992). A técnica de IC-RT-PCR já foi utilizada para a detecção do *Cherry leaf roll virus* (CLR) em plantas de petúnia e *Apple stem pitting virus* em plantas de macieira. Em sementes de damasco, o IC-RT-PCR foi utilizado para diagnose do *Plum pox virus*. Em sementes de

amendoim, o IC-RT-PCR foi utilizado na diagnose do *Peanut stripe virus* e *Peanut mottle virus*. Desde a sua descoberta, em 1974, a imunocaptura passou por algumas modificações, visando tornar o método mais eficiente.

A IC-RT-PCR vem mostrando ser uma técnica que tem alta sensibilidade, especificidade e maior rapidez, quando comparada a outras técnicas imunológicas e moleculares, e pode ser utilizada para estudos epidemiológicos e a detecção de baixas concentrações virais em tecidos vegetais (JANSEN; SIEGL; LEMOM, 1990). Em resumo, o IC-RT-PCR é uma técnica que visa simplificar e reduzir o tempo de preparo de amostras para um diagnóstico do vírus mais rápido e, com isso, a possibilidade de manipular um maior número de amostras, sem perda de sensibilidade e especificidade.

2.5 Métodos recomendados para detecção de vírus em sementes

O sucesso da diagnose de vírus em semente depende da escolha da técnica a ser adotada, assim como a escolha do melhor método de preparo da amostra de acordo com a localização 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 a detecção do LMV em sementes de alface; do *Tobacco mosaic virus*, ToMV e PMMoV em diferentes espécies em pimentão, pimenta e tomate; do PSbMV em semente de ervilha; do PepMV em sementes de tomate e SqMV, CGMMV e *Melon necrotic spot virus* em sementes de curcubitáceas.

REFERÊNCIAS

- ALBRECHTSEN, S. E. **Testing methods for seed-transmitted virus: principles and protocols**. Wallingford: CABI, 2006. 268 p.
- ALENCAR, N. E. et al. Identificação biológica e molecular de vírus detectados em espécies de cucurbitáceas provenientes do Estado do Tocantins. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 3, n. 1, p. 32-37, Feb. 2012.
- ALI, A.; ROOSSINCK, M. J. Genetic bottlenecks during systemic movement of Cucumber mosaic virus vary in different host plants. **Virology**, London, v. 404, n. 2, p. 279-283, Sept. 2010.
- ALVAREZ, M.; CAMPBELL, R. N. Transmission and distribution of squash mosaic virus in seeds of cantaloupe. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, p. 257-263, 1978.
- 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.
- 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, 2008.
- BHAT, S. et al. Influence of host chloroplast proteins on Tobacco mosaic virus accumulation and intercellular movement. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 161, n. 1, p. 134-147, Jan. 2013.
- 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, p. 569-572, 1979.
- BRITO, M. et al. Seed transmission of Cucumber mosaic virus in canna (*Canna indica*). **Fitopatología Venezolana**, Maracay, v. 25, n. 1, p. 24-26, jun. 2012.

- BROADBENT, L. The epidemiology of tomato mosaic: XI., seed transmission of TMV. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 56, p. 177-205, 1965.
- CEZAR, M. A. et al. Evaluation of resistance of *Capsicum* spp. genotypes to tobamovirus. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 1, p. 39-43, Jan./Feb. 2009.
- CHEN, C. E. et al. A vicilin-like seed storage protein, PAP85, is involved in Tobacco mosaic virus replication. **Journal of Virology**, Washington, v. 87, n. 12, p. 6888-6900, June 2013.
- CHESS, L.; MACDERMOTT, R. P.; SCHLOSSMAN, S. T. Immunologic functions of isolation human lymphocyte subpopulations: I., quantitative isolation of human T and B cells and response of mitogens. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 113, p. 1113-1121, 1974.
- CHUNG, B. N.; PAK, S. H. Seed transmission of *Chrysanthemum stunt viroid* in *Chrysanthemum*. **Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 24, n. 1, p. 31-35, Jan. 2008.
- 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, p. 475-483, 1977.
- CLARK, M. F.; BAR-JOSEPH, M. Enzyme immunosorbent assay in plant virology. **Methods in Virology**, Orlando, v. 7, p. 51-85, 1984.
- COHEN, S.; NITZANI, F. E. Identity of viruses affecting cucurbits in Israel. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 53, p. 193-196, 1963.
- CORDOBA-SELLES, M. D. C. et al. Seed transmission of *Pepino mosaic virus* and efficacy of tomato seed disinfection treatments. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 10, p. 1250-1254, Oct. 2007.
- DOMIER, L. L. et al. Similarities in seed and aphid transmission among soybean mosaic virus isolates. **Plant Disease**, Quebec, v. 91, n. 5, p. 546-550, Nov. 2007.
- EIRAS, M. et al. Characterization of a non-L3 gene-resistance breaking Pepper mild mottle virus isolate in *Capsicum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 670-675, nov./dez. 2004.
- FAULIN, E. J.; AZEVEDO, P. F. Distribuição de hortaliças na agricultura familiar: uma análise das transações. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 33, n. 11, p. 24-37, 2003.

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

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.

HANSSSEN, I. M.; THOMMA, B. P. H. J. Pepino mosaic virus: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 11, n. 2, p. 179-189, Mar. 2010.

JADÃO, A. S. et al. 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./fev. 2002.

JANSEN, R. W.; SIEGL, G.; LEMOM, S. M. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. **Proceedings of National Academy of Science**, Washington, v. 87, n. 8, p. 2867-2871, Apr. 1990.

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, 1994.

JONES, R. A. Virus diseases of perennial pasture legumes in Australia: incidences, losses, epidemiology, and management. **Crop and Pasture Science**, Collingwood, v. 64, n. 3, p. 199-215, Aug. 2013.

KHAN, S. et al. Immunodiagnosics of cucumber mosaic virus using antisera developed against recombinant coat protein. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Oxon, v. 45, n. 5, p. 561-569, Mar. 2012.

KÖKLÜ, G.; YILMAZ, Ö. Occurrence of cucurbit viruses on field-grown melon and watermelon in the Thrace region of Turkey. **Phytoprotection**, Saint Hyacinthe, v. 87, n. 3, p. 123-130, Dec. 2006.

KRAUSE-SAKATE, R. et al. 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.

- LAPIDOT, M. et al. *Pelagonium zonate spot virus* is transmitted vertically via seed and pollen in tomato. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 8, p. 798-804, Aug. 2010.
- LIMA, M. F. et al. Detecção por sorologia do Melon yellowing associated virus (MYaV) em áreas produtoras de melão no Nordeste brasileiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 478-483, out. 2009.
- LING, K. S. Pepino mosaic virus on tomato seed: virus location and mechanical transmission. **Plant Disease**, Quebec, v. 92, n. 12, p. 1701-1705, Dec. 2008.
- MINK, G. J. Pollen and seed-transmitted viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 375-402, 1993.
- MORALES, F. J.; CASTAÑO, M. Seed transmission characteristics of selected *Bean common mosaic virus* strains in differential bean cultivars. **Plant Disease**, Quebec, v. 71, p. 51-53, 1987.
- NOLAN, P. A.; CAMPBELL, R. N. Squash mosaic virus detection in individual seeds and seed lots of cucurbits by enzyme-linked immunosorbent assay. **Plant Disease**, Quebec, v. 68, p. 971-975, 1984.
- 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.
- ROBERTS, I. M. et al. *Pea seed-borne mosaic virus* seed transmission exploits novel symplastic pathways to infect the pea embryo and is, in part, dependent upon chance. **Protoplasma**, Karlsruhe, 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, p. 522-523, 1964.
- SASTRY, K. S. Mechanism of seed transmission. In: _____. **Seed-borne plant virus diseases**. New Delhi: Springer India, 2013. p. 85-100.
- SCHIPPERS, B. Transmission of *Bean common mosaic virus* by seed of *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Beka. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v. 12, p. 433-497, 1963.

TOSIC, M.; SUTIC, D.; PESIC, Z. Transmission of tobacco mosaic virus through pepper (*Capsicum annuum* L.) seed. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 97, p. 10-13, 1980.

UDAYASHANKAR, A. C. et al. Immunocapture RT-PCR detection of Bean common mosaic virus and strain blackeye cowpea mosaic in common bean and black gram in India. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Oxon, v. 45, n. 13, p. 1509-1518, Apr. 2012.

VOLLER, A. et al. Microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 51, p. 209-211, 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. W.; MACFARLANE, S. A.; MAULE, A. J. Viral determinants of pea early browning virus seed transmission in pea. **Virology**, London, v. 234, n. 1, p. 112-117, July 1997.

WETZEL, T. et al. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 39, n. 1/2, p. 27-37, Sept. 1992.

SEGUNDA PARTE – ARTICULOS CIENTIFICOS

ARTIGO 1: Detecção do *Squash mosaic virus* (SqMV) e estudo da sua transmissibilidade em sementes de abóbora cv. Caserta

Artigo preparado de acordo com as normas da revista *Seed Science and Technology*.

Detecção do *Squash mosaic virus* (SqMV) e estudo da sua transmissibilidade em sementes de Abóbora cv. Caserta

João Eduardo Melo de Almeida¹, Antonia dos Reis Figueira¹, Nara Edreira Alencar¹, Daniele Costa Pompeu¹, Maurício Antônio Lucas¹, Jéssica Vieira Lima Teixeira¹

¹ Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil, Cep. 37200-000 (autor para correspondência: AR. Figueira: Antonia@dfp.ufla.br)

RESUMO

Sementes de abóbora com boa qualidade sanitária são importantes no processo de produção agrícola, entretanto, no Brasil ainda não existem programas de certificação das mesmas, quando se trata de vírus. Sendo assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de utilizar as técnicas de IC-RT-PCR, DAS-ELISA, RT-PCR e teste biológico na diagnose do SqMV-LC2 em semente de abóbora. Teste de sensibilidade das técnicas IC-RT-PCR e DAS-ELISA foram realizados em sementes com diferentes níveis de infecção. O antígeno foi obtido a partir de sementes sem germinar e de folhas primárias de plântulas, empregando-se amostras com apenas uma semente/plântula e amostras compostas contendo 10 sementes/plântulas cada. Foi também estudada a distribuição do SqMV-LC2 nas sementes e nos órgãos florais das plantas de abóbora e o mecanismo de transmissão do SqMV-LC2 da planta para semente e da semente para planta. O SqMV-LC2 foi detectado, por DAS-ELISA e IC-RT-PCR, em 100% das amostras das sementes sem germinar, enquanto o RT-PCR não foi capaz de detectá-lo em nenhuma semente. Após a germinação, o IC-RT-PCR detectou o vírus em 15% e o DAS-ELISA em 1,33% das folhas analisadas. Todos os cotilédones e tegumentos das plântulas, analisados individualmente, foram positivos para SqMV-LC2, independente da técnica utilizada. Em amostras compostas de folhas primárias das plântulas não foi possível a detecção do SqMV-LC2, tanto por DAS-ELISA quanto por IC-RT-PCR, mostrando a baixa concentração de partículas virais nas folhas infectadas. A porcentagem de plantas infectadas, com sintomas perceptíveis, no teste biológico foi de 14%. Quanto à sensibilidade, o DAS-ELISA foi capaz de identificar o SqMV até a diluição, em que se empregou uma semente proveniente de uma planta infectada e 150 de plantas sadias. O IC-RT-PCR foi capaz de identificar o SqMV-LC2 até a diluição em que se empregou uma semente de planta infectada e 500 de plantas sadias. O SqMV-LC2 foi diagnosticado nas sépalas, nas pétalas, na corola, no ovário, nos óvulos, na antera e no grão de

polén. Em relação aos mecanismos de transmissão do SqMV da planta para a semente, foi verificado que todas as plantas infectadas, antes ou depois do florescimento e da formação do embrião, produziram sementes infectadas com SqMV-LC2. Esses resultados indicam que o SqMV pode infectar a planta de abóbora, de forma direta e/ou indireta. Os resultados apresentados neste trabalho indicam que o SqMV-LC2 pode infectar todos os cotilédones das sementes de abóbora caserta, entretanto, apenas 15% delas originam plantas infectadas. A presença do SqMV nos cotilédones é suficiente para condenar um lote de semente, pois os cotilédones infectados podem servir como fonte de inóculo no campo para o vetor *Diabrotica speciosa*.

ABSTRACT

Detection of *Squash mosaic virus* (SqMV) and study of its transmissibility by seeds of squash cv. Caserta. Squash Seeds with good phytosanitary quality are important in the process of agricultural production, however, in Brazil there are no seed certification programs for viruses. Serological, molecular and biological methods can be used to detect viruses in seeds, however they need to be standardized for the detection of the *Squash mosaic virus* (SqMV) in seeds of *Cucurbitaceae*. The aim of this work use DAS- ELISA, RT-PCR, IC-RT-PCR and biological methods for the diagnosis of the SqMV-LC2 in seed of the squash. Test sensibility of IC-RT-PCR and DAS- ELISA were performed on seeds with different levels of infection. The antigen was obtained from germinated and non germinated seeds and also from primary leaves of seedlings, using samples with a single seed/seedling and with composite samples containing 10 seeds/seedlings each. It was also studied the distribution of SqMV-LC2 in seeds and in floral organs of squash plants and the transmission mechanism of SqMV from plant to seeds and from seeds to plant. The SqMV-LC2 was detected by DAS -ELISA and IC- RT-PCR in 100% of the samples of non germinated seeds, while the RT-PCR failed to detect it in any seed. After germination, the IC- RT-PCR detected the virus in 15 % and DAS- ELISA in 1.33 % of the analyzed leaves. All seed coats and cotyledons of seedlings, analyzed individually, were positive for SqMV-LC2, regardless of the technique used. In composite samples of the primary leaves of the seedlings was not possible to detect SqMV-LC2, either by DAS-ELISA and by IC- RT-PCR showing the low concentration of viral particles in infected leaves. The percentage of infected plants showing visible symptoms in biological tests was 14%. Regarding to sensitivity, DAS-ELISA was able to identify SqMV up to the dilution where was used a single seed produced by infected plant mixed with 150 seeds produced by healthy plants. The IC- RT-PCR was able to identify SqMV-LC2 up to the dilution of one single seed from infected plant plus

500 seeds from healthy plants. The SqMV-LC2 was detected in the sepals, petals, corolla, ovary, ovules, anther and pollen grain. The plants infected with SqMV-LC2, before or after the flowering and formation of the embryo, produced infected seeds, indicating that the SqMV can infect the squash plants in a directly and/or indirectly mechanism. The results presented in this study showed that SqMV-LC2 can infect all the cotyledons of seeds produced by infected squash cv. Caserta, however, only 15 % of them originated infected plants. The presence of SqMV in seed cotyledons should be enough to reject a seed lot, considering that they can be a source of inoculum in the field to the vector *Diabrotica speciosa*.

INTRODUÇÃO

O *Squash mosaic virus* (SqMV) ocorre em praticamente todo o mundo, entretanto, no Brasil, sua ocorrência está restrita aos estados das regiões norte e nordeste, e ao Distrito Federal (Silveira et al. 2009). Na família das cucurbitáceas, o SqMV já foi relatado infectando diversas espécies, destacando-se o melão (*Cucumis melo*), a melancia (*Citrullus lanatus*) e a abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo*) como os de maior importância econômica (Grogan et al. 1959; Silveira et al. 2009; Alencar et al., 2013).

Os sintomas induzidos pelo SqMV são variáveis e dependem da combinação da virulência do isolado, da cultivar, da idade em que a planta foi infectada e de condições ambientais, como, por exemplo, a temperatura, que pode influenciar diretamente a população do besouro vetor (*Diabrotica speciosa*). Nas folhas, os sintomas podem variar desde mosaico fraco a severo, manchas anelares, embolhamento, deformação foliar, nanismo e, até mesmo, ocasionar a morte da planta. As plantas infectadas podem apresentar florescimento precoce, redução do tamanho e peso, além da baixa produtividade (Alvarez e Campbell 1978).

Além da transmissão por vetor, o SqMV pode ser transmitido na natureza através das sementes (Alvarez e Campbell 1978; Nolan e Campbell 1984). A taxa de transmissão do SqMV pelas sementes de abóbora e melão pode variar entre 0% a 16,8%, sendo essa variação devido à combinação entre cultivar e estirpe/isolado viral (Alvarez e Campbell 1978; Nelson e Knuhtsen 1973a, 1973b).

A diagnose do SqMV baseado na análise da sintomatologia não é considerada confiável, pois nem todas as plantas infectadas podem expressá-lo (Albrechtsen 2006). Além disso, frequentemente, deve-se associar a esse teste a inoculação em plantas indicadoras ou esperar por, pelo menos, 30 dias após a germinação, para analisar os sintomas nas plantas, para que

esses não sejam confundidos com algum estresse ocorrido durante o processo de germinação das sementes.

Dentre as técnicas sorológicas aplicadas para a detecção de vírus em plantas, o DAS-ELISA tem sido a mais utilizada, devido à sua simplicidade, adaptabilidade, rapidez e sensibilidade, podendo ser empregada para diagnose de um grande número de amostras ao mesmo tempo (Figueira 2000; Shang et al. 2011).

A RT-PCR é uma técnica molecular de grande sensibilidade que vem sendo muito utilizada para a detecção de vírus em plantas (Colinet et al. 1993; Colinet & Kummert 1993; Candresse et al. 1998). Entretanto, alguns fatores limitam a sua utilização na diagnose de vírus em certos tecidos vegetais (Sastry 2013), como, por exemplo, a concentração de alguns componentes, como os compostos fenólicos, que podem inibir o funcionamento da enzima DNA polimerase, empregada na amplificação do DNA (Dietzgen, 2002).

As sementes, em sua maioria, são ricas em compostos fenólicos, principalmente os taninos e as cumarinas (Veronezi et al. 2012). Sendo assim, uma maneira eficiente de evitar esses inibidores de PCR presentes nas sementes seria a utilização de métodos apropriados, como a IC-RT-PCR. Nessa técnica, o vírus é, primeiramente, capturado pelo anticorpo e pode ser diretamente submetido à RT-PCR, o que também evita a etapa de extração do RNA viral (Jansen et al. 1990; Wetzal et al. 1992; Graff et al. 1993; Nolasco et al. 1993; Gall Reculé et al. 2001; Yu et al. 2005; Udayashankar et al. 2012).

Estudos conduzidos em todo o mundo têm gerado algumas metodologias validadas pela International Seed Federation – ISF (2009) e a International Seeds Testing Association – ISTA (2009). Para os fitovírus em sementes, até o momento, existem recomendações de protocolos para diagnose do *Pepino mosaic virus* (PepMV) em sementes de tomate; *Pea seed born mosaic virus* (PSbMV) e *Pea early browning virus* (PEMV), em sementes de ervilha e *Letuce mosaic virus*, em sementes de alface.

Recentemente, a ISTA estabeleceu protocolos para diagnose do SqMV, *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) e *Melon necrotic spot virus* (MNSV), em sementes de cucurbitáceas. No Brasil, os esforços para a padronização de metodologias para a detecção de vírus ainda são incipientes, de modo que existe a necessidade de desenvolver, adaptar e padronizar protocolos o mais rápido possível.

Diante disso, no presente trabalho foram empregadas quatro técnicas, IC-RT-PCR, RT-PCR, DAS-ELISA e teste biológico, para a diagnose do SqMV em sementes de abóbora, empregando-se procedimentos variados para a obtenção do antígeno. Foi também estudada a distribuição do SqMV-LC2 nas sementes e nos órgãos florais das plantas de abóbora e o mecanismo de transmissão da semente para a planta e vice-versa.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Virologia Vegetal e no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais, no Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA).

Produção de plantas e sementes infectadas por SqMV-LC2

O isolado de *Squash mosaic virus* utilizado neste estudo, denominado SqMV-LC2, faz parte da coleção de vírus do DFP/UFLA, proveniente de planta de melancia infectada naturalmente em campo de produção localizado no município de Lagoa da Confusão, no estado de Tocantins. A multiplicação deste isolado e a produção das sementes infectadas foram realizadas em plantas de abóbora-de-moita (*Curcubita pepo* cv. Caserta) que, apesar de altamente suscetíveis, conseguem produzir frutos viáveis com sementes. Para isso, sementes livres de vírus foram semeadas diretamente em vasos com capacidade para 8 kg, utilizando-se substrato

enriquecido com os nutrientes adequados. As plantas de abóbora sadias foram inoculadas mecanicamente com o extrato de folhas de abóbora cv. Caserta infectadas com SqMV-LC2, obtido por maceração das mesmas, em solução tampão fosfato 0,01M, pH 7,0 contendo sulfito de sódio na mesma molaridade. Após a fricção do extrato nas folhas das plantas receptoras, previamente polvilhadas com carbureto de silício (CSi), as folhas foram lavadas com água corrente.

Como a produção das sementes foi realizada em casa de vegetação, a polinização das plantas de abóbora foi feita manualmente, uma vez que a polinização da abóbora no campo é dependente das abelhas. O processo de polinização manual foi efetuado sempre na parte da manhã, preferencialmente entre 9 e 10 horas, período em que as flores estavam abertas e os grãos de pólen viáveis. Após o destacamento das flores masculinas, as anteras das mesmas foram suavemente passadas sobre o estigma das flores femininas, deixando o máximo de pólen aderido a esta estrutura. As plantas do experimento foram mantidas em casa de vegetação até o final do ciclo, quando foi feita a colheita dos frutos em ponto de maturidade fisiológica. As sementes foram extraídas dos frutos, lavadas, secas e, em seguida, armazenadas em câmara fria até a realização dos testes.

Obtenção do antígeno para realização do DAS-ELISA e IC-RT-PCR

Os testes diagnósticos aplicados na detecção do SqMV-LC2 nas sementes de abóbora foram o sorológico DAS-ELISA, o molecular RT-PCR, o IC-RT-PCR, que é uma combinação entre DAS-ELISA e RT-PCR, e o biológico, no qual as sementes foram semeadas em bandejas e as plântulas emergentes analisadas visualmente para a detecção dos possíveis sintomas induzidos pelo SqMV-LC2.

O antígeno foi obtido a partir de sementes sem germinar e de plântulas obtidas por germinação das sementes. No primeiro caso, as sementes foram maceradas em almofariz, com o auxílio de um pistilo, na

presença da solução tampão de extração, na proporção de 1:20 (p/v). O extrato obtido foi centrifugado por 1 minuto, a 12.000 rpm, e o sobrenadante empregado como antígeno nos testes.

No processo de obtenção das plântulas, as sementes foram colocadas para germinar em bandejas contendo substrato comercial e mantidas em casa de vegetação, com temperatura média de 22 °C e sem controle de luminosidade, ou em papel de filtro umedecido, mantido durante 3 a 5 dias em germinador, com temperatura controlada de 26 °C, umidade de 80% e luminosidade de 12 horas. Após a emergência das plântulas, foram coletadas as suas folhas primárias, eliminando-se os cotilédones, o caulículo, a raiz e o tegumento. Essas folhas foram colocadas em um saco plástico, juntamente com a solução tampão de extração, na proporção de 1:20 (p/v) e maceradas com o auxílio de um pequeno bastão de madeira. O extrato obtido foi empregado como antígeno.

Tanto as sementes como as folhas primárias foram avaliadas individualmente ou combinadas. Assim sendo, nas avaliações individuais, foi empregado o extrato/RNA de cada semente/plântula, enquanto, nas amostras combinadas, foi empregado o extrato/RNA de 10 sementes/plântulas, misturadas antes da extração. Em cada ensaio foi empregada uma amostra composta por 1.000 sementes e/ou folhas primárias.

Obtenção do RNA total

A extração do RNA foi realizada seguindo o protocolo do Trizol (AFGC Protocols, 2002), a partir de sementes e folhas primárias. Inicialmente, as sementes e/ou folhas foram trituradas em almofariz, na presença de nitrogênio líquido, e o pó obtido foi homogeneizado em solução de trizol (solução aquosa contendo 38% de fenol saturado, 0,8M de tiocianato de guanidina, 0,4M de tiocianato de amônio e 0,1M de acetato de sódio, pH 5 e 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 300 µL de clorofórmio a cada microtubo. Após agitação em vortex, os tubos foram deixados à temperatura ambiente, por 3 minutos e, em seguida, centrifugados, a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para outros microtubos e a ela foi adicionada a metade do volume da solução contendo 0,8 M de citrato de sódio e 1,2 M 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 25 µL de água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O RNA total extraído foi analisado em gel de agarose a 0,7%, constraçado com Gel Red (Invitrogen).

Testes diagnósticos aplicados na diagnose do SqMV-LC2 em sementes de abóbora e folhas primárias de sementes germinadas

DAS-ELISA

O teste sorológico empregado foi o *Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay* (DAS-ELISA), utilizando-se o antissoro policlonal da empresa Bioreba, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Os tampões utilizados foram preparados no laboratório. São eles: tampão de cobertura (carbonato-bicarbonato 0,025M, pH 9,6, contendo 0,02% de azida sódica), tampão de extração do vírus (Tris-HCl 0,02 M , pH 7,4, contendo 137 mM de cloreto de sódio, 3 mM de cloreto de potássio, 2% PVP, 0,05% de Tween 20 e 0,02% de azida sódica), tampão do conjugado (fosfato salino tamponado (PBS) contendo 0,2% de soro albumina bovina

(BSA), 2% de PVP e 0,02% de azida sódica), tampão do substrato (dietanolamina 1M, pH 9,8, contendo 0,02% de azida sódica) e tampão de lavagem (fosfato salino tamponado (PBS) contendo 0,02% de azida sódica e 0,05% de Tween 20).

RT- PCR

O par de *primer* utilizado para a detecção do SqMV-LC2 foi SqMV-1648 F:5'TTTGACGGCATGGTC3' e SqMV-2465 R: 5'GGAAAGAAGCCACAAC3', para amplificar 818 pb englobando 172 nucleotídeos do gene da unidade maior e todo o gene da unidade menor das proteínas do capsídeo, além de 98 nucleotídeos após o terminal 3' do gene da subunidade menor.

Para a obtenção da fita de cDNA, inicialmente, foi feita a incubação de 1,0 µL do *primer reverse* com 8,5 µL de água ultrapura tratada com DEPC, a 75 °C, por 5 minutos, após o que os tubos foram imediatamente transferidos para o gelo. Em seguida, foram adicionados 5 µL do RNA extraído, 0,4 µL da enzima transcriptase reversa (RT M-MLV), 4,0 µL do tampão da enzima, 1,0 µL de dNTP a 10 mM e água ultrapura tratada com DEPC, para completar o volume final de 20 µL. Os tubos foram incubados, a 42 °C, por 30 minutos, depois a 95 °C, por 5 minutos e transferidos para o gelo.

A reação de PCR foi montada para um volume de 25 µL, composto por 8,5 µL de água ultrapura previamente tratada com DEPC, 2,5µL do tampão da enzima (5x), 0,5 µL de MgCl₂ 25 mM; 0,25 µL de dNTP 10 mM; 0,75 µL de cada um dos *primers forward* e *reverse* a 10 pM; 0,125 µL GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega); 0,25µL do cDNA e água ultrapura para completar o volume. Para a amplificação do DNA foi feita uma desnaturação inicial, a 95 °C, por 2 minutos, seguida por 35 ciclos: 95 °C, por 45 segundos; 49 °C, por 1 minuto e 72 °C, por 1 minuto, com alongação final, a 72 °C, por 10 minutos. Os produtos amplificados foram

analisados em gel de agarose a 0,7%, contrastados com Gel Red (Invitrogen).

IC-RT-PCR

Nesse testes, 50 µL de antissoro policlonal anti SqMV, da empresa Bioreba, na diluição de 1:1000, foram adicionados a microtubos de polipropileno com capacidade de 200 µL, da marca *Axygen*, e incubados, por 2 horas, a 35 °C. Em seguida, os microtubos foram lavados com PBS, por 3 vezes, após o que foram adicionados 50 µL do extrato das sementes e/ou plântulas, das amostras simples e/ou combinadas, fazendo-se nova incubação de um dia para o outro, a 4 °C (aproximadamente 12 horas). Após esta incubação, os microtubos foram lavados com PBS, por sete vezes, e empregados para montar a reação para a obtenção do cDNA viral.

Inicialmente, foram adicionados a esses microtubos 10,0 µL de água ultrapura tratada com DEPC e 1,0 µL do *primer reverse* SqMV- 2465 R: 5'GGAAAGAAGCCACAAC3', na concentração de 10 pM, e incubou-se, por 5 minutos, a 75 °C, transferindo-os imediatamente para o gelo. As demais etapas dessa reação e da reação de PCR foram idênticas às anteriormente descritas para o RT-PCR.

Teste Biológico

Para esse teste, sementes produzidas a partir de plantas infectadas com SqMV-LC2 foram selecionadas e submetidas ao teste biológico. O teste biológico consistiu de três repetições de 1.000 sementes em bandejas de plástico (50x30 cm) contendo substrato devidamente esterilizado, com os nutrientes necessários para o desenvolvimento das plantas. Essas bandejas foram mantidas em casa de vegetação, com temperatura média de 22 °C e sem controle de luminosidade, até um período aproximado de 40 dias após a germinação, com avaliação visual diária das plântulas. As avaliações

consistiram em analisar a presença ou a ausência de sintomas característicos do SqMV-LC2 nas plantas. Para a confirmação da análise visual, todas as plântulas foram testadas por DAS-ELISA, empregando-se os antíssoros para SqMV-LC2.

Avaliação da transmissão do SqMV-LC2 da planta para semente

Esse ensaio foi conduzido para avaliar a transmissão do SqMV-LC2 das plantas de abóbora caserta para as sementes. Para isso, plantas sadias foram separadas em três tratamentos, sendo cada um deles constituído por inoculação em um diferente estágio do ciclo de vida das plantas.

No tratamento 1, as plantas foram inoculadas com SqMV-LC2, antes do florescimento, aproximadamente 10 dias após a emergência, estágio em que as mesmas estavam com 2 a 3 folhas totalmente formadas. Nessa fase não foi verificada a formação de flores masculinas e femininas.

As plantas do tratamento 2 foram inoculadas com SqMV-LC2 em pleno florescimento, aproximadamente aos 35 dias após a emergência. Essas plantas estavam com todas as flores masculinas e femininas formadas e expandidas.

No tratamento 3, as plantas foram inoculadas com SqMV-LC2, após o florescimento e a fertilização dos frutos, aproximadamente aos 50 dias após a emergência das plantas, quando apresentavam os frutos e as sementes em fase de formação. Em todos os tratamentos, apenas um fruto foi polinizado e marcado com uma fita de cor específica para cada tratamento.

Aos 70 dias após a emergência das plantas, tecidos foliares foram coletados e submetidos ao teste sorológico DAS-ELISA, para confirmar a infecção pelo SqMV-LC2. Essas plantas foram conduzidas até a colheita, momento em que os frutos foram colhidos, e as sementes foram extraídas e reservadas para realização dos testes.

Duzentas sementes foram selecionadas por tratamento e, em seguida, foram submetidas ao teste sorológico DAS-ELISA para avaliar a

porcentagem de sementes infectadas pelo SqMV-LC2. Para avaliar a taxa de transmissão do SqMV-LC2 nas sementes de abóbora dos diferentes tratamentos, 300 sementes por tratamento foram semeadas em bandejas e, assim, foi avaliada a sintomatologia das plantas. Aos 30 dias após a emergência das plantas, folhas foram coletadas de todas as plantas e submetidas ao teste sorológico ELISA, para que assim fosse comprovada a presença ou a ausência do SqMV-LC2 nas plantas.

Avaliação da transmissão do SqMV-LC2 da semente para as progênes

Para avaliar a transmissão do SqMV-LC2 das sementes de abóbora para as progênes, 100 sementes de abóbora oriundas de plantas infectadas foram utilizadas. As sementes foram germinadas em gerbox e, em seguida, um dos cotilédones de cada uma das sementes germinadas foi submetido ao teste sorológico DAS-ELISA. Todas as sementes germinadas com o segundo cotilédone remanescente foram transplantadas para vasos contendo substrato comercial e, assim, acompanhou-se o desenvolvimento das plantas durante 50 dias. Aos 30 dias após o transplante, folhas das plantas foram coletadas e submetidas ao teste sorológico DAS-ELISA para avaliar a transmissão do SqMV-LC2 dos cotilédones para a planta.

Distribuição do SqMV-LC2 nos órgãos florais e nas sementes de abóbora

Esse ensaio foi conduzido para determinar o padrão de distribuição do SqMV-LC2 em órgãos florais e em sementes em ponto de maturidade fisiológica. Para isso, todos os tecidos selecionados foram submetidos ao DAS-ELISA.

Órgãos florais: 50 flores de diferentes plantas de abóbora infectadas com SqMV foram utilizadas. Das flores masculinas, separaram-se as sépalas, as pétalas, a corola, as anteras e o grão de pólen. Das flores femininas foram

coletados corola, estigma, sépalas, nectário, ovário e óvulos. Flores de plantas sadias também foram coletadas.

Sementes em ponto de maturidade fisiológica: vinte frutos maduros foram colhidos de diferentes plantas de abóbora infectadas com SqMV e as sementes foram extraídas e colocadas para germinar, com a finalidade de fazer a separação das plântulas em tegumento, cotilédones e folhas primárias, para análise.

Avaliação da sensibilidade do DAS-ELISA e IC-RT-PCR na diagnose do SqMV-LC2 em sementes de abóbora

O teste de sensibilidade das técnicas DAS-ELISA e IC-RT-PCR foi aplicado diretamente nas sementes provenientes de plantas infectadas. O experimento foi composto por 12 tratamentos, sendo cada um deles composto pela mistura de sementes sadias e infectadas (Tabela 1), e três repetições.

Tabela 1 Composição dos tratamentos realizados com a combinação de sementes de abóbora produzidas por plantas sadias infectadas pelo SqMV-LC2

Tratamento	Número de sementes produzidas por plantas infectadas/número de sementes produzidas por plantas sadias
1	1/100
2	1/150
3	1/200
4	1/250
5	1/300
6	1/350
7	1/400
8	1/450
9	1/500
10	1/550
11	1/600
12	0/600

Assim sendo, no tratamento 1, foram misturadas 100 sementes produzidas por plantas sadias com 1 semente produzida por planta infectada com SqMV-LC2, e a cada tratamento o número de sementes sadias foi aumentando, até 600 sementes. Após a maceração das sementes, o extrato contendo o antígeno foi submetido simultaneamente aos testes DAS-ELISA e IC-RT-PCR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de plantas e sementes infectadas por SqMV-LC2

Todas as plantas de abóbora-de-moita *C. pepo* cv. Caserta inoculadas artificialmente com SqMV-LC2 apresentaram sintomas característicos de mosaico, indicando, assim, a presença do SqMV-LC2. Os sintomas mais comumente encontrados foram deformação foliar, subdesenvolvimento, mosaico intenso, diminuição do limbo e mosaico dos frutos (Figura 1). As plantas produziram poucos frutos e poucas sementes por fruto. Amostras foliares de todas as plantas foram positivas para SqMV-LC2, quando submetidas ao teste sorológico DAS-ELISA.

Mesmo causando sintomas relativamente severos, o isolado de SqMV-LC2, oriundo do estado do Tocantins, foi capaz de infectar plantas de abóbora-de-moita cv. Caserta sem causar a morte das plantas, permitindo a produção de frutos e sementes viáveis.

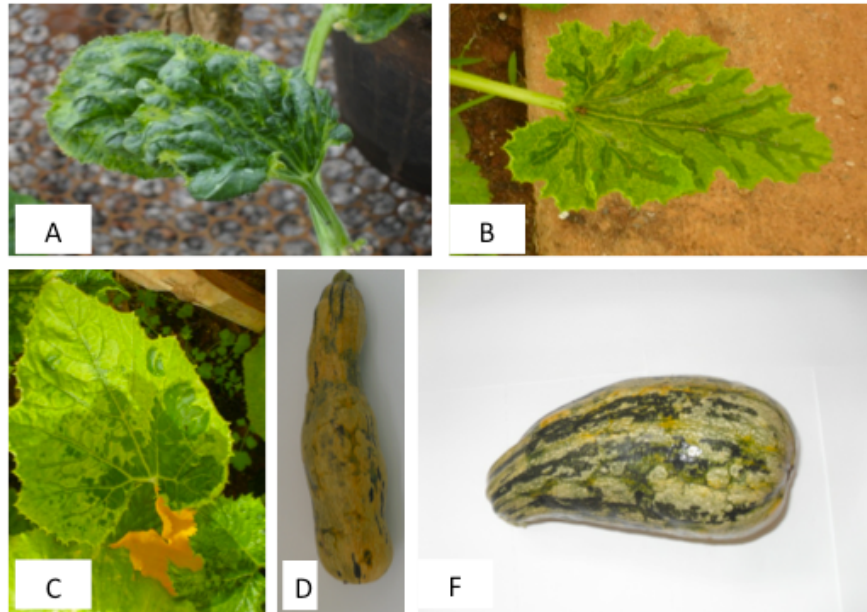


Figura 1 Sintomas em folhas e frutos de plantas de abóbora caserta infectadas com *Squash mosaic virus* isolado LC2. A – Folha mosaico intenso, embolhamento, encarquilhamento e subdesenvolvimento. B e C – Folhas com mosaico. D e E – Frutos com embolhamento e subdesenvolvimento.

Quando o antígeno foi extraído de sementes de abóbora sem germinar, o DAS-ELISA e o IC-RT-PCR foram capazes de detectar o SqMV-LC2 em 100% das sementes produzidas por plantas infectadas, tanto nas análises de sementes individuais como nas amostras combinadas, contendo uma semente infectada misturada com diferentes quantidades de sementes sadias (Figuras 2 e 3).

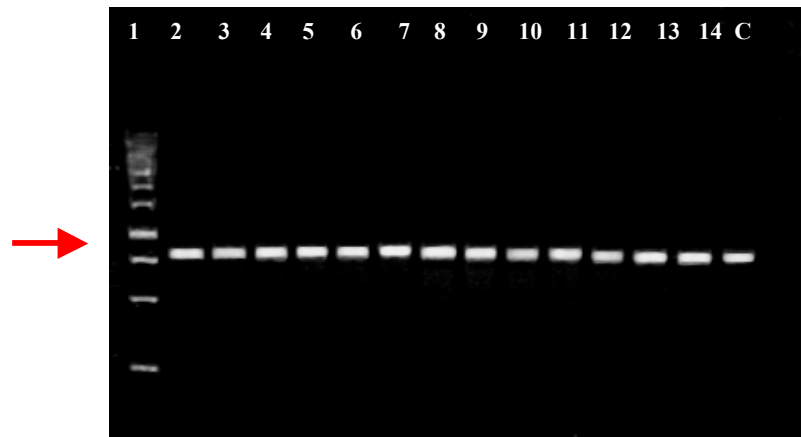


Figura 2 Análise eletroforética das bandas amplificadas por IC-PCR com os *primers* para *Squash mosaic virus* isolado LC2. M: 1 Kb DNA ladder; 1 a 14: amostras simples contendo apenas uma semente sem germinar; C: controle negativo.

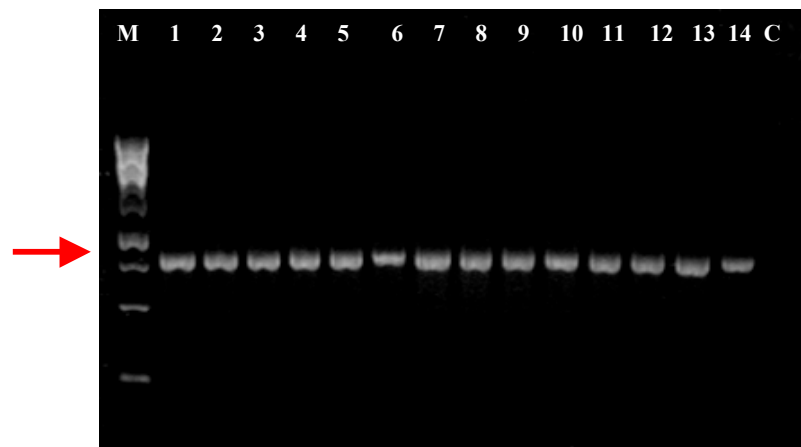


Figura 3 Análise eletroforética das bandas amplificadas por IC-PCR com os *primers* para *Squash mosaic virus* isolado LC2. M: 1 Kb DNA ladder; 1 a 14: amostras compostas contendo 10 sementes sem germinar em cada uma. C: controle negativo.

Entretanto, O IC-RT-PCR apresentou uma maior sensibilidade na diagnose do SqMV-LC2 em folhas primárias, analisadas individualmente, quando comparado com o teste sorológico DAS-ELISA. A porcentagem de

amostras positivas para o SqMV-LC2 foi de 15%, no IC-RT-PCR (Figura 4) e de 1,33%, para o DAS-ELISA.

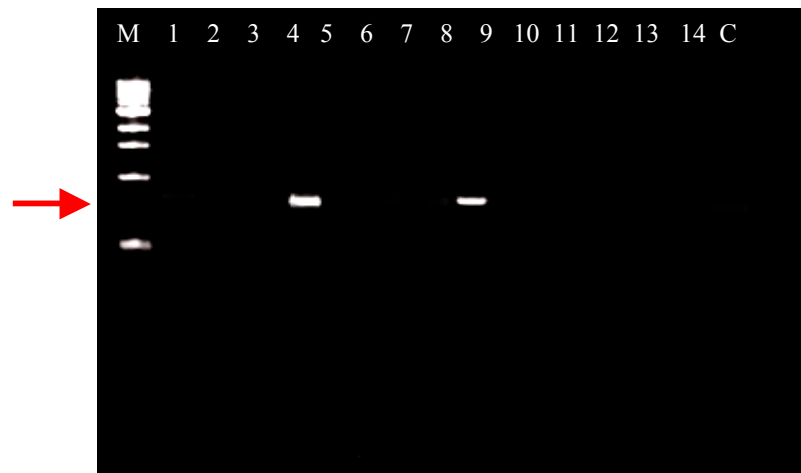


Figura 4 Análise eletroforética dos produtos da IC-PCR obtidos com os *primers* para *Squash mosaic virus* isolado LC2. M: 1 Kb DNA ladder; 4 a 14: amostras simples de folha primária, positivas para SqMV-LC2. As demais amostras foram negativas para SqMV-LC2. C: controle negativo.

Quando as folhas primárias foram analisadas em combinações com 10 folhas primárias por extração, tanto o DAS-ELISA como o IC-RT-PCR não foram capazes de detectar o SqMV. Isso deve ter acontecido devido à concentração de partículas virais nas folhas primárias que, quando diluída dez vezes, provavelmente, ficou abaixo do limite de sensibilidade de ambas as técnicas.

Nos testes de RT-PCR em que se empregou o RNA extraído diretamente das sementes produzidas por plantas infectadas, os resultados foram negativos, indicando a presença de algum componente capaz de interferir na reação, uma vez que os testes anteriores mostraram que as partículas virais estavam presentes em 100% dessas sementes.

No teste biológico, a presença de plântulas com sintomas de mosaico, característicos da presença do SqMV, foi identificada, sem gerar nenhuma dúvida sobre a sua etiologia, somente aos 40 dias após a emergência das plantas.

Na análise visual foi identificada a presença do vírus em 14% das plantas, o que foi posteriormente confirmado pelo teste sorológico DAS-ELISA.

A taxa de transmissão do isolado SqMV-LC2, detectada em sementes de abóbora caserta, foi semelhante à relatada por Nolan e Campbell (1984), que encontraram uma transmissão do SqMV, por sementes de abóbora e de melão, para 0,4% a 16,8% das plântulas.

Apesar de a técnica biológica ter sido eficiente na detecção do SqMV em sementes de abóbora, o tempo necessário para um diagnóstico definitivo foi muito longo, quando comparado com as demais técnicas. A diagnose, provavelmente, ocorreu tardiamente devido à baixa concentração de partículas virais nas sementes e, geralmente, os sintomas demoram a se expressar (Albrectsem, 2006).

Distribuição do SqMV-LC2 nos órgãos florais e nas sementes de abóbora

O SqMV-LC2 foi detectado em todos os órgãos florais das plantas de abóbora, ou seja, nas sépalas, pétalas, nectário, ovário, óvulos, anteras e grãos de pólen, de acordo com os resultados do DAS-ELISA. As absorbâncias obtidas no DAS-ELISA variaram entre 1,18 a 1,71 nm, em todos os tecidos, mostrando, assim, que o vírus estava presente em altas concentrações nos mesmos.

Nos tecidos das sementes, o DAS-ELISA detectou o SqMV em todos os tegumentos e cotilédones, com absorbâncias variando entre 0,5 e 1,28 nm, para ambos. Em todos esses testes, os controles negativos apresentaram média de 0,06 de absorbância.

Pelo IC-RT-PCR também foi identificada a presença do SqMV em 100% das amostras de cotilédones e tegumento (Figuras 5 e 6).

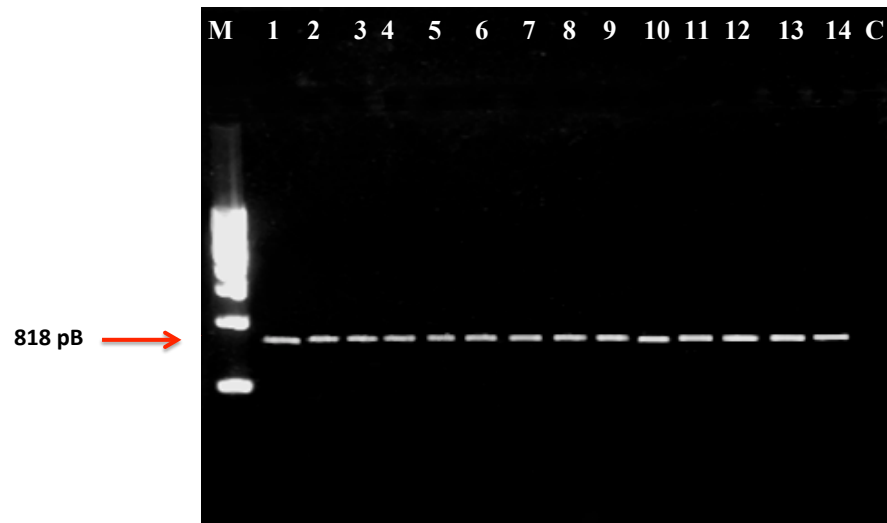


Figura 5 Análise eletroforética das bandas amplificadas por IC-PCR com os *primers* para *Squash mosaic virus* isolado LC2. M: 1 Kb DNA ladder; 1 a 14: amostras simples de cotilédones; C: controle negativo



Figura 6 Análise eletroforética das bandas amplificadas com os *primers* para *Squash mosaic virus* isolado LC2. M: 1 Kb DNA ladder; 1 a 14: amostras simples do tegumento; C: controle negativo.

Quando as folhas primárias foram analisadas, descartando-se o tegumento e os cotilédones, o SqMV-LC2 foi identificado em 2,0% das amostras, por DAS-ELISA, com absorbâncias que variaram entre 0,2 a 0,32 nm, indicando baixa concentração de partículas virais. Essa sensibilidade na detecção aumentou quando se empregou o IC-RT-PCR, no qual 14% das amostras das amostras foram positivas para o SqMV-LC2.

Avaliação da transmissão do SqMV-LC2 da semente para progênie

Das 100 sementes germinadas e os cotilédones avaliados, o SqMV foi identificado, pelo DAS-ELISA, em 100% das amostras. Em relação às sementes germinadas e transplantadas, o SqMV-LC2 foi identificado em 13 das 100 plantas. Esses resultados indicaram que, mesmo estando presente em todos os cotilédones das sementes de abóbora, SqMV-LC2 deve ter dificuldade em movimentar-se desses tecidos para as progênies e, assim, originar uma planta infectada.

Neste experimento, foi demonstrado que a capacidade e a eficiência da transmissão do SqMV-LC2 das sementes para as plantas de abóbora são totalmente influenciadas pela localização do vírus nas sementes.

Nolan e Campbell (1984) verificaram a presença do SqMV no tegumento das sementes de abóbora analisadas, entretanto, a maioria delas estava com o embrião livre do vírus. Em outras ocasiões, as sementes apresentaram o embrião livre do vírus e, mesmo assim, produziram plantas infectadas.

Em sementes de ervilha oriundas de plantas infectadas, Wang & Maule (1992; 1994) e Maule & Wang (1996) identificaram a presença do PSbMV em cotilédones e/ou eixo embrionário de sementes. Esses autores verificaram que as partículas virais do PSbMV presentes nos cotilédones não foram capazes de produzir plantas infectadas, tendo somente as sementes com folhas primárias infectadas sido capaz de produzi-las. Os autores concluíram que as partículas virais presentes nos cotilédones, testa ou tegumento, não são capazes de produzir plantas infectadas. Isso acontece porque o PSbMV não é capaz de se movimentar desses tecidos para as folhas das plantas. Sendo assim, para determinar a taxa de transmissão do PSbMV por sementes de ervilha, é necessária a análise das folhas primárias, sem os demais tecidos, para não gerar resultados falsos positivos.

Uma possível explicação para a não transmissão do PSbMV dos cotilédones para as folhas primárias foi dada por Maule & Wang (1996). Segundo esses autores, o movimento do PSbMV inicia-se da planta para micrópila da semente e, em seguida, atinge o tecido denominado suspensor (carreador de nutrientes durante as fases de desenvolvimento do embrião da semente), antes de chegarem ao embrião (Wang & Maule 1994; Roberts et al. 2003). O suspensor fica presente na semente até o final do processo de maturação do embrião, entretanto, à medida que a semente completa o seu ciclo de desenvolvimento, ele é degradado. Para sementes de abóbora, o movimento do SqMV dentro da semente ainda não foi determinado,

entretanto, os resultados obtidos por Robert et al. (2003), em sementes de ervilha, poderiam sugerir um mecanismo semelhante.

Outra explicação para a causa da baixa taxa de transmissão, a falta de correlação entre a presença do SqMV-LC2 em cotilédones e a ausência de plântulas infectadas poderia ser obtida com base nos processos fisiológicos que podem ocorrer durante a maturação da semente no fruto e/ou processo de germinação. Segundo Johansen (1994), durante a germinação, pode haver a transferência de nutrientes nas sementes e paralisação de atividades celulares, e, assim, aumentar a quantidade de compostos fenólicos e quinonas, que podem degradar as partículas viriais presentes na semente.

Durante a maturação e a germinação das sementes, mecanismos de defesa podem ser desencadeados e as moléculas produzidas podem afetar direta ou indiretamente as partículas virais nas sementes. Em sementes de damasco infectadas pelo *Prunus ringspot virus* (PNRSV) foi observada alta produção de radicais livres, devido ao estresse oxidativo ocorrido. O desequilíbrio e a produção de radicais livres em sementes de damasco certamente explicam a baixa taxa de transmissão do PNRSV das sementes (Amari et al. 2007).

Bower e Godman (1979) verificaram a presença do SMV em sementes de soja, nos estágios iniciais de desenvolvimento do embrião, mas, à medida que a semente foi maturando, o SMV não foi mais encontrado.

Avaliação da transmissão do SqMV-LC2 da planta para semente

Todas as plantas de abóbora que foram inoculadas com SqMV-LC2 antes do florescimento (Tratamento 1), no florescimento (Tratamento 2) e depois do florescimento (Tratamento 3) apresentaram sintomas característicos da presença do SqMV-LC2. Pelo teste sorológico DAS-ELISA, foi possível confirmar a infecção do SqMV-LC2 nas plantas de todos os tratamentos. Em relação à porcentagem de sementes infectadas, o DAS-ELISA identificou a presença do SqMV-LC2 nas sementes de todos os

três tratamentos, ou seja, plantas inoculadas antes ou depois do florescimento produziram sementes infectadas com SqMV-LC2.

A taxa de transmissão do SqMV-LC2 pelas sementes colhidas de nesse experimento variou de acordo com o tratamento aplicado nas planta. A taxa de transmissão foi de 15%, em sementes colhidas no tratamento 1 (plantas inoculadas antes do florescimento); de 7,5%, no tratamento 2 (plantas inoculadas no florescimento) e de 4%, no tratamento 3 (plantas inoculadas após o florescimento).

Os resultados apresentados neste trabalho indicaram que, no patossistema abóbora e SqMV-LC2, podem ocorrer os mecanismos de infecção indireta (infecção dos óvulos) e direta (infecção do embrião já formado), ou seja, plantas inoculadas com SqMV-LC2, antes ou depois do florescimento, produzem sementes infectadas.

Wang & Maule (1992) verificaram que, em algumas cultivares de ervilha suscetíveis ao PSbMV, não existe transmissibilidade do vírus dos tecidos das plantas para os tecidos das sementes. Os autores atribuíram essa não transmissibilidade à resistência da planta e não à inabilidade do vírus em se translocar de um para outro tecido. Em plantas suscetíveis, o PSbMV pode infectar todos os tecidos da semente de ervilha, incluindo o eixo embrionário, cotilédones e testa, entretanto, somente as sementes com as folhas primárias do eixo embrionário infectadas é que darão origem a uma planta infectada. Os mesmos autores observaram que, se apenas os cotilédones estiverem infectados, certamente a planta originada dessa semente será sadia.

Schippers (1963) verificou a presença do BCMV em 80% dos óvulos de plantas de feijão infectadas e Beserra Júnior (2008) verificou a presença de LMV em 20% dos óvulos de plantas de alface.

Para que ocorra infecção direta do embrião, a movimentação do vírus da planta para semente ocorre sempre após a formação do embrião. Neste trabalho, as plantas de abóbora inoculadas com SqMV-LC2, após a

formação do embrião, também produziram sementes infectadas com SqMV-LC2, indicando, assim, o mecanismo de transmissão direta.

Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Bower et al. (1979), quando estudaram o mecanismo de transmissão do SMV das plantas de soja para as sementes. Eles verificaram que plantas inoculadas nos estágios vegetativos ou reprodutivos produziram sementes infectadas com SMV e que, de modo análogo ao que foi verificado para o SqMV-LC2 neste trabalho, o tempo de inoculação afetou a taxa de transmissão do SMV. A taxa de transmissão nas plantas inoculadas tardiamente foi menor, quando comparada com as das plantas inoculadas nos estágios iniciais de desenvolvimento.

Avaliação da sensibilidade do DAS-ELISA e IC-RT-PCR na diagnose do SqMV-LC2 em sementes de abóbora

O extrato empregado como antígeno no DAS-ELISA foi o mesmo empregado no teste IC-RT-PCR, de modo que foi possível fazer uma comparação precisa entre essas duas técnicas. O DAS-ELISA foi eficiente para a diagnose do SqMV-LC2 até o nível de infecção, no qual se obteve o extrato de 1 semente infectada misturada com 150 sadias. Já o IC-RT-PCR apresentou maior sensibilidade, tendo sido capaz de identificar o SqMV-LC2 até a diluição de 1 semente infectada misturada com 500 sadias (Figura 7).

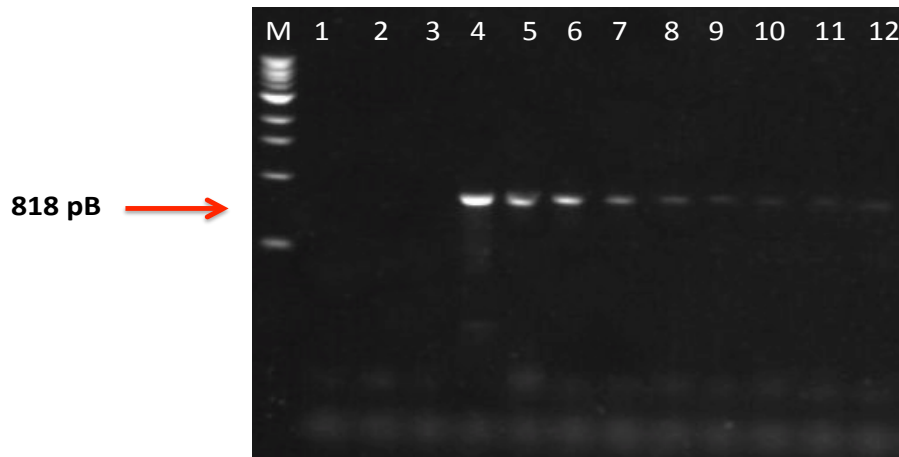


Figura 7 Análise eletroforética das bandas amplificadas com os *primers* para *Squash mosaic virus* isolado LC2. M: 1 Kb DNA ladder; teste de sensibilidade IC-RT-PCR. Número de sementes produzidas por plantas infectadas/número de sementes produzidas por plantas sadias. 1) 0/600; 2) 1/600; 3) 1/550; 4) 1/100; 5) 1/150; 6) 1/200; 7) 1/250; 8) 1/300; 9) 1/350; 10) 1/400; 11) 1/450; 12) 1/500.

A maior sensibilidade do IC-RT-PCR em relação ao DAS-ELISA já foi verificada, por diversos autores, para outros vírus. Van der Vlugt et al. (1997), quando empregaram o IC-RT-PCR para a detecção do *Lettuce mosaic virus* (LMV) em plântulas de alface, verificaram que a sensibilidade desse teste foi 1.000 vezes maior, quando comparada com a do DAS-ELISA. Vaveri (2000) também encontrou sensibilidade 1.000 vezes maior, quando empregou o IC-RT-PCR para detectar a presença do *Potato virus Y* (PVY) em pulgões vetores. Em condições naturais de campo, a detecção do *Citrus tristeza virus* (CTV) em laranja por meio do ELISA ocorreu entre sete a oito meses após o plantio das mudas. Pelo IC-RT-PCR, foi possível fazer a diagnose do CTV quatro meses após o plantio das mudas de citros (Sganzerla et al. 2006). Empregando IC-RT-PCR, Silva et al. (2011) detectaram o *Cassava mosaic virus* em 10 das 16 folhas de mandioca que tinham sido consideradas livres do vírus pelo teste PTAs-ELISA.

CONCLUSÕES

- As técnicas de IC-RT-PCR, DAS-ELISA e biológica são eficientes para a detecção do SqMV-LC2 nas sementes e nas folhas primárias.
- O IC-RT-PCR apresenta maior sensibilidade para diagnose do SqMV-LC2 em sementes de abóbora cv. Caserta, quando comparado com o DAS-ELISA.
- O SqMV-LC2 é detectado em 100% dos tegumentos e dos cotilédones de sementes produzidas por plantas de abóbora 'Caserta' infectadas, quando analisados por DAS-ELISA e IC-RT-PCR.
- A taxa de transmissão do SqMV-LC2 foi de 15%, determinada pelo IC-RT-PCR
- Plantas inoculadas antes ou depois do florescimento e da formação do embrião produzem sementes infectadas com SqMV-LC2, indicando que o mecanismo de transmissão do vírus da planta para a semente pode ser direto e indireto.

REFERÊNCIAS

- Alencar, N. E., Figueira, A. D. R., Almeida, J. E. M. D., Lucas, M. A., dos Santos, L. B., & do Nascimento, I. R. (2012) Identificação biológica e molecular de vírus detectados em espécies de cucurbitáceas provenientes do Estado do Tocantins. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3 : 32-37.
- Albrechtsen, S. E. (2006) Testing methods for seed-transmitted viruses: principles and protocols. 268 p, Wallingford: Cabi.
- Amari, K.; Diaz-Vivancos, P.; Vincente, S. V. P.; Sanchez-Pina, M. A.; Hernandez, J. A. (2007) Oxidative stress induction by *Prunus necrotic ringspot virus* infection in apricot seeds. *Physiologia Plantarum*, 131:302-

310.

Alvarez, M.; Campbell, R.N. (1978) Transmission and Distribution of Squash Mosaic Virus in Seeds of Cantaloupe. *Phytopathology*, 68:257-263.

Bowers, G. R.; Goodman, R. M. (1979) Soybean mosaic virus: infection of soybean seed parts and seed transmission. *Phytopathology*, 69:569-572.

Colinet, D.; Kummert, J. (1993) 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*, 45:149-159.

Colinet, D.; Kummert, J.; Lepoivre, P. (1993) Identification of distinct potyviruses in mildly infected sweet potato by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Phytopathology*, 84:65-69.

Candresse, T.; Cambra, M.; Dallot, S. (1998). Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the M and D serotypes of plum pox potyvirus. *Phytopathology*, 88:198–204.

Dietzgen, R.G. (2002) Application of PCR in plant virology. In: Khan, J.A. and Dijkstra, J. (eds) Plant Viruses as Molecular Pathogens. New York: Food Products Press, pp. 471–500.

Figueira, A. R. (2000) Manejo de doenças viróticas. 99 p, UFLA/FAEPE, Lavras.

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.

Gall-Reculé, G. L.; Zwingelstein, F.; Portejoie, Y.; Gall, G. (2001) Immunocapture-RT-PCR assay for detection and molecular epidemiology studies of Rabbit Haemorrhagic Disease and European Brown Syndrome viruses. *J. Virol. Methods*, Amsterdam, 97: 49-57.

Graff, J., Ticehurst, J., & Flehmig, B. (1993). Detection of hepatitis A virus in sewage sludge by antigen capture polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:3165-3170.

Grogan, R. G., Hall, D. H., Kimble, K. A. (1959). Cucurbit mosaic viruses in California. *Phytopathology*, 49:366-376.

Jansen, R. W., Siegl, G., Lemom, S. M. (1990). Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proceedings of National Academy of Science*, 87:2867-2871.

Johansen, E.; Edwards, M. C.; Hampton, R. O. (1994) Seed transmission of viruses: current perspectives. *Annual Review of Phytopathology*, 32:363-386.

Maule, A. J.; Wang, D. (1996). Seed transmission of plant viruses: A lesson in biological complexity. *Trends in Microbiology*, 154: 153-158.

Nolasco, G., De Blas, C., Torres, V., Ponz, F. (1993). A method combining immuno- capture and PCR amplification in a microtiter plate for the

detection of plant viruses and subviral pathogens. *Journal Virology Methods*, 45:201- 218.

Nolan, P.A., Campbell, R.N. (1984) *Squash mosaic virus* detection in individual seeds and seed lots of cucurbits enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant disease*, 68:971-975.

Nelson, M.R., Knuhtsen, H.K. (1973a) Squash mosaic virus variability: epidemiological consequences of differences in seed transmission frequency between strains. *Phytopathology*, 63: 918-920

Nelson, M.R., Knuhtsen, H.K. (1973b) Squash mosaic virus variability: review and serological comparison for six biotypes. *Phytopathology*, 63:920-926.

Roberts, I. M.; Wang, D.; Thomas, C. L.; Maule, A. J. (2003) *Pea seed-borne mosaic virus* seed transmission exploits novel symplastic pathways to infect the pea embryo and is, in part, dependent upon chance. *Protoplasma*, 222:31-43.

Sastry, K. S. (2013) Mechanism of Seed Transmission. In: Seed-borne plant virus diseases. *Springer India*, p. 85-100.

Silva, J. M., Carnelossi, P. R., Bijora, T., Facco, C. U., Picoli, M. H., Souto, E. R., Almeida, Á. M. (2011) Immunocapture-RT-PCR detection of Cassava common mosaic virus in cassava obtained from meristem-tip culture in Paraná state. *Tropical Plant Pathology*, 36: 271-275.

Silveira, L.M., Queiróz, M. A. de., Lima, J. A. A., Nascimento, A. K. Q., Lima Neto, I. S. (2009) Levantamento Sorológico de Vírus em Espécies de

Cucurbitáceas na Região do Submédio São Francisco, Brasil. *Tropical Plant Pathology*, 34:111-114.

Sganzerla, L.C.M. Detecção do Citrus Tristeza Virus em plantas armadilhas de laranja 'Pêra' livre de vírus. 2006. 60p. Dissertação, Universidade Estadual de Maringá, Faculdade de Ciências Agronômicas, Maringá.

Schippers, B. (1963). Transmission of *Bean common mosaic virus* by seed of *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Beka. *Acta Botanica Neerlandica*, 12:433-497.

Udayashankar, A. C., Nayaka, S. C., Niranjana, S. R., Mortensen, C. N., & Prakash, H. S. (2012). Immunocapture RT-PCR detection of Bean common mosaic virus and strain blackeye cowpea mosaic in common bean and black gram in India. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45: 1509-1518.

Varveri, C. (2000) Potato Y potyvirus detection by immunological and molecular techniques in plants and aphids. *Phytoparasitica*, 28:1-8.

Veronezi, C, M., Jorge, N. Aproveitamento de sementes de abóboras (*Cucurbita* sp) como fonte alimentar. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.14, n.1, p.113-124, 2012.

Vlugt, R. A. A., Berendsen, M., Koenraadt, H., Hutchins, J. D., & Reeves, J. C. (1997). Immunocapture reverse transcriptase PCR for the detection of lettuce mosaic virus. In *Seed health testing: progress towards the 21st century*. pp. 185-191. CAB International, Wallingford, Cambridge, UK.

Wang, D., Maule, A. J. (1994) 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*, 6: 777-787.

Wang, D., Maule, A. J. (1992) Early embryo invasion as a determinant in pea of the seed transmission of pea seedborne mosaic virus. *Journal of General Virology*, London, 73: 1615-1620.

Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M., & Dunez, J. (1992). A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 39: 23-37.

Yu, C.; Wu, J.; Zhou, X. (2005) Detection and subgrouping of Cucumber mosaic virus isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. *Journal Virology Methods*, 123:155-161.

ARTIGO 2: Detecção do *Tomato mosaic virus* e do *Pepper mild mottle virus*, em sementes de tomate e de pimentão, por IC-RT-PCR e DAS-ELISA

Artigo preparado de acordo com as normas da revista Journal of Seed Science

Detecção do *Tomato mosaic virus* e *Pepper mild mottle virus*, em sementes de tomate e de pimentão, por IC-RT-PCR e DAS-ELISA

João Eduardo Melo de Almeida ¹, Antonia dos Reis Figueira ¹, Nara Edreira ¹, Carlos Alberto Melo de Almeida ², Mauricio Antônio Lucas ¹, Luciana Sousa Cassetari ³.

¹ Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

² Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

³ Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Autor para correspondência: email: antonia@dfp.ufla.br . Telefone: (+55) 35 3829-1282

RESUMO

Esse trabalho foi realizado com o objetivo, primeiramente, de produzir sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*) contaminadas com *Tomato mosaic virus* (ToMV) e de pimentão (*Capsicum annum*) contaminadas com o *Pepper mild motle virus* (PMMoV). Foi desenvolvido um método para a contaminação artificial das sementes de tomate com ToMV e de pimentão com PMMoV, mergulhando-as no extrato de folhas infectadas pelos respectivos vírus, por períodos de tempo variando entre 1 a 270 segundos. A contaminação foi confirmada pelo teste sorológico DAS-ELISA e por inoculação em plantas indicadoras. Em uma segunda etapa, foram testadas e otimizadas as técnicas biológica, sorológica DAS ELISA, IC-RT-PCR e RT-PCR, para detectar esses vírus nas respectivas sementes e plântulas de tomate e pimentão. Além dos protocolos desenvolvidos, foi testada a sensibilidade das técnicas para diagnosticar diferentes taxas de incidência de sementes contaminadas. Foi possível obter sementes de tomate contaminadas com ToMV e de pimentão contaminadas com PMMoV, tanto pelo método natural quanto pelo artificial, identificadas por DAS-ELISA. Pelo método artificial, 100% das sementes de tomate e pimentão foram contaminadas quando as mesmas permaneceram em contato com o extrato foliar contendo o vírus, por um segundo ou mais. Nos testes efetuados para a diagnose de vírus nas sementes, as técnicas DAS-ELISA e IC-RT-PCR foram capazes de detectar 1 semente contaminada em um lote de 1.000 sementes (0,1%). O RT-PCR não foi capaz de detectar o ToMV nem o PMMoV nas sementes de tomate e de pimentão, respectivamente. A sensibilidade por DAS-ELISA foi capaz de detectar 1 semente de tomate contaminada com ToMV, em uma amostra com 200 sementes, e 1 semente de pimentão contaminada com PMMoV, em uma amostra com 140 sementes. Pelo IC-RT-PCR, foi obtida uma banda de 783 pb para ToMV até a incidência de 1 semente contaminada em 400. Para o PMMoV, foi obtida uma banda de 757 pb para amostras com até 1 semente contaminada em 300. No teste biológico, não foi possível observar o aparecimento de sintomas que indicassem a infecção das plântulas pelo ToMV e pelo PMMoV, quando se empregaram amostras com 0,1% de sementes contaminadas. Esses dados permitem concluir que o DAS-ELISA e o IC-RT-PCR são os mais recomendados para a diagnose de tobamovírus em sementes de pimentão e de tomate, tendo o IC-RT-PCR sido o teste mais sensível.

ABSTRACT

Detection of *Tomato mosaic virus* e *Pepper mild mottle virus* in pepper and tomato seeds by IC-RT-PCR e DAS-ELISA. This work was carried out in order to firstly produce seeds of tomato (*Solanum lycopersicum*) and pepper (*Capsicum annum*) natural and artificially contaminated with *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), respectively. The artificial contamination was done by dipping them in the extract of leaves infected by each virus for periods of time ranging from 1 to 270 seconds. The contamination was confirmed by serological DAS- ELISA and by inoculating host plants. In a second step, were tested DAS ELISA , RT – PCR, IC- RT – PCR and biological techniques to detect these viruses in seeds and seedlings of tomato and pepper. In addition to the developed protocols, was tested the sensitivity of techniques for detecting different incidence rates of contaminated seeds. It was possible to obtain tomato seeds infected with ToMV, and peppers contaminated with PMMoV, using both natural and artificial methods, confirmed by DAS- ELISA. Employing the artificial method, 100 % of tomato and peppers seeds were contaminated when they remained in contact with the extract of the virus infected leaves for a second or more. In tests carried out for the routine diagnosis of virus in the seeds, the techniques DAS-ELISA and IC- RT-PCR were able to detect one contaminated seed in a sample containing 1,000 seeds (0.1%). The RT - PCR was unable to detect the ToMV and PMMoV in seeds of tomato and pepper, respectively. Regarding to the sensitivity, DAS- ELISA was able to detect one tomato seed contaminated with ToMV in a composite sample with 200 seeds, and one pepper seed contaminated with PMMoV peppers in a composite sample with 140 seeds. By IC -RT- PCR was amplified a 783 pb of ToMV up to the incidence of one contaminated seed in a composite sample with 400 seeds, and a 757 bp band of PMMoV in samples containing up to 1 contaminated seed in a composite sample with 300 seeds. In biological tests it was not possible to visualize symptoms in plants coming from samples with 0.1% of ToMV and PMMoV contaminated seeds. It allowed concluding that both DAS- ELISA and IC- RT-PCR is the most recommended tests for tobamovirus diagnosis in tomato and pepper seeds, and that the IC-RT-PCR is more sensitive one.

INTRODUÇÃO

Dentre os patógenos de plantas, os fitovírus são considerados de grande importância, por não possuírem métodos de controle do tipo curativo. Assim sendo, o seu controle deve ser principalmente do tipo preventivo, impedindo sua introdução e disseminação nos campos de produção, o que pode ser feito por meio de vetores e, principalmente, por sementes (Hull, 2006).

A presença de sementes infectadas em um campo de produção pode levar à ocorrência de sérios impactos epidemiológicos, uma vez que a fonte de inóculo estará presente na lavoura desde o início do ciclo da cultura (Krause-Sakate, 2002; Munkvold, 2009).

Apesar de a maioria dos vírus não ser transmitida por sementes, aqueles que o são devem ser cuidadosamente monitorados. Embora seja considerada mais uma exceção do que regra, cerca de 20% das espécies de virais podem ser transmitidos pelas sementes verdadeiras, podendo a infecção ocorrer de forma direta ou indireta (Johansen et al., 1994; Simmons et al., 2013). Podem também, raramente, ser encontradas no tegumento das sementes e nas polpas dos frutos. Este tipo de transmissão ocorre somente quando os vírus são bastante estáveis, podendo permanecer por muito tempo como contaminantes. Neste mecanismo, as partículas virais não conseguem infectar os tecidos da semente e nem o embrião, permanecendo apenas na parte exterior, aderidos ao seu tegumento (Albrechtsen, 2006). Algumas espécies de vírus, como o *Tomato mosaic virus* (ToMV), o *Tobacco mosaic virus* (TMV) e o *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), do gênero *Tobamovirus*, estão entre os que já foram identificados como sendo transmitidos dessa maneira (Johansen et al., 1994; Broadbent, 1976; Genda et al., 2005).

Dentre as estratégias de controle de vírus, a utilização de sementes sadias constitui uma das principais alternativas a serem empregadas. Assim sendo, a necessidade do desenvolvimento de técnicas de

diagnose adequadas para a identificação de vírus em sementes é considerada imprescindível (Sastry, 2013).

Nas últimas décadas, diversas técnicas foram desenvolvidas para esse propósito, desde as mais simples, como a utilização de plantas indicadoras, até as mais sofisticadas, como é o caso das técnicas sorológicas e moleculares. O DAS-ELISA tem sido a técnica mais utilizada, devido à sua simplicidade, adaptabilidade, rapidez e sensibilidade, podendo ser empregada para diagnose de um grande número de amostras ao mesmo tempo (Figueira 2000). As técnicas molecular de *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR) e sorológico-molecular de *immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction* (IC-RT-PCR) vêm sendo utilizadas devido à sua alta sensibilidade na diagnose de pequenas concentrações virais nos tecidos vegetais (Figueira, 2000; Genda, 2011).

Apesar dos esforços empregados para estabelecer um método padrão para a diagnose dos diferentes patógenos em sementes, para os *Tobamovirus* não existe, no momento, nenhum procedimento que esteja sendo empregado em âmbito nacional e, mesmo, internacional (Albrechtsen, 2006). Resultados de grupos de trabalho formados por pesquisadores de todo o mundo têm gerado algumas metodologias validadas pela Federação Internacional de Semente – ISF (2011) e pela Associação Internacional de Testes em Sementes – ISTA (2011). Ainda assim, no Brasil, os esforços para a padronização de metodologias para a detecção de vírus ainda são incipientes, de modo que existe a necessidade de se iniciar um movimento visando desenvolver, adaptar e padronizar essas técnicas para uso rotineiro.

Atendendo a essa demanda, no presente trabalho foram empregadas quatro técnicas (IC-RT-PCR, RT-PCR, ELISA e Biológico) para diagnose do ToMV em sementes de tomate e de PMMOV em semente de pimentão. Além disso, foi desenvolvido um método de inoculação artificial do ToMV e do PMMOV em sementes de tomate e de pimentão.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de sementes de tomate e de pimentão contaminadas naturalmente com *Tobamovirus*

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, com telado antiafídico, no Laboratório de Virologia Vegetal e no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais (CIV-MG), todos localizados no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA).

Os isolados virais empregados foram cedidos e/ou fazem parte da coleção do Departamento de Fitopatologia/Virologia Vegetal, que são mantidos dessecados e/ou congelados a -80 °C. São eles um isolado de ToMV e um de PMMoV, gentilmente cedidos pela Sakata Seed Sudamérica Ltda.

Para a produção de sementes contaminadas naturalmente com ToMV, foram empregadas plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivar Santa Clara. Para a produção de sementes contaminadas naturalmente com PMMoV, foram utilizadas plantas de pimentão (*Capsicum annum*) cultivar Ikeda.

As plantas de tomate e de pimentão foram obtidas a partir de semeadura de sementes sadias 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 5 kg, utilizando-se o mesmo substrato empregado nas bandejas. Na fase de 2 a 3 folhas, as plantas foram inoculadas mecanicamente, empregando-se os extratos de folhas infectadas, obtidos por maceração dessas na presença de solução tampão fosfato 0.01M, pH 7,0, contendo sulfato de sódio na mesma molaridade. Os extratos obtidos foram friccionados nas folhas das plantas receptoras previamente polvilhadas com carbureto de silício (CSi). Em seguida, as folhas inoculadas foram lavadas e as plantas mantidas em casa de vegetação

até a colheita dos frutos, cujas sementes foram encaminhadas para o laboratório, para serem submetidas aos testes diagnósticos. Todas as sementes colhidas de plantas de tomate infectadas com ToMV e de pimentão infectadas com PMMoV, foram submetidas ao teste sorológico DAS-ELISA e, assim, foi determinada a porcentagem de sementes contaminadas naturalmente.

Desenvolvimento de um método para a produção de sementes de tomate e de pimentão contaminadas artificialmente ToMV e PMMoV

O método de inoculação foi avaliado em sementes de tomate e de pimentão. Em sementes de tomate, foi testada a espécie ToMV e, em pimentão, a espécie PMMoV. O experimento foi composto por 11 tratamentos para cada espécie de planta com seu respectivo vírus. Os tratamentos foram constituídos por diferentes tempos de imersão das sementes em extrato de folhas infectadas (Figura 1).

Figura 1 Tempos de exposição das sementes de tomate e de pimentão ao extrato contendo particuladas virais do ToMV e do PMMoV.

Tratamento	Tempo de inoculação (s)	
1	0	Controle negativo
2	1	Imersão das sementes no extrato e retiradas rapidamente
3	30	Imersão das sementes no extrato, permanência por 30 segundos
4	60	Imersão das sementes no extrato, permanência por 60 segundos
5	90	Imersão das sementes no extrato, permanência por 90 segundos
6	120	Imersão das sementes no extrato, permanência por 120 segundos
7	150	Imersão das sementes no extrato, permanência por 150 segundos
8	180	Imersão das sementes no extrato, permanência por 180 segundos
9	210	Imersão das sementes no extrato, permanência por 210 segundos
10	240	Imersão das sementes no extrato, permanência por 240 segundos
11	270	Imersão das sementes no extrato, permanência por 270 segundos

O extrato para a imersão das sementes foi obtido pela maceração de folhas de fumo (*Nicotiana tabacum*) cv. Turksh, infectadas com ToMV e, para o PMMoV, folhas de pimenta (*Capsicum bacatum*) em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio na mesma molaridade (Figura 1).

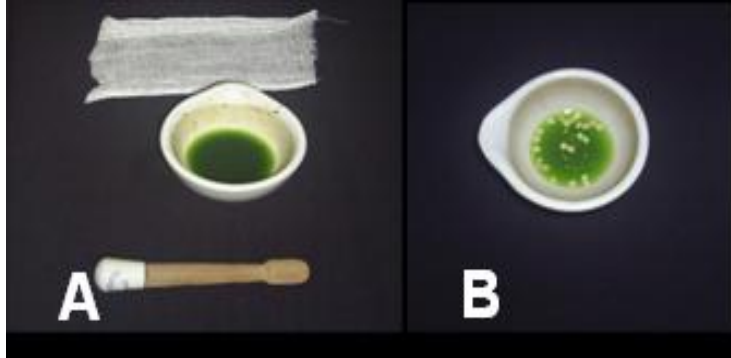


Figura 1 A: Preparo do extrato contendo partículas virais para a inoculação das sementes de tomate e de pimentão. B: Sementes submetidas à inoculação.

Para comprovar a presença dos vírus nas sementes, as sementes de todos os tratamentos foram submetidas ao teste sorológico DAS-ELISA e à inoculação mecânica em plantas de fumo (*N. tabacum*) cv. Turksh N, que apresentam reação de hipersensibilidade a ToMV e a PMMoV. 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 ($P \leq 5\%$).

Obtenção do antígeno

Para a obtenção do antígeno, as sementes foram mergulhadas em solução tampão de extração, específica para o vírus, na proporção de 1 semente/15 μL , para remover as partículas virais contidas em volta do tegumento da semente. Após ficarem em agitação por 30 minutos, as sementes foram descartadas e o tampão com as partículas, supostamente em suspensão, foi empregado como antígeno.

Para avaliar a eficiência do DAS-ELISA na diagnose do ToMV e do PMMoV em sementes e plântulas de tomate e pimentão, respectivamente,

foi gerado um índice de infecção de 0,1%, ou seja, uma semente e ou plântula contaminada artificialmente em 1.000 sementes e ou plântulas sadias. O número de sementes e ou plântulas empregadas em cada experimento de tomate e pimentão foi de 1.000, com três repetições, totalizando, assim, um volume de 3.000 sementes avaliadas. Para economizar o número de testes sorológicos processados e torná-lo menos onerosos, cada amostra de 1.000 sementes foi processada em combinações, sendo montadas 20 subamostras de 33 sementes e 10 subamostras de 34 sementes, efetuando-se, portanto, 30 testes. Assim, apenas uma microplaca foi empregada para avaliar as três repetições de 30 testes cada, deixando-se dois orifícios para os controles positivos e quatro para os controles negativos.

Para avaliar a eficiência do IC-RT-PCR e do RT-PCR, as amostras de 1.000 sementes e ou plântulas de tomate com ToMV e de pimentão com PMMoV, contendo apenas uma semente infectada (índice de infecção de 0.1%), foram processadas em combinações, sendo montadas 10 subamostras de 100 sementes.

Diagnose de tobamovirus em sementes de tomate e pimentão.

Foram empregadas as técnicas de DAS-ELISA, RT-PCR, IC-RT-PCR e biológica, na detecção de ToMV e de PMMoV em sementes e em plântulas de tomate e de pimentão.

DAS-ELISA

Na diagnose do ToMV e do PMMoV em sementes de tomate e pimentão, a técnica sorológica DAS-ELISA foi empregada utilizando-se o antissoro policlonal da empresa Bioreba, de acordo o protocolo recomendado pelo fabricante. Os tampões utilizados, descritos a seguir, foram preparados no laboratório: tampão de cobertura (carbonato-

bicarbonato 0,025M, pH 9,6, contendo 0,02% de azida sódica); tampão de extração do vírus (Tris-HCl 0,02 M , pH 7,4, contendo 137 mM de cloreto de sódio, 3 mM de cloreto de potássio, 2 % PVP, 0,05 % Tween 20 e 0,02 % de azida sódica); tampão do conjugado (fosfato salino tamponado (PBS) contendo 0,2% de soro albumina bovina (BSA), 2% de PVP e 0,02% de azida sódica), tampão do substrato (dietanolamina 1M, pH 9,8, contendo 0,02% de azida sódica) e tampão de lavagem (fosfato salino tamponado (PBS) contendo 0,02% de azida sódica e 0,05% de Tween 20).

RT-PCR

1 - Extração do RNA viral

O RNA viral foi extraído das sementes, utilizando-se o método da trizol (AFGC Protocols, 2002). Após a maceração das sementes 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, 0,4 M de amônio tiocianato e 0,1 M de acetato de sódio, pH 5, 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 300 µL de clorofórmio a cada microtubo. Após agitação em vortex, eles foram deixados à temperatura ambiente por 3 minutos e, posteriormente, centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para outro microtubo e a ela foi adicionada metade do volume da solução contendo 0,8 M 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. Em seguida, 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 25 µL de água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e analisado em gel de agarose a 0,7%, contrastado com Gel Red (Invitrogen).

2 - Síntese do cDNA e PCR

O par de *primer* utilizado para a detecção do ToMV foi ToMV-F, 5'CCAATGTCGTTAGACTCG3' e ToMV-R, 5'CGCTCCAAGACTACTAC3', para amplificar 783 pb localizados na região do gene do capsídeo. Para a detecção do PMMoV, utilizaram-se PMMoV-F, 5'GGAGGACCCGTTGAACTTAC3' e PMMoV-R, 5'GTTATCGTACTCGCCAC3', para amplificar 757 pb também na região do capsídeo.

O cDNA foi sintetizado incubando-se, inicialmente, 1,0 µL do *primer reverse* com 8,5 µL de água ultrapura tratada com DEPC a 75 °C, por 5 minutos, após o que os tubos foram imediatamente transferidos para o gelo. Posteriormente, foram adicionados 5 µL do RNA extraído, 4 µL do tampão da enzima 1 µL de dNTP a 10 mM e 0,4 µL da enzima (M-MLV) e água ultrapura tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) para um volume de 20 µL. 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. A reação de PCR foi montada para um volume de 25 µL, contendo 5 µL do tampão da enzima (5x), 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM; 1 µL de dNTP 10 mM; 0,75 µL de cada um dos *primers forward* e *reverse* a 10 pM; 0,125 µL GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega); 1,5 µL do cDNA e água ultrapura previamente tratada com DEPC para completar o volume. Para a amplificação do cDNA do ToMV foi feita uma desnaturação inicial, a 95 °C, por 2 minutos, seguida por 35 ciclos: 95 °C, por 45 segundos; 49 °C, por 1 minuto e 72 °C, por 1 minuto, com alongação final, a 72 °C, por 10 minutos. Para a amplificação do PMMoV, a única diferença foi a

temperatura de anelamento, que foi de 57 °C. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose, a 0,7%, contrastados com GelRed (Invitrogen).

IC-RT-PCR

No IC-RT-PCR, inicialmente, microtubos de polipropileno da *Axygen Scientific*, com volume de 500 µL, foram cobertos com 400 µL de anticorpo policlonal (Bioreba), diluídos a 1:1000 com o tampão de cobertura. Em seguida, os microtubos foram incubados em estufa à temperatura de 37 °C, por 2 horas e trinta minutos. Logo após a incubação, os tubos foram lavados com o tampão de lavagem, por três vezes, e foi adicionado um volume de 400 µL do antígeno, obtido conforme descrito anteriormente, com posterior incubação, a 4 °C, por 12 horas. Após incubação, os tubos foram novamente lavados com o tampão de lavagem, por 3 vezes, e a síntese do cDNA viral foi efetuada nesse tubo, utilizando-se a mesma metodologia descrita para RT-PCR

Para a reação de PCR, o mix foi composto por 10,0 µL do tampão da enzima (5x), 3,0 µL de MgCl₂ 25 mM, 2,0 µL de DNTPs 10 mM, 1,5 µL de cada um dos *primers* senso e antisense, 0,25 µL de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega); 3 µL do cDNA 2 28,75 µL de água ultrapura, para um volume final de 50 µL. Os ciclos para amplificação do ToMV e do PMMoV e a análise dos produtos foram feitos conforme descrito para RT-PCR.

Método Biológico

Neste caso, as sementes de tomate infectadas com ToMV e de pimentão com PMMoV foram misturadas com sementes sadias para um nível de incidência de 0,1%, ou seja, 1 semente contaminada em 1.000 sementes sadias, com 3 repetições. As semeaduras foram realizadas 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 para a identificação dos sintomas. A confirmação da presença ou da ausência de vírus foi feita por DAS-ELISA.

Avaliação da sensibilidade do DAS-ELISA e IC-RT-PCR na diagnose do ToMV e do PMMoV em sementes de tomate e de pimentão

O teste de sensibilidade das técnicas DAS-ELISA e IC-RT-PCR foi aplicado diretamente nas sementes provenientes de plantas infectadas. O experimento foi composto por doze tratamentos, sendo cada um deles composto pela mistura de sementes sadias e infectadas (Tabela 2), e três repetições.

Tabela 2 Composição dos tratamentos realizados com a combinação de sementes de abóbora produzidas por plantas sadias e infectadas pelo SqMV-LC2

Tratamento	Número de sementes produzidas por plantas infectadas/número de sementes produzidas por plantas sadias
1	1/100
2	1/150
3	1/200
4	1/250
5	1/300
6	1/350
7	1/400
8	1/450
9	1/500
10	1/550
11	1/600
12	0/600

RESULTADO E DISCUSSÃO

Produção de sementes contaminadas naturalmente

As plantas de tomate cv. Santa Clara e de pimentão cultivar Ikeda inoculadas mecanicamente com ToMV inoculadas PMMoV, respectivamente, mostraram sintomas típicos de mosaico nas folhas e nos frutos. Os frutos de tomate produzidos pelas plantas infectadas com ToMV e de pimentão com PMMoV produziram 100% de sementes contaminadas, comprovados pelo DAS-ELISA.

O índice de sementes contaminadas obtido neste experimento, para tomate, foi semelhante aos encontrados por outros autores. Winckel (1965) verificou a presença do ToMV em 94% das sementes coletadas de frutos produzidos por plantas infectadas. Entretanto, os níveis de sementes de pimentão contaminadas com PMMoV ficaram acima dos encontrados por outros autores. Tosic et al. (1980) verificaram a presença do PMMoV em 29% das sementes oriundas de plantas infectadas. McKinney (1952) verificou apenas 22% das sementes de plantas de *Capsicum frutescens* infectadas com PMMoV. Isso poderia estar ligado à suscetibilidade da cultivar ou, mesmo, à agressividade do isolado viral empregado em cada trabalho.

Desenvolvimento de um método para a produção de sementes de tomate e pimentão contaminadas artificialmente ToMV e PMMoV

A contaminação das sementes de pimentão e de tomate inoculadas artificialmente foi checada por DAS-ELISA. Os dados médios das absorbâncias obtidas nesse experimento estão discriminados no Quadro 3.

Tabela 3 Absorbância média obtida no teste DAS-ELISA, com as sementes de tomate inoculadas artificialmente com *Tomato mosaic virus* (ToMV) e pimentão com *Pepper mild motle virus* (PMMoV).

Tratamento ¹	Pimentão	Tomate
	PMMoV	ToMV
0 (não inoculado)	0,115 a	0,110 a
1	0,324 b	0,600 b
30	0,302 b	0,620 b
60	0,320 b	0,634 b
90	0,275 b	0,580 b
120	0,279 b	0,632 b
150	0,300 b	0,589 b
180	0,306 b	0,697 b
210	0,410 b	0,689 b
240	0,431 b	0,590 b
270	0,532 b	0,630 b
CV.	20,89%	18,32%

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). ¹tempo(s) de imersão das sementes no extrato.

Não foi evidenciada diferença estatística entre as absorbâncias de todos os tratamentos, indicando que, para a obtenção de sementes de pimentão contaminadas com PMMoV e de tomate contaminada com ToMV, a imersão da semente no extrato contendo o vírus, por apenas 1 segundo, foi suficiente para que as partículas virais aderissem às mesmas.

Sementes de tomate contaminadas com ToMV apresentaram uma maior absorbância em relação às sementes de pimentão com PMMoV. O fato de ocorrer uma maior absorbância nas sementes de tomate em relação às de pimentão, provavelmente, está relacionado à presença de estruturas denominadas tricomas, que somente estão presentes nas sementes de tomate (Figura 2). Vários autores verificaram que os tricomas são estruturas que propiciam maior aderência de patógenos nas superfícies das sementes, principalmente de bactérias (Silva et al., 2013; Romeiro et. al., 2005).



Figura 2 A: semente de tomate. A seta indica a presença de tricomas. B: semente de pimentão, ausência de tricomas.

Este trabalho foi pioneiro no desenvolvimento desta metodologia para inoculação e produção de sementes contaminadas artificialmente, podendo auxiliar futuras pesquisas com ToMV e PMMoV em sementes de tomate e pimentão.

Métodos para diagnose de *Tobamovirus* em sementes de tomate e pimentão

O teste sorológico DAS-ELISA mostrou boa eficiência na diagnose do ToMV em sementes de tomate e do PMMoV em sementes de pimentão. Das 30 amostras de tomate analisadas, uma foi positiva para ToMV, indicando a presença da única semente infectada que foi empregada no teste. Em sementes de pimentão, os resultados foram semelhantes aos encontrados para tomate, ou seja, das 30 amostras de sementes de pimentão, uma foi positiva para PMMoV.

Quando se empregou o RT-PCR, utilizando o RNA extraído diretamente das sementes, pelo método de Trizol, não foi possível detectar nenhum dos dois vírus. Este fato pode estar relacionado à presença de substâncias inibidoras do RNA viral ou de polimerases, como, por exemplo, diversos compostos fenólicos que podem ser produzidos nas sementes (Dietzgen, 2002). Segundo Veronezi et al. (2012), os compostos fenólicos

mais comumente encontrados nas sementes são taninos e cumarinas. Esses compostos fenólicos podem degradar o RNA viral como também podem inibir funcionamento da DNA polimerase, que é uma enzima importantíssima no processo da PCR (Colinet et al. 1998; Dietzgen, 2002).

O terceiro teste, que combinou a sorologia com o teste molecular, o IC-RT-PCR, também mostrou uma alta eficiência na detecção do ToMV em sementes de tomate e do PMMoV em sementes de pimentão, ambos com 0,1% de incidência. Dos 10 testes com 100 sementes de tomate ou pimentão, com seus respectivos vírus, um teste foi positivo, do mesmo modo constatado pelo DAS-ELISA. Na análise eletroforética em gel de agarose 0,7%, foi observada uma banda de, aproximadamente, 783 pb para ToMV e 757 pb para PMMoV (Figuras 3 e 4).

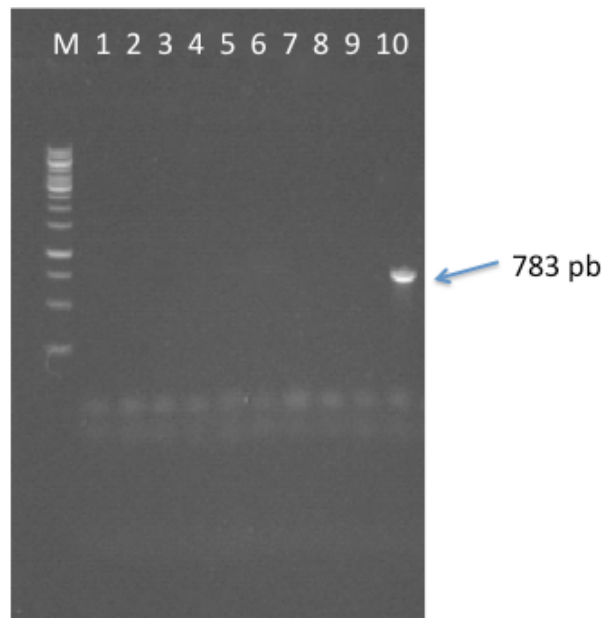


Figura 3 Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos da IC-RT-PCR. M = 1 Kb ladder; 01 a 10 = amostras compostas por 100 sementes de tomate. A banda obtida com *primers* desenhado indica a presença do *Tomato mosaic virus*.

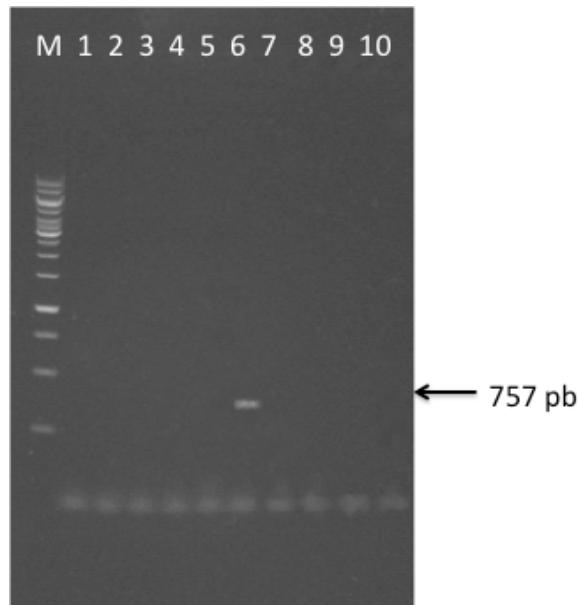


Figura 4 Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos da IC-RT-PCR. M = 1 Kb ladder; 01 a 10 = dez amostras compostas por 100 sementes de pimentão. A banda obtida com *primers* desenhados indica a presença do *Pepper mild motle virus*.

A vantagem do IC-RT-PCR é que, como o vírus é capturado pelo anticorpo e separado da semente, os compostos inibidores supostamente presentes nos seus tecidos não entram em contato com a reação, garantindo a sua plena realização. Outra vantagem do IC-RT-PCR seria a rapidez na realização dos testes. Para a obtenção do RNA pelo IC-RT-PCR, utiliza-se um menor número de etapas, quando comparado com RT-PCR (Jansen et al, 1990; Wetzel et al, 1992; Nolasco et al, 1993; Gall Reculé et al., 2001; Yu et al., 2005).

No teste biológico, utilizando-se lotes de semente com níveis de incidência de 0,1%, não foi possível observar o aparecimento de sintomas que indicassem a infecção das plântulas de tomate e pimentão. Isso deve ter ocorrido porque a contaminação do ToMV e de PMMoV é externa às sementes e nem sempre chega a infectar a planta. Para que ocorra infecção, a

parte aérea ou, mesmo, a raiz das plântulas têm que sofrer ferimentos ou danos mecânicos (Rast, 1973; Gulser et al., 2008; Broadbent, 1976). Isso pode ser facilitado no manejo em viveiro de produção de mudas, pois, após a germinação, o tegumento permanece aderido ao primeiro par de folhas, de onde o vírus pode ser transmitido para a plântula.

Teste de sensibilidade da técnica DAS-ELISA e IC-RT-PCR na detecção do ToMV em sementes de tomate e de PMMoV em sementes de pimentão

No teste sorológico DAS-ELISA, quando foram empregados diversos índices de contaminação das sementes, foi possível detectar o ToMV nas amostras com até 1 semente infectada em 200. A detecção do PMMoV foi menos sensível, tendo sido possível detectar o vírus nas amostras que continham 1 semente infectada em 150.

Quando se empregou o IC-RT-PCR, este mostrou uma sensibilidade cerca de duas vezes maior do que a observada no teste anterior. Na análise eletroforética, em gel de agarose a 0,7%, foi observada a amplificação de uma banda de aproximadamente 783 pB nas amostras em que se utilizou uma semente de tomate, contaminada ToMV, em 400 (Figura 5). O PMMoV, por sua vez, foi detectado nas amostras com, no máximo, 1 semente contaminada em 300. As bandas de 754 pB obtidas na amplificação desse vírus podem ser vistas na Figura 6. Ambos os testes mostraram que a concentração de partículas virais em sementes de tomate deve ser maior do que as observadas em sementes de pimentão, possivelmente devido às suas diferenças morfológicas externas.

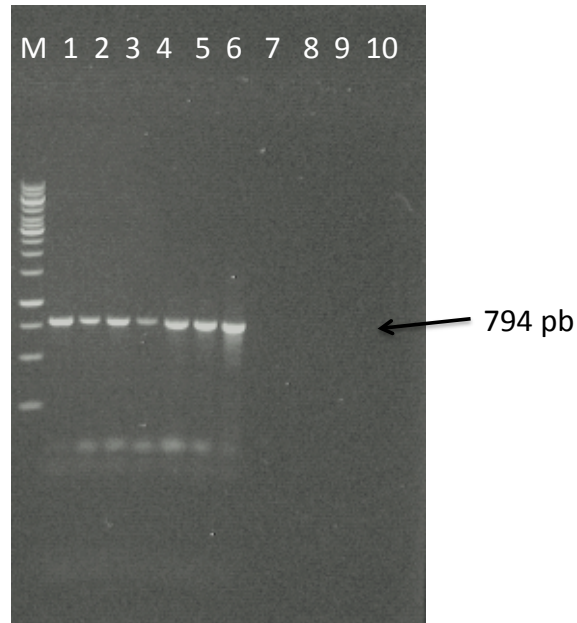


Figura 5 Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos da IC-RT-PCR. ToMV. M = 1 Kb ladder; Número de sementes produzidas por plantas infectadas/número de sementes produzidas por plantas sadias. 1) 1/100; 2) 1/150; 3) 1/200; 4) 1/250; 5) 1/300; 6) 1/350; 7) 1/400 ; 8) 1/450 ; 9) 1/500; 10) 0/500. As bandas obtidas com *primers* desenhados indicam a presença do *Tomato mosaic virus* até a diluição de 1:400.

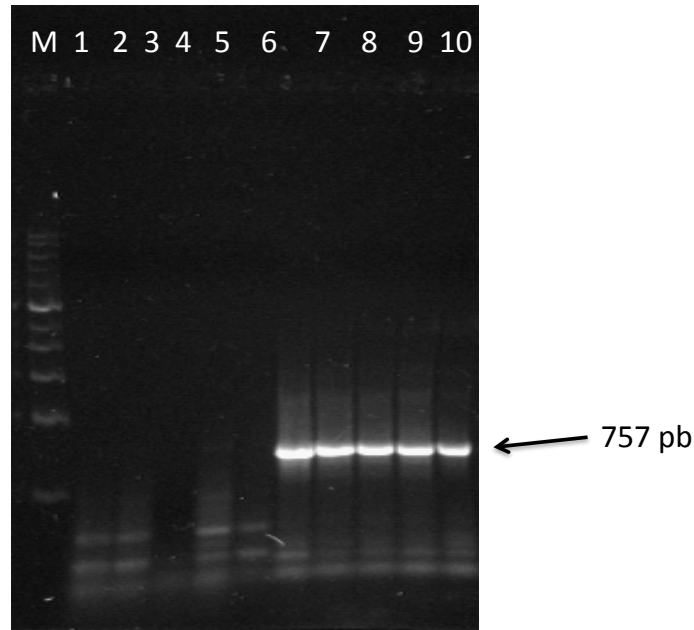


Figura 6 Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos da IC-RT-PCR. PMMoV. M = 1 Kb ladder; análise eletroforética em gel de agarose dos produtos da IC-RT-PCR. M = 1Kb ladder; Número de sementes produzidas por plantas infectadas/número de sementes produzidas por plantas sadias. 1) 0/500; 2) 1/500; 3) 1/450; 4) 1/400; 5) 1/350; 6) 1/300; 7) 1/250 ; 8) 1/200 ; 9) 1/150; 10) 1/100. As bandas obtidas com *primers* desenhados indicam a presença do *Pepper mild motle virus* até a diluição de 1:300.

A IC-RT-PCR é baseada no princípio que combina a imunologia e a RT-PCR na diagnose. A técnica é baseada na captura do antígeno viral específico. Em seguida, a RT-PCR é iniciada, sem haver necessidade de extração do RNA total. Com isso, a IC-RT-PCR apresenta excelente especificidade e alta sensibilidade (Jansen et al, 1990).

Gillaspie et al. (2000) aplicaram o ELISA e IC-RT-PCR na diagnose do *Peanut stripe virus* (PStV) e de *Peanut mottle virus* (PeMV) em sementes de amendoim. O ELISA foi capaz de identificar PStV e PeMV em lotes composto por até 30 sementes. Quando o teste foi aplicado em lotes com mais de 30 sementes, o ELISA não foi eficiente na diagnose. Por meio do IC-RT-PCR, a diagnose foi realizada em lotes compostos por até 100

sementes. Esses resultados demonstraram que o IC-RT-PCR foi mais eficiente, se comparado com ELISA.

Nos estudos realizados por Yang et al. (2012), o IC-RT-PCR foi aplicado na detecção do TMV em solos, tendo a técnica apresentado uma sensibilidade 104 vezes maior, quando comparada com ELISA.

Silva et al. (2011) aplicaram ELISA e IC-RT-PCR na detecção do *Cassava common mosaic virus* (CsCMV) em plantas de mandioca. Parte das amostras analisadas por ELISA foi negativa para CsMV, entretanto, quando as amostras foram submetidas a IC-RT-PCR, os resultados foram positivo. Esses resultados demonstraram a grande sensibilidade do IC-RT-PCR na diagnose de patógenos virais em plantas.

Reis Jr. (1998) avaliaram o ELISA e o IC-RT-PCR na diagnose da bactéria *Glunonacetobacter diazotrophicus* em quatro amostras de cana-de-açúcar. Com a utilização da IC-RT-PCR, três das amostras foram positivas para *G. diazotrophicus*, enquanto, pelo ELISA, todas as amostras foram negativas.

CONCLUSÕES

Plantas infectadas de tomate cv. Santa Clara e de pimentão cv. Ikeda produzem 100% de sementes contaminadas com ToMV e PMMoV.

A produção de sementes de tomate e de pimentão com ToMV e PMMoV, respectivamente, mostrou ser uma metodologia eficiente para formar lotes com diferentes índices de contaminação, com esses vírus, para estudos de detecção e transmissão.

As técnicas DAS-ELISA e IC-RT-PCR mostraram boa eficiência para diagnosticar ToMV em sementes de tomate e o PMMoV em sementes de pimentão e a técnica de RT-PCR não se mostrou adequada.

A técnica biológica não foi eficiente para diagnose do ToMV e PMMoV em sementes de tomate e pimentão.

A técnica de IC-RT-PCR foi mais sensível para a detecção de *Tobamovirus* em sementes de tomate e de pimentão do que a DAS-ELISA.

REFERÊNCIAS

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

BROADBENT, Leonard. Epidemiology and control of tomato mosaic virus. *Annual review of Phytopathology*, v. 14, n. 1, p. 75-96, 1976.

COLINET, D.; NGUYEN, M.; KUMMERT, J.; LEPOIVRE, P.; XIA, F. Z. Differentiation among potyviruses infecting sweet potato based on genus- and virus-specific reverse transcription polymerase chain reaction. *Plant disease*, v. 82, n. 2, p. 223-229, 1998.

DIETZGEN, R.G. Application of PCR in plant virology. In: Khan, J.A. and Dijkstra, J. (eds) *Plant Viruses as Molecular Pathogens*. New York: Food Products Press, pp. 471–500, 2002.

FIGUEIRA, A. R. Manejo de Doenças Viróticas. Lavras: Editora UFLA, 2000, 99p.

GULSER, 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*, v. 146, n. 1, p. 235-242, 2008.

GALL-RECUÉ, G. L.; ZWINGELSTEIN, F.; PORTEJOIE, Y.; GALL, G. Immunocapture-RT-PCR assay for detection and molecular epidemiology studies of Rabbit Haemorrhagic Disease and European Brown Hare

Syndrome viruses. *Journal of virological methods*, v. 97, n. 1, p. 49-57, 2001.

GENDA, Y.; SATO, K.; NUNOMURA, O.; HIRABAYASHI, T.; TSUDA, S. Immunolocalization of Pepper mild mottle virus in developing seeds and seedlings of *Capsicum annuum*. *Journal of General Plant Pathology*, v. 77, n. 3, p. 201-208, 2011.

GENDA, Y.; SATO, K.; NUNOMURA, O.; HIRABAYASHI, T.; OHNISHI, J.; TSUDA, S. Immunolocalization of Pepper mild mottle virus in *Capsicum annuum* seeds. *Journal of General Plant Pathology*, v. 71, n. 3, p. 238-242, 2005.

GILLASPIE J.R.A.G., PITTMAN, R.N.; PINNOW, D. L.; CASSIDY, B. G. Sensitive method for testing peanut seed lots for Peanut stripe and Peanut mottle viruses by immunocapture-reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant disease*, v. 84, n. 5, p. 559-561, 2000.

HULL, R. Methods for assay, detection and diagnosis. In: Matthew's plant virology, San Diego: 4th ed. Academic, 2006, pp. 627-674.

INTERNATIONAL SEED FEDERATION (ISTA). Disponível em: <<https://www.seedtest.org/upload/cms/user/7-026.pdf> 2011>. Acesso em: 10 junho 2011.

JOHANSEN, E.; EDWARDS, M.C.; HAMPTON, R.O. Seed transmission of viruses: current perspectives. *Annual Review of Phytopathology*, v. 32, n. 1, p. 363-386, 1994.

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 (LMV) isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. *Phytopathology*, v. 92, n. 5, p. 563-572, 2002.

MCKINNEY, H. H. Two strains of Tobacco-mosaic virus, one of which is seed-borne in an etch-immune pungent Pepper. *Plant Disease Reporter*, v. 36, n. 5, p. 184-187, 1952.

MUNKVOLD, G. P. Seed pathology progress in academia and industry. *Annual review of phytopathology*, v. 47, p. 285-311, 2009.

VERONEZI, C, M.; JORGE, N. Aproveitamento de sementes de abóboras (*Cucurbita* sp) como fonte alimentar. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.14, n.1, p.113-124, 2012.

NOLASCO, G.; BLAS, C.; TORRES, V.; PONZ, F. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *Journal Virology Methods*, Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 201- 218, 1993.

JANSEN, R. W.; SIEGL, G.; LEMOM, S. M. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 87, n. 8, p. 2867-2871, 1990.

RAST, A. T. B. Systemic infection of tomato plants with tobacco mosaic virus following inoculation of seedling roots. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, v. 79, n. 1, p. 5-8, 1973.

ROMEIRO, R. S. Bactérias Fitopatogênicas. 2ª ed. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. 2005. 417p

SILVA, J.M.; CARNELOSSI, P.R.; BIJORA, T.; FACCO, C.U.; PICOLI, M.H.S.; SOUTO, E.R.; OLIVEIRA, A.J.B.; ALMEIDA, A.M.R. Immunocapture-RT-PCR detection of *Cassava common mosaic virus* in cassava obtained from meristem-tip culture in Paraná state. *Tropical plant pathology*. vol.36, n.5, pp. 271-275, 2011.

SILVA, D. A.; DE CARVALHO, A. D. O.; PEREIRA, M. B.; OLIVARES, F. L.; DO CARMO, M. G. F. Transporte de *Xanthomonas vesicatoria* de sementes para plântulas e mudas de tomate. *Horticultura brasileira*, v. 31, n. 1, p 50-58, 2013.

SIMMONS, H. E.; DUNHAM, J. P.; ZINN, K. E.; MUNKVOLD, G. P.; HOLMES, E. C.; STEPHENSON, A. G. Zucchini yellow mosaic virus: Vertical transmission, seed infection and cryptic infections. *Virus research*, v. 176, n. 1-2, pp. 259-364, 2013.

SASTRY, K. S. Mechanism of Seed Transmission. In: Seed-borne plant virus diseases. *Springer India*, p. 85-100. 2013.

YU, C.; WU, J.; ZHOU, X. Detection and subgrouping of Cucumber mosaic virus isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. *Journal Virology Methods*, v. 123, n. 2, p. 155-161, 2005.

YANG, J. G.; WANG, F. L.; CHEN, D. X.; SHEN, L. L.; QIAN, Y. M.; LIANG, Z. Y.; YAN, T. H. Development of a One-Step Immunocapture Real-Time RT-PCR Assay for Detection of Tobacco Mosaic Virus in Soil. *Sensors*, v. 12, n. 12, p. 1685-1694, 2012.

WETZEL, T.; CANDRESSE, T.; MACQUAIRE, G.; RAVELONANDRO, M.; DUNEZ, J. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, v. 39, n. 1, p. 27-37, 1992