

Caracterização de uma Nova Estirpe do *Tomato mosaic virus* isolada de Tomateiro no Estado de São Paulo

Silvia R. Moreira¹, Marcelo Eiras¹, Alexandre L.R. Chaves¹, Silvia R. Galleti² & Addolorata Colariccio¹

¹Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, ²Unidade Laboratorial de Referência em Microscopia Eletrônica, Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, e-mail: colariccio@biologico.sp.gov.br

(Aceito para publicação em 01/09/2003)

Autor para correspondência: Addolorata Colariccio

MOREIRA, S.R., EIRAS, M., CHAVES, A.L.R., GALLETI, S.R. & COLARICCIO, A. Caracterização de uma nova estirpe do *Tomato mosaic virus* isolada de tomateiro no Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 28:602-607. 2003.

RESUMO

Um vírus isolado em Guaratinguetá, SP, de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) 'Santa Clara' com sintomas característicos de virose, foi estudado por meio de plantas indicadoras e de hospedeiras diferenciais pertencentes a linhagens homozigotas de tomateiro, ensaios de estabilidade *in vitro*, purificação, contrastação negativa, testes sorológicos de ELISA-PTA e imunomicroscopia eletrônica, utilizando-se anti-soros contra diferentes vírus do gênero *Tobamovirus*. O isolado infetou plantas de espécies de amarantáceas, quenopodiáceas e solanáceas. Plantas de *Chenopodium amaranticolor* reagiram com sintomas locais e sistêmicos; *Nicotiana sylvestris* e *N. rustica* reagiram com lesões locais e a linhagem homozigota de tomateiro Tm-2 mostrou-se imune ao vírus. Nas preparações purificadas de contrastação negativa, foram observadas partículas rígidas e alongadas com cerca de 300 nm. O isolado foi identificado como um tobamovírus, com anti-soros contra

o *Tomato mosaic virus* (ToMV) e *Tobacco mosaic virus* (TMV). As hospedeiras diferenciais indicaram se tratar de ToMV. Por meio de RT-PCR, com oligonucleotídeos para o gene da capa protéica de espécies do gênero *Tobamovirus* do subgrupo 1, amplificaram-se fragmentos com 850 pb que foram clonados e seqüenciados. A similaridade de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos variou entre 85 e 91% quando a seqüência do ToMV-SP foi comparada com outras seqüências de ToMV, 75 e 83% quando comparada com as do TMV e 67 e 72% quando comparada com a do *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV). As comparações com outras espécies de tobamovírus apresentaram valores de similaridade inferiores a 65%. Confirmou-se a identidade dos vírus como sendo uma nova estirpe do ToMV.

Palavras-chave adicionais: *Tobamovirus*, hospedeiras diferenciais, sorologia, seqüenciamento.

ABSTRACT

Characterization of a new *Tomato mosaic virus* strain isolated from tomato in the State of São Paulo, Brazil

Tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants 'Santa Clara' from the city of Guaratinguetá in the State of São Paulo, Brazil, show typical virus symptoms in this study. The evaluation was carried out by using indicator plants and differential tomato genotypes with resistance factors of Tm-1, Tm-2 and Tm-2²; virus stability in sap; purification; and negative staining, PTA-ELISA and ISEM. The isolates infected plants from several species of Amaranthaceae, Chenopodiaceae and Solanaceae. *Chenopodium amaranticolor* plants reacted with local and systemic symptoms; *Nicotiana sylvestris* and *N. rustica* reacted with local lesions and the tomato Tm-2 showed immunity. Rod-shaped particles about 300 nm were observed in

negatively stained preparations. The isolate reacted against *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Tobacco mosaic virus* (TMV) antisera. Based on host plants, the isolate was identified as tToMV and by the tomato genotype response, but it could be not identified as the 0 or I ToMV strain. In order to confirm the identity of the virus, RT-PCR was performed with specific primers for the tobamovirus coat protein gene and the amplified DNA was cloned and sequenced. The nucleotides and deduced aminoacids showed 85 and 91% similarity when compared to ToMV sequences, 75 and 83% similarity with those of TMV, and 67 and 72%, with *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV). For other tobamovirus species, the similarity values were lower than 65%. The virus was confirmed as a new ToMV strain.

INTRODUÇÃO

Dentre os fitovírus já relatados causando perdas significativas na cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), destacam-se os pertencentes aos gêneros *Cucumovirus*, *Luteovirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus* e *Tospovirus* (Blancard, 1996; Faria *et al.*, 2000; Colariccio *et al.*, 2001). Do gênero *Tobamovirus*, família *Tombusviridae*, fazem parte os vírus com forma de bastonetes rígidos com 300 nm de comprimento, simetria helicoidal, constituídos de RNA de fita

simples com cerca de 6.400 nucleotídeos e quatro fases abertas de leitura (ORF). Os vírus deste gênero apresentam distribuição mundial em regiões de clima temperado e tropical (Van Regenmortel *et al.*, 2000), são transmitidos por contato mecânico, decorrente das práticas culturais, podendo permanecer em resíduos vegetais, no solo e na água por longos períodos, não havendo, até o momento, vetores conhecidos. Também podem ser transmitidos por sementes, infestando a superfície do tegumento, mucilagem externa, testa e endosperma, não sendo transmitidos por pólen. Possuem ampla

gama de hospedeiras, tendo sido relatados em nove famílias botânicas (Brunt *et al.*, 1996).

Dezessete espécies constituem o gênero *Tobamovirus* (Van Regenmortel *et al.*, 2000; Antignus *et al.*, 2001). Atualmente, o gênero *Tobamovirus* está dividido em três subgrupos, sendo o ToMV pertencente ao subgrupo 1, juntamente com o TMV, *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV), *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) e *Pepper mild mottle virus* (PMMoV). Esta classificação é feita em função de parâmetros como origem de montagem da partícula, número de nucleotídeos presentes entre duas diferentes ORFs, análise filogenética e hospedeiras, sendo o subgrupo 1 denominado subgrupo das solanáceas, o 2 das crucíferas e o 3 das cucurbitáceas, tendo como membro-tipo o TMV, o *Turnipe vein-clearing virus* (TVCV) e o *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), respectivamente (Lartey *et al.*, 1996).

No Brasil, há somente relatos da ocorrência de espécies do gênero *Tobamovirus* pertencentes ao subgrupo 1: o TMV infetando tomateiro, *Nicotiana tabacum* L., *Petunia* sp. e *Zinnia* sp.; o ToMV infetando tomateiro; o ORSV em *Cymbidium* sp.; e mais recentemente o PMMoV infetando pimenta (*Capsicum baccatum* L.) e pimentão (*C. annuum* L.) (Caner *et al.*, 1990; Bastos *et al.*, 1999; Alexandre *et al.*, 2000; Maritan & Gaspar, 2001; Kobori *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2001; Eiras *et al.*, 2003). As primeiras descrições do ToMV, no Brasil, foram feitas por Costa *et al.* (1971), Fernandes *et al.* (1983) e Caner *et al.* (1990), tendo sido feita, neste último relato, a descrição de uma estirpe severa causando quebra da produção em tomateiros na Região de Conchal, SP.

O presente trabalho teve como finalidade a caracterização de um isolado de tobamovírus em tomateiros 'Santa Clara', por meio de análises ao microscópio eletrônico de transmissão, da caracterização biológica da espécie e estirpe utilizando hospedeiras diferenciais, purificação, produção de anti-soro, testes sorológicos e moleculares.

MATERIALE MÉTODOS

Fonte e manutenção do vírus

Tomateiros 'Santa Clara' com sintomas sistêmicos semelhantes à infecção causada pelo ToMV, tais como afilamento, distorção e bolhas nos folíolos, foram coletados no município de Guaratinguetá, Vale do Paraíba-SP.

Visando a manutenção da fonte de vírus, extrato vegetal obtido desses tomateiros foi empregado na inoculação mecânica em plantas de *N. tabacum* 'White Burley' e tomateiro 'Santa Clara', as quais foram mantidas em casa de vegetação. Além disso, tanto o material original quanto as plantas inoculadas foram armazenadas em cloreto de cálcio a -20 °C.

Gama de Hospedeiras

O extrato vegetal empregado nos ensaios de inoculação mecânica para a determinação da gama de hospedeiras foi preparado pela homogeneização de folhas de *N. tabacum* 'White Burley' infetadas, em presença de solução de sulfito de sódio 0,5%, pH 6,0 na proporção de 1:5 (g:ml), adicionando-

se carborundum (400 mesh) como abrasivo. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação para a observação dos sintomas. Foram inoculadas mecanicamente plantas de 27 espécies vegetais e variedades pertencentes a nove famílias botânicas: *Gomphrena globosa* L. (Amaranthaceae), *Chenopodium quinoa* Willd., *C. murale* L. (Chenopodiaceae), *Sonchus oleraceos* L. (Compositae), *Cucumis sativus* L., *Citrullus lunatus* Schrad. (Cucurbitaceae), *Glicine max* (L.) Merrill., *Vigna unguiculata* L. (Fabaceae), *Hybiscus esculentus* L. (Malvaceae), *Passiflora edulis* Sims. (Passifloraceae), *Capsicum annuum* L. 'Reinger', *C. baccatum* L. 'Dedo de Moça', *Datura metel* L., *D. stramonium* L., *L. esculentum* 'Gaúcho', 'Jumbo' e 'Santa Clara', *N. clevelandii* Gray., *N. debneyi* Domin., *N. glutinosa* L., *N. tabacum* 'Samsun', 'Samsun NN', 'TNN', 'Turkish', 'Xanthii' e 'White Burley' (Solanaceae), *Plantago tomentosa* Lam. (Plantaginaceae) e *Tetragonia expansa* L. (Tetragoniaceae). Na ausência de sintomas, foram feitos testes de recuperação do vírus por meio da inoculação mecânica em plantas de *N. tabacum* 'White Burley', a fim de se verificar a ocorrência de latência.

Plantas de *C. amaranticolor*, *N. sylvestris* Speg & Comes., *N. rustica* L., petunia (*Petunia hybrida* Vilm.), diferenciais para TMV e ToMV, e linhagens de tomateiro 'Tm-1', homocigoto resistente ao ToMV, 'Tm-2' e 'Tm-2' homocigotos resistentes ao TMV 1 e 2 e 'Santa Clara' suscetível ao ToMV, foram inoculadas com o isolado e mantidas em casa de vegetação para identificação do vírus por meio da manifestação de sintomas.

Purificação do vírus

Folhas infetadas de *N. tabacum* 'White Burley' foram utilizadas no processo de purificação. Empregou-se o método descrito por Caner *et al.* (1990), com modificações pela adição de 2,5% de polietilenoglicol (PEG) e 0,1 M de NaCl ao volume final do sobrenadante, sob agitação em banho de gelo nas fases de clarificação e precipitação. A preparação semipurificada do vírus foi submetida a gradiente de densidade linear de sacarose (10-40%), o qual foi ultracentrifugado a 80.000 g por 2,5 h. A banda resultante foi recolhida e submetida a uma nova ultracentrifugação nas mesmas condições anteriores. Ao final do processo, foi realizada leitura de absorvância em espectrofotômetro (Shimadzu UV-160A) nos comprimentos de onda entre 200 e 300 nm. A concentração do vírus na preparação purificada foi estimada com base no valor 3 do coeficiente de extinção dos tobamovírus. A porcentagem de ácido ribonucléico (RNA) presente nas partículas virais foi estimada pela leitura de absorvância (A_{260}/A_{280}), segundo a fórmula de Gibbs & Harrison (1976).

Produção de anti-soro

Três injeções da preparação purificada (6 mg/ml) do isolado ToMV-SP, sendo a primeira emulsificada em adjuvante completo de Freund (1:1) e as demais em adjuvante incompleto, foram aplicadas no linfonodo de um coelho da raça Nova Zelândia a cada 15 dias. Uma semana após a última injeção, promoveram-se a sangria e a separação do anti-soro, que foi

titulado por meio de ELISA-PTA, aliquotado e mantido a -20°C .

Testes sorológicos

Utilizou-se o ELISA-PTA para a identificação sorológica do vírus, empregando-se anti-soros contra a capa protéica de quatro espécies de tobamovírus: ToMV-SP, TMV-Pet isolado de petúnia, *Frangipani mosaic virus* (FrMV) e *Ribgrass mosaic virus* (RGMV). Além disso, realizou-se ELISA-PTA confrontando o TMV e o ToMV com os respectivos anti-soros nas diluições 1:4.000 e 1:13.000, para verificar o relacionamento sorológico e a especificidade dos anti-soros produzidos contra o ToMV-SP e o TMV-Pet. Após as reações imuno-enzimáticas, foram realizadas leituras de absorbância ($A_{405\text{ nm}}$) em leitor BioRad modelo 3550.

Para os testes de imunomicroscopia eletrônica, empregaram-se AS-ToMV-SP e AS-TMV-Pet utilizados no ELISA. Para visualizar partículas virais decoradas pelos anti-soros ao microscópio eletrônico de transmissão Phillips EM 208 empregou-se extrato foliar de *N. tabacum* 'White Burley' experimentalmente infetadas com ToMV-SP e TMV-Pet.

Extração de RNAs totais

Para a extração de RNAs totais, 1 g de amostras foliares de tomateiro infetado pelo isolado ToMV-SP foi submetido ao procedimento descrito por Eiras *et al.* (2001). Amostras de RNAs totais de folhas de tomateiro sadias também foram extraídas para servirem como controles negativos.

RT-PCR

A RT-PCR seguiu de acordo com Alexandre *et al.* (2000), partindo-se de 1 μg de RNAs totais extraídos e utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam a ORF da capa protéica (Figura 1A), desenhados por meio do alinhamento de diferentes espécies de Tobamovirus já seqüenciadas. Para a PCR, foi utilizado o termociclador Programmable Thermal Controller - PTC100 (MJ Research), e os reagentes do kit Taq DNA Polymerase recombinant (Gibco BRL), seguindo as recomendações do fabricante. As condições para a PCR constaram de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos a 94°C por 45 s, 55°C por 1 min e 72°C por 1,5 min, com uma extensão final de 10 min a 72°C . Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,0 % (p/v) corado com brometo de etídeo sob luz ultravioleta.

Clonagem

Os produtos amplificados via RT-PCR foram eluídos do gel de agarose, utilizando-se o kit "Concert Rapid Gel Extraction System" (Life Technologies). Em seguida, foram ligados em pGEM-T vector (Promega) e utilizados para a transformação de células competentes de *Escherichia coli* (DH5- α). Todos esses procedimentos seguiram as recomendações dos respectivos fabricantes e indicações contidas em Sambrook *et al.* (1989).

Seqüenciamento

Os produtos amplificados via RT-PCR foram seqüenciados pela técnica de reação de terminação em cadeia,

utilizando-se o seqüenciador automático ABI 377 e o "kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit - Ampli Taq DNA Polymerase" (Perkin Elmer) seguindo as recomendações do fabricante. O alinhamento das seqüências obtidas nos dois sentidos foi feito com o auxílio do programa Sequencer 3.1 (Gene Codes Corporation) e as comparações, com as seqüências existentes no GenBank, foram feitas através do programa "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI), disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

As seqüências foram alinhadas (Clustal X) com outras seqüências de isolados de ToMV, TMV e ORSV depositadas no GenBank, sendo obtido um dendrograma (TreeView 1.5) das seqüências de nucleotídeos. A seqüência de nucleotídeos obtida neste trabalho foi depositada no GenBank com o código de acesso AF411922.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos revelaram uma gama de hospedeiras semelhante àquela descrita na literatura para tobamovírus. Entretanto, algumas hospedeiras empregadas como diferenciais reagiram com sintomas diferentes dos citados (Brunt *et al.*, 1996). *Chenopodium amaranticolor* desenvolveu sintomas sistêmicos semelhantes aos causados pelo RGMV, porém *P. tomentosum* reagiu com lesões locais necróticas não descritas para este último, enquanto *N. rustica*, *N. sylvestris* e *P. hybrida*, reagiram com lesões locais características para o

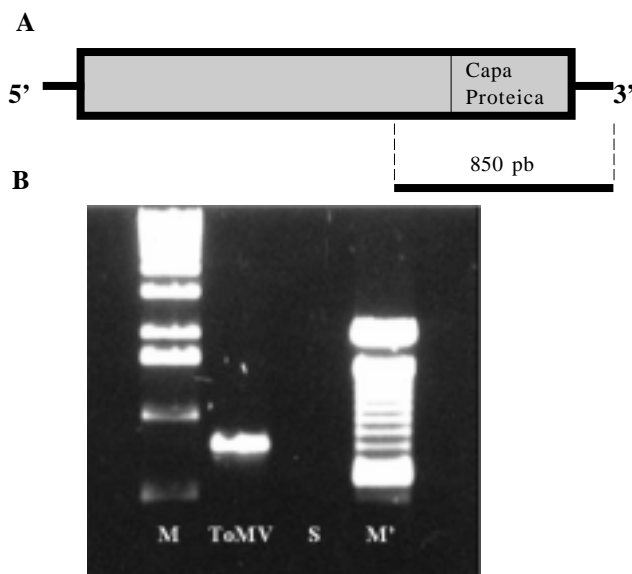


FIG. 1 - A) desenho esquemático das regiões de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e o produto esperado com 850 pares de bases (pb) da amplificação via RT-PCR do *Tomato mosaic virus* (ToMV); B) análise em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo do isolado ToMV-SP, amplificado via RT-PCR, a partir de RNAs totais extraídos de folíolos de tomateiro infetados. ToMV representa os fragmentos de DNA com 850 pb; S representa RT-PCR de RNAs totais extraídos de folíolos de tomateiro sadios; M - 1kb DNA ladder; M' - 100 pb DNA ladder (Gibco-BRL).

ToMV, conforme descrito por Hollings & Huttinga (1976). *Capsicum baccatum* ‘Dedo de Moça’ hospedeira sistêmica do PMMoV (Brunt *et al.*, 1996), reagiu com lesões locais necróticas (Tabela 1). *Gomphrena globosa* reagiu com sintomas necróticos locais e sistêmicos; *T. expansa* e *P. edulis* reagiram com lesões locais cloróticas e necróticas, respectivamente. As demais espécies reagiram com sintomas típicos aos induzidos por tobamovírus, exceto as espécies pertencentes às famílias Compositae, Cucurbitaceae, Fabaceae e Malvaceae que não manifestaram sintomas.

Este isolado manifestou, ainda, sintomas típicos de mosaico, bolhas, distorção, afilamento e necrose foliar nas linhagens de tomateiro homocigotas com genes de resistência Tm-1, Tm-2² e na cultivar ‘Santa Clara’. Tomateiros da linhagem Tm-2² também apresentaram subdesenvolvimento e superbrotação, enquanto os tomateiros da linhagem Tm-2 não manifestaram sintomas (Tabela 1). Os testes de recuperação em *N. tabacum* ‘White Burley’ foram negativos para as plantas assintomáticas. Os resultados possibilitaram a identificação, neste material, de uma estirpe intermediária do ToMV, entre as estirpes 0 e 1, que se designou de ToMV-SP. A ocorrência de estirpes intermediárias já havia sido relatada nos Estados Unidos por Fletcher & McNeill (1971), que observaram a predominância da estirpe 1 e a ocorrência de estirpes intermediárias às estirpes 0 e 1 em 14% dos isolados de ToMV por eles estudados. No Brasil, levantamentos realizados por Bastos *et al.* (1999), em quatro municípios paulistas, revelaram a predominância da estirpe 1, a ocorrência da estirpe 0 e nenhum relato de estirpes intermediárias. Porém, neste trabalho e em avaliações posteriores realizadas com tomateiros provenientes da Região do Vale do Paraíba e Indaiatuba, SP, portanto em outras regiões do estado, verificou-se novamente, a ocorrência da estirpe intermediária do ToMV (Moreira *et al.*, 2000).

TABELA 1 - Resultado da inoculação com o isolado do *Tomato mosaic virus* (ToMV), proveniente de Guaratinguetá (ToMV-SP) em plantas hospedeiras diferenciais utilizadas na identificação das espécies do gênero *Tobamovirus* e linhagens homocigotas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) empregadas para a identificação das estirpes do vírus

Família	Espécie	Sintoma Local*	Sintoma Sistêmico**
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	PC, PN	PC, PN
Plantaginaceae	<i>Plantago tomentosa</i>	PN	-
Solanaceae	<i>Capsicum baccatum</i>	LN	-
	<i>Nicotiana rustica</i>	LN	-
	<i>N. sylvestris</i>	LN	-
	<i>Petunia hybrida</i>	LN	-
	<i>Lycopersicon esculentum</i>		
	Tm -1	PC, PN	PC, PN
	Tm -2 ²	-	-
	Tm2 ²	AF, B, DF, LN	AF, B, DF, LN, N, M, S
	Santa Clara	AF, B, DF, LN	AF, B, DF, LN, N, M, S

*LN – lesão necrótica; PC – pontos cloróticos; PN – pontos necróticos.
**AF – afilamento foliar; B – bolhas; DF – deformação foliar; M – mosaico; N – nanismo; S - superbrotação

No Estado de São Paulo, cerca de 80% das cultivares plantadas provêm de tomateiros do grupo ‘Santa Cruz’, principalmente a cultivar Santa Clara, que predomina devido à resistência dos frutos ao manuseio, transporte e tradição de consumo. Assim, é importante ressaltar a suscetibilidade desta cultivar às diferentes estirpes de ToMV, na qual ocorrem sintomas mais severos do que os causados pelas estirpes de TMV descritas no Brasil.

Pelas propriedades físicas, o ToMV-SP apresentou PIT de 74 °C, PFD de 10⁻⁴ e LIV de 180 dias à temperatura ambiente, resultados que se mostraram semelhantes aos descritos para os tobamovírus (Brunt *et al.*, 1996). Na preparação purificada, a concentração do vírus foi de 3,95 mg/ml, e foram observadas partículas com cerca de 300 nm de comprimento em contração negativa, típicas de tobamovírus. O anti-soro produzido (AS-ToMV-SP) a partir desta preparação apresentou um título de 1:13.000 em ELISA-PTA.

O ToMV-SP reagiu com ToMV e TMV em ELISA-PTA e em imunomicroscopia eletrônica de transmissão, na qual observaram-se partículas rígidas fortemente decoradas com o AS-ToMV-SP (Figura 2) e AS-TMV-Pet. Mas, não reagiu com os anti-soros para as espécies FrMV e RGMV, confirmando os resultados obtidos nas plantas indicadoras.

Confrontando antígenos e anti-soros dos isolados ToMV-SP e TMV-Pet não foi possível diferenciar sorologicamente o ToMV de TMV, uma vez que os valores de absorvância da reação cruzada foram de 0,737 e 0,687, respectivamente. Caner *et al.* (1990) e Duarte *et al.* (2002) já haviam verificado a necessidade de utilizar anticorpos monoclonais para diferenciar sorologicamente estas espécies.

Foram obtidos fragmentos de DNA com 850 pb (Figura 1B), sequenciados (Figura 3) e comparados com outros depositados no GenBank. A similaridade de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos variou entre 85 e 91% quando comparada com outras seqüências de ToMV, 75 e 83% com o TMV e 67 e 72% com o ORSV (Tabela 2). As comparações com outras espécies do gênero *Tobamovirus* apresentaram valores de similaridade inferiores a 65% confirmando a identidade do vírus como

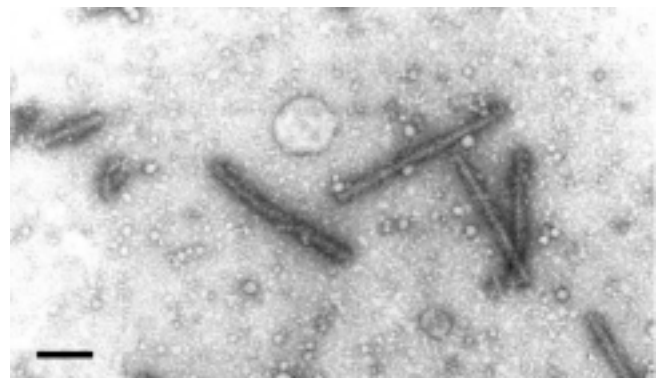


FIG. 2 - Micrografia eletrônica de imunomicroscopia de partículas típicas de tobamovírus de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) ‘Santa Clara’, proveniente de Guaratinguetá, utilizando o AS-ToMV-SP. A barra corresponde a 100 nm.

ATG TCT TAC GCT ATT ACT TCT CCG TCA CAA TTC GTG TTT TTG TCA 45
M S Y A I T S P S Q F V F L S
TCA GCA TGG GCC GAC CCT GTA GAA TTA ATA AAT ATT TGT ACT AAT 90
S A W A D P V E L I N I C T N
TCG TTA GGT AAC CAG TTT CAA ACA CAA CAA GCA AGG ACT ACT GTT 135
S L G N Q F Q T Q Q A R T T V
CAA CAG CAG TTC AGC GAG GTG TGG AAA CCT TTC CCT CAA AGT ACT 180
Q Q Q F S E V W K P F P Q S T
GTC AGG TTC CCT GAC ATT GTA TTT AAG GTG TAT AGG TAT AAT GCG 225
V R F P D I V F K V Y R Y N A
GTT ATA GAT CCT CTA ATT ACT GCA TTG CTG GGA ACT TTC GAT ACT 270
V I D P L I T A L L G T F D T
AGA AAT AGA ATA ATA GAG GTA GAA AAT CAG CAA AGC CCG ACT ACA 315
R N R I I E V E N Q Q S P T T
GCC GAA ACA TTG GAT GCC ACT CGC AGA GTG GAC GAT GCT ACG GTT 360
A E T L D A T R R V D D A T V
GCG ATC AGG TCC GCT ATT AAT AAT TTA GTT AAT GAA TTG GTA AGA 405
A I R S A I N N L V N E L V R
GGA ACA GGT TTC TAC AAC CAG AGT ACT TTT GAA AGT ATG TCT GGG 450
G T G F Y N Q S T F E S M S G
TTG GCC TGG ACT TCT GCG CCA GCG TCC TAA 480
L A W T S A P A S *

FIG. 3 - Sequência de nucleotídeos (linha superior) e de aminoácidos deduzidos (linha inferior) do gene da capa protéica (CP) do *Tomato mosaic virus* isolado de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) 'Santa Clara' (ToMV-SP). Os nucleotídeos estão numerados a partir da extremidade 5'. O asterisco (*) indica o códon de parada da ORF da CP; O número de acesso da seqüência no Genbank é AF411922.

TABELA 2 - Similaridade (%) de nucleotídeos (abaixo da diagonal) e aminoácidos deduzidos (acima da diagonal) entre diferentes espécies e isolados de tobamovírus. As seqüências utilizadas nas comparações estão depositadas no GenBank

Isolado*	ToMV-SP	ToMV-I	ToMV-1	TMV-pet	TMV-L	TMV-D	ORSV
ToMV-SP	-	91	91	83	83	81	72
ToMV-I	85	-	99	82	81	81	72
ToMV-1	85	99	-	81	81	81	72
TMV-pet	76	74	74	-	97	95	70
TMV-L	76	74	74	96	-	98	70
TMV-D	75	73	73	95	98	-	68
ORSV	67	66	66	63	63	62	-

*ToMV-SP - isolado de tomateiro caracterizado neste trabalho (AF411922); ToMV-I isolado de *Impatiens* sp. (AY063743); ToMV-1 (AJ011934); TMV-pet - isolado de *Petunia* sp. (AY029262); TMV-L (X02144); TMV-D (X70884); ORSV (AF033848). *Entre parênteses estão os códigos de acesso no GenBank.

sendo o ToMV, estando estes valores de acordo com os obtidos por outros autores (Lartey *et al.*, 1996).

No dendrograma, o ToMV-SP está isolado em um ramo, porém, compartilhando um mesmo ancestral com outros isolados de ToMV e TMV (Figura 4). Ohno *et al.* (1984) sugeriram que o TMV (estirpe comum e de tomate) provinha de um ancestral comum. Análises filogenéticas da ORF da capa protéica de espécies do gênero *Tobamovirus* indicam a proximidade entre

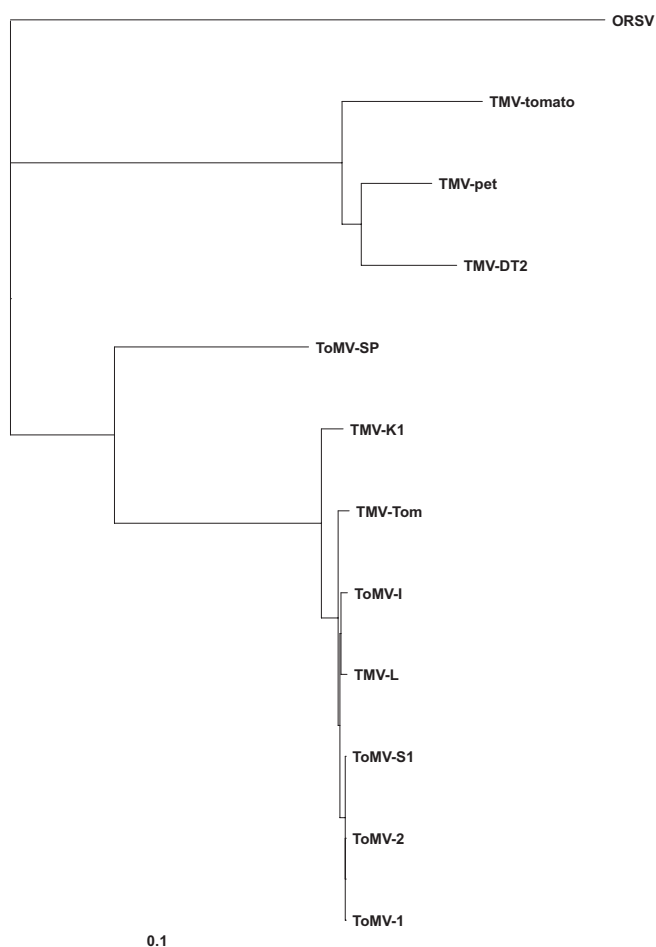


FIG. 4 - Dendrograma (Treeview 1.5) obtido por meio do alinhamento (Clustal X) de nucleotídeos de espécies de tobamovírus do subgrupo 1 depositados no GenBank: ORSV (AF033848); TMV-tomato (AF126505); TMV-Pet (AY029262); TMV-DT2 (X70884); ToMV-SP (AF411922); TMV-K1 (AJ243571); TMV-tom (AF103779); ToMV-I (AY063743); TMV-L (X02144); ToMV-S1 (Z98201); ToMV-2 (AJ32845); ToMV-1 (AJ011934). A barra significa 0,1 substituições de nucleotídeos por sítio.

ToMV e TMV, o que dificulta a diferenciação destas pelo uso de anti-soros policlonais (Lartey *et al.*, 1996). Gibbs (1999) também observou que as espécies do subgrupo 1 compartilham de um mesmo ancestral comum.

A correta identificação de vírus infetando tomateiros é importante pois esta é uma das hortaliças mais cultivadas no mundo. O Brasil está entre os nove maiores produtores (Duarte *et al.*, 2002) e o estado de São Paulo é responsável por cerca de 33% da produção nacional (IEA, 2000). Para tanto, a demanda anual de sementes é de aproximadamente 80 ton. Deste total, cerca de 40% é importada, principalmente dos Estados Unidos (Nascimento *et al.*, 1994), representando uma possível entrada de novas estirpes de tobamovírus, transmitidos por sementes. Colariccio *et al.* (2002), empregando sorologia, detectaram o ToMV-SP em sementes de linhagens homozigotas (Tm-2²) experimentalmente infetadas.

Neste trabalho, observou-se que somente a linhagem

com o alelo Tm-2, em homozigose, apresentou resistência ao ToMV-SP, sugerindo que os tomateiros em homozigose (Tm-2/Tm-2) seriam os mais recomendados para o desenvolvimento de cultivares resistentes à essa estirpe. Estes dados fornecem subsídios para estratégias de controle e adequação dos programas de melhoramento genético, visto que os tobamovírus do subgrupo 1 têm sua provável origem nas Américas, em regiões da Bolívia, Brasil e Peru, havendo, portanto, uma maior pressão de inóculo, principalmente devido à existência de espécies de *Nicotiana* já descritas como originárias destas mesmas regiões e hospedeiras naturais destes tobamovírus (Gibbs, 1999).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Pesquisadores M.A.V. Alexandre (Instituto Biológico, São Paulo, Brasil), P. Roggero (Istituto di Virologia Vegetale, Torino, Itália) e D.E. Lesemann (Instituto de Biologia, Braunschweig, Alemanha) pelos anti-soros cedidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTIGNUS, Y., WANG, Y., PEARLSMAN, M., LACHMAN, O., LAVI, N. & GAL-ON, A. Biological and molecular characterization of a new cucurbit-infecting *Tobamovirus*. *Phytopathology* 91:565-571. 2001.
- BASTOS, H.B., PAVAN, M.A. & SILVA, N. Estirpes do vírus do mosaico do tomateiro presentes em regiões produtoras de tomate do Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* 1:14-16. 1999.
- BLANCARD, D. *Enfermidades del tomate*. Editora Mundi-Prensa, INRA, Paris, 1996.
- BRUNT, A., CRABTREE, K., DALLWITZ, M.J., GIBBS, A.J. & WATSON, L. *Viruses of Plants: Descriptions and lists from the vide data base*. CABI International, United Kingdom, 1996.
- CANER, J., COLARICCIO, A., CHAGAS, C.M., ALBA, A.P.C. & VICENTE, M. Identificação de um isolado do vírus do mosaico do tomateiro (ToMV) no Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 15:347-350. 1990.
- COLARICCIO, A., ROGGERO, P., CHAVES, A.L.R. & EIRAS, M. *Lateral-flow*: um teste rápido para detecção de fitovírus. *Summa Phytopathologica* 28:104. 2002 (Resumo).
- COLARICCIO, A., EIRAS, M., CHAVES, A.L.R., ROGGERO, P. & CHAGAS, C.M. Diversidade de tospovírus em olerícolas no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* 27:177-182. 2001.
- COSTA, A.S., NAGAI, H. & COSTA, C.L. Mancha parda interna do tomate associada à infecção pelo vírus do mosaico do fumo. *Revista de Olericultura* 11:77-78. 1971 (Resumo).
- DUARTE, K.M.R., GOMES, L.H., ANDRINO, F.G., LEAL Jr., G.A., SILVA, F.H.B., PASCHOAL, J.A.R., GIACOMELLI, A.M.B. & TAVARES, F.C.A. Identificação do vírus do mosaico do tomateiro (ToMV) *Tobamovirus*, por meio de anticorpos monoclonais. *Scientia Agrícola* 59:107-112. 2002.
- EIRAS, M., CHAVES, A.L.R., COLARICCIO, A., HAKAKAVA, R., ARAUJO, J. & CHAGAS, C.M. Caracterização do *Tomato chlorotic spot tospovirus* isolado de jiló no Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 27:285-291. 2002.
- FARIA, J.C., BEZERRA, I.C., ZERBINI, F.M., RIBEIRO, S.G. & LIMA, M.F. Situação atual das geminiviruses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 25: 125-137. 2000.
- FERNANDES, J.J., CARVALHO, M.G. & ALMEIDA, E.G. Distribuição do mosaico em tomates de duas regiões produtoras de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira* 8:625. 1983 (Resumo).
- FLETCHER, J.T. & MCNEILL, B.H. The identification of strains of tobacco mosaic virus from crops in Southern Ontario. *Canadian Journal of Microbiology* 17:123-128. 1971.
- GIBBS, A. & HARRISON, B.D. *Plant virology. The principles*. Edward Arnold Publication. London. 1976.
- GIBBS, A. Evolution and origins of tobamoviruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 354:593-602. 1999.
- HOLLINGS, M. & HUTTINGA, H. *Tomato mosaic virus*. CMI/AAB. *Descriptions of plant viruses*. n.º. 156, 1976.
- Informações Estatísticas da Agricultura (Anuário IEA-1999), São Paulo, Instituto de Economia Agrícola, Governo do Estado de São Paulo, v.11, n.1, 2000, pp.233.
- KOBORI, R.F., WIERZBICKI, R., DELLA VECCHIA, P.T., PAVAN, M.A. & REZENDE, J.A.M. Ocorrência do *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) em pimentão (*Capsicum annuum*) cultivado sob estufas no Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 26:516. 2001 (Resumo).
- LARTEY, R.T., VOSS, T.C. & MELCHER, U. *Tobamovirus* evolution: genes overlaps, recombination, and taxonomic implications. *Molecular Biological Evolution* 13:1327-1338. 1996.
- MARITAN, A.C. & GASPAR, J.O. Infecção de *Zinnia elegans* pelo *Tobacco mosaic virus* resultante da interação com um potyvírus. *Fitopatologia Brasileira* 26:533. 2001 (Resumo).
- MOREIRA, S.R., COLARICCIO, A., CHAVES, A.L.R., EIRAS, M. & GALLETI, S.R. Identificação de uma nova estirpe do vírus do mosaico do tomateiro através de hospedeiras diferenciais. *Summa Phytopathologica* 26:100. 2000 (Resumo).
- MOREIRA, S.R., COLARICCIO, A., EIRAS, M. & CHAVES, A.L.R. Caracterização molecular do *Tomato mosaic virus* isolado de tomateiro no Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 26:515. 2001 (Resumo).
- NASCIMENTO, W.M., SILVA, J.B. & PESSOA, H.B.S.V. Produção de sementes de tomate para a indústria em Brasília / DF. *Horticultura Brasileira* 12:196-198. 1994.
- OHNO, T., AOYAGI, M., YAMANASHI, Y., SAITO, H., IKAWA, S., MESHII, T. & OKADA, Y. Nucleotide sequence of the Tobacco mosaic virus (tomato strain) genome and comparison with the common strain genome. *Journal of Biochemistry* 96:1915-1923. 1984.
- RIVAS, E.B., DUARTE, L.M.L., ALEXANDRE, M.A.V. & CHAGAS, C.M. Viroses em orquídeas no Estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico* 63:31-35. 1996.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARSTENS, E.B., ESTES, M.K., LEMON, S.M., MANILOFF, J., MAYO, M.A., McGEACH, D.J., PRINGLE, C.R. & WICKNER, R.B. *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses*. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, California, USA. 2000.