

**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS  
AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO AGRONÔMICO**

IDENTIFICAÇÃO DO PVY<sup>0</sup>-1 EM LAVOURAS  
COMERCIAIS DE TOMATEIROS E REAÇÃO  
DE ACESSOS DE *Lycopersicon* spp.

SILVIA REGINA LUZ PALAZZO

Campinas  
2005

SILVIA REGINA LUZ PALAZZO

IDENTIFICAÇÃO DO PVY<sup>0</sup>-1 EM LAVOURAS  
COMERCIAIS DE TOMATEIROS E REAÇÃO  
DE ACESSOS DE *Lycopersicon* spp.

Dissertação de Mestrado apresentado à  
Comissão de pós-graduação do IAC como  
parte dos requisitos para realização da  
Defesa de mestrado em Agricultura Tropical  
e Subtropical na Área de concentração em  
Melhoramento Genético Vegetal

Orientadora: Dra. Addolorata Colariccio  
Co-orientadora: Dra. Arlete Marchi Tavares  
de Melo

Campinas  
2005

Dedico este trabalho a Paulo, Carmen, Deniza e Thaís, pelo apoio e confiança depositados em mim.

## **AGRADECIMENTOS**

À Pesquisadora Científica Dra. Addolorata Colariccio do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico pela oportunidade, orientação, confiança, amizade e carinho.

À Pesquisadora Científica Dra. Arlete Marchi Tavares de Melo da Unidade Hortaliças do Instituto Agrônomo pela co-orientação, receptividade e apoio nos trabalhos.

Ao Instituto Biológico e ao Instituto Agrônomo pela oportunidade de realização dos experimentos e pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos Pesquisadores Científicos do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico pela amizade e colaboração durante os trabalhos.

A pesquisadora científica Silvia Rocha Moreira da Unidade Hortaliças do Instituto Agrônomo pela amizade e colaboração.

Aos estagiários do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico.

Aos funcionários do Instituto Biológico e Instituto Agrônomo pelo apoio e colaboração na realização da pós-graduação.

A todas as pessoas que diretamente e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Não é porque certas coisas são difíceis que nos não ousamos. É justamente porque não ousamos que tais coisas são difíceis”

Sêneca, 55d.c

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	04
2.1 O gênero <i>Lycopersicon</i> spp.....	04
2.2 Panorama varietal.....	07
2.3 <i>Potato vírus Y</i> (PVY) .....	08
2.3.1 Características gerais.....	08
2.3.2 Estrutura e organização do genoma.....	09
2.3.3 Replicação.....	10
2.3.4 Transmissão.....	10
2.4. Identificação do PVY.....	11
2.4.1 Círculo de hospedeiras.....	12
2.4.2 Sintomas.....	14
2.4.3 Morfologia das partículas virais.....	15
2.4.4 Sorologia.....	15
2.5 Importância econômica do PVY.....	17
2.6 Resistência ao PVY no gênero <i>Lycopersicon</i> spp.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Local de realização dos experimentos.....	20
3.2 Semeadura e transplante.....	20

3.3 Fonte e manutenção do vírus.....	21
3.4 Teste de transmissão mecânica.....	23
3.5 Identificação dos isolados de tomateiro.....	23
3.5.1 Teste biológico.....	23
3.5.2 Teste sorológico.....	24
3.5.2.1 Enzyme Linked Immonosorbent Assay-Double Antibody Sandwich (DAS-ELISA) .....	24
3.5.2.2 Enzyme Linked Immonosorbent Assay-Plate Trapped Antigen (PTA-ELISA).....	25
3.6 Avaliação da reação de acessos de <i>Lycopersicon</i> spp. pertencentes ao BAG do Instituto Agrônomo, Campinas.....	26
3.6.1 Acessos.....	26
3.7 Avaliação da reação dos acessos de <i>Lycopersicon</i> spp. ao isolado de vírus tomateiro 'Alambra'.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 Identificação e manutenção da infectividade dos isolados de vírus.....	30
4.2 Transmissão mecânica dos isolados de vírus provenientes de tomateiros.....	30
4.3 Identificação dos isolados de vírus provenientes de tomateiros.....	31
4.3.1 Teste biológico.....	31
4.3.2 Teste sorológico.....	39
4.4 Avaliação de acessos de <i>Lycopersicon</i> spp ao PVY <sup>O</sup> -1.....	41
5. CONCLUSÕES.....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de representação do genoma potyviral.....	09
<b>Figura 2.</b> <i>Lycopersicon esculentum</i> ‘Álambra’ com sintomas de amarelecimento foliar A) coletado em Elias Fausto e B) coletado em Mogi-Guaçu.....	22
<b>Figura 3.</b> Espécies de nicotianas com o isolado ToAl-EF com sintomas sistêmicos de mosaico bolhoso e redução foliar A) <i>N. tabacum</i> ‘WB’ e B) <i>N. debneyi</i> .....	34
<b>Figura 4.</b> <i>Lycopersicon esculentum</i> ‘Álambra’ inoculado com o isolado ToAl-EF com sintomas sistêmicos A) risca amarela e B) Risca amarela e redução foliar.....	37
<b>Figura 5.</b> Acessos de <i>Lycopersicon</i> spp. inoculados com o isolado PVY <sup>o</sup> –1 com sintomas sistêmico de risca amarela, mosaico bolhoso A) Acesso 15- F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> ) experimento I e B) Acesso 14- F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-3) x (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-2) experimento II.....	42



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Plantas de tomateiros com sintomas semelhantes a vírus nas principais regiões do Estado de São Paulo.....	21
<b>Tabela 2.</b> Acessos de <i>Lycopersicon</i> spp. pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Instituto Agronômico, Campinas.....	27
<b>Tabela 3.</b> Critérios de avaliação do comportamento dos acessos de <i>Lycopersicon</i> ssp utilizados nos ensaios experimentais.....	28
<b>Tabela 4.</b> Sintomas manifestados pelas plantas indicadoras utilizadas para determinar o círculo de hospedeiras para cada um dos isolados de vírus provenientes de tomateiros, São Paulo novembro de 2003.....	32
<b>Tabela 5.</b> Sintomas causados em cultivares comerciais de tomateiros pelos seis isolados de vírus provenientes de tomateiros, São Paulo março de 2004.....	36
<b>Tabela 6.</b> Reação sorológica em PTA-ELISA e DAS-ELISA dos vírus isolados de tomateiros com antissoros para diferentes espécies de vírus.....	39
<b>Tabela 7.</b> Valores das médias em absorbância $A_{405}$ no DAS-ELISA dos vírus de tomateiros com anticorpos monoclonais para identificar estirpes de PVY.....	40
<b>Tabela 8.</b> Sintomas manifestados pelos acessos de <i>Lycopersicon</i> spp. ao isolado PVY <sup>O</sup> -1 no experimento I, São Paulo outubro de 2004.....	43
<b>Tabela 9.</b> Sintomas manifestados pelos acessos de <i>Lycopersicon</i> spp. ao isolado PVY <sup>O</sup> -1 no experimento II, São Paulo dezembro de 2004.....	44
<b>Tabela 10.</b> Reação de acessos de <i>Lycopersicon</i> spp. ao isolado PVY <sup>O</sup> -1 no experimento I.....	46
<b>Tabela 11.</b> Reação de acessos de <i>Lycopersicon</i> spp. ao isolado PVY <sup>O</sup> -1 no experimento II.....	47
<b>Tabela 12.</b> Valores do peso da matéria fresca (PF) e do peso secos (PS) medidos em gramas (g) da parte aérea utilizadas dez plantas por experimento dos acessos de <i>Lycopersicon</i> ssp. inoculados com o vírus PVY <sup>O</sup> -1.....	49
<b>Tabela 13.</b> Análise estatística pelo teste $\chi^2$ a 1% de significância da avaliação de acessos de <i>Lycopersicon</i> spp. ao PVY <sup>O</sup> -1.....	50

PALAZZO, Silvia R. L Identificação do PVY<sup>O</sup>-1 em lavouras comerciais de tomateiros e reação de acessos de *Lycopersicon* spp. 2005. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical)- Instituto Agrônômico.

## RESUMO

Plantas de tomateiros com sintomas de amarelecimento foliar generalizado, semelhantes aqueles causados por vírus, procedentes de Campinas, Itu, Sumaré, Elias Fausto, Monte Mor e Mogi-Guaçu no Estado de São Paulo foram submetidas à identificação biológica pela determinação do círculo parcial de hospedeiras, composto por plantas indicadoras e diferenciadoras pertencentes à família das Chenopodiaceas e Solanaceas e identificação sorológica por PTA-ELISA para as espécies *Potato virus Y* (PVY), Pepper yellow mosaic virus (PepYMV), *Cumcuber mosaic virus* (CMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) e DAS-ELISA com antissoros policlonais para as espécies *Tomato spot wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV) e com anticorpos monoclonais para as estirpes do PVY comum (PVY<sup>O</sup>), PVY necrótico (PVY<sup>N</sup>) e PVY clorótico (PVY<sup>C</sup>). No teste sorológico de PTA-ELISA e DAS-ELISA, os isolados reagiram positivamente com a espécie PVY estirpe comum. As plantas indicadoras inoculadas com as diferentes amostras reagiram com sintoma local em *Chenopodium amaranticolor* e sintomas de mosaico sistêmico em *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* 'WB', *N. sylvestris*, *N. debneyi*, *N. tabacum* 'Samsun' mosaico amarelo em tomateiro 'Alambra' e particularmente, com a ausência de sintomas em *Datura stramonium*, *D. metel* e *C. annuum* 'Magda'. A ausência de sintomas em 'Magda' possibilitou a identificação nestas amostras do PVY estirpe comum patotipo 1 (PVY<sup>O</sup>-1). Dezenove acessos de tomateiros selvagens e um híbrido suscetível 'Alambra', empregado como controle positivo. O delineamento dos experimentos foi inteiramente casualizado e a reação dos acessos foi avaliada pela manifestação dos sintomas, pela recuperação biológica e sorológica do vírus a partir dos acessos inoculados e análise do  $\chi^2$  utilizando as proporções de plantas com e sem sintomas do vírus e com resultados de recuperação positivos ou negativos em PTA-ELISA. Os cultivares comerciais foram altamente suscetíveis ao vírus. Dos acessos avaliados a espécie *L. peruvianum*, LA-371-2 e o irradiado 1C apresentaram um grande número de plantas imunes constituindo fontes potenciais de genes de resistência ao PVY<sup>O</sup>-1. As progênies segregantes também apresentaram plantas imunes que serão selecionadas para a continuidade do programas de melhoramento de tomate do IAC visando a resistência ao PVY.

**Palavras-chave:** Tomate, *Lycopersicon* spp, Resistência genética, *Potyvirus*, *Potato virus Y*, sorologia.

PALAZZO, Silvia R. L. Identification of PVY<sup>O</sup>-1 in tomatoes commercial crops and reaction of *Lycopersicon* spp access. 2005. Dissertation in Tropical e Subtropical Agriculture- Instituto Agronômico.

## ABSTRACT

Samples of tomatoes plants with generalized virus-like-symptoms of foliar yellow mosaic, collected, from 2003 to 2004, in Campinas, Itú, Sumaré, Elias Fausto, Monte-Mor and Mogi-Guaçu producing regions of São Paulo State, were submitted to mechanical inoculation, in host plants of Chenopodiaceae, Solanaceae, in differential sweet peppers, and to serological identification in PTA-ELISA with polyclonal antiserum against *Potato virus Y* (PVY), Pepper yellow mosaic virus (PePYMV), *Cumcuber mosaic virus* (CMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV); DAS-ELISA with policlonal antiserum for the *Tomato spot wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV) and DAS-ELISA with monoclonal antibodies against PVY common strain (PVY<sup>O</sup>), PVY chlorotic strain (PVY<sup>C</sup>) and PVY necrotic strain (PVY<sup>N</sup>). In PTA-ELISA all the samples reacted positively to the antiserum of PVY and negatively for the antiserum to others virus species. In DAS-ELISA with monoclonal antibodies, this samples reacted positively with the PVY<sup>O</sup>. The inoculated plants, reacted with local symptom in *Chenopodium amaranticolor* and sistemic symptoms of mosaic in *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* 'WB', *N. sylvestris*, *N. debneyi*, *N. tabacum* 'Samsun', yellow mosaic in tomato 'Alambra' and particularly with the absence of symptoms in *Datura stramonium*, *D. metel* and *C. annuum* 'Magda'. The absence of symptoms in 'Magda' allowed to identifying the PVY<sup>O</sup> patotipo 1 (PVY<sup>O</sup>1). Nineteen access of *Lycopersicon* spp. to the active bank of germoplasm of the IAC, for to evaluate the reaction of tomatoes access to this isolated and using as positive control the hybrid 'Alambra'. The experimental delineation was randomized and the plants reaction were evaluated by the manifestation of the symptoms, the biological and serological recovery of the virus and by the  $\chi^2$  analysis using the ratios between plants with and without virus symptoms and positive or negative in PTA-ELISA. In evaluated access was verified that most of them had been tolerant behavior to PVY<sup>O</sup>-1, but *L. peruvianum*, LA-371-2 and radiated 1C had been a great number of plants with immunity behavior, providing a potential sources of resistance genes that could be used in future breeding programs.

**Key-words:** Tomato, *Lycopersicon* spp., Genetic resistance, *Potyvirus*, *Potato virus Y*, serological.

## 1 INTRODUÇÃO

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma das hortaliças mais cultivadas no mundo, e sua produção mundial supera 70 milhões de toneladas/ano sendo considerada uma das culturas mais importantes. Seu cultivo no mundo atende economicamente a duas cadeias produtivas distintas, a produção de tomate industrial e a produção para consumo *in natura*. O primeiro é produzido sob contato produtor-indústria, o segundo tem características próprias da cadeia produtiva de hortaliças (CAMARGO FILHO, 2001). Sob o ponto de vista social, a tomaticultura nacional é o segundo segmento mais importante do agronegócio olerícola, abrigando em sua cadeia produtiva mais de 10.000 produtores, com 60.000 famílias de trabalhadores, compostas por em efetivo de mais de 200.000 pessoas (JUNQUEIRA, 1997). Originário da parte ocidental da América do Sul, entretanto sua domesticação ocorreu no México e, no século XV foi levado para outras partes do mundo por viajantes europeus (MIRANDA, 1995).

A produção brasileira de tomate em 2003 foi de 4,2 milhões de toneladas em uma área plantada de 71 mil hectares, com o rendimento médio de 59 t/ha. As principais regiões produtoras são: a Sudeste (1,9 milhões de toneladas) representada principalmente pelos Estados de São Paulo que apresenta a segunda maior produção com 765 mil toneladas com rendimento médio de 64 t/ha e o Estado de Minas Gerais com a terceira maior produção de 637mil toneladas com rendimento médio de 65 t/ha; e a região Centro-oeste (1,1 milhões de toneladas) onde está localizado o maior produtor de tomate do Brasil o Estado de Goiás com 951mil toneladas com um rendimento médio de 76 t/ha. (LSPA-IBGE, 2003).

O tomate cultivado pertence à família Solanaceae e apresenta suscetibilidade a inúmeros patógenos causadores de diferentes tipos de doenças. Entre os patógenos de importância econômica para a cultura, destacam-se os vírus. Dentre os fitovírus já relatados causando perdas significativas na cultura do tomateiro encontram-se os pertencentes aos gêneros *Cucumovirus*, *Geminivirus*, *Luteovirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus* e *Tospovirus* (BLANCARD, 1996; FARIA *et al.*, 2000; COLARICCIO *et al.*, 2000; 2001).

Em tomateiro, os *Potyvirus* induzem sintomas de clareamento de nervuras, pontuações e mosaico amarelo e redução dos folíolos. O *Potato virus Y* (PVY) é o vírus mais importante em solanáceas cultivadas incluindo tomate, pimentão, batata e tabaco, causando sérios danos a essas culturas em todo o mundo, sendo transmitido por afídeos, de modo não persistente (SHUKLA *et al.*, 1994).

Existem várias estirpes do PVY, sendo as mais frequentes PVY<sup>O</sup> (estirpe comum), PVY<sup>N</sup> (estirpe necrótica), PVY<sup>C</sup> (estirpe clorótica), entretanto, além destas, algumas estirpes não podem ser identificadas (COLARICCIO, 1996). Para a identificação e classificação do PVY, pode-se empregar critérios sintomatológicos como a utilização de plantas indicadoras (MATTHEWS, 1993); sorológicos, com utilização de anticorpo monoclonal contra as estirpes de PVY (MATTHEWS, 1991; SHUKLA *et al.*, 1994) e moleculares onde as seqüências de nucleotídeos ou aminoácidos do genoma viral são utilizadas para classificar as espécies e estirpes do gênero *Potyvirus* (INOUE-NAGATA *et al.*, 2001).

O controle de doenças causadas por *Potyvirus* é dificultado pelo caráter da transmissão via inseto vetor e pela ampla gama de hospedeiros do vírus. O tipo de transmissão inviabiliza o controle do vírus pelo controle químico do vetor (ZARBINI E ZAMBOLIM, 2000). Como o PVY infecta as principais Solanaceas cultivadas por todo o mundo, tanto em campo aberto como em estufas, a procura por variedades resistentes tem sido intensa. Portanto, a necessidade de identificar novos genótipos resistentes torna-se imprescindível (LEGNANI *et al.*, 1995).

A resistência ao PVY foi detectada em uma espécie selvagem de tomate, *Lycopersicon hirsutum* PI247087 (THOMAS, 1981; GEBRE-SELASSIE *et al.*, 1987; LEGNANI *et al.*, 1995). No Brasil NAGAI E COSTA (1969; 1972) identificaram *L. peruvianum* como uma espécie resistente ao PVY. O presente trabalho teve como objetivos:

- Identificar biológica e sorologicamente os isolados virais presentes nos tomateiros infectados procedentes, das principais regiões produtoras de tomate do Estado de São Paulo;
- Avaliar a reação de acessos de *Lycopersicon* spp pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma. do Instituto Agrônômico (BAG-IAC) a um isolado PVY<sup>O</sup> de tomateiro prevalente no Estado de São Paulo em condições de casa-de-vegetação, para identificar fontes de resistência para futura utilização em programas de melhoramento de tomate.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Gênero *Lycopersicon*

*Lycopersicon* é um dos gêneros da família Solanaceae abrangendo a espécie *Lycopersicon esculentum* Mill. conhecido como o tomate que é atualmente, consumido e cultivado em todo o mundo (WARNOCK, 1991).

O gênero *Lycopersicon* é originário da costa ocidental da América do Sul, do sudeste do Equador ao nordeste do Chile, incluindo a Ilha de Galápagos (WARNOCK, 1991). Oito espécies selvagens desse gênero encontram-se distribuídas naturalmente nessa região (RICK, 1976). A possível espécie selvagem precursora do *Lycopersicon esculentum* seria *L. esculentum* var. *cerasiforme*, amplamente dispersa por toda a América Latina. Mas sua domesticação ocorreu especificamente na América Central, no México. A partir do século XV, por meio de conquistadores espanhóis, foi levado para outras partes do mundo (RICK E FOBES, 1975; MIRANDA, 1995).

No início o tomateiro foi denominado botanicamente como *Solanum lycopersicum*, pertencente ao gênero *Solanum*, mas MILLER, em 1788, separou o tomate da batata, criando um novo gênero o *Lycopersicon* (WARNOCK, 1988), designando de *Lycopersicon esculentum* o tomate cultivado, e *L. pimpinellifolium* o tomate selvagem (KALLOO, 1991). Posteriormente, o gênero *Lycopersicon* foi dividido em dois subgêneros: *Eulycopersicon*, fruto maduro de coloração vermelha e *Eriopersicon* fruto maduro de coloração verde (MULLER, 1940).

Atualmente, no gênero *Lycopersicon* estão classificadas nove espécies: *Lycopersicon esculentum* Mill., *L. pimpinellifolium* Mill., *L. cheesmanii* Riley, *L. hirsutum* Humb. e Bonpt.; *L. pennelii* D'Arcy, *L. chmielewskii* Rick, Kes., Fob e Holle, *L. parviflorum* Rick, Kesicki, Fobes e Holle, *L. chilense* Dun e *L. peruvianum* (L.) Mill. (WARNOCK, 1988).

*L. esculentum* Mill. é a espécie de maior destaque devido a sua importância econômica e social. O complexo *esculentum*, assim denominado devido a grande variação genética entre seus biótipos, possui frutos vermelhos com diâmetros variados (WARNOCK, 1988).

A espécie *L. pimpinellifolium* Mill. é muito parecida geneticamente, com *Lycopersicon esculentum*. Há suposições que durante a evolução das espécies ocorreram intercruzamentos naturais entre as duas sendo o fruto de *L. pimpinellifolium* considerado uma miniatura de *L. esculentum*, não atingindo diâmetro superior a 1,5 cm (RICK, 1976).

*L. cheesmanii* tem como centro de origem a ilha de Galápagos (RICK, 1956) e possui uma segunda forma descrita o *L. cheesmanii* f. *minor* (WARNOCK, 1988).

A espécie *L. hirsutum* possui como centro de maior variabilidade a região nordeste do Peru (RICK *et al.*, 1979), LUCKWILL (1943) considerou-a uma espécie estável que tem uma segunda forma, *L. hirsutum* f. *glabratum*l.



*L. chmielewskii* e *L. parviflorum* possuem frutos verdes e afinidades aparentes com as espécies dos complexos *esculentum* e *peruvianum*. *L. parviflorum* é uma espécie totalmente autógama e *L. chmielewskii* apresenta compatibilidade reprodutiva com outras espécies do gênero (RICK, 1976).

*L. peruvianum* apresenta elevado polimorfismo entre seus biótipos sendo denominado de complexo *peruvianum*. O complexo *peruvianum* possui biótipos naturais tanto de regiões montanhosas como das regiões costeiras do centro de origem do gênero (RICK, 1963).

A espécie *L. chilense* inicialmente foi denominada como *L. peruvianum* var. *dentatum*. Entretanto, em 1955, após nova reorganização das espécies comprovou-se distinções morfológicas, reprodutivas e geográficas entre *L. peruvianum* e *L. peruvianum* var. *dentatum* e esta última passou a ser denominada de *L. chilense* (RICK, 1955).

As espécies do gênero *Lycopersicon* são diplóides com  $2n = 24$ , os cromossomos não excedem ao tamanho de 1,5-3  $\mu\text{m}$ . Em geral, a taxa de cruzamento natural em *L. esculentum* é inferior a 5% (NAGAI, 1993). Os fatores que contribuem para o aumento da polinização cruzada são o comprimento do estilete e a população de abelhas, principais polinizadores do gênero (NUEZ *et al.*, 1998).

A flor de tomate é perfeita, regular e hipógina, o que dificulta a fecundação cruzada, e possui em número de cinco a seis sépalas e pétalas dispostas de forma helicoidal e intervalos de  $135^\circ$ , e número igual de estames, que se alteram com as pétalas e ovário bi

ou plurilocular. As flores apresentam-se em números variáveis, agrupando-se em inflorescências do tipo racemoso (NUEZ *et al.*, 1998).

Quando jovem, o sistema radicular do tomateiro é caracterizado por uma raiz principal e pivotante, quando a planta atinge o estágio adulto as raízes laterais e adventícias ao caule desenvolvem-se mais que a principal (FILGUEIRA, 2000).

Os frutos do tomateiro são bagas carnosas, suculentas, com aspecto, tamanho e peso variados, conforme o cultivar. Na maioria dos cultivares, os frutos apresentam coloração vermelho vivo, quando maduros, resultante da combinação da cor da polpa com a película amarela. São exceções os cultivares japoneses do grupo 'salada', rosados, devido à película esbranquiçada (FILGUEIRA, 2000). A coloração vermelha deve-se ao carotenóide licopeno, um agente anticancerígeno. Esse pigmento também é responsável pela coloração atrativa vermelha que os produtos agroindustriais apresentam. O tamanho do fruto, o formato e o número de lóculos, de 2 até 10, caracterizam cultivares biloculares e pluriloculares. As sementes são pilosas, pequenas e envoltas por mucilagem, quando no fruto (FILGUEIRA, 2000).

## **2.2 Panorama varietal**

As variedades ou cultivares de tomate mais difundido são pertencentes aos tipos Santa Cruz (Santa Clara), Caqui, Longa Vida, Cereja, Italiano/Saladete e Industrial (JUNQUEIRA, 1997). O cultivar IAC-Santa Clara (tipo Santa Cruz) durante grande parte da década de 90 representou 90% das sementes de tomate comercializadas no país, mas esse

quadro foi alterado com a chegada dos tomates híbridos. Estes possuem na sua constituição genética, genes que prolongam por mais de quinze dias a durabilidade dos frutos depois de colhidos. Atualmente os híbridos plantados no país apresentam algumas deficiências destacando-se a suscetibilidade a desordens fisiogenéticas que depreciam o valor dos frutos no momento da comercialização e as doenças que geram a busca por fontes estáveis de resistência genética a doenças limitantes como as causadas por bactérias e vírus (MELO E RIBEIRO, 1993).

### **2.3 *Potato virus Y (PVY)***

#### **2.3.1 Características gerais**

A espécie *Potato virus Y* é um importante patógeno ocorrente nas solanáceas cultivadas, principalmente em batata, pimentão, tomate e tabaco (DE BOKX E HUTTINGA, 1981), pertence ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, e são transmitidos na natureza, de plantas infectadas para plantas sadias, por diferentes afídeos vetores (SHUKLA *et al.*, 1994).

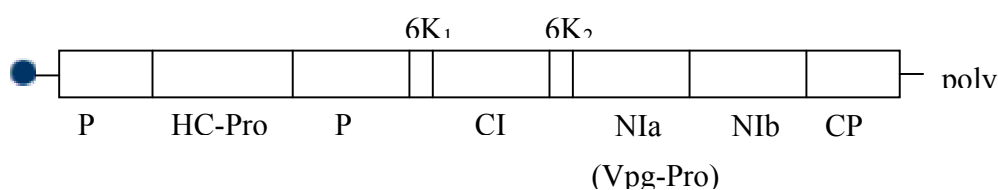
Os vírus pertencentes à família *Potyviridae* apresentam partículas alongadas, flexuosas, medindo cerca de 650 a 900 nm de comprimento e induzem à formação de corpos de inclusão cilíndricos, os cata-ventos, no citoplasma das células infectadas (MURPHY *et al.*, 1995).

O genoma dos *Potyvirus*, como o da maioria dos fitovírus, é constituído de uma molécula de fita simples de RNA de polaridade positiva (RIECHMANN *et al.*, 1992).

A maioria das espécies e estirpes de fitovírus pertencentes a esta família são sorologicamente relacionadas, devido à presença nas partículas dos vírus de uma região central interna conservada comum a todos (COLARICCIO, 1996).

### 2.3.2 Estrutura e organização do genoma

O genoma dos *Potyvirus* é constituído de uma molécula de fita simples de RNA com aproximadamente 10 kb de comprimento, possuindo a proteína Vpg ligada a sua porção 5' (SIAW *et al.*, 1985; RIECHMANN *et al.*, 1989 MURPHY *et al.*, 1990) e uma cauda poly(A) na extremidade 3' (HARI *et al.*, 1979). Contém uma única “open reading frame” (ORF) (RIECHMANN *et al.*, 1992), que codifica aproximadamente nove proteínas associadas a diferentes funções biológicas (LINDBO E DOUGHERTY, 1994). O genoma é traduzido como uma longa poliproteína precursora, que quando quebrada por proteases forma de sete a nove resíduos de proteínas (DOUGHERTY E CARRINGTON, 1988; SKULA E WARD, 1989).



**Figura 1:** Diagrama de representação do genoma potyviral.

A seqüência dessas proteínas na poliproteína sintetizada a partir do genoma (Figura 1) é: P1, primeira proteína envolvida na translocação do vírus de célula-a-célula; HC-Pro proteína do componente “helper” necessária para a transmissão por afídeos (THORNBURY *et al.*, 1985); P3, terceira proteína ou terceira proteinase tem função

reguladora, está envolvida na clivagem da poliproteína (VOS *et al.*,1988); CI, proteína da inclusão cilíndrica, é uma RNA helicase (LAIN *et al.*,1990); NIa proteína da pequena inclusão nuclear que inclui a Vpg que se liga a porção 5' do genoma; NIIb proteína da grande inclusão nuclear, é uma RNA polimerase dependente do RNA (DOUGHERTY E CARRINGTON, 1988) e CP, proteína da capa protéica, cuja função é encapsidar o RNA viral (THORNBURY *et al.*,1985).

### **2.3.3 Replicação**

O sítio de replicação dos *Potyviridae* ainda não está identificado, mas acredita-se que seja é o citoplasma (VERCHOT *et al.*, 1991). Nos *Potyviridae*, o genoma inteiro é copiado, e esse processo de replicação requer uma polimerase. As proteínas envolvidas no complexo da replicação são CI, Vpg, NIa e NIIb (SKULA *et al.*,1994). RIECHMANN *et al.* (1992) sugeriram que outras duas pequenas proteínas (6K<sub>1</sub> e 6K<sub>2</sub>) estariam também envolvidas na replicação do RNA viral.

### **2.3.4 Transmissão**

Os vírus pertencentes à família *Potyviridae* são transmitidos na natureza de plantas infectadas para plantas sadias, através de diferentes vetores (SHUKLA *et al.*,1994). O *Potyvirus* é o gênero mais importante dentre os vírus transmitidos por afídeos (HOLLINGS E BRUNT, 1981). O vírus é adquirido durante as picadas de prova, retido no estilete e na porção anterior do esôfago e transmitido durante a regurgitação e salivação que antecedem

novas picadas de prova (HARRIS, 1977; POWELL *et al.*, 1995; COLLAR *et al.*, 1997; MARTIN *et al.*, 1997).

A transmissão ocorre após um breve período de aquisição e infecção durante o período de alimentação, que pode durar de poucos segundos a poucos minutos, sendo denominada transmissão não-persistente (FERRERES *et al.*, 1992). Nesse tipo de transmissão, um período de jejum durante a pré-aquisição normalmente aumenta a eficiência da transmissão (MATTHEWS, 1991; POWELL *et al.*, 1995).

No Brasil, foram relatados como vetores do PVY, as seguintes espécies de afídeos: *Myzus persicae* Sulz. (CUPERTINO *et al.*, 1992) que pode transmitir mais de 100 *Potyvirus* (SHUKLA *et al.*, 1994), *Aphis rumicis*, *Macrosiphum solanifolii* (COSTA E ALVES, 1950) e *Myzus nicotianae* Blackman (CUPERTINO *et al.*, 1993).

A transmissão depende, principalmente, de dois fatores, do componente “helper” (HC-Pro), proteína codificada pelo vírus que facilita a adesão da partícula viral na superfície do estilete dos afídeos, e da constituição de aminoácidos da capa protéica do vírus (ANTIGNUS *et al.*, 1989; LECOO E PURCIFULL, 1992).

Os vírus do gênero *Potyvirus* também são transmitidos experimentalmente, por inoculação mecânica, através do extrato bruto ou de preparações purificadas de vírus (SHUKLA *et al.*, 1994).

## 2.4 Identificação do PVY

Os isolados do PVY são classificados em diferentes estirpes, dependendo da planta hospedeira de origem (DE BOHX E HUTTING, 1981). Diversas técnicas são utilizadas para a detecção e a identificação do fitovírus embasadas em critérios biológicos, sorológicos, citológicos, antigênicos e em propriedades estruturais dos vírus (SHUKLA *et al.*, 1994).

Os testes biológicos por meio de sintomas e resposta de resistência de plantas indicadoras e diferenciadoras são amplamente utilizados para a detecção e identificação de estirpes e patotipos de *Potyvirus* (ROMERO *et al.*, 2001). Por outro lado, testes de transmissão por vetores e proteção cruzada são menos utilizados para diferenciar estirpes e distinguir viroses. Algumas espécies pertencentes à família *Potyviridae* podem ser identificadas e detectadas por observações de alterações ultra-estruturais no citoplasma da planta hospedeira (SHUKLA *et al.*, 1994). A sorologia da partícula viral e da capa protéica também tem sido um critério bastante usado, pois possibilita que vírus pertencentes a diferentes gêneros possam ser identificados e classificados com exatidão (VAN REGENMORTEL, 2000).

### 2.4.1 Círculo de hospedeiras

Os vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus* apresentam um círculo de hospedeiras com as seguintes espécies vegetais mais suscetíveis *Chenopodium amaranticolor*, *C. murale*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. tabacum*, *Phaseolus vulgaris*, *Petunia hybrida* e *Tetragonia expansa*, pertencentes principalmente às

famílias Aizoaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Fabaceae e Solanaceae (HOLLINGS E BRUNT, 1981).

O PVY possui um círculo de hospedeiras relativamente grande quando comparado aos demais vírus da família *Potyviridae* podendo infectar muitas espécies, pertencentes a diferentes famílias botânicas. E uma das espécies vegetais que apresenta imunidade ao PVY é a *Datura stramonium* (SHUKLA *et al.*, 1994).

No Brasil, foram relatadas estirpes de PVY infectando batata (COSTA, 1950; CÂMARA *et al.*, 1986; ANDRADE E FIGUEIRA, 1992; SOUZA E BERTONCINI, 1993), tomate (COSTA *et al.*, 1960; PAVAN *et al.*, 1988; MEISSNER E CUPERTINO, 1990; INOUE-NAGATA *et al.*, 2001; CUNHA *et al.*, 2002; PALAZZO *et al.*, 2004) e pimentão (NAGAI, 1983; MEISSNER E CUPERTINO, 1990; CUPERTINO *et al.*, 1991; BRIOSO *et al.*, 1993; 1996). Outras culturas também são suscetíveis às várias estirpes desse vírus, além de várias espécies de solanáceas da vegetação espontânea como *Solanum atropurperum* Schrank (CHAGAS *et al.*, 1977); *S. ciliatum* Lam. (KUDAMATSU *et al.*, 1981), *S. palinacanthum* Dun. (COLARICCIO, 1996), *S. viarum* Dun. (KUDAMATSU *et al.*, 1981) e *S. mammosum* que foi descrita como hospedeira diferencial para o PVY<sup>N</sup> (ALEXANDRE E BARRADAS, 1982).



### 2.4.2 Sintomas

Os *Potyvirus* apresentam uma grande variação de sintomas tanto nas espécies hospedeiras experimentais como nas naturais, e a expressão do sintoma na planta hospedeira, de forma geral, é pouco visível. Dentre os sintomas causados por *Potyvirus* estão: o mosaico, mosqueado, lesões necróticas, clareamento de nervuras, lesões cloróticas, epinastia, mosaico bolhoso, redução da área foliar e, comumente, são observadas as combinações dos mesmos. (SHUKLA *et al.*, 1994).

Existem várias estirpes do PVY, sendo as mais freqüentes: PVY<sup>O</sup> (estirpe comum), PVY<sup>N</sup> (estirpe necrótica), PVY<sup>C</sup> (estirpe clorótica), entretanto algumas estirpes não são classificadas em nenhuma das três (COLARICCIO, 1996). As três estirpes podem ser classificadas pela expressão do sintoma nas hospedeiras diferenciadoras: PVY<sup>O</sup> causa sintomas de mosaico e mosqueado quando inoculado em plantas de tabaco; PVY<sup>N</sup> causa sintomas de necrose em plantas de tabaco e PVY<sup>C</sup> causa reação de hipersensibilidade em cultivares de batata (DE BOKX E HUTTINGA, 1981). Recentemente uma nova estirpe de PVY foi relatada em batata, causando anéis necróticos no tubérculo (PVY<sup>NTN</sup>) (BECZNER *et al.*, 1984; LÊ ROMANCER *et al.*, 1994). No Brasil a ocorrência das estirpes PVY<sup>O</sup> e PVY<sup>N</sup> foram intensamente relatadas em plantas de batata e tabaco (SILBERSCHMIDT *et al.*, 1954; MONTENEGRO *et al.*, 1968; ALEXANDRE E BARRADAS, 1982).

Os sintomas induzidos por PVY em solanáceas, principalmente em plantas de tomate, podem sofrer alterações conforme os níveis de nutrientes presentes no solo, principalmente em relação ao nitrogênio, o clareamento em faixas das nervuras e o

amarelecimento foliar podem ser confundidos como uma deficiência desse nutriente (STOBBS *et al.*, 1994).

### **2.4.3 Morfologia das partículas virais**

As partículas de vírus podem ser observadas apenas em microscópio eletrônico de transmissão, exceto algumas espécies de *Closterovirus* que podem ser observadas em microscópio de luz. A visualização direta das partículas de vírus e a análise de sua morfologia foram realizadas intensamente durante a década de 60, após a introdução da técnica da contrastação negativa, gerando informações cruciais para o estabelecimento da moderna classificação dos vírus, centrada no tipo de ácido nucléico e na morfologia como principais critérios (ALMEIDA E LIMA, 2001). A morfologia das partículas revelou que os vírus podem ser alongados, rígidos ou flexuosos; bastonetes, isométricos esferoidais ou baciliformes. As partículas do PVY são alongadas flexuosas e apresentam, aproximadamente, um comprimento modal de 740-750nm e 11nm de largura (MURPHY *et al.*, 1995).

### **2.4.4 Sorologia**

A sorologia da partícula viral e da capa protéica tem sido um critério intensamente utilizado na identificação e caracterização de fitovírus (VAN REGERMORTEL, 2000) porque permite a diferenciação de espécies e estirpes de vírus (KOENIG, 1988). No entanto, os *Potyvirus* apresentam estreitas e complexas relações sorológicas ocorrendo assim reações

sorológicas entre diferentes espécies deste gênero (FRANCKY *et al.*, 1985; MURPHY *et al.*, 1995).

A técnica de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) tem por base a reação antígeno-anticorpo associado a propriedades colorimétricas, que pode ser detectada em pequenas quantidades. Portanto, entre as técnicas sorológicas de diagnose é a que apresenta maior sensibilidade na detecção das partículas virais (SHUKLA *et al.*, 1994). As variações do ELISA diferem na sensibilidade e na capacidade de detectar as partículas virais sorologicamente relacionadas (KOENING E PAUL, 1982).

Basicamente, os tipos de ELISA mais utilizados para o diagnóstico de fitovírus incluindo os *Potyvirus* são PTA-ELISA (Plate Trapped Antigen) (VOLLER E BIDWELL, 1977) e DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich) (CLARK E ADAMS, 1977). No primeiro caso utiliza-se a IgG (imunoglobina tipo G) e o conjugado produzidos em apenas um animal; no segundo caso, utilizam-se duas IgGs, uma para reconhecer o antígeno e outra (anti-IgG) produzida em diferente espécie de animal, que reconhece a primeira IgG, com a qual se ligará.

O DAS-ELISA possibilita uma maior especificidade na identificação do fitovírus, possibilitando que estirpes de um mesmo vírus sejam detectadas (ALMEIDA E LIMA, 2001). Os antissoros policlonais geralmente não distinguem as diferentes estirpes do PVY (HEATH *et al.*, 1987), entretanto os anticorpos monoclonais permitem identificar diferentes estirpes de PVY (GUGERLY E FRIES, 1983).

## 2.5 Importância econômica do PVY

O PVY, agente etiológico da doença risca do tomateiro ou mosaico Y do tomateiro, manifesta os primeiros sintomas trinta dias após o plantio no campo. A planta doente apresenta mosaico no folíolo apical, e as folhas, imediatamente abaixo, apresentam-se curvadas com área foliar reduzida. Os frutos, parte consumida da planta, têm o seu tamanho e quantidade reduzida devido à ação do vírus. A época de maior incidência da doença acontece no inverno, quando o clima é frio e seco (KUROZAWA E PAVAN, 1997).

As perdas na produção podem atingir de 20 a 70%, mas devido a fácil disseminação do vírus e ao tipo de transmissão não persistente, pelo inseto vetor, as perdas podem atingir até 100% da produção (KUROZAWA E PAVAN, 1997). Perdas de 50-100% devido à infecção por PVY foram registradas, em tomateiro, na Índia (BEHL E CHOWFLA, 1989), Austrália (THOMAS E MC GRATH, 1988), Canadá (STOBBS *et al.*, 1994), França (GEBRE-SELASSIE, 1985; MARCHOUX *et al.*, 1995) e Espanha (BLANCO-URGOITI *et al.*, 1998; ROMERO *et al.*, 2001 e PARELLA *et al.*, 2002).

O controle de doenças causadas por *Potyvirus* é dificultado pelo caráter da transmissão via inseto vetor e pela ampla gama de hospedeiros dos vírus. O tipo de transmissão inviabiliza o controle do vírus pelo controle químico do vetor (ZARBINI E ZAMBOLIM, 2000). Como o PVY infecta as principais solanáceas cultivadas por todo o mundo, tanto em campo aberto como em estufas, a procura por variedades resistentes tem sido intensa. Portanto, a necessidade de identificar novos genótipos resistentes torna-se imprescindível para o melhoramento genético de tomateiros (LEGNANI *et al.*, 1995).

## 2.6 Resistência a PVY no gênero *Lycopersicon*

Em estudos recentes sobre hortaliças, a principal demanda foi a obtenção de cultivares mais produtivos, resistentes a pragas e doenças e adaptados às condições locais de cultivo. O aumento do número de programas de melhoramento, visando resistência genética, ocorreu devido, principalmente, ao aumento das doenças causadas por vírus. A maioria dos genes que conferem resistência utilizados nos programas de melhoramento, deriva de espécies selvagens (LEGNANI *et al.*, 1995).

Atualmente, a ênfase maior no melhoramento de tomate visa a obtenção de sementes híbridas, pela série de vantagens que os cultivares apresentam, como produtividade, resistência a patógenos (inclusive nematóides) e as pragas, uniformidade, entre outras características. Tais cultivares apresentam a solução, muitas vezes duradoura, para certos problemas fitossanitários, e estão acessíveis para a maioria dos agricultores e permitem reduzir a poluição do ambiente (FERRAZ E MENDES, 1992).

A resistência ao PVY foi detectada na espécie selvagem de tomateiro *L. hirsutum* PI247087, pois posteriormente à sua inoculação, não pôde ser detectada a presença de sintomas do vírus, tanto na folha inoculada como nas folhas imediatamente acima (THOMAS, 1981; GEBRE-SELASSIE *et al.*, 1987; LEGNANI *et al.*, 1995). THOMAS E MAC GRATH (1988) sugeriram que o mecanismo de resistência ao PVY em tomate estaria ligado com uma diminuição da multiplicação viral nas folhas inoculadas em alguns genótipos sendo a resistência controlada por um único gene recessivo.

LEGNANI *et al.* (1995) sugeriram a imunidade do *L. hirsutum* PI247087 ao PVY como mecanismo de resistência, pois não foi detectada em testes biológicos e sorológicos tanto nas folhas inoculadas como nas não inoculadas a presença do vírus. Essa resistência de acordo com os autores seria controlada por dois genes recessivos independentes.

No Brasil, NAGAI E COSTA (1969) identificaram *L. peruvianum* como uma espécie imune ao PVY, e uma linhagem de *L. pimpinellifolium* (NAV 1062) e a PI 126410, uma introdução oriunda do Peru, com resistência satisfatória. De acordo com NAGAI E COSTA, 1972 a resistência ao PVY é conferida por um par de genes recessivos denominados de *rt rt* (risca do tomateiro).

PARELLA *et al.* (2002) estudando os genes que conferem resistência do *L. hirsutum* PI247087 ao PVY e ao *Tobacco etch virus* (TEV) denominaram o loco do gene de resistência como *pot-1*. Usando técnicas moleculares de mapeamento genético, localizaram *pot-1* no braço menor do cromossomo 3. Devido a similaridades genéticas entre genes de pimentão e tomate, compararam a resistência genética recessiva ao PVY nessas espécies, com a utilização de marcadores moleculares e constataram que os genes estão localizados na mesma região genômica.

Uma característica peculiar dos genes que controlam resistência a *Potyvirus* em diferentes espécies de plantas é que, em espécies infectadas por mais de um *Potyvirus*, como o pimentão e o tomateiro, o mesmo loco frequentemente confere resistência a das diferentes espécies. Diversos genes de resistência que mostram resposta a mais de uma espécie de *Potyvirus* têm sido identificados em pimentão e tomate (TRUTA *et al.*, 2004).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de realização dos experimentos**

A identificação biológica e sorológica do agente causal dos sintomas de mosaico amarelo em amostras de tomateiros, coletados nas regiões produtoras de Campinas, Itú, Monte-Mor, Mogi-Guaçú, Elias Fausto e Sumaré, no estado de São Paulo, foi realizada no Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia (LFF), Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal (CPDSV), no Instituto Biológico, SP, no período de outubro de 2003 a março de 2004.

A avaliação da reação dos acessos de *Lycopersicon* spp pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma do Instituto Agronômico, Campinas, a um isolado de vírus proveniente de tomateiro ‘Alambra’, identificado neste trabalho. Foram realizados dois ensaios experimentais em casa-de-vegetação no LFF do Instituto Biológico, São Paulo. No período de setembro a dezembro de 2004.

#### **3.2 Semeadura e transplante**

A semeadura dos acessos foi realizada em bandejas de poliestireno expandido contendo 128 células, preenchidas com substrato à base de fibra de coco comercial Amafibra. As mudas foram transplantadas no estágio de duas folhas verdadeiras para vasos de plásticos individuais, com capacidade para 300 ml, contendo solo esterilizado. Todos os processos de semeadura, transplante e manutenção das plantas foram realizados em casa-de-vegetação telada.

### 3.3 Fonte e manutenção do vírus

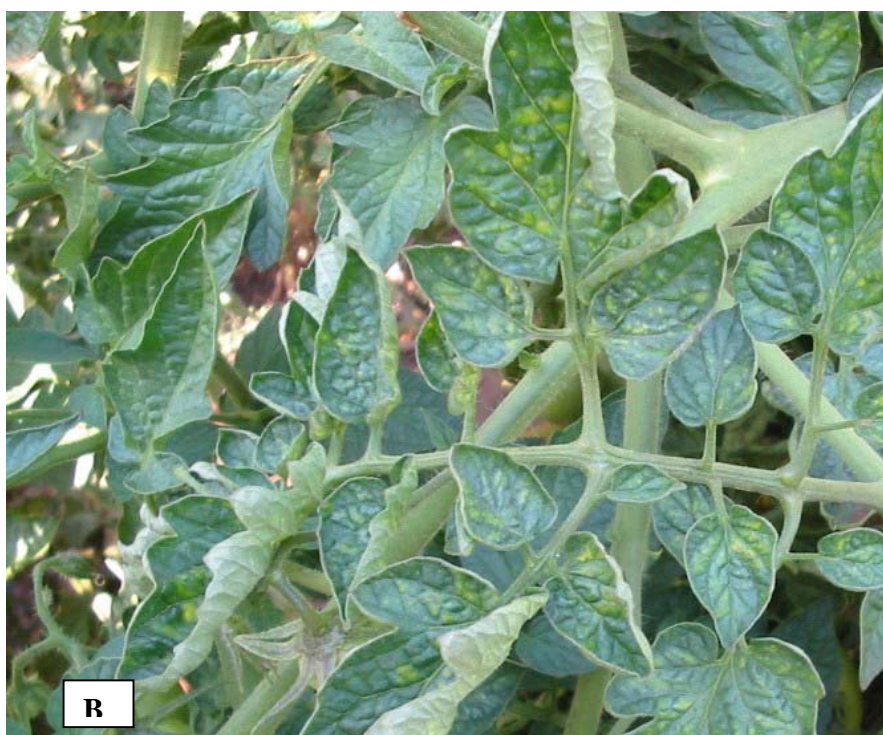
Os vírus isolados de tomateiros com sintoma de amarelecimento intenso e redução dos folíolos (Figura 2) oriundos das principais regiões produtoras de tomate do Estado de São Paulo (Tabela 1), foram submetidos a testes biológicos e sorológicos para identificação da espécie e, posteriormente incorporados à Coleção de Fitovírus ‘Karl Sifersmidt’ (CoFiKS) do LFF do Instituto Biológico, São Paulo.

Tabela 1. Plantas de tomateiros com sintomas semelhantes a vírus, coletadas nas principais regiões produtoras do Estado de São Paulo

Isolado	Material original	Procedência
ToIAC-C	Tomate IAC35	Campinas
ToD-I	Tomate ‘Densus’	Itu
ToTF-S	Tomate ‘Ty Fanny’	Sumaré
ToAl-EF	Tomate ‘Alambra’	Elias Fausto
ToAl-MM	Tomate ‘Alambra’	Monte-Mor
ToAl-Mg	Tomate ‘Alambra’	Mogi-Guaçú

Para manutenção destes isolados *in vivo* foram realizadas inoculações mecânicas contínuas em tomateiros ‘Alambra’, *Nicotiana megalosiphon* e *N. tabacum* ‘White Burley’ que foram mantidas em casa-de-vegetação. A infectividade dos isolados foi preservada pelo armazenamento do material foliar, em placas de Petri, através da técnica de desidratação de material vegetal com cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) anidro à temperatura de -20°C (BARRADAS, 1978).





**Figura 2.** *Lycopersicon esculentum* ‘Alambra’ com sintomas de amarelecimento foliar. A) coletado em Elias Fausto e B) coletado em Mogi-Guaçú

### 3.4 Teste de transmissão mecânica

Para a realização dos ensaios experimentais de transmissão mecânica o inóculo foi obtido pela trituração de folhas infectadas de tomateiros, em almofariz em presença de tampão Tris-HCl pH 8,0 (TACM) (DERRICK, 1986), na proporção 1:5 (g/mL) (YARWOOD, 1969), carborundo (400 meshes) e carvão ativado. O inóculo obtido foi friccionado na face superior das folhas de plantas sadias com o auxílio de um pistilo de porcelana e posteriormente lavado com água para retirar o excesso de abrasivo e inóculo.

### 3.5 Identificação dos vírus isolados de tomateiros

#### 3.5.1 Teste biológico

Para determinar a gama parcial de hospedeiras dos vírus, plantas pertencentes a diferentes espécies botânicas foram obtidas pela germinação de sementes sadias em solo esterilizado, transplantadas para vasos e inoculadas mecanicamente, no estágio de cinco folhas verdadeiras. Foram utilizadas dez plantas indicadoras de cada espécie, mantendo-se uma como controle. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação para avaliar a manifestação e desenvolvimento dos sintomas.

Plantas indicadoras empregadas para determinar o círculo de hospedeiras de *Chenopodium amaranticolor* (Chenopodiaceae), *Nicotiana debneyi*, *N. sylvestris*, *N. glutinosa*, *N. megalosiphon*, *N. tabacum* ‘Samsun’, *N. tabacum* ‘White Burley’, *Datura stramonium*, *D. metel* (Solanaceae), cultivares diferenciais de pimentão (*Capsicum*

*annuum*): ‘Criolo de Morellos’, ‘Magda’, ‘Yolo Wonder’, ‘Ikeda’, ‘Yolo Y’, ‘Delray Bell’ e ‘Myr 10’ e cultivares comerciais de tomate: ‘Alambra’, ‘Carmen’, ‘Thomas’, ‘Diana’, ‘Jumbo’, ‘Kindyo’, ‘Graziella’, ‘Olympia’, ‘Rodas HQ’, ‘Santa Cruz’, ‘Romana’, ‘Concorde’, ‘Densus’.

### **3.5.2 Teste sorológico**

Em PTA-ELISA e DAS-ELISA foram utilizados controles positivos e negativos para cada espécie de vírus avaliado. Os valores de absorbância a 405nm foram lidos 45 minutos após a adição do substrato. Foram considerados positivos os valores de absorbância três vezes maiores do que os valores das amostras sadias.

#### **3.5.2.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay - Double Antibody Sandwich (DAS-ELISA)**

Para identificação dos seis isolados foram realizados DAS-ELISA (CLARK E ADAMS, 1977), utilizando-se antissoros policlonais para as espécies de *Tospovirus*: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CNSV) e para a espécie de *Tobamovirus*: *Tomato mosaic virus* (ToMV) e anticorpos monoclonais para as estirpes de PVY: estirpe comum (PVY<sup>O</sup>), clorótica (PVY<sup>C</sup>) e necrótica (PVY<sup>N</sup>).

A seguir está descrito o protocolo adotado:

1. Aplicação de 50  $\mu$ L de antissoro ou anticorpo diluído em tampão carbonato pH 9,6 na proporção de 1:1000 em cada poço da placa de poliestireno;
2. Incubação a 4 °C por 12 horas;
3. Lavagem da placa três vezes por três minutos com tampão de lavagem (PBS-Tween pH 7,4);
4. Trituração folhas com sintomas em PBS-TPo na proporção de 1:10 (g/mL). Utilização de folhas sadias como controle negativo. Aplicação de 50  $\mu$ L das amostras na placa;
5. Incubação a 37 °C por quatro horas;
6. Lavagem da placa três vezes por três minutos com tampão de lavagem (PBS-Tween);
7. Diluição do conjugado em PBS-TPo na proporção de 1:1000 e aplicação de 50  $\mu$ L em cada poço da placa;
8. Incubação a 4 °C por 12 horas;
9. Lavagem da placa 3 vezes por 3 minutos com tampão de lavagem (PBS-Tween);
10. Diluição o substrato p-nitrofenil fosfatase em tampão substrato (dietanolamina pH 9,8) na proporção de 1:1 (mg/mL) e aplicação de 50  $\mu$ L em cada poço da placa;
11. Incubação a 37 °C até a ocorrência da reação colorimétrica;
12. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro com absorbância de  $A_{405nm}$  utilizando-se um aparelho Microplate Reader 3550-UV (Bio-Rad).

### **3.5.2.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay – Plate Trapped Antigen (PTA-ELISA)**

Foram realizados testes de PTA-ELISA (CLARK E ADAMS, 1977), para identificação dos seis isolados utilizou-se antissoros contra *Potyvirus*: Pepper yellow mosaic virus (PepYMV) e PVY e *Cucumovirus*: *Cumcuber mosaic virus* (CMV) e na recuperação do isolado do vírus nas plantas avaliadas para resistência

A seguir está descrito o protocolo adotado.

1. Trituração das folhas em PBS-TPo na proporção de 1:10 (g/mL) e posteriormente diluição do extrato em tampão carbonato pH 9,6 na proporção de 1:1 (mL/mL).

Foram utilizadas plantas sadias como controle negativo e água como controle dos tampões. Aplicação de 50 µL das amostras na placa;

2. Incubação a 4 °C por 12 horas;
3. Lavagem da placa três vezes por três minutos com tampão de lavagem (PBS-Tween pH 7,4);
4. Aplicação de 50µL de antissoro diluído em PBS-TPo na proporção de 1:1000 em cada poço da placa de poliestireno;
5. Incubação a 37 °C por quatro;
6. Lavagem da placa três vezes por três minutos com tampão de lavagem (PBS-Tween);
7. Diluição do conjugado em PBS-TPo na proporção de 1:1000 e aplicação de 50 µL em cada poço da placa;
8. Incubação a 4°C por 12 horas;
9. Lavagem da placa três vezes por três minutos com tampão de lavagem PBS-Tween;
10. Diluição do substrato p-nitrofenil fosfatase em tampão substrato (dietanolamina pH 9,8) na proporção de 1:1 (mg/mL) aplicação de 50 µL em cada poço da placa;
11. Incubação a 37 °C até a ocorrência da reação colorimétrica;
12. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro com absorvância de  $A_{405nm}$  utilizando-se um aparelho Microplate Reader 3550-UV (Bio-Rad).

### **3.6 Avaliação da reação de acessos de *Lycopersicon* spp. pertencentes ao BAG do Instituto Agronômico, Campinas**

#### **3.6.1 Acessos**

Para a avaliação da reação dos acessos de *Lycopersicon* spp. foram utilizados 19 acessos do Banco Ativo de Germoplasma do Centro de Horticultura do Instituto

Agronômico de Campinas (BAG-IAC) (Tabela 2). E como controle positivo foi o utilizado o tomateiro ‘Alambra’ devido a sua suscetibilidade ao isolado de vírus utilizado.

**Tabela 2.** Acessos de *Lycopersicon* spp. pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma do Instituto Agronômico, Campinas

Nº de ordem	Espécie
1	<i>Lycopersicon hirsutum</i> PI 134417
2	<i>Lycopersicon hirsutum</i> PI 134416
3	<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> HES 5808-02
4	<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> NAV 1062
5	<i>Lycopersicon peruvianum</i> 29/115
6	<i>Lycopersicon peruvianum</i> LA-371-2
7	<i>Lycopersicon peruvianum</i>
8	<i>Lycopersicon peruvianum</i>
9	<i>Lycopersicon peruvianum</i> PI 270435
10	<i>Lycopersicon peruvianum</i> irradiado 1C
11	<i>Lycopersicon peruvianum</i> (roxo)
12	[F <sub>2</sub> (Rio Grande x F <sub>3</sub> 1-2) x F <sub>3</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> )]
13	F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-2 x Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-3)
14	F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-3 x Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-2)
15	F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> )
16	CNPH 944 LA 1036 <i>Lycopersicon chmielewskii</i>
17	CNPH 672 (F <sub>1</sub> Sugar Lamp) <i>Lycopersicon esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i>
18	CNPH 673 (F <sub>1</sub> Piko) <i>Lycopersicon esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i>
19	CNPH 674 (F <sub>1</sub> Cheloy mini) <i>Lycopersicon esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i>
20	<i>Lycopersicon esculentum</i> F <sub>1</sub> Alambra

### 3.7 Avaliação da reação dos acessos de *Lycopersicon* spp. ao vírus isolado de tomateiro ‘Alambra’

Para avaliar a reação destes acessos ao vírus isolado a primeira inoculação foi realizada no estádio de três folhas definitivas e a segunda após sete dias, empregando-se dez mudas para cada acesso. Três leituras foram realizadas para avaliação do comportamento de resistência, a primeira leitura no 7º dia, a segunda no 22º dia e terceira

no 30° dia após a segunda inoculação . As plantas inoculadas foram avaliadas com base na manifestação dos sintomas, na recuperação do vírus das plantas sem sintomas por classificando a reação com base nos critérios adotados por MATTHEUS (2002), (Tabela 3).

**Tabela 3.** Critérios de avaliação do comportamento dos acessos de *Lycopersicon* spp. utilizados nos ensaios experimentais.

<b>Comportamento</b>	<b>Sintomas</b>	<b>Recuperação viral</b>	<b>Replicação viral (PTA-ELISA)</b>
Imune	Ausente	Negativa	Negativa
Resistente	Hipersensibilidade	Negativa*	Negativa*
Tolerante	Ausente	Positiva	Positiva
Suscetível	Presente	Positiva	Positiva

\*nas folhas acima das folhas inoculadas

As plantas sem sintomas foram submetidas a testes de recuperação biológica em plantas de *N. tabacum* ‘WB’, para avaliar a reação de resistência, tolerância ou imunidade dos acessos. Todos os genótipos inoculados foram submetidos ao teste sorológico PTA-ELISA, para comprovar a replicação viral.

O delineamento experimental foi composto por 20 tratamentos com duas repetições, com 10 plantas por parcela. As parcelas foram dispostas inteiramente ao acaso sob bancada em casa-de-vegetação. As proporções entre plantas com e sem sintomas de cada grupo de acessos foram analisadas estatisticamente pelo teste  $\chi^2$  à 1% de significância. Através desta análise testou-se a hipótese de igualdade ( $H_0: r=s$ ) contra a hipótese alternativa ( $H_1: r \neq s$ ) (GOMES, 1984).

Os graus de liberdade foram calculados segundo a fórmula:

$$Gl = (nl - 1) \cdot (nc - 1)$$

Onde:

nl: número de linhas da tabela

nc: número de colunas da tabela

O valor de  $\chi^2$  foi calculado pela fórmula:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^s \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

Onde:

$\Sigma_r$ : somatória das plantas sem sintomas

$\Sigma_s$ : somatória das plantas com sintomas

$O_{ij}$ : valor observado

$E_{ij}$ : valor esperado sendo calculado pela fórmula:

$$E_{ij} = \frac{f_r \cdot f_{rt}}{T_p}$$

Onde:

$f_r$ : frequência total de plantas sem sintomas  $i$

$f_{rt}$ : frequência de plantas com e sem sintomas

$T_p$ : total de plantas analisadas

O mesmo foi utilizado para calcular o valor esperado das plantas com sintomas.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Identificação e manutenção da infectividade dos isolados do vírus

O vírus presente nas seis amostras de tomateiros oriundas das diferentes regiões produtoras do Estado de São Paulo foi identificado como o PVY<sup>O</sup>. A manutenção da infectividade do vírus foi eficiente através da técnica de desidratação em cloreto de cálcio anidro de folhas infectadas, neste caso o PVY<sup>O</sup> manteve-se infectivo em folhas de *N. megalosiphon* armazenadas a -20° pelo período de seis meses. De acordo com COLARICCIO (1996) a preservação da infectividade de PVY<sup>O</sup> isolado de *Solanun palinachantum* com a utilização desta técnica foi mantida, por um período de 12 meses.

A manutenção *in vivo* do isolado foi realizada por contínuas repicagens em plantas hospedeiras de *Nicotiana megalosiphon* e *N. tabacum* 'WB' e tomateiros 'Alambra', se mostrou eficiente, durante todo o período de realização dos experimentos.

### 4.2 Transmissão mecânica dos isolados de vírus provenientes de tomateiro

Os seis isolados de vírus de tomateiros foram facilmente transmitidos mecanicamente para as plantas indicadoras utilizadas no círculo de hospedeiras. Os inóculos utilizados para a avaliação da reação dos acessos de *Lycopersicon* spp., foram infectivos em todos os testes biológicos realizados, demonstrando assim que a infectividade do vírus foi mantida no extrato tamponado em pH 8,0 como previamente constatado por

COLARICCIO (1996) para o PVY<sup>0</sup> verificando-se, que o vírus permanece infectivo na variação do pH do tampão de inoculação na faixa de pH 6,0 a pH 8,0.

### **4.3 Identificação dos isolados de vírus provenientes de tomateiros**

#### **4.3.1 Teste biológico**

Na Tabela 4 estão relacionadas às espécies de plantas indicadoras utilizadas no círculo de hospedeira e os tipos de sintomas induzidos, pelos seis isolados de PVY, nestas espécies de plantas indicadoras e diferenciadoras.

As plantas indicadoras reagiram com o mesmo tipo de sintomas aos seis isolados avaliados, portanto, não foi detectada variabilidade biológica entre estes isolados, apesar de serem provenientes de diferentes regiões produtoras de São Paulo (Tabela 4).

As espécies que determinaram o círculo de hospedeiras foram selecionadas conforme dados da literatura (BRUNT *et al.*, 1997); como os isolados eram oriundos de plantas de tomateiro, espécie pertencente à família Solanaceae, as plantas do círculo de hospedeiras pertenciam principalmente a esta família, embora a espécie *C. amaranticolor* pertencente à família Chenopodiaceae também foi suscetível a estes isolados, reagindo com lesão local a cada um deles (Tabela 4).

Tabela 4: Sintomas manifestados pelas plantas indicadoras utilizadas para determinar o círculo de hospedeiras para cada um dos isolados de vírus provenientes de tomateiros São Paulo novembro de 2003

Plantas indicadoras	Tipo de sintomas					
	ToIAC-C	ToD-I	ToTF-S	ToAl-EF	ToAl-MM	ToAl-Mg
<i>C. amaranticolor</i>	LNL*	LNL	LNL	LNL	LNL	LNL
<i>Datura metel</i>	AS	AS	AS	AS	AS	AS
<i>D. stramonium</i>	AS	AS	AS	AS	AS	AS
<i>Nicotiana benthamiana</i>	LNL	LNL	LNL	LNL	LNL	LNL
<i>N. tabacum</i> ‘TNN’	S; Mo;RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF
<i>N. tabacum</i> ‘White Burley’	S; Mo;RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF
<i>N. debneyi</i>	S; Mo;RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF
<i>N. glutinosa</i>	S; Mo;RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF
<i>N. megalosiphon</i>	S; Mo;RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF
<i>N. sylvestris</i>	S; Mo;RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF
<i>N. tabacum</i> ‘Samsun’	S; Mo;RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF
<i>Petunia hybrida</i>	S; Mo;RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF	S; Mo; RF
<i>C. annuum</i> ‘Magda’	AS	AS	AS	AS	AS	AS
‘Criolo de Morellos’	AS	AS	AS	AS	AS	AS
‘Yolo Wonder’	S; Mo	S; Mo	S; Mo	S; Mo	S; Mo	S; Mo
‘Ikeda’	S; Mo	S; Mo	S; Mo	S; Mo	S; Mo	S; Mo
‘Yolo Y’	S; Mo	S; Mo	S; Mo	S; Mo	S; Mo	S; Mo
‘Delray Bell’	AS	AS	AS	AS	AS	AS
‘Myr 10’	AS	AS	AS	AS	AS	AS
‘Florida VR-2’	AS	AS	AS	AS	AS	AS

\*Sintomas: LNL= lesão necrótica local; AS= ausência de sintomas; S= sistêmico; Mo= mosaico bolhoso; RF= redução foliar.

As espécies hospedeiras *N. tabacum* ‘White Burley’ (Figura 3), *N. tabacum* ‘TNN’ e *N. megalosiphon*, esta última utilizada para a manutenção *in vivo* dos isolados, manifestaram sintomas sistêmicos de mosaico bolhoso e reduções foliares, assim como nas

demais nicotianas (Figura 3), com ressalva para *N. benthamiana* que apresentou apenas lesões locais caracterizando a reação de hipersensibilidade (Tabela 4). Portanto, *N. benthamiana* pode ser indicada como diferenciadora para o PVY<sup>O</sup> e PepYMV, manifestando para este último, sintomas sistêmicos de mosaico amarelo forte com formação de bolhas, deformação foliar e redução do crescimento (MACIEL-ZAMBOLIM *et al.*, 2004). As espécies de fumo *N. tabacum* ‘White Burley’ e *N. tabacum* ‘TNN’ também, têm sido utilizadas para identificar as estirpes de PVY com capacidade de infectar pimentão e tomate (BRIOSO *et al.*, 1996).

A espécie *P. hybrida* manifestou sintomas sistêmicos de mosaico como aquele verificado nas plantas de fumo, não tendo sido observados sintomas de lesões locais necróticas que indicam a presença de *Tospovirus*. ÁVILA *et al.* (1993) reportaram a utilização de *P. hybrida* para a realização de triagens de *Tospovirus* uma vez que estes induzem lesões locais necróticas em 24 horas.

As espécies de *C. amaranticolor* assim como a *N. benthamiana* apresentaram sintomas de lesões locais. As plantas de *D. stramonium* e *D. metel* tiveram reação de imunidade aos isolados, isto é, não manifestaram sintomas e o vírus não pode ser delas recuperado em plantas de *N. tabacum* ‘White Burley’ e ‘Alambra’. A ausência de sintomas em *D. stramonium* é citada na literatura como diferenciadora para o diagnóstico da presença do PVY (DE BOKX E HUTTINGA, 1981; SHUKLA *et al.*, 1994), eliminando a possibilidade da presença do *Tobacco etch virus* (TEV) que causa sintomas em datura.



Figura 3. Espécies de nicotianas inoculadas com o isolado ToAl-EF com sintomas sistêmicos de mosaico bolhoso e redução foliar. A) *N. tabacum* 'WB' B) *N. debneyi*

Pela reação das plantas indicadoras *N. glutinosa*, *N. sylvestris*, *N. tabacum* 'TNN', *C. amaranticolor* e *D. stramonium* foi possível constatar a ausência de *Tobacco mosaic virus* (TMV) e ToMV nos seis isolados de tomate avaliados. A reação observada nos cultivares de pimentão 'Criolo de Morellos', 'Magda', 'Delray Bell', 'Myr 10' e 'Florida VR-2' possibilitou a identificação destes isolados como pertencentes ao PVY patotipo 1, pela ausência de sintomas em 'Magda', 'Criolo de Morellos', 'Florida VR-2' eliminando a possibilidade de infecção mista com o PepYMV ou PVY<sup>M</sup>. Os demais cultivares de pimentão apresentaram sintomas sistêmicos de mosaico bolhoso (Tabela 4).

Recentemente ocorreu um surto epidêmico de uma nova espécie de *Potyvirus*, o Pepper yellow mosaic virus (PepYMV) descrita por INOUE-NAGATA *et al.* (2002) em tomateiro, pimentão e pimenteiras. Foi identificado principalmente no híbrido Alambra nos Estados de São Paulo (PALAZZO *et al.*, 2004) e Espírito Santo (MACIEL-ZAMBOLOIM *et al.*, 2004; ÁVILA *et al.*, 2004). Essa nova espécie, PepYMV, tem como hospedeira natural o pimentão 'Magda' e os cultivares 'Florida VR-2' e 'Criolo de Morellos' apresentam suscetibilidade (INOUE-NAGATA *et al.*, 2002). Já os seis isolados estudados não manifestaram sintomas nesses três cultivares (Tabela 4) e todos foram negativos na recuperação biológica, quando inoculados em plantas de *N. tabacum*'WB' e *N. megalosiphon* indicando a ausência do PepYMV nestes isolados.

Todos os cultivares comerciais de tomateiro foram suscetíveis aos isolados inoculados (Tabela 5), ocorrendo reprodutibilidade dos sintomas de amarelecimento generalizado e redução do folíolo observados em campo, para os tomateiros 'Alambra' (Figura 4) e 'Densus'. Os sintomas de mosaico, a presença de riscas amarelas e redução

foliar são considerados um sintoma característico da infecção por PVY em tomateiros (TRUTA *et al.*, 2004).

Tabela 5. Sintomas causados em cultivares comerciais de tomateiros pelos seis isolados de vírus provenientes de tomateiro, São Paulo março 2004.

Cultivares de tomateiros	Tipo de sintomas sistêmicos					
	Isolados					
	ToIAC-C	ToD-I	ToTF-S	ToAl-EF	ToAl-MM	ToAl-Mg
‘Alambra’	Mo*;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;
‘Rodas HQ’	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;
‘Olympia’	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;
‘Jumbo’	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;
‘Thomas’	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;
‘Kindyo’	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;
‘Graziella’	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;
‘Romana’	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;
‘Concorde’	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;
‘Diana’	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;
‘Carmen’	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;
‘Densus’	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;	Mo;RA; RF	Mo;RA;RF;

\*Sintomas sistêmicos: Mo=mosaico bolhoso; RA=risca amarela; RF=redução foliar.



Figura 4. *Lycopersicon esculentum* cv. Alambra inoculado com o isolado ToAl-EF com sintomas sistêmicos. A) Risca amarela e B) Risca amarela e redução foliar.



Os resultados obtidos através dos sintomas manifestados nas plantas indicadoras permitiram identificar os isolados como PVY, pois os sintomas são semelhantes aos descritos por DE BOKX E HUTTINGA, 1981; SHUKLA *et al.*, 1994, COLARICCIO, 1996, TRUTA *et al.*, 2004. O PVY foi classificado em três estirpes principais PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>C</sup>, essas estirpes apresentam-se disseminadas por várias regiões do mundo, a estirpe clorótica prevalece na Europa, Índia e Austrália, a necrótica na Europa, África e na América e a estirpe comum está disseminada, principalmente na América do Sul (COLARICCIO, 1996).

Os sintomas manifestados nos cultivares diferenciadores de pimentão contendo genes de resistência permitiram classificar estes isolados como patotipo 1 de acordo com GEBRE-SELASSIE *et al.* (1985), pois os cultivares ‘Ikeda’, ‘Yolo Wonder’ e ‘Yolo Y’ foram suscetíveis a estes isolados com manifestação de sintomas de mosaico sistêmico, enquanto ‘Criolo de Morelos’, ‘Magda’ e ‘Florida VR-2’ foram imunes a estes isolados. A reação obtida nos cultivares de pimentão, principalmente em ‘Magda’, eliminaram a possibilidade destes seis isolados serem o PVY<sup>M</sup> (NAGAI, 1993) e também de pertencer a nova espécie PepYMV (INOUE-NAGATA, 2002). O resultado difere também, daquele obtido por BRIOSO *et al.* (1996) para um isolado obtido de pimentão ‘Margareth’, denominado Rio de Janeiro (RJ) e para o isolado severo de *Potyvirus* em pimentão ‘Magali’ identificado por COLARICCIO *et al.* (1996).

Segundo BLANCO-URGOITI *et al.* (1998), isolados classificados como diferentes patotipos podem pertencer à mesma estirpe genética. Essa afirmação resulta da visão de que o conceito de patotipo é diferente do conceito de estirpe, pois estirpe refere-se a características genéticas de uma região particular do genoma viral (TRUTA *et al.*, 2004).

### 4.3.2 Teste sorológico

A identificação sorológica do vírus presente nas seis amostras de tomateiros possibilitou identificar uma reação positiva de todos os isolados com o antissoro policlonal para a espécie PVY (Tabela 6). Assim os isolados apresentam-se relacionados sorologicamente com a espécie PVY e não apresentaram relação sorológica com as demais espécies testadas (Tabela 6), comprovando o resultado obtido no círculo de hospedeiras.

Tabela 6. Reação sorológica em PTA- ELISA e DAS-ELISA dos vírus isolados de tomateiros com antissoros para diferentes espécies de vírus.

	Isolados					
	ToIAC-C	ToD-I	ToTF-S	ToAl-EF	ToAl-MM	ToAl-Mg
Antissoro policlonal						
PePYMV	-*	-	-	-	-	-
PVY	+	+	+	+	+	+
CMV	-	-	-	-	-	-
ToMV	-	-	-	-	-	-
TSWV	-	-	-	-	-	-
TCSV	-	-	-	-	-	-
GRSV	-	-	-	-	-	-
CSNV	-	-	-	-	-	-

\*- resposta negativa, + resposta positiva

O vírus presente nos seis isolados de tomateiros foi identificado tanto biológica como sorologicamente como pertencente ao gênero *Potyvirus*, espécie PVY.

O DAS-ELISA empregado com anticorpos monoclonais mostrou que os PVY identificados nos seis isolados pertencem a estirpe comum (PVY<sup>0</sup>), pois reagiram

positivamente com o anticorpo para a estirpe comum (PVY<sup>O</sup>) e negativamente com os anticorpos para as estirpes PVY<sup>C</sup> e PVY<sup>N</sup> (Tabela 7).

Tabela 7. Valores das médias em absorbância A<sub>405</sub> no DAS-ELISA dos vírus isolados de tomateiros com anticorpos monoclonais para identificar diferentes estirpes de PVY.

Isolados	Anticorpos monoclonais		
	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>C</sup>
To IAC35-C	16,0*	0,8	1,2
ToD-I	15,9	1,0	0,8
ToTF-S	17,8	1,1	0,9
ToAl-EF	14,6	1,1	1,7
ToAl-MM	18,2	1,5	1,1
ToAl-Mg	25,1	1,2	1,2
Controle negativo	1,0	1,0	1,0

\* valores iguais e superiores a três foram considerados positivos

Assim as seis amostras de tomateiros de diferentes regiões produtoras do Estado de São Paulo que apresentavam sintomas típicos de infecção por vírus, quando submetidas à testes para a identificação do agente causal do sintomas, revelaram a presença do *Potato virus Y* -PVY, estirpe comum, patotipo-1 (PVY<sup>O</sup>-1).

Como os seis isolados estavam infectados pelo mesmo o vírus, optou-se aleatoriamente pelo isolado tomateiro ‘Alambra’ procedente de Elias Fausto, que será denominado PVY<sup>O</sup>-1, para a avaliação da reação dos acessos de *Lycopersicon* spp pertencentes ao BAG-IAC unidade de hortaliças.

#### 4.4 Avaliação de acessos de *Lycopersicon* spp. ao isolado PVY<sup>0</sup>-1

As reações sintomatológicas dos acessos de *Lycopersicon* spp ao PVY<sup>0</sup>-1 foram observadas e anotadas em três leituras feitas 15<sup>o</sup>, 22<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dia após a primeira inoculação (Tabelas 8 e 9), utilizando como controle positivo da inoculação, o híbrido Alambra e plantas de *N. tabacum* 'WB' e como controle negativo *D. stramonium* nos dois experimentos.

O híbrido Alambra e a indicadora *N. tabacum* 'WB' foram sintomático para todas as plantas inoculadas e as plantas de *D. stramonium* foram imunes ao vírus nos dois experimentos. Portanto as inoculações realizadas nos experimentos foram positivas e os extratos vegetais utilizados não apresentaram contaminações.

Na avaliação dos sintomas do PVY<sup>0</sup>-1 nos acessos de *Lycopersicon* spp, verificou-se que entre as espécies selvagens os acessos 4 (*L. pimpinellifolium*), 8, 10 e 11 (*L. peruvianum*) foram assintomáticos em todas as plantas inoculadas dos dois experimentos.

As plantas em PI 134417 e PI 134416 (*L. hirsutum*) no experimento I apresentaram sintomas locais na folha inoculada no 15<sup>o</sup> dia (Tabela 8) e não foram observados sintomas nesses acessos nas leituras seguintes. No experimento II todas as plantas inoculadas foram assintomáticas nas três leituras realizadas (Tabela 9).



Figura 5. Acessos de *Lycopersicon* spp. inoculados com o isolado PVY<sup>o</sup> –1 com sintomas sistêmico de risca amarela, mosaico bolhoso A) Acesso 15- F<sub>2</sub> (Santa Clara x *L. hirsutum*) experimento I e B) Acesso 14- F<sub>2</sub> (Santa Clara x *L. hirsutum* 1-3) x (Santa Clara x *L. hirsutum* 1-2) experimento II.

Nas progênies segregantes, nos dois experimentos, o acesso 12 não apresentou sintomas e os acessos 13, 14 e 15, apresentaram plantas com sintomas típicos induzidos por PVY<sup>0</sup>-1 em tomateiros como a risca amarela, mosaico e redução de folíolo (Figura 5) esses mesmos sintomas observados no híbrido Alambra e nos demais cultivares de tomateiros analisados (Tabela 5, Figura 4). Os acessos 17, 18 e 19 foram assintomáticos para todas as plantas inoculadas nos dois experimentos mostrando uma resposta uniforme ao vírus. (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8. Sintomas manifestados pelos acessos de *Lycopersicon* spp. ao isolado PVY<sup>0</sup>-1 no experimento I, São Paulo outubro de 2004.

Acessos	Sintomas		
	Experimento I		
	15° dia	22° dia	30° dia
1- PI 134417	Mo (FI)*	AS	AS
2- PI134416	Mo(FI); LNL	AS	AS
3- HES 5808-02	LNL; Mo	Mo; RF; NA	Mo; RF; AF, NA; E
4- NAV 1062	AS	AS	AS
5- <i>L. peruvianum</i> 29/115	Mo; B	NA; AF; RF; Mo; B	NA; AF; RF; Mo; B
6- <i>L. peruvianum</i> LA-371-2	AS	Mo; RF	Mo; RF; AF
7- <i>L. peruvianum</i>	AS	Mo; RF; E	Mo; RF; E
8- <i>L. peruvianum</i>	AS	AS	AS
9- <i>L. peruvianum</i> PI 270435	AS	RF	RF; AF; E
10- <i>L. peruvianum</i>	AS	AS	AS
11- <i>L. peruvianum</i>	AS	AS	AS
12-F <sub>2</sub> (Rio Grande x F <sub>3</sub> 1-2) x F <sub>3</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> )	AS	AS	AS
13-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-2 x Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-3)	AS	RF; Mo; RA	RF; Mo; RA
14-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-3 x Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-2)	AS	Mo; RA	Mo RA
15-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> )	AS	Mo; RA	Mo; RA
16- LA 1036 <i>Lycopersicon chmielewskii</i>	AS	Mo	Mo
17- F <sub>1</sub> Sugar Lamp	AS	AS	AS
18- F <sub>1</sub> Piko	AS	AS	AS
19- F <sub>1</sub> Cheloy mini	AS	AS	AS
20- F <sub>1</sub> 'Alambra'	Mo; RA	Mo; RA; RF	Mo; RA; RF; AF

\*Sintomas: LNL = lesão necrótica local; Mo = mosaico bolhoso; RA = risca amarela; AS = ausência de sintomas; RF = redução foliar; AF = afilamento foliar; NA = nanismo; E =epinastia.FI = folha inoculada.

Tabela 9. Sintomas manifestados pelos acessos de *Lycopersicon* spp. ao isolado PVY<sup>0</sup>-1 no experimento II, São Paulo dezembro de 2004.

Acessos	Sintomas		
	Experimento II		
	15 <sup>o</sup> dia	22 <sup>o</sup> dia	30 <sup>o</sup> dia
1- PI 134417	AS*	AS	AS
2- PI134416	AS	AS	AS
3- HES 5808-02	AS	Mo; RF; NA, E	Mo; RF; AF; NA; E
4- NAV 1062	AS	AS	AS
5- <i>L. peruvianum</i> 29/115	AS	RF; Mo	RF; Mo
6- <i>L. peruvianum</i> LA-371-2	AS	RF; Mo	RF; Mo; AF
7- <i>L. peruvianum</i>	AS	RF; Mo	RF; Mo
8- <i>L. peruvianum</i>	AS	AS	AS
9- <i>L. peruvianum</i> PI 270435	AS	RF; Mo; AF	RF; Mo; AF
10- <i>L. peruvianum</i>	AS	AS	AS
11- <i>L. peruvianum</i>	AS	AS	AS
12-F <sub>2</sub> (Rio Grande x F <sub>3</sub> 1-2) x F <sub>3</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> )	AS	AS	AS
13-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-2 x Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-3)	AS	RF; Mo; RA; AF; E;	RF; Mo; RA; AF; E
14-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-3 x Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-2)	AS	Mo; RA	Mo; RA
15-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> )	AS	Mo, RA; AF; RF	Mo; RA; AF; RF
16- LA 1036 <i>Lycopersicon chmielewskii</i>	AS	AS	AS
17- F <sub>1</sub> Sugar Lamp	AS	AS	AS
18- F <sub>1</sub> Piko	AS	AS	AS
19- F <sub>1</sub> Cheloy mini	AS	AS	AS
20- F <sub>1</sub> 'Alambra'	Mo, RA	Mo; RA; RF	Mo; RA; RF; AF

\*Sintomas: Mo= mosaico bolhoso; RA= risca amarela; AS= ausência de sintomas; RF= redução foliar; AF= afilamento foliar; NA= nanismo; E=epinastia.

Nos dois experimentos realizados todas as plantas do acesso 4 (*L. pimpinellifolium*), apresentaram ausência total de sintomas visuais, mas o vírus pode ser recuperado em *N. tabacum* 'WB' e as folhas apicais submetidas ao PTA-ELISA, foram positivas para PVY, classificando-o como tolerante ao vírus (Tabelas 10 e 11). NAGAI E COSTA (1969) obtiveram plantas com resistência satisfatória ao PVY com o cruzamento desse acesso com tomateiros do tipo Santa Cruz.

Nos acessos 6, 7, 8, 10 e 11 (*L. peruvianum*) foram observadas respectivamente, oito, seis, seis, seis e duas plantas com recuperação negativa em PTA- ELISA, portanto imunes ao vírus e plantas tolerantes. Além da imunidade e tolerância observada nesses acessos, outros acessos de *L. peruvianum* têm sido relacionados como resistentes a PVY: PI 126410, PI 128660 e PI 127829 (NAGAI *et al.*, 1991).

Na espécie selvagem PI 134417 (*L. hirsutum*) observaram-se quatro plantas suscetíveis e seis tolerantes no experimento I e todas tolerantes no experimento II. Esses resultados são diferentes dos obtidos por THOMAS E MAC GRATH (1988) e LEGNANI *et al.* (1995) que obtiveram somente plantas suscetíveis. Essa diferença pode ser atribuída a utilização de isolados distintos, procedentes de diferentes regiões e em ambos trabalhos não foram identificados à estirpe do PVY podendo então se tratar de outra estirpe que não a comum, empregada neste estudo.

Todas as plantas da PI 134416 (*L. hirsutum*) no experimento II foram positivas em PTA-ELISA, portanto tolerantes ao vírus, no experimento I seis plantas foram tolerantes e quatro plantas imunes. Os acessos de *L. hirsutum* foram relacionados como resistentes ao PVY a PI 247087, sendo que (*L. hirsutum*), tem apresentado reação imune a diversos isolados de PVY (LEGNANI, *et al.*, 1995).

De modo geral as espécies selvagens avaliadas apresentaram reações desuniformes ao PVY<sup>0</sup>-1, como no acesso 6 (*L. peruvianum*) com 8 plantas imunes, 10 tolerantes e 2 suscetíveis, no acesso 7 (*L. peruvianum*) com 3 plantas imunes, 13 tolerantes e 4 suscetíveis e no acesso 16 (*L. chmielewskii*) com 2 plantas imunes, 7 tolerantes e 11 suscetíveis. Este



comportamento pode ser atribuído a grande variabilidade genética apresentada nas espécies selvagens, a uma possível mistura de sementes ou contaminação na polinização, por serem selvagens e possuírem uma alta taxa de fecundação cruzada.

Tabela 10. Reação de acessos de *Lycopersicon* spp. ao isolado PVY<sup>0</sup>-1 no experimento I.

Acessos	Experimento I								
	Sintomas e comportamento								
	To	CS	SS	+	-	I	R	T	S
1- PI 134417	10*	4	6	10	0	0	0	6	4
2- PI 134416	10	3	7	10	0	0	0	7	3
3- HES 5808-02	10	7	3	10	0	0	0	3	7
4- NAV 1062	10	0	10	10	0	0	0	10	0
5- <i>L. peruvianum</i> 29/115	10	1	9	10	0	0	0	9	1
6- <i>L. peruvianum</i> LA-371-2	10	1	9	2	8	8	0	1	1
7- <i>L. peruvianum</i>	10	2	8	7	3	3	0	5	2
8- <i>L. peruvianum</i>	10	0	10	4	6	6	0	4	0
9- <i>L. peruvianum</i> PI 270435	10	1	9	10	0	0	0	9	1
10- <i>L. peruvianum</i>	10	0	10	6	4	4	0	6	0
11- <i>L. peruvianum</i>	10	0	10	10	0	0	0	10	0
12-F <sub>2</sub> (Rio Grande x F <sub>3</sub> 1-2) x F <sub>3</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> )	10	0	10	7	3	3	0	7	0
13-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-2 x Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-3)	10	8	2	8	2	2	0	0	8
14-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-3 x Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-2)	10	7	3	7	3	3	0	0	7
15-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> )	10	8	2	8	2	2	0	0	8
16- LA 1036 <i>Lycopersicon chmielewskii</i>	10	3	7	10	0	0	0	7	3
17- F <sub>1</sub> Sugar Lamp	10	0	10	10	0	0	0	10	0
18- F <sub>1</sub> Piko	10	0	10	10	0	0	0	10	0
19- F <sub>1</sub> Cheloy mini	10	0	10	10	0	0	0	10	0
20- F <sub>1</sub> 'Alambra'	10	10	0	10	0	0	0	0	10

\*To = total de plantas; CS = com sintomas; SS = sem sintomas; + = plantas positivas no teste de PTA-ELISA; - = plantas negativas no teste de PTA-ELISA; I = imune; R = resistente; T = tolerante; S = suscetível.

Tabela 11. Reação de acessos de *Lycopersicon* spp. ao isolado PVY<sup>0</sup>-1 no experimento II.

Acessos	Experimento II								
	Sintomas e comportamento								
	T	CS	SS	+	-	I	R	T	S
1- PI 134417	10*	0	10	10	0	0	0	10	0
2- PI 134416	10	0	10	6	4	4	0	6	0
3- HES 5808-02	10	10	0	10	0	0	0	0	10
4- NAV 1062	10	0	10	10	0	0	0	10	0
5- <i>L. peruvianum</i> 29/115	10	4	6	10	0	0	0	6	4
6- <i>L. peruvianum</i> LA-371-2	10	1	9	10	0	0	0	9	1
7- <i>L. peruvianum</i>	10	2	8	10	0	0	0	8	2
8- <i>L. peruvianum</i>	10	0	10	10	0	0	0	10	0
9- <i>L. peruvianum</i> PI 270435	10	3	7	10	0	0	0	7	3
10- <i>L. peruvianum</i>	10	0	10	8	2	2	0	8	0
11- <i>L. peruvianum</i>	10	0	10	8	2	2	0	8	0
12-F <sub>2</sub> (Rio Grande x F <sub>3</sub> 1-2) x F <sub>3</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> )	10	0	10	10	0	0	0	10	0
13-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-2 x Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-3)	10	7	3	7	3	3	0	0	7
14-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-3 x Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-2)	10	8	2	9	1	1	0	1	8
15-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> )	10	8	2	9	1	1	0	1	8
16- LA 1036 <i>Lycopersicon chmielewskii</i>	10	0	10	8	2	2	0	0	8
17- F <sub>1</sub> Sugar Lamp	10	0	10	10	0	0	0	10	0
18- F <sub>1</sub> Piko	10	0	10	10	0	0	0	10	0
19- F <sub>1</sub> Cheloy mini	10	0	10	10	0	0	0	10	0
20- F <sub>1</sub> 'Alambra'	10	10	0	10	0	0	0	0	10

\*T= total de plantas; CS= com sintomas; SS= sem sintomas; += plantas positivas no teste de PTA-ELISA; -= plantas negativas no teste de PTA-ELISA; I= imune; R= resistente; T= tolerante; S= suscetível ;

As reações de imunidade e tolerância ao PVY<sup>0</sup>-1 observadas nas progêneses segregantes acessos 12 (3 plantas imunes e 17 tolerantes), 13 (5 imunes), 14 (4 plantas imunes e 1 tolerante) e 15 (3 plantas imunes e 1 tolerante) podem ser atribuídas ao *L. hirsutum* e ao tomate 'Santa Clara' utilizados nos cruzamentos, já mencionado que acessos

de *L. hirsutum* estão relacionados como resistentes ao PVY (LEGNANI, *et al.*, 1995) assim como o ‘Santa Clara’ que apresenta resistência ao PVY (NAGAI, *et al.*, 1991). As diversidades de comportamento manifestadas pelas plantas ao vírus também são atribuídas a alta variabilidade genética em que se encontram as progênes, gerações F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>.

Os tomateiros comerciais analisados foram sintomáticos e responderam positivamente ao PVY<sup>O</sup>-1, quando submetidos ao PTA-ELISA e foram considerados suscetíveis ao isolado PVY<sup>O</sup>-1 através dos critérios de avaliação adotados, demonstrando que os cultivares disponíveis no mercado são altamente suscetíveis a esse vírus. O súbito reaparecimento de surtos de PVY em tomateiro no estado de São Paulo (PALAZZO *et al.*, 2004) reflete a sistemática substituição de tomateiros com resistência genética ao PVY existentes na região nos últimos anos (ÁVILA *et al.*, 2004) fato que pode provocar mudanças nos programas de melhoramento dessa hortaliça.

Todas as plantas assintomáticas dos acessos 17, 18 e 19 quando submetidas ao PTA-ELISA foram positivas para a presença do vírus por isso foram consideradas tolerantes, essas uniformidades, tanto dos sintomas, como sorológica das plantas era esperada, pois esses acessos são híbridos, portanto quase não apresentam variabilidade genética em seu genótipo.

A interferência do vírus mesmo nas plantas que não apresentaram sintomas visuais pôde ser observada na variação entre os pesos fresco e seco das plantas, mecanicamente inoculadas, quando comparadas com as plantas sadias usadas como controle (Tabela 12).

Essa diferença entre o peso fresco e seco das plantas infectadas e sadias ocorreu, principalmente nos acessos híbridos 17, 18 e 19 evidenciando o dano causado pela infecção viral, mesmo quando não são observado sintomas externos.

Tabela 12. Valores do peso da matéria fresca (PF) e do peso secos (PS) medidos em gramas (g) da parte aérea utilizadas dez plantas por experimento dos acessos de *Lycopersicon* spp. inoculados com o vírus PVY<sup>0</sup> - 1.

Acessos	Experimento 1				Experimento 2			
	Controle		Inoculadas		Controle		Inoculadas	
	PF	PS	PF	PS	PF	PS	PF	PS
1- PI 134417	130	100	123.8	119.8	132	110	114.5	100
2- PI134416	125	88	96.8	95.7	125	88	93.4	90.1
3- HES 5808-02	84	80	74	71.8	90	81	74.8	72
4- NAV 1062	86	81	72.4	61.8	84	80	74	71.8
5- <i>L. peruvianum</i> 29/115	129	124	64.3	48.7	123.1	129.9	56.2	54
6- <i>L. peruvianum</i> LA-371-2	70	68	47.5	45.7	70.9	67.7	45.5	43.7
7- <i>L. peruvianum</i>	88	83	52.7	49	91.5	88	54.8	52.2
8- <i>L. peruvianum</i>	50	48	12.8	12.4	49	47.1	10.7	9.1
9- <i>L. peruvianum</i> PI 270435	30	23	10.3	9.9	30.5	28.9	10.1	9.7
10- <i>L. peruvianum</i>	40	38	14	13.5	38	36	13.1	11.8
11- <i>L. peruvianum</i>	32	28	12.1	11.7	34	31	12.8	1.7
12-F <sub>2</sub> (Rio Grande x F <sub>3</sub> 1-2) x F <sub>3</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> )	22.3	21	14.3	13.6	24.3	20.9	15.1	13.7
13-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-2 x Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-3)	90	87	18.6	17.8	94	91	20	18.5
14-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-3 x Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-2)	28	26	16.9	16.5	29	27	17.1	16.2
15-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> )	76	74	8.5	8	86	81	10.1	8.9
16- LA 1036 <i>Lycopersicon chmielewskii</i>	76	72	9	8.7	81	79	11.3	9.9
17- F <sub>1</sub> Sugar Lamp	110	90	12.4	11.8	120	111	15.4	13.2
18- F <sub>1</sub> Piko	60	58	13.2	12.6	70	66	20	17.1
19- F <sub>1</sub> Cheloy mini	90	88	18.7	17.8	95	91	23.3	20.8
20- F <sub>1</sub> 'Alambra'	130	100	55	45.5	133	99.8	48.7	44.5

A análise da proporção das plantas com e sem sintomas de PVY<sup>0</sup>- 1 (Tabela 13) pelo teste  $\chi^2$ , mostrou diferenças significativas, descartada a hipótese de igualdade entre a proporção de plantas sem e com sintomas dentro dos acessos. O teste  $\chi^2$  também foi feito para a proporção das plantas positivas e negativas em PTA-ELISA, obtidas diferenças significativas, rejeitada a hipótese de igualdade entre as plantas positivas e negativas dentro dos acessos.

Tabela 13. Análise estatística pelo teste  $\chi^2$  a 1% de significância da avaliação de acessos de *Lycopersicon* spp. ao PVY<sup>0</sup>-1.

Acessos	Sintomas e comportamento								
	To	CS	SS	$\chi^2$	%SS	+	-	$\chi^2$	%+
1- PI 134417	20*	4	16	47,0**	80	20	*	81,2**	100
2- PI134416	20	3	17	70,0**	85	16	4	20,76**	80
3- HES 5808-02	20	17	3	74,0**	15	20	*	81,2**	100
4- NAV 1062	20	0	20	170,1**	100	20	*	81,2**	100
5- <i>L. peruvianum</i> 29/115	20	6	14	49,46**	70	20	*	81,2**	100
6- <i>L. peruvianum</i> LA-371-2	20	2	18	152,2**	90	12	8	10,61**	60
7- <i>L. peruvianum</i>	20	4	16	55,0**	80	17	3	53,49**	85
8- <i>L. peruvianum</i>	20	0	20	170,1**	100	16	4	20,76**	80
9- <i>L. peruvianum</i> PI 270435	20	4	16	66,5**	80	20	0	17,13**	100
10- <i>L. peruvianum</i>	20	0	20	170,1***	100	14	6	10,09**	70
11- <i>L. peruvianum</i>	20	0	20	170,1**	100	18	2	87,55**	90
12-F <sub>2</sub> (Rio Grande x F <sub>3</sub> 1-2) x F <sub>3</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> )	20	0	20	170,1**	100	17	3	53,49**	85
13-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-2 x Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-3)	20	15	5	34,53**	25	15	5	12,26**	75
14-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-3 x Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> 1-2)	20	15	5	39,86**	25	16	4	19,25**	80
15-F <sub>2</sub> (Santa Clara x <i>L. hirsutum</i> )	20	16	4	55,0**	20	17	3	34,98**	85
16- LA 1036 <i>Lycopersicon chmielewskii</i>	20	3	17	48,95**	85	18	2	59,11**	90
17- F <sub>1</sub> Sugar Lamp	20	0	20	170,1**	100	20	0	81,2*	100
18- F <sub>1</sub> Piko	20	0	20	170,1**	100	20	0	81,2*	100
19- F <sub>1</sub> Cheloy mini	20	0	20	170,1**	100	20	0	81,2*	100
20- F <sub>1</sub> 'Alambra'	20	20	0	170,1**	0	20	0	81,2**	100

\*To= total de plantas; CS= com sintomas; SS= sem sintomas; %SS porcentagem de plantas sem sintomas; + = plantas positivas no teste de PTA-ELISA; -= plantas negativas no teste de PTA-ELISA; %+= porcentagem de plantas positivas no teste de PTA-ELISA.

Os acessos que apresentaram 100% de plantas sem sintomas visuais obtiveram após o ELISA, uma porcentagem que variou de 70-100% de plantas positivas para PVY. Este dado alerta para o fato de que mesmo quando as plantas não expressam fenotipicamente os sintomas do vírus, a infecção nas plantas ocorreu e o vírus pode ser facilmente disseminado no campo pelos afídeos vetores, a partir de plantas assintomáticas, que por não serem retiradas do campo atuam como fontes de infecção primária para novas culturas de tomate.

As plantas interessantes para o melhoramento genético que visam a resistência a viroses seriam as imunes e resistentes (FRASER, 1990), como neste trabalho nenhuma das plantas estudadas mostrou-se resistentes, as plantas que apresentaram imunidade entre todos os acessos foram selecionadas e mantidas em casa-de-vegetação para a obtenção de sementes para a continuidade dos estudos.

Entre os acessos avaliados as espécie selvagens de *L. peruvianum*, LA-371-2 e irradiado 1C apresentaram um grande número de plantas com comportamento imune ao PVY<sup>0</sup>-1, sendo as mais promissoras como fontes de resistência ao vírus. As plantas imunes das progênies segregantes foram selecionadas para a continuidade do programa de melhoramento do IAC.

## 5 CONCLUSÕES

1. O vírus isolado de plantas de tomateiro híbrido ‘Alambra’ de Elias Fausto, SP foi identificado como PVY estirpe comum patotipo 1 (PVY<sup>0</sup>-1) por testes biológicos e sorológicos.
2. Os acessos de *L. peruvianum* 8, LA-371-2 e o irradiado 1C apresentaram um grande número de plantas imunes constituindo fontes potenciais de genes de resistência ao PVY<sup>0</sup>-1.
3. As progênies segregantes apresentaram plantas com comportamento imune selecionadas para que o programa de melhoramento genético de tomate do IAC, visando à resistência ao PVY prossiga com sucesso.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, M.A.V. E BARRADAS, M.M. *Solanum mammosum* L. nova hospedeira diferencial para o vírus Y da batata (PVY) e sua estirpe necrótica (PVY<sup>N</sup>). *Fitopatologia Brasileira*, 7(1), p.105-109, 1982.

ALMEIDA, A.M.R. E LIMA, J.A.A. Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia, Brasília, Sociedade brasileira de Fitopatologia, p.1-150, 2001.

ANDRADE, E.R, E FIGUEIRA, A.R. Incidência e sintomatologia de estirpes do vírus Y (PVY) nas regiões produtoras de batata do sul de Minas Gerais. *Ciência e Prática*, 16, p.371- 376, 1992.

ANTIGNUS, Y.; RACCAH, B.; GAL-ON, A.; COHEN, S. biological and serological characterization of Zucchini yellow mosaic and watermelon mosaic virus-2 isolate in Israel. *Phytoparasitica*, 17, p. 289-298, 1989.

ÁVILA, A.C.de; INOUE- NAGATA, A.K.; COSTA, H. BOITEUX, L.S; NEVES, L.O.Q.; PRATES, R.S.; BERTINI, L.A. Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. *Horticultura brasileira*, 22:3, p.655-658, 2004.

ÁVILA, A.C.; De HAAN, P.; SMEETE, M.L.L.; RESENDE, R. de O.; KORMELINK, R.; KITAJIMA, E.W.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Distinct levels of relationship between tospovirus isolates. *Archives of Virology*, v. 128, p.211-227, 1993.



BARRADAS, M.M. Organização de uma coleção de vírus fitopatogênicos em tecidos foliares desidratados com cloreto de cálcio, *O Biológico*, 44, p.221-229, 1978.

BECZNER, L.; HORVATH, H.; ROMHANYI, I.; FORSTER, H. Studies on the aetiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Research*, 27, p. 339-351, 1984.

BEHL, M.K. & CHOWFLA, S.C. Resistance to necrotic strain of potato virus Y in tomato plants. *Indian- Phytopathology*. 42(4), p.555-556, 1989.

BLANCARD, D. Enfermedades del tomate. Editora Mundi-Prensa, INRA, Paris, 1996.

BLANCO-URGOITI, B.; SÁNCHEZ, E.; SAN ROMÁN, C.P.; DOPAZO, J.; PONZ, F. *Potato virus y group C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strain*. *Journal of General of Virology*, Great Britain, 79, p.2037-2042, 1998.

BRIOSO, P.S.T., FERREIRA, M.A. E OLIVEIRA, D.E. “Potato vírus Y”- identificação de estirpes infectando naturalmente o pimentão (*Capsicum annum* L.) “Margareth” *Fitopatologia Brasileira*, 18, p.274, 1993.

BRIOSO, P.S.T.; FERREIRA, M.A. E OLIVEIRA, D.E. “Potato vírus Y”- identificação de estirpes infectando naturalmente o pimentão (*Capsicum annum* L.) e fonte de resistência. *Fitopatologia Brasileira*, 21, p. 226-235, 1996.

BRUNT, A.A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M.J.; GIBBS, A.J.; WATSON, L.E.; GURCHER, E.J. Plant viruses on line. Description and list from the vide database. URL: <http://biology.anu.edu.au/groups/mes/vide/> versão 16/01/1997.

CÂMARA, F.L.A.; CUPERTINO, F.P.E FILGUEIRA, F.A.R. Incidência de vírus em cultivares de multiplicados sucessivamente em Goiás. *Fitopatologia Brasileira*, 11, p.711-716, 1986.

CAMARGO FILHO, W.P. de. Perspectivas dos mercados de tomate para indústria e mesa. *Informações Econômicas*, São Paulo, 31, 5, p.51-54, 2001.

CHAGAS, C.M.; VICENTE, M. ALBA, P.C. & JULY, J.R. *Solanum athropurpureum* Schrank, A natural reservoir of potato virus Y (PVY). *Phytopathology Zeitschrift*, 90, p.147-151, 1977.

CHOD, J.; CHODOVA, D.; KOCOVA, M. & JOKES, M. Sensitivity of some tomato cultivares to potato virus Y with respect to chlorophyll content. *J. Zahradnictvi* 23,1, p.15-18, 1996.

CLARK, M.F. E ADAMS, A.N. Characterization of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, Great Britain, 34, p.475-483, 1977.

COLARICCIO, A. Identificação do vírus da batata, estirpe comum (PVY<sup>0</sup>), em *Solanum palinacanthum* Dun., Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Botânica, Universidade de São Paulo-USP, p.8-10, 1996.

COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, LOURENÇÃO, A.L.; MELO, A.M.T. de; SIQUEIRA, W.J. Detecção do “*Chrysanthemum stem necrosis virus*” em tomateiro no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, 26, 2, p.252-254, 2000.

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, p.177-182, 2001.

COLLAR, J.L.; AVILLA, C. E FERRERES, A. New correlations between aphid stylet paths and nonpersistent virus transmission. *Environment Entomology* 26, p.537-544, 1997.

COSTA, A.S. E ALVES, S. Mosaico do pimentão, *Bragantia*., 10, p.95-96, 1950.

COSTA, A.S., CARVALHO, A.M.B.E KITAJIMA, E.W. Risca do tomateiro em São Paulo causada por estirpe do vírus Y. *Bragantia*, 19, p. 1111-1128, 1960.

COSTA, A.S.; CARVALHO, A.M.B.; COSTA, C.L.e NAGAI, H. Moléstias de vírus do tomateiro, *Boletim do Campo* 183, p.8-26, 1964.

CUNHA, L.C.V.; RESENDE, R.O.; NAGATA, T. & INOUE-NAGATA, A.K.

Characterization of brasilian potyvirus isolates from tomate and sweetpepper. XIII

National meeting of virology ,7: 11, p.49, 2002.

CUPERTINO, F.P.; COSTA, C.L.;MELO, A.B.P.; SUDO,S. e SILVA, A.M.R.

Transmissão de estirpes de PVY vindas de batata, pimentão ou tomate por meio de

*Myzus persicae*. Fitopatologia Brasileira 17, p.187, 1992.

CUPERTINO, F.P.; COSTA, C.L.; SILVA, A.M.R. Transmissão de três estirpes do vírus Y

da batata por *Myzus nicotianae*, Fitopatologia Brasileira. 18(1), p.102-106, 1993.

CUPERTINO, F.P.; SÁ, P.B. de, MEDEIROS, R.B. e CARVALHO, C.G.P. Purificação e

sorologia de uma estirpe de PVY causadora de mosaico em pimentão (*Capsicum anuum*)

'Magda'. Fitopatologia Brasileira, 16(2): XXVIII. Resumo n°58, 1991.

DE BOKX, J.A.; HUTTINGA, H. *Potato vírus Y*. In: Descriptions plant viruses, n°242.

Kew, England:CMI/AAB, 1981.

DERRICK, R. *quantitative assay for plant viruses using aerologically specif electron*

*microscopy*. Virology, 56 p.652-656, 1986.

DOUGHERTY, W.G. E CARRINGTON, J.C.. Expression and function of potyviral gene

products. Annual Review Phytopathology, 26, p. 123-143, 1988.

FARIA, J.C.; BEZERRA, I.C.; ZERBINI, F.M.; RIBEIRO, S.G.; LIMA, M.F. Situação atual das geminivirose no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 25, p.125-137, 2000.

FERRAZ, F. E MENDES, M.L. O nematóide das galhas . In: Informe Agropecuário-nematóide inimigo oculto da agricultura. Belo Horizonte, 16:172, p.43-45, 1992.

FERRERES, A.; BLUA, M.J. E PERRING, T.M. Reaction and transmission characteristics of Zucchini yellow mosaic virus by *Aphids gossypii* and *Myzus persicae* (homoptera: Aphididae), *Journal Economic Entomology*, 85, p.759-765, 1992.

FILGUEIRA, F.A.R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção de hortaliças. Viçosa: UFV, p.220, 2000.

FRANCKI, R.I.B.; MILNE, R.G.; HATTA, T. Potyvirus group. Atlas of plant viruses. Boca Raton: CRC Press, 2, p.183-217, 1985.

FRASER, R.S.S. The genetics of resistance to plant viruses. *Annual Review Phytopathology* 28, p.179-200, 1990.

GEBRE-SELASSIE, K; MARCHOUX, G.; DELECOLLE, B.; POCHARD, E. *Variabilité naturelles des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France. Caractérisation et classification en pathotypes*. *Agronomie, France*, 5(7), p.621-630, 1985.

GEBRE-SELASSIE, K; LATERROT, H; MARCHOUX, G. Breeding tomatoes for resistance against necrotic of potato virus Y.10<sup>th</sup> meeting eucarpia tomato working group, Salerno (Italy), 2-6 september, p.25. 1987.

GOMES, F.P. A estatística moderna na Pesquisa Agropecuária, Piracicaba, p.91-97, 1984

GUGERLI, P. E FRIES, P. Characterization of monoclonal antibodies to potato virus Y their use for virus detection. Journal General Virology, 64, p. 2471-2477, 1983.

HARI, V.; SIEGEL, A.; ROZEK, D.; TIMBERLAKE, W. E. The RNA of tobacco etch virus contains poly(A). Virology, 92, p.568-571, 1979.

HARRIS, K.F. E MARAMOROSCH, K. An ingestion-egestion hypothesis of non-circulation virus transmission. In Aphids: virus vectors. New York, Academic Press, p.165-220, 1977.

HEATH, R.; SWARD, R.J.; MORAN, J.R.; MASON, A.J.; HALLAM, N.D. Biological characterization of six Australian isolates of potato virus Y and their serological detection by ELISA. Australian Journal Agriculture, 38, p.395-402, 1987.

HOLLINGS, M. E BRUNT, A.A. Potyvirus group. CMI/AAB. Descr. Plant Viruses, 15, n<sup>o</sup>245, 1981.

INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, LOBO, T.O.T.A.; ÁVILA, A.C.de E MONTE, D.C. Analysis of the nucleotide sequence of the coat protein and 3'-untranslated region of two brazilian *Potato virus Y* isolates. *Fitopatologia Brasileira*, 26(1), março, p.45-52, 2001.

INOUE-NAGATA, A.K.; RESENDE, R.O.; BOITEUX, D.C.; MONTE, D.C.; DUSI, <sup>a</sup>N.; ÁVILA, A.C. de E VANDER- VLUGT, R.A.A. Pepper yellow mosaic vírus, a new potyvirus in sweetpepper; *Capsicum annuum*, *Archives of Virology*147, p.849-855, 2002.

JUNQUEIRA, A.H. Repensando a agricultura paulista: Cadeia produtiva das hortaliças. SAAS, março 1993, p.17-33.

KALLOO, G. Genetic improvement of tomato, BLHB p.1-8, 1991.

KOENING, R.; PAUL, H.L. Variants of ELISA in plant virus diagnosis. *Journal of virology Methods*, 5, p.113-125, 1982.

KOENING, R. Serology and immunochemistry. In: Milne, R.G. *The filamentous plant viruses*, 4, New York, Plenum Press, p. 111-158, 1988.

KUDAMATSU, M.; ALBA, <sup>a</sup>P.C. & CHAGAS, C.M. Determinação serológica do vírus Y da batata em plantas de *S. ciliatum* Lam. e de *S. viarum* Dun. Naturalmente infectadas. *Arquivos Instituto Biológico*, 48 (1/4), p. 45-47, 1981.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, A., BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; RESENDE, J.A.M. Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. Editora Agronômica Ceres, v.2, 3<sup>o</sup>. Eds., São Paulo, p.774, 1997.

LAIN, S.; RIECHMANN, J.L.; GARCIA, J.A. RNA helicase: a novel catalytic activity associated with protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Resect.*, 18, p.7003-7006, 1990.

LE ROMANCER, M.; KERLAN, C.; NEDELLEC, M. Biological characterization of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathology*, 43, p.138-144, 1994.

LECOQ, H. E PURCIFULL, D.E. Biological variability of potyvirus, an example: Zucchini yellow mosaic virus. *Archives of Virology*, 5, p. 229-23, 1992.

LEGNANI, R.; SELASSIE, R.G.; WOMDIM, R.N.; GOGNALONS, P.; MOTTI, A.;

LATERROT, H. & MARCHOUX, G. Evaluation and inheritance of the *Lycopersicon hirsutum* resistance against potato virus Y. *Euphytica*, 86:3, p.219-226, 1995.

LINDBO, J.A. E DOUGHERTY, W.G. Potyviruses In: *Encyclopedia of virology* (Webster, R.G. e Granoff, A.), New York, Academic Press, v.3, p. 1148-1153, 1994.



LUCKWILL, L.C. The genus *Lycopersicon*: an historical, biological, and taxonomic survey of the wild and cultivated tomatoes. *Aberdeen University Studies*, 120, 1943.

LSPA Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (IBGE), p.589-601, 2003.

MACIEL-ZAMBOLIM, E.; COSTA,H.; CAPUCHO, A.S.; ÁVILA, A.C. de; INOUE-NAGATA, A.K.; KITAJIMA, E.W. Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região serrana do Espírito Santo. *Fitopatologia brasileira*, 29:3, p.325-327, 2004.

MALUF, W.R. Evolução das espécies hortícolas na América Latina. In: PASSOS, F.A. 1ºSimpósio Latino- Americano sobre recursos genéticos de espécies hortícolas, Anais, Fundação Cargill, Campinas, SP, Brasil, p.111-114,1990.

MARTIN, B., COLLAR, J.L.; TJALLINGIL, W.F., FERRERES, A. Intercellular ingestion and salivation by aphid may cause the acquisition and inoculation of non-persistent transmethylation reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 92, p.6117-6121, 1997.

MARCHOUX, G.; PALLOIX, A; GEBRE-SELASSIÉ, K.; CARANTA, C; LEGNANI,R; DOGIMONT,C. Variabilité du virus Y de la pomme de terre et des potyvirus voisins. Diversité des sources de résistance chez le piment (*Capsicum* sp.). *Annual du Tabac*, Seita BERGERAC, section 2, p.27, 1995.

MATTHEWS, R.E.F. *Plant virology*, 3<sup>rd</sup> San Diego, Academic, p.336-342, 1991.

MATTHEWS, R.E.F. *Plant virology*, 4<sup>th</sup> San Diego, Academic, p.443-444, 1993.

MATTHEWS, R.E.F. *Plant Virology*, California, Academic Press, 4<sup>a</sup>. Eds., p.1001. 2002.

MEISSNER FILHO, P.E. & CUPERTINO, F.P. Reação de *Capsicum* a uma estirpe do vírus Y da batata, isolado de pimentão e tomate. *Fitopatologia Brasileira*, 15(1), 38-41p., 1990.

MEISSNER FILHO, P.E.; CUPERTINO, F.P.; KITAJIMA, E.W. & COSTA, C.L. Propriedades biológicas de uma estirpe de PVY isolada de plantações de tomate do Distrito Federal, *Fitopatologia Brasileira*, 12, 145p., 1987.

MELO, P.C.T. E RIBEIRO, S. Retrospectiva da agroindústria do tomate no Brasil nos anos 90. *Horticultura Brasileira*, 11 (2), p. 109-111, 1993.

MIRANDA, G.M.C. Importância da cultura do tomateiro. In: *Cenário do negócio agrícola de Minas Gerais- Cenário futuro para a cadeia produtiva de olerícolas em Minas Gerais.*, p.48-68,1995.

MONTENEGRO, M.J.; KITAJIMA, E.W.; CAMARGO, L.J.B.; COSTA, <sup>a</sup>S. Comparação eletrono-microscópica dos tecidos de plantas infectadas por diferentes estirpes do vírus Y da batata que ocorrem no estado de São Paulo. *Bragantia*, 27, p.17-23, 1968.

MULLER, C.H. A revision of the genus *Lycopersicon*. USDA Misc. Publ. 382:29pp, 1940.

MURPHY, F.A., ARLFORS, V.; SHAW, J.G. Development of cylindrical inclusions in potyvirus infected protoplasts. *Phytopathology*, 80, p.1033, 1990.

MURPHY, F.A., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., GHABRIAL, S.A., JARVIS, A.W.; MARTELL, G.P., MAYO, M.A., SUMMERS, M.D. Vírus taxonomy 6<sup>th</sup> Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, 1 (suplemento), p. 1-586, 1995.

NAGAI, H. E COSTA, A.S. Incorporação de resistência ao mosaico Y em tomateiro. *Bragantia*, Campinas, 26:225-232, 1969.

NAGAI, H. & COSTA, A.S. Resistência ao mosaico Y, combinada com a resistência ao mosaico comum, em tomateiro. *Bragantia*, Campinas, 31:1-8, 1972.

NAGAI, H. Melhoramento de pimentão (*Capsicum annuum L.*) visando a resistência ao vírus Y. *Horticultura brasileira*, 1, p.3-9., 1983

NAGAI, H., LOURENÇÃO, A.L. & SIQUEIRA, W.J. Tomato breeding for resistance to diseases and pests in Brazil. *Acta Horticulturae* 301, p.: 91-97, 1991.

NAGAI, H. Tomate. In: FURLANI, A.M.C.; VIÉGAS, G.P. O melhoramento de plantas no Instituto Agrônômico, Campinas, São Paulo, v.1, 301-313p., 1993.

NUEZ, F. ; RINCON, A.R. del; TELLO, J. ; CUARTERO, J ; SEGURA, B. El cultivo del tomate, ediciones Mundi-Prensa Madrd-Barcelona-México, p. 59-66, 1998.

PALAZZO, S.R.L.; BERGMANN, J.C.; CHAVES, A.I.R; EIRAS, M.; CHAGAS,C.M.; COLARICCIO,A. Surto de Potyvirus associado ao mosaico amarelo do tomateiro no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, vol.30, n° 1, 117p. (res.), 2004.

PARELLA,G.; RUFFEL, S; MORETTI, A.; MOREL, C.; PALLOIX, A.; CARANTA,C.  
*Recessive resistance gene against potyviruses are localized in collinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes.* *Theoretical Applied Genetics*, 105, p.855-861, 2002.

PAVAN, M.A.;KUROZAWA,C.; HOJO, H. Ocorrência do vírus Y da batata PVY em tomateiro da variedade Ângela Hiper na região de Botucatu, SP. *Summa Phytopathologica*, 14:83, 1998 (res.)

POWELL, G.; PIRONE, T. & HARDIE, J. Aphid stylet activities during potyvirus acquisition from plants and an in vitro system that correlate with subsequent transmission.; European Journal Plant Pathology, 101, p.411-420, 1995.

REIFSCHNEIDER, F.J.B. (Eds.) *Capsicum pimentas e pimentões no Brasil*. Embrapa, Brasília, p.113, 2000.

RICK, C.M., LAMM R. Biosystemetic studies on the status of *Lycopersicon chilense*. American Journal Botanic, 42, p.663-675, 1955.

RICK, C.M. Genetic and systematic studies on accessions of *Lycopersicon* from Galapagos Islands. American Journal Botanic, 43, p.687-696, 1956.

RICK, C.M. Biosystemetic studies on Galapagos tomatoes. Occasional papers California Academic Science, 44, p.59-77, 1963.

RICK, C.M. Natural variability in wild species of *Lycopersicon* and its bearing on tomato breeding. Genetic Agriculture, 30, p.249-259, 1976.

RICK, C.M. E FOBES, J.F. Allozymes of Galapagos tomatoes: polymorphism, geographic distribution, and affinities. Evolution, 29, p.443-457, 1975.

RICKS, C.M. Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*, In: Hawkes, J.G.; NESTER R.N.; SKLEDING A.D. The biology and taxonomy of the solanaceae. Linear Society Symposium , Academic London, 1979.

RIECHMANN, J.L.; LAIN, S.; GARCIA, J.A. The genome-linked protein and 5' and RNA sequence of plum pox potyvirus. Journal of General virology, 70, p.2785-2789, 1989.

RIECHMANN, J.L.; LAIN, S.; GARCIA, J.A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. Journal General of Virology, 73, p.1-16, 1992.

ROMERO, A.; BLANCO-URGOITI, B.; SOTO, M.J.; FERRERES, A.; PONZ, F.

*Characterization of typical pepper isolates of reveals multiple pathotypes within a single genetic strain.* Virus Research 79, p.71-80, 2001.

SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.; BRUNT, A.A. The *Potyviridae*. Cambridge, University Press, p.1-500 , 1994.

SILBERSCHMIDT, K.M.; ROSTOM, E.; ULSON, C.M. A strain of Potato virus Y inducing local and systemic necrotic spots on leaves of tobacco White Burley, American Potato Journal, 31, p. 213-217, 1954.

SILBERSCHMIDT, K.M. Uma doença do tomateiro em Piedade causado pelo vírus Y da batatinha. Arquivos do Instituto Biológico, 23, p. 123-150, 1956.

SIAW, M.F.E.; SHAHABUDDIN, M.; BALLARD, S.; SHAW, J.G.; RHOADS, R. E. Identification of a protein covalently linked to the 5' terminus of tobacco vein mottling virus RNA. *Virology*, 142, p.134-143, 1985.

SOMOS, A. *The paprika*. Budapest: Akadémiai Kiadó, p.302, 1984.

SOUZA, Z.S. & BERTONCINI, O. Ocorrência de PLRV e PVY em cultivares e clones de batata São Joaquim. *Horticultura brasileira*, 11, p.103 (res.), 1993.

STOBBS, L.W.; POYSA, V.; SCHAGEN, J.G. van. Susceptibility of cultivars of tomato and pepper to a necrotic strain of potato virus Y. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16:1, p.43-48, 1994.

THOMAS, J.E. Resistance to potato virus Y in *Lycopersicon* species. *Australas. Plant Pathology*, 10, p. 67-68, 1981.

THOMAS, J. E. Mc GRATH, Inheritance of resistance to potato virus Y in tomato. *Australian Journal agriculture*, 39, p.475-479, 1988.

THORNBURY, D.W.; HELLMAN, G.M.; RHODS, R.E.; PIRONE, T.P. Purification and characterization of potyvirus helper component. *Virology.*, 144, p. 260-267, 1985.

TRUTA, A.A.C.; SOUZA, A.R.R.; NASCIMENTO, A.V.S.; PEREIRA, R.C.; PINTO, C.M.F.; BROMMONCHENKEL, S.H.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. *identidade e propriedades de isolados de Potyvirus provenientes de Capsicum spp.* Fitopatologia brasileira, Brasília, 29(2) p.160-168, 2004.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.H.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. *Virus Taxonomy*. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York, Academic Press, p. 1162, 2000.

VERCHOT, J.; KOONIN, E.V.; CARRINGTON, J.C. The 35 kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology*, 185, p. 527-535, 1991.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E. Enzyme immunoassays and their potential in diagnostic virology. In: Krustak, E.; Krustak, A. *Cooperative Diagnosis of Viral Diseases*, volume 2. Academic Press, New York, p.449-457, 1977.

VOS, P.; VERVER, J.; JAEGLE, M.; WELLINK, J.; VAN KAMMEN, A.; GOLDBACH, R. Two viral proteins involved in the proteolytic processing of the cowpea mosaic virus polyproteins. *Nucleic Acids Research*, 16, p.1967-1985, 1988.

WARNOCK, S.J. A review of taxonomy and Phylogeny of the Genus *Lycopersicon*. *HortScience*, 23(4), p.669-673, 1988.



WARNOCK, S.J. Natural habits of *Lycopersicon* species. HortScience, 26(5), p.466-471, 1991.

ZERBINI, F.M. E ZAMBOLIN, E.M. A família *Potyviridae* , Review Annual Plant Diseases- vol 8, p.225-285, 2000.