

## IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DO MOSAICO DO TOMATEIRO (TOMV) *TOBAMOVIRUS*, POR MEIO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

Keila Maria Roncato Duarte<sup>1\*</sup>; Luiz Humberto Gomes<sup>2</sup>; Felipe Gabriel Andrino<sup>2</sup>; Gildemberg Amorin Leal Jr.<sup>1</sup>; Fabio Henrique Bicudo da Silva<sup>2</sup>; Jonas Augusto Rizzato Paschoal<sup>1</sup>; Ana Maria Brancalion Giacomelli<sup>2</sup>; Flavio Cesar Almeida Tavares<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lab. de Nutrição Animal - USP/CENA, C.P. 96 - CEP: 13416-000 - Piracicaba, SP.

<sup>2</sup>Depto. de Genética, Lab. de Genética de Leveduras - USP/ESALQ, C.P. 83 - CEP: 13418-900 - Piracicaba, SP.

\*Autor correspondente <kmrduart@cena.usp.br>

**RESUMO:** O tomateiro é uma olerícola de grande importância econômica e uma das mais suscetíveis a viroses, dentre as quais, a causada pelo vírus do mosaico do tomateiro (ToMV), gênero *Tobamovirus*, que tem como sintomas mosaico verde claro-escuro nas folhas, afilamento dos folíolos e diminuição da produção, entre outros sintomas. Visando a identificação do ToMV, foram produzidos anticorpos monoclonais (MABs), testados através de PTA- ELISA ("plate trapped antigen- enzyme linked immunoassay"). O MAb (10.H1) foi utilizado para avaliar a capacidade de identificação do ToMV em testes no campo em plantas de tomate infectadas. O MAb não apresentou reação cruzada com TMV (tobamovirus do mosaico do tabaco) nem com extrato de plantas sadias. O ToMV das amostras foi isolado, purificado e re-inoculado em plantas de tomateiro e de tabaco, para confirmação dos sintomas. Em "immunoblotting" o MAb 10.H1 reconheceu somente a proteína referente à capa protéica do ToMV (de 17,5 kDa). A especificidade do MAb 10.H1 pode permitir o diagnóstico precoce desta doença na fase de plântulas, ainda em casa de vegetação, evitando assim a disseminação desta virose no campo.

Palavras-chave: ToMV, TMV, anticorpo monoclonal, diagnóstico, tomate

## IDENTIFICATION OF TOMATO MOSAIC VIRUS (TOMV) *TOBAMOVIRUS* USING MONOCLONAL ANTIBODIES

**ABSTRACT:** Tomato is a highly important crop for the world economy, and very susceptible to virus diseases, among them the tomato mosaic tobamovirus (ToMV), which causes light and dark green mosaic in the leaves, decreases yield, among other symptoms. With the aim of early identifying ToMV in biological material, harvested from crop fields, monoclonal antibodies (MABs) were produced against ToMV. The MAb 10.H1 tested through PTA-ELISA (Plate Trapped Antigen-Enzyme-Linked immunosorbent assay), does not cross-react with TMV (tobacco mosaic tobamovirus) or with proteins extracted from plant sap. The MAb was able to identify ToMV from infected plants. The ToMV was isolated, purified and used to re-inoculate tobacco and tomato plants to confirm the symptoms. In immunoblotting assays the MAb recognizes only the band corresponding to the coat protein of the ToMV (17.5 kDa). The MAb 10.H1 opens the possibility to identify ToMV in tomato seedlings avoiding its dissemination in cropped fields.

Key words: ToMV, TMV, monoclonal antibody, diagnose, tomato

### INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é suscetível a mais de 40 viroses que ocorrem no mundo e, embora a virose causada pelo vírus do mosaico do tomateiro ("tomato mosaic virus - ToMV), gênero *Tobamovirus*, não seja a virose mais importante na cultura no Brasil, vem acarretando prejuízos crescentes no Estado de São Paulo, devido à variedade de mesa "Santa Clara" apresentar alta suscetibilidade a esse vírus, que é transmitido via sementes (Bastos, 1998). Desta forma, programas de melhoramento aliados a testes precisos de diagnóstico precoce tem assumido uma importância cada vez maior (Jones et al., 1991) O tomate é atualmente um dos dez primeiros produtos da agricultura brasileira (Melo, 1997), com uma produção de

3,1 milhões de toneladas de tomate para mesa e para indústria em cerca de 65 mil hectares no ano de 1999 (Agriannual 2000). O Brasil é o nono produtor mundial e o Estado de São Paulo como principal produtor no país com cerca de 767.580 toneladas, em 14.030 ha, responsável por quase um terço do tomate produzido (Agriannual, 2000). Os sintomas do ToMV no tomateiro são: mosaicos de áreas verde claro e escuro nas folhas; enrolamento, redução e afilamento de folíolos, além de apresentar aspecto bolhoso nas folhas e aspermia nos frutos (Jones et al., 1991). Sua transmissão pode se dar através de tratos culturais, por ferramentas e pelo manuseio humano, assim como pode se alojar nas sementes, tornando-se assim um importante meio de disseminação, o que não ocorre com o TMV (Zaitilin & Israel, 1975).

No exterior o ToMV tem se tornado uma doença importante em cultivos hidropônicos de tomate e pimentão, onde há uma disseminação rápida da doença causando grandes prejuízos econômicos para os produtores (Schuerger & Brown, 1997).

A tecnologia de produção de anticorpos monoclonais (Köhler & Milstein, 1975) no setor agrícola e na produção de tomates, pode auxiliar no diagnóstico do ToMV em sementes e plântulas e também, em diversas fases do processo produtivo, como estocagem e comercialização de produtos, contribuindo para melhorar a qualidade do produto.

O uso de plantas indicadoras para realizar diagnóstico requer instalações apropriadas e principalmente tempo, desde a produção das mudas das plantas indicadoras, até a visualização dos sintomas após a inoculação dos vírus, além da existência de estirpes do TMV que também podem causar sintomas semelhantes àqueles causados pelo ToMV. Assim, quando se trata de estabelecer a sanidade de um lote de sementes ou o diagnóstico da doença já instalada no campo, o uso de plantas indicadoras pode ser substituído pelo teste ELISA com monoclonais. Há pelo menos duas estirpes do ToMV já relatadas no Estado de São Paulo, TM-1 e TM-2 (Bastos, 1998) dentre as cinco estirpes de ToMV relatadas, denominadas (Rast, 1975), o que reforça a necessidade de se ter um teste eficiente para o diagnóstico desta doença.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material Vegetal e Vírus** - Foram utilizadas sementes de tabaco da espécie *Nicotiana rustica* (tabaco asteca) e de *Nicotiana tabacum* "Turkish NN". As plântulas de tomate variedade Santa Clara, com cerca de 40 dias de idade, utilizadas para reprodução dos sintomas do ToMV.

O inóculo do ToMV, estirpe TM-1 estava armazenada em folhas de tomateiro. A estirpe de TMV numerada 898/9718, apresentava-se armazenada em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* "Turkish NN"). A multiplicação do ToMV foi feita por meio de inoculação mecânica em plantas *Nicotiana rustica* (tabaco asteca) utilizando-se como inóculo folíolos de tomateiro infectado com ToMV estirpe TM-1 macerado em almofariz, na presença de PBS (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 7,36, diluído 1:20 em água destilada deionizada. O TMV também foi multiplicado em plantas de *Nicotiana tabacum* "Turkish NN", através de inoculação mecânica (Matthews, 1993). Ambos os tobamovírus foram purificados por gradiente de sacarose, descrito por Caner et al. (1990).

**Produção de Anticorpos Monoclonais** - A produção de anticorpos monoclonais seguiu protocolos já estabelecidos (Duarte, 2000) utilizando-se quatro camundongos fêmeas BALB/c, de dois meses de idade que receberam 20 µg do antígeno puro em cada injeção, num total de 4 imunizações, a intervalos de 15 dias, conforme protocolo descrito (Geszteti et al., 1996).

**Ensaio Imunoenzimático** - A titulação dos soros dos animais foi realizada por teste indireto de ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay") do tipo "Plate Trapped Antigen" (PTA-ELISA) (Crowther, 1995) para determinar a concentração do antígeno necessária para sensibilização das placas e do título dos antissoros produzidos. O ELISA foi realizado com conjugado anti-imunoglobulina IgG de camundongo marcado com peroxidase (leitura a 492 nm) e com fosfatase alcalina (leitura a 405 nm) ("blotting grade affinity purified goat anti-mouse IgG (H+L) human IgG conjugate" - Bio Rad). No caso de marcação com peroxidase, o substrato utilizado para reação foi orto-fenilendiamina (OPD) contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diluído em tampão de OPD (5 mg mL<sup>-1</sup> de tampão), no escuro por 2 a 3 minutos e bloqueada com solução de H<sub>2</sub>S 2,5 mol L<sup>-1</sup> procedendo-se a leitura a 492 nm. No caso da marcação com fosfatase alcalina, a revelação foi feita com p-Nitrofenil fosfato (PNPP) dissolvido em tampão de PNPP, na proporção de 2 mg mL<sup>-1</sup> e lido a 405 nm (Duarte, 2000). As leituras foram realizadas em leitor de microplacas (BioRad mod. 550) e foram consideradas reações positivas as amostras com três repetições que apresentaram média superior a três vezes o controle negativo (Sutula et al., 1986). Para o ELISA, amostras de plantas e frutos infectados e de plantas sadias foram maceradas em tampão PBS, na concentração de 0,1 g mL<sup>-1</sup>, empregando-se plantas infectadas com o complexo do vira-cabeça como controle negativo, por ser a virose mais freqüente na região de coleta do material. Suspensão de ToMV purificado foi utilizado como controle positivo.

**Fusão e Seleção de Clones** - A fusão de células de mielomas com células esplênicas do camundongo foi realizada segundo Köhler & Milstein (1975), bem como a seleção inicial de hibridomas positivos. A colônia escolhida contra o ToMV (10H1), foi clonada e expandida para garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> contendo "Feeder Layer" de macrófagos e meio R10 para recuperação em meio artificial (Duarte, 1996).

**Isotipagem** - para a isotipagem dos anticorpos monoclonais foi utilizado um "kit Immuno Select" (monoclonal antibody-based isotyping system for mouse immunoglobulins - Gibco BRL - cat. no. 9660SA), seguindo as especificações do fabricante, contendo os seguintes padrões de imunoglobulinas: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM, IgA, *Kappa* e *Lambda*.

**Coleta de material em campo** - foi coletado material infectado com ToMV na região de Conchal (Caner et al., 1990), em seis grandes áreas produtoras de Tomate (Mogi-Guaçu, Conchal e Aguai) e no principal viveiro de mudas (Viveiro "Nova Era", Fazenda Cantinho II, Mogi-Guaçu), conforme mapa na Figura 1.

**Immunoblotting** - Os géis de proteína total SDS-PAGE foram realizados segundo Laemmli (1970), utilizando gel de 10% e de 3% em sistema vertical da Hoefer 16 cm,

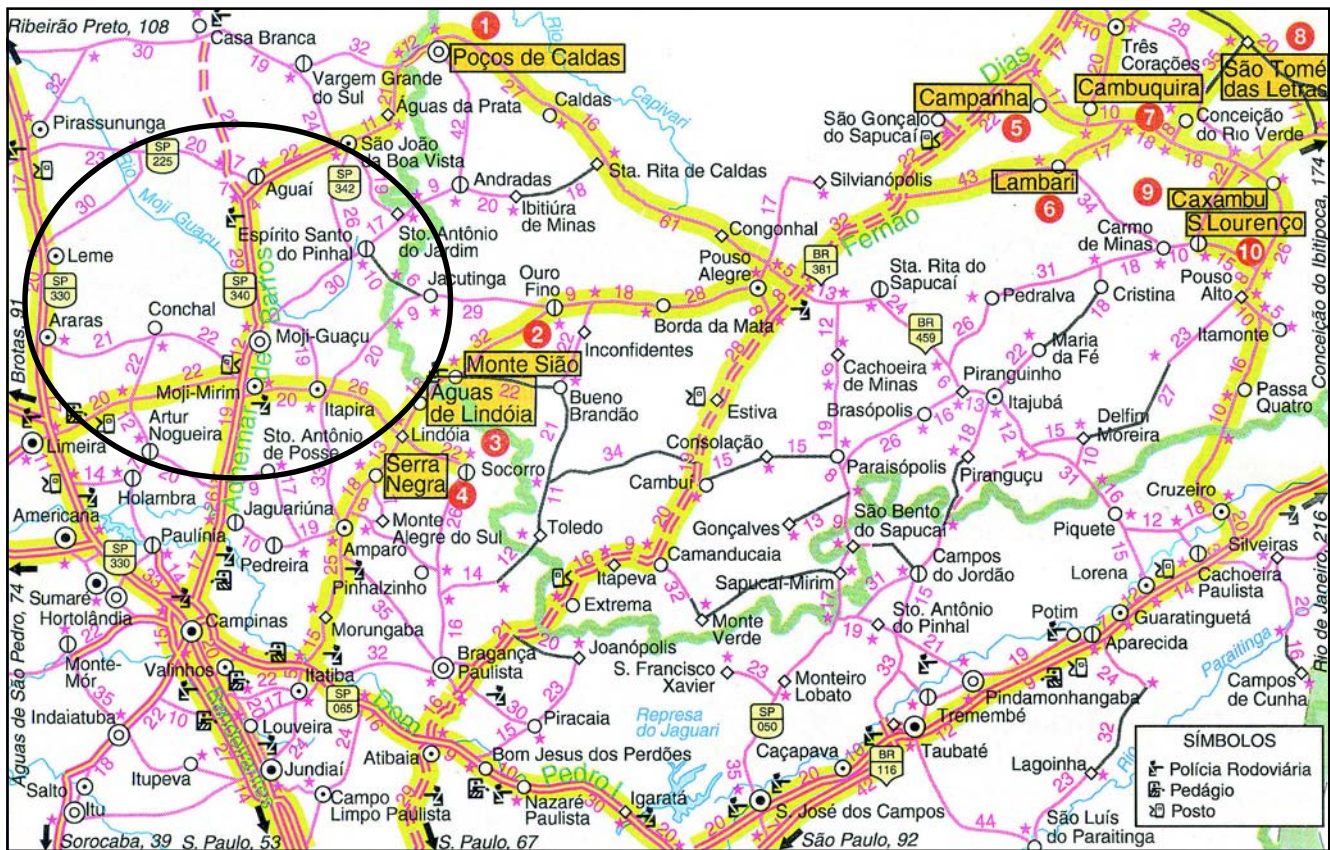


Figura 1 - Mapa mostrando a região do Brasil referente aos municípios de Conchal, Aguaí e Mogi-Guaçu (Regiões produtoras de tomate), locais de coleta das plantas infectadas com ToMV.

corados com prata (Gomes et al., 2000) e transferidos para membrana de nitrocelulose, conforme protocolo descrito em (Harlow & Lane, 1988) utilizando o sistema de transferência "Mini-V8.10 Vertical Gel Electrophoresis System" (Gibco BRL cat. 21078). A membrana foi incubada com conjugado anti-camundongo marcado com peroxidase e revelada com 4-cloronaftol.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Anticorpos monoclonais foram produzidos contra o ToMV e estes anticorpos foram específicos para a identificação do ToMV, sem apresentar reação cruzada com extratos de plantas saudáveis. Dos camundongos imunizados, o camundongo 3 apresentou melhor resultado para a retirada do baço para a fusão (Figura 1). Foram obtidos cerca de 123 hibridomas em 10 placas de fusão, dos quais, oito colônias "mães" foram selecionadas e congeladas. A colônia denominada 10 H1 foi empregada para clonagem por apresentar melhor título em ELISA e não apresentar reação cruzada com TMV (Figura 2). Das 10 placas de clonagem, foram escolhidos 5 colônias: 10H1H1, 10H1B9, 8G7D4, 8G1B2, 3B8A8 e 10H6D6, respectivamente (Figura 3), que apresentaram alta reação com o ToMV e baixa reação cruzada com TMV, além de apresentarem bom crescimento nas placas de

24 orifícios e posteriormente nas garrafas de 25 cm<sup>2</sup>. Estes clones foram expandidos e congelados, enquanto estavam sendo testados.

O melhor clone 10H1H1, foi multiplicado e reclonado, sendo escolhido o clone 6H9 para ser multiplicado via ascite (Harlow & Lane, 1988). Para facilitar a marcação, foi adotado a nomenclatura de 10.H1 para este clone.

**Isotipagem** - Neste ensaio, os MAb 10H1.H1, 10H1.B9, 8G7.D4 e 8G1.B2 apresentaram títulos positivos para a IgG2a, comparados com o controle positivo do Kit, enquanto que os MABs 3H8.A8 e 10H6.D6 apresentaram título para o isotipo IgG2b. Todos os MABs foram caracterizados com cadeia leve do tipo *Kappa*, bastante comum em camundongos (Roitt et al., 1992). A vantagem do uso deste Kit é a facilidade de utilização aliado à rapidez dos resultados.

**Ensaio com as Amostras Coletadas** - Neste ensaio do tipo ELISA indireto foram utilizadas amostras coletadas no campo reagindo contra o MAb 10.H1, produzido contra o ToMV (Figura 4). As plantas infectadas coletadas foram separadas em dois grupos: Amostra 1 – plantas com sintomas severos de ToMV e Amostra 2 – plantas com poucos sintomas de ToMV. Na figura 4 podemos observar maior título na amostra 1, comparada com a amostra 2. Diversos controles negativos foram

utilizados, como folhas de variedades de tomate sadio e amostra infectada com complexo do Vira-cabeça. Além de folhas utilizadas nas amostras 1 e 2, frutos e sementes infectadas foram utilizadas neste ensaio, mostrando que o MAb produzido, 10.H1 é específico para amostras de folhas infectadas com ToMV.

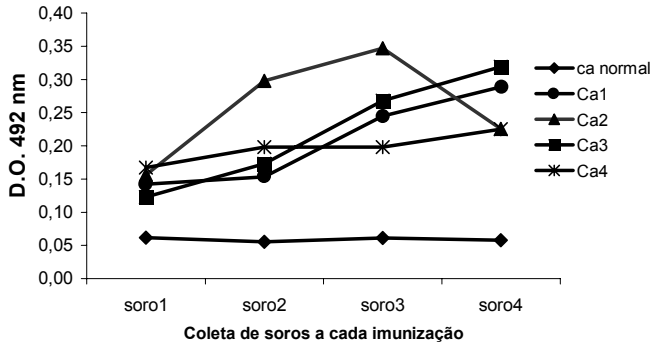


Figura 2 - Titulação dos soros dos camundongos imunizados a intervalos de 20 dias, onde foram coletados os soros 1, 2, 3 e 4 respectivamente. Cada curva representa resultados do ELISA realizado com soro na diluição de 1:200 dos quatro animais e do camundongo normal, usado como controle.

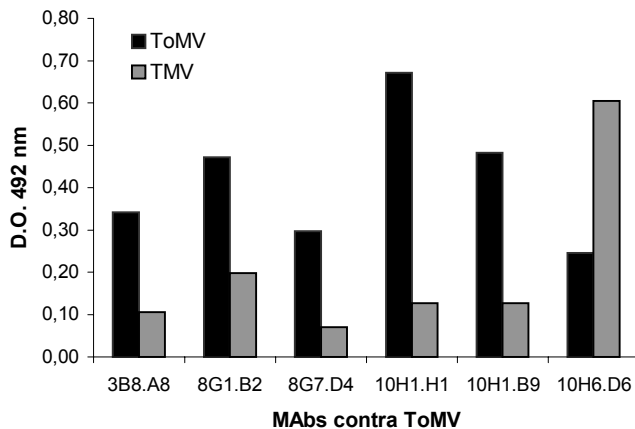


Figura 3 - Resultados da titulação dos anticorpos monoclonais selecionados contra o ToMV, utilizando 100 µl de sobrenadante de cultura, em ensaio do tipo ELISA-PTA utilizando TMV e ToMV como antígenos.

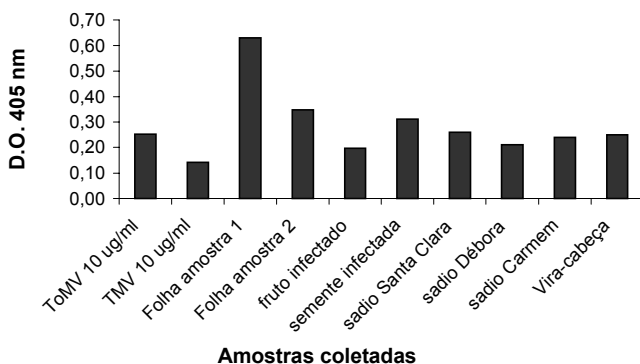


Figura 4 - ELISA-PTA de amostras coletadas no campo mostrando sintomas de ToMV, comparado com plantas sadias, plantas com sintomas de TMV e do complexo Vira-cabeça. O MAb 10.H1 foi utilizado como antissoro, na concentração de 10 mg de IgG mL<sup>-1</sup>.

### Teste Biológico em Plantas de Tomate e de Tabaco -

As plantas de tomate inoculadas com o ToMV isolado das amostras coletadas em campo mostraram sintomas bastante severos, levando algumas plantas a definharem completamente e outras a exibirem sintomas bastante característicos de afilamento de folíolos e mau desenvolvimento das plantas. Tal procedimento é recomendado quando se deseja certeza na avaliação dos sintomas observados em campo, tornando assim o diagnóstico confiável (Matthews, 1992). As inoculações apresentaram resultados semelhantes aos obtidos por Weber & Pfitzner (1998), afilamento acentuado nas folhas de tomate infectado como primeiro sintoma em plantas jovens, enquanto outros autores relatam primeiramente sintomas de mosaicos verde claro e escuro nas plantas (Figuras 5 e 6).

Na inoculação de plantas de *Nicotiana tabacum* "Turkish NN", com o ToMV, as folhas exibiram sintomas típicos de lesão local. Conforme descrito em Mattheus (1993), o uso de diferentes variedades de tabaco produzem diferentes tipos de sintomas (lesão local, sintomas sistêmicos, cloroses etc), dependendo da espécie ou estirpe do vírus inoculado. Neste trabalho a espécie de tabaco utilizada (*Nicotiana tabacum* "Turkish NN") reage com lesões locais quando inoculada com ToMV ou com TMV (Figura 7).

**Immunoblotting** - Neste ensaio, o MAb 10.H1 foi utilizado para revelar a presença das bandas protéicas referentes ao ToMV em gel de eletroforese de proteínas totais, em plantas de tomate e de tabaco (*Nicotiana tabacum* "Turkish NN") infectadas, e em plantas de tomate e tabaco sadias (Figura 8).

Na Figura 9 vemos uma banda de peso aproximado de 20 kDa, que segundo a literatura (Mattheus, 1992; Ohno et al., 1984) corresponde à banda da capa protéica do ToMV de 17,5 kDa. A banda aparece nos extratos de planta de tomate infectado e embora menos evidenciada, na amostra de fumo infectado. A proteína de 17,5 kDa, além de ser parte estrutural dos tobamovírus, influencia os sintomas da doença, determinando se a lesão será necrótica local ou sistêmica, como também as plantas resistentes, pela sua constituição de aminoácidos (Mattheus, 1992). Resultados semelhantes foram obtidos em "immunoblotting" de tobamovírus por Hamamoto et al. (1997), porém utilizando fragmentos das proteínas isoladas por RT-PCR.

A escolha dos testes de ELISA neste trabalho se deu pelo fato do ELISA ser rápido e apresentar alta sensibilidade e alta especificidade quando se trata de diagnóstico de doenças (Crowther, 1995). Embora os estudos recentes de vírus da plantas apontem para técnicas como PCR e RT-PCR e "fingerprinting" (Joelson et al., 1997; Jacobi et al., 1998), inclusive para a identificação do ToMV (Routh et al., 1997). trabalhos caracterizando o ToMV e o TMV têm sido realizados



Figura 5 - Sintomas severos do ToMV em planta de tomate var. Santa Clara (a esquerda), em comparação com a planta sadia (a direita).



Figura 6 - Sintoma típico de afilamento e deformação dos folíolos do tomateiro causada pela inoculação do ToMV. Na foto, todos os folíolos apresentam-se deformados.



Figura 7 - Folha de tabaco (*N. rustica*) exibindo sintomas locais devido à inoculação com ToMV (folha de cima), comparado com folha sadia (folha que está abaixo).

utilizando somente imunoenaios (Bachand & Castello, 1998). Como principal vantagem está o fato de que uma vez estabelecido o ensaio, um técnico de nível médio é perfeitamente capaz de realizar o ELISA e analisar os dados, uma vez que se trata de uma reação colorimétrica

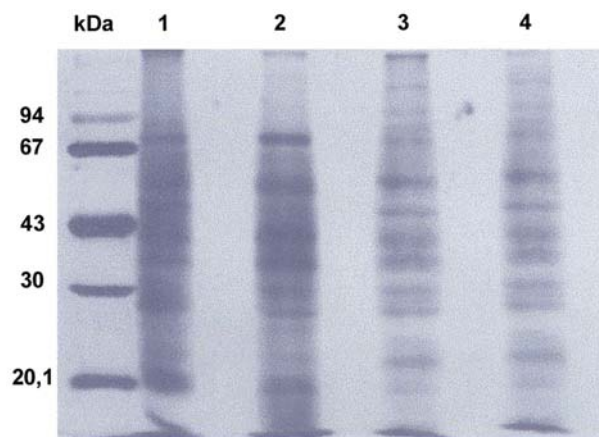


Figura 8 - Gel de eletroforese de proteínas totais corado com prata onde temos o padrão de peso molecular em kDa, canaleta 1: amostras de tomate com ToMV; 2: amostra de tomate sadia; 3: amostra de tabaco com ToMV; 4: amostra de tabaco sadia.

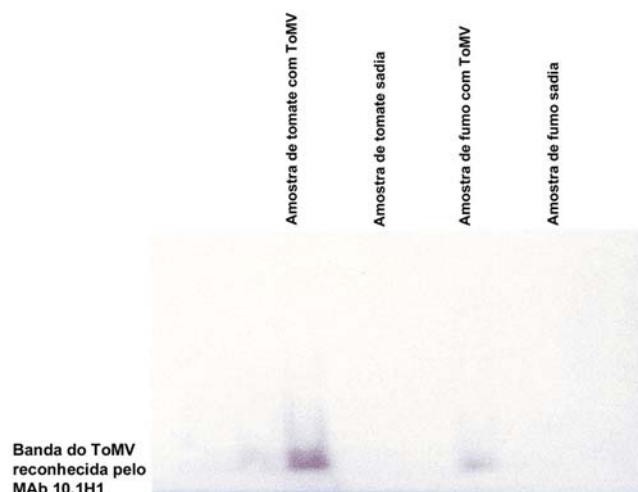


Figura 9 - Imuno Blot utilizando o MAb 10.H1, revelado com 4-cloronaftol, onde vemos apenas uma banda referente à capa protéica do ToMV, mais evidenciada na amostra de tomate e menos evidente na amostra de fumo.

de resultados visuais. Já o PCR e técnicas afins necessitam, depois de estabelecido o teste, de pessoal especializado principalmente para a análise dos resultados. Neste trabalho nos propusemos a produzir os anticorpos monoclonais e realizar testes com amostras do campo, utilizando o ToMV com modelo, mostrando que é possível, a partir destes resultados fazer o diagnóstico desta e de outras doenças através de testes rápidos destinados a agricultores e produtores de mudas de tomate.

### AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Jorge A. M. Rezende, do Depto. de Fitopatologia, Entomologia e Zoologia, ESALQ/USP por ceder as estufas para multiplicação das plantas indicadoras, bem como as sementes de tabaco; ao produtor Eng. Agrônomo Antonio Ledo, do Viveiro de

mudas “Nova Era”-Fazenda Cantinho II - Município de Mogi-Guaçu -SP); ao Dr. Valdir Atsushi Yuki, Pesquisador Científico da Seção de Virologia Fitotécnica do IAC - Campinas-SP, pela estirpe de TMV e ao Prof. Dr. Marcelo A. Pavan, da UNESP, Botucatu-SP, por ter fornecido a estirpe do ToMV. À Bibliotecária Marília Ribeiro Garcia Henyei, do CENA/USP pelas correções finais deste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACHAND, G.D.; CASTELLO, J.D. Seasonal Pattern of tomato mosaic tobamovirus infection and concentration in Red Spruce Seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.1436-1441, 1998.
- BASTOS, H.B. Tobamovírus do mosaico do tomateiro: levantamento, identificação, caracterização de estirpes em algumas regiões do estado de São Paulo e determinação da herança da resistência. Botucatu, 1998. 58p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- CANER, J.; COLARICCIO, A.; CHAGAS, C.M.; ALBA, A.P.C.; VICENTE, M. Identificação de um isolado do tobamovírus do mosaico do tomateiro (ToMV) no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.15, p.347-350, 1990.
- CROWTHER, J.R. **ELISA: theory and practice**. Totowa: Humana Press, 1995. 223p. (Methods in Molecular Biology, 42).
- DUARTE, K.M.R. Anticorpos monoclonais e policlonais para identificação do tobamovírus do mosaico do tomateiro (ToMV) em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Piracicaba, 2000. 87p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- DUARTE, K.M.R. **Anticorpos monoclonais aplicados à agricultura**. Piracicaba: ESALQ, 1996. 48p. (NAPMA Publicação, 2).
- FNP Consultoria e Comércio. **Agriannual 99**. São Paulo, 2000. p.516.
- GESZTESI, J.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R.; VICENTINI, A.P.; MORAES, J.Z.; FRANCO, M.F.; LOPES, J.D. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. **Hybridoma**, v.15, p.415-422, 1996.
- GOMES, L.H.; DUARTE, K.M.R.; ARGUESO, J.L.; ECHEVERRIGARAY, S.; TAVARES, F.C.A. Methods for yeast characterization from industrial products. **Food Microbiology**, v.17, p.217-223, 2000.
- HAMAMOTO, H.; WATANABE, Y.; KAMADA, H.; OKADA, Y. A single amino acid substitution in the virus-encoded replicase of tomato mosaic tobamovirus alters host specificity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, p.1015-1018, 1997.
- HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726p.
- JACOBI, V.; BACHAND, G.D.; HAMELIN, R.C.; CASTELLO, J.D. Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses. **Journal of Virological Methods**, v.74, p.167-178, 1998.
- JOELSON, T.; AKERBLUM, L.; OXELFELT, P.; STRANDBERG, B.; TOMENIUS, K.; MORRIS, T.J. Presentation of a foreign peptide on the surface of tomato bushy stunt virus. **Journal of General Virology**, v.78, p.1213-1217, 1997.
- JONES, J.B.; STALL, R.E.; ZITTER, T.A. **Compendium of tomato diseases**. St. Paul: APS Press, 1991. 75p.
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. **Nature**, v.256, p.495-497, 1975.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- MATTHEWS, R.E.F. **Fundamentals of plant virology**. San Diego: Academic Press, 1992. 403p.
- MATTHEWS, R.E.F. **Diagnosis of plant virus diseases**. 4.ed. Boca Raton: CRC Press, 1993. 374p.
- MELO, P.C.T. Tomate. **Agriannual 97: Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira**, p.402-408, 1997.
- OHNO, T.; AOYAGI, M.; YAMANASHI, Y.; SAITO, H.; IKAWA, S.; MESHII, T.; OKADA, Y. Nucleotide sequence of the tobacco mosaic virus (tomato strain) genome and comparison with the common strain genome. **Journal of Biochemistry**, v.96, p.1915-1923, 1984.
- RAST, A.T.B. Variability of tobacco mosaic virus in relation to control of tomato mosaic in grasshouse tomato crops by resistance breeding cross protection. **Agricultural Research Reports**, v.834, p.11-76, 1975.
- ROITT, I.M.; BROSTOFF, J.; MALE, D.K. **Imunologia**. 2.ed. São Paulo: Ed. Manole, 1992.
- ROUTH, G.; NGON, M.; YASSI, A.; RAO, A.L.N.; MRKOV, T.E.; DODDS, J.A. Replication of a wild-type and mutant clones of satellite tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana* protoplasts. **Journal of General Virology**, v.78, p.1271-1275, 1997.
- SCHUERGER, A.C.; BROWN, C.S. Spectral quality affects disease development of three pathogens on hydroponically grown plants. **Hortscience**, v.32, p.96-100, 1997.
- SUTULA, C.L.; GILLET, J.M.; MORRISSEY, S.M.; RAMSDELL, D.C. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. **Plant Disease**, v.70, p.722-726, 1986.
- WEBER, H.; PFITZNER, J.P. Tm-2<sup>2</sup> resistance in tomato requires recognition of the carboxy terminus of the movement protein of tomato mosaic virus. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.11, p.498-503, 1998.
- ZAITILIN, M.; ISRAEL, H.M. Tobacco Mosaic Virus (type strain). **Descriptions of Plant Viruses**, v.151, p.1-5, 1975.

Recebido em 02.10.00