

ADRIANA ARAÚJO COSTA TRUTA

**IDENTIDADE E PROPRIEDADE DE ISOLADOS DE POTYVÍRUS
PROVENIENTES DE *Capsicum* spp.**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002**

ADRIANA ARAÚJO COSTA TRUTA

**IDENTIDADE E PROPRIEDADE DE ISOLADOS DE POTYVÍRUS
PROVENIENTES DE *Capsicum* spp.**

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

APROVADA: 2 de julho de 2002.

Dra. Cleide Maria Ferreira Pinto
(Conselheira)

Prof. Sérgio H. Brommonschenkel
(Conselheiro)

Prof. Murilo Geraldo de Carvalho

Prof. Kiyoshi Matsuoka

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Orientador)

Aos meus pais – Nicácio e Odaci, pelo apoio incondicional.

Ao Aldrin – pelo apoio nas horas difíceis.

A Liliana, Viviana, Nicácio Filho, Mariana, Augusto,
Yasmin, André e Rosilda por saber que sempre posso contar
com eles.

AGRADECIMENTOS

A CAPES pela concessão da bolsa.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

Ao prof. Francisco Murilo Zerbini Jr. pela orientação e bons conselhos durante todo o curso.

Ao prof. Murilo Geraldo de Carvalho pela valiosa ajuda durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Sergio Brommonschenkel pelas contribuições durante o desenvolvimento do trabalho.

A pesquisadora Cleide Maria Ferreira Pinto pela valiosa contribuição para a obtenção de isolados e dos acessos de *Capsicum*.

A Eunize Maciel pela amizade e ajuda na rotina do laboratório.

Ao Prof. Egberto Araújo pelo permanente estímulo.

Aos amigos de Laboratório: Alessandra, Renate, Raquel, Ana e Fizinho pelo companheirismo e ajuda nas horas difíceis.

Aos meus amigos Adelica, Débora, Regina, Raunira, Maurício, Edson, Luiz Artur, Gaus e Iraíldes, Claudine, Claudia e Jailson, Sandra, Ailton, Jorge bacana, Márcia, Araida, Josivaldo, pela ótima convivência durante quatro anos em Viçosa.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Obtenção e manutenção dos isolados virais	15
3.2. Caracterização biológica	17
3.2.1. Gama de hospedeiros	17
3.2.2. Transmissão via semente	17
3.2.3. Inoculação em cultivares diferenciadoras	18
3.3. Produção de anti-soros	18
3.3.1. Purificação viral	19
3.3.2. Avaliação da qualidade e do rendimento do vírus purificado	20
3.3.3. Imunização de coelhos	20
3.3.4. Caracterização dos anti-soros	21
3.3.4.1. ELISA indireto	21
3.3.4.2. Purificação do IgG	22
3.3.4.3. Preparo do conjugado	23
3.3.4.4. ELISA direto	23
3.4. Caracterização molecular	24

3.4.1. Concentração do vírus a partir de amostras foliares	24
3.4.2. Extração do RNA viral.....	24
3.4.3. Amplificação dos genes da replicase (nib) e proteína capsidial (cp) e da 3' NTR por RT-PCR	25
3.4.4. Clonagem e seqüenciamento dos genes nib e cp	25
3.4.5. Análise filogenética.....	26
3.4.6. Análise de diversidade genética via PCR-RFLP.....	26
3.5. Avaliação de acessos de <i>Capsicum</i> quanto à resistência a potyvírus....	27
4. RESULTADOS	29
4.1. Obtenção e identificação dos isolados virais.....	29
4.2. Caracterização biológica	29
4.2.1. Gama de hospedeiros	29
4.2.2. Transmissão via semente.....	34
4.2.3. Cultivares diferenciadoras.....	34
4.3. Produção de anti-soros	36
4.3.1. Purificação dos isolados 1 e 3	36
4.3.2. Especificidade e título dos anti-soros.....	36
4.4. Caracterização molecular	38
4.4.1. Análise filogenética.....	39
4.4.2. Análise da diversidade genética via PCR-RFLP	39
4.5. Avaliação de acessos de <i>Capsicum</i> quanto à resistência a potyvírus....	44
5. DISCUSSÃO.....	47
5.1. Caracterização biológica de isolados de potyvírus provenientes de <i>Capsicum</i>	47
5.2. Caracterização molecular	52
5.3. Análise sorológica dos isolados.....	56
5.4. Avaliação de acessos de <i>Capsicum</i> da UFV e EPAMIG	57
6. CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

RESUMO

TRUTA, Adriana Araújo Costa, D.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2002. **Identidade e propriedade de isolados de potyvirus provenientes de *Capsicum* spp.** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Conselheiros: Sérgio Hermínio Brommonschenkel e Cleide Maria Ferreira Pinto.

No Brasil a ocorrência de mosaico causado por PVY é relatada desde 1941 na cultura da batata, mas sua ocorrência em pimentão só foi relatada a partir de 1950. As perdas causadas por essa virose no campo levaram ao estabelecimento de um programa de melhoramento do pimentão visando a incorporação de genes de resistência a PVY, dando origem à série de cultivares “Agrônômico”. A resistência a PVY introduzida na série Agrônômico mostrou-se bastante eficiente e duradoura, conseguindo impedir a infecção por todas as estirpes de PVY então presentes no Brasil. No entanto, relatos de mosaico, deformações foliares e acentuada redução no crescimento das plantas vem sendo realizados por produtores de diversos estados nos últimos cinco anos. O objetivo principal deste trabalho foi estudar a etiologia do mosaico em campos de produção de pimentão e pimenta. Vinte e um isolados virais provenientes de plantas de pimenta e pimentão foram coletados em campos de produção em Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Distrito Federal. Dois isolados provenientes de batata (PVY^N e PVY^O) foram utilizados como controle.

Para caracterizar e diferenciar biologicamente estes vinte isolados utilizou-se um gama de hospedeiros e uma série de cultivares diferenciadoras de pimentão. As indicadoras utilizadas mostraram a existência de um considerável grau variabilidade biológica entre os isolados em estudo, embora todos tenham sido identificados como PVY. As reações diferenciais de algumas espécies distinguiram os isolados de outros potyvírus que infectam pimentão. Foi possível observar, de maneira generalizada, a distinção de três grupos de isolados, causando sintomas severos, moderados ou fracos, em várias das hospedeiras utilizadas. A reação das cultivares diferenciadoras classificou os isolados como patótipo 1 ou 1.2 do PVY. Não foi encontrado nenhum representante do patótipo 0. A produção de anti-soro foi realizada utilizando-se como imunógeno partículas virais purificadas de um isolado severo e um isolado fraco. O título e a especificidade dos anti-soros foram avaliados por ELISA indireto. Reações positivas foram obtidas com uma diluição do anti-soro bruto acima de 1:32.000. Reações positivas também foram observadas contra isolados distintos, mas não contra todos os isolados testados. Os anti-soros não reagiram contra o isolado PVY^O de batata, mas reagiram contra o isolado PVY^N, também de batata. Para caracterização molecular dos isolados foi realizada a clonagem e sequenciamento dos genes *nib*, *cp* e da região 3' não-traduzida (3'NTR) de isolados biologicamente distintos. Após análise filogenética confirmou-se a identidade de seis isolados como pertencentes à espécie *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), um potyvírus descrito em 2002 infectando pimentão no Brasil. Esse resultado sugere que o PepYMV pode ser a espécie de potyvírus predominante em *Capsicum* no Brasil.

ABSTRACT

TRUTA, Adriana Araújo Costa, D.S., Universidade Federal de Viçosa. July 2002. **Identity and property of potyvirus isolates from *Capsicum* spp.** Advisor: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Committee Members: Sérgio Hermínio Brommonschenkel and Cleide Maria Ferreira Pinto.

In Brazil, the mosaic caused by PVY was reported for the first time in 1941 in potato. The first report of this virus infecting bell pepper occurred only in 1950. The heavy losses caused by the disease in pepper plants led to the establishment of a breeding program with the objective of obtaining PVY-resistant cultivars. This program generated the “Agrônômico” series of pepper cultivars in the early 1970’s. The resistance present in the “Agrônômico” series was durable and extremely effective against all the viral strain present in Brazil at the time. However, reports of mosaic, leaf distortion and growth reduction symptoms in pepper plants have occurred repeatedly over the last five years. The main objective of this work was the study the etiology of the disease in bell pepper and chili pepper fields. Twenty-one isolates were obtained from bell pepper and chili pepper plants in the states of Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Rio de Janeiro and the Federal District. Two isolates from potato (PVY^N e PVY^O) were used as controls. The isolates were biologically characterized using a host range assay and inoculation into a series of differential bell pepper

cultivars. The isolates displayed a high degree of biological variability upon inoculation onto the indicator plants used in the host range assay, although they could all be identified as PVY. Some host species could be used to distinguish the isolates from other viruses that also infect bell pepper. In general, it was possible to divide the isolates in three groups, causing severe, moderate and mild symptoms in several host species. The reaction of the differential cultivars allowed the classification of the isolates as pathotypes 1 or 1.2 of PVY. None of the isolates were classified as pathotype 0. The production of anti-sera was carried out using purified virions of a mild and a severe isolate. The titer and specificity of the anti-sera were evaluated by indirect ELISA. Positive reactions were obtained with a dilution of the crude serum up to 1:32.000. Positive reactions were also observed against most, but not all the isolates. The anti-sera did not react against the PVY^O isolate from potato, but did react against the PVY^N isolate, also from potato. For the molecular characterization, the *nib* and *cp* genes and the 3' non-translated region (3'NTR) of biologically distinct isolates were cloned and sequenced. Sequence and phylogenetic analysis confirmed the identity of six isolates as *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), a potyvirus first described in 2002 infecting bell pepper in Brazil. This result suggests that PepYMV could be the predominant potyvirus causing mosaic in *Capsicum* species in Brazil.

1. INTRODUÇÃO

Os registros mais antigos do consumo de *Capsicum* spp. datam de aproximadamente nove mil anos, evidenciados por explorações arqueológicas realizadas no México. Outros sítios arqueológicos pré-históricos (2.500 A.C.) foram encontrados no Peru que também documentam o uso de *Capsicum*. Vários relatos de exploradores do Brasil Colônia indicam que as pimentas eram amplamente cultivadas e representavam um importante componente na dieta das populações indígenas (REIFSCHNEIDER, 2000). O gênero alcançou a Europa por intermédio dos navegantes e exploradores portugueses e espanhóis que procuravam na América tropical a pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), e encontraram as pimentas do gênero *Capsicum*. Por essa razão foram aceitas no velho mundo mais rapidamente do que o tomate e a batata (CASALI e COUTO, 1984). Atualmente, essa cultura é plantada e consumida em quase todo o mundo, sendo utilizada basicamente como tempero.

Cinco espécies de *Capsicum* são aceitas como cultivadas: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. pubescens*, a última não cultivada no Brasil. Todas possuem espécies selvagens afins com as quais apresentam possibilidade de permuta de genes. A espécie *C. annuum* apresenta a maior variabilidade genética, é a mais cultivada e economicamente mais importante (CASALI e COUTO, 1984).

Não se sabe com precisão a época ou local onde se iniciou o cultivo de pimentão no Brasil em larga escala. Segundo REIFSCHNEIDER (2000), há registros de que as primeiras cultivares de pimentão introduzidas no Brasil são de origem espanhola, do grupo “Casca Dura”, plantadas inicialmente nos municípios de Mogi das Cruzes e Suzano, estado de São Paulo. As primeiras cultivares brasileiras de pimentão surgiram a partir de seleções feitas em populações desses materiais.

Atualmente, o pimentão é uma das 10 espécies de hortaliças mais plantadas em todo o mundo. A área cultivada com essa hortaliça no Brasil foi estimada em 7.400 ha/ano no biênio 1997/1998. O estado de Minas Gerais apresentou a segunda maior área plantada, com 1.300 ha, que corresponderam a 17,6% do total (KOBORI, 1999). Quanto às pimentas do gênero *Capsicum*, REIFSCHNEIDER (2000) estima a área plantada em 5.000 ha, com uma receita anual de 79 milhões de reais, embora enfatizando a carência de dados estatísticos sobre estas culturas no Brasil.

Nessas solanáceas, em termos de importância econômica, as doenças causadas por vírus são superadas apenas pela podridão do colo causada por *Phytophthora capsici*. Existem diversos relatos de vírus ocorrendo em pimentão e pimenta em todo o mundo, incluindo seis vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus*: *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco etch virus* (TEV), *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Pepper veinal mottle virus* (PVMV), *Chili veinal mottle virus* (ChiVMV) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (BRIOSO, 1996; CARANTA, et al., 1997; CARANTA e PALLOIX, 1996; COOK e ANDERSON, 1959; DOGIMONT et al., 1996; INOUE-NAGATA et al., 2002). O PepMoV é o único transmitido pela semente (SHUKLA et al., 1994).

No Brasil, o mosaico causado por PVY em batata foi relatado pela primeira vez em 1941 (NOBREGA e SILBERSCHMIDT, 1944), mas o mosaico em pimentão causado por PVY só foi relatado a partir de 1950, já causando sérios prejuízos (COSTA e ALVES, 1950). As perdas causadas por essa virose no campo levaram NAGAI (1968) a iniciar um programa de melhoramento do pimentão visando à incorporação de genes de resistência a PVY, dando origem à

série de cultivares “Agrônômico”. A resistência a PVY introduzida na série Agrônômico mostrou-se bastante eficiente, conseguindo impedir a disseminação de todas as estirpes de PVY então presentes no Brasil. No entanto, mudanças significativas vem ocorrendo em campos de produção de batata e pimentão quanto à incidência dessa virose nos últimos anos. O surgimento de relatos de PVY causando prejuízos a bataticultores (FIGUEIRA e PINTO, 1995; FIGUEIRA et al., 1996; FIGUEIRA e SANTOS, 1997), coincide com relatos de perdas em campos de produção de pimentão e pimenta devido a ocorrência de mosaicos, deformações foliares, e acentuada redução no crescimento das plantas. Até há pouco tempo o único potyvírus relatado em espécies de *Capsicum* no Brasil era o PVY (BOITEUX e PESSOA, 1994; BRIOSO, 1995; BRIOSO, 1996; NAGAI, 1993). Em 2002, INOUE-NAGATA et al. relataram a ocorrência de uma nova espécie de potyvírus causando mosaico amarelo e distorção foliar em pimentão. Anteriormente considerada uma estirpe severa do PVY (PVY^m), essa nova espécie foi denominada *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). Estudos moleculares desse novo vírus demonstraram que a seqüência de aminoácidos do gene da proteína capsidial difere significativamente de outros potyvírus conhecidos. Após a avaliação de uma seqüência parcial de 1.330 nucleotídeos correspondendo a CP e a região 3' não-traduzida, os autores verificaram uma homologia entre 62 e 46% com os potyvírus PVY, PepMoV, *Potato virus V* (PVV) e *Sunflower chlorotic mottle virus* (SCMV) (INOUE-NAGATA et al., 2002). Outro relato da ocorrência de PepYMV em pimentões nos estados de São Paulo e Minas Gerais foi feito recentemente por STANGARLIN (2001). Curiosamente, não existem, até o momento, dados de seqüência de nucleotídeos de isolados brasileiros de PVY que infectem espécies de *Capsicum*.

Além destes potyvírus, outros vírus já foram relatados em pimentão no Brasil, pertencendo aos gêneros *Cucumovirus* (*Cucumber mosaic virus*, CMV), *Curtovirus* (*Tomato pseudop-curly top virus*, TPCTV), *Tospovirus* (*Groundnut ringspot virus*, GRSV, *Tomato chlorotic spot virus*, TCSV e *Tomato spotted wilt virus*, TSWV), *Tobravirus* (*Pepper ringspot virus*, PepRSV), *Luteovirus* (*Potato leaf roll virus*, PLRV) e *Tobamovirus* (*Tobacco mosaic virus*, TMV). Os sintomas

induzidos por alguns destes vírus podem ser confundidos com aqueles causados pelo PVY, surgindo a necessidade da produção de anti-soros específicos para as espécies presentes nos campos de produção, que permitam a diagnose rápida e precisa.

Com base nessas considerações, o objetivo principal deste trabalho foi estudar a etiologia do mosaico em campos de produção de *Capsicum* no Sudeste do Brasil. Os objetivos específicos foram: (1) caracterização biológica de isolados de potyvírus provenientes de pimentão e pimenta, (2) produção de anti-soros específicos para as estirpes representativas encontradas nos campos de produção de pimentão e pimenta, (3) verificar a possibilidade de transmissão dos isolados via semente em *Capsicum*, (4) sequenciamento dos genes *nib* (replicase) e *cp* (proteína capsidial) de isolados biologicamente distintos e comparação das seqüências obtidas com as seqüências de PVY disponíveis em banco de dados, e (5) avaliação de germoplasma de *Capsicum* visando detectar genótipos resistentes ou tolerantes ao mosaico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A família *Potyviridae* é a mais numerosa entre os vírus de plantas, contendo cerca de 20% dos vírus descritos. A família é dividida em seis gêneros (*Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus*), diferenciados com base no tipo de inseto vetor e número de componentes do genoma. O gênero *Potyvirus*, que inclui os vírus transmitidos por afídeos e com um componente genômico, é o mais numeroso, com 91 espécies, incluindo o PVY (VAN REGENMORTEL et al., 2000).

Todos os membros do gênero *Potyvirus* possuem características comuns como partícula alongada, flexuosa, medindo $700-900 \times 12-15$ nm, um genoma composto de uma única molécula de RNA de fita simples (ssRNA) com cerca de 10.000 nucleotídeos, com uma proteína viral ligada covalentemente à extremidade 5' e uma cauda poli-A ligada à extremidade 3' do RNA. A sequência de nucleotídeos completa de diversas espécies já é conhecida (DOUGHERTY e CARRINGTON, 1988; SHUKLA et al., 1988 a,b; TORDO et al., 1995; VAN DER VLUGT et al., 1993). O genoma viral possui uma única fase aberta de leitura (ORF) que dá origem a uma poliproteína com aproximadamente 350 kDa. A partir da poliproteína, pelo menos 9 proteínas (P1, HC-Pro, P3, CI, 6K₂, VPg, NIa, NIb e CP) são produzidas através da atividade enzimática de 3 proteinases contidas na própria poliproteína (P1, HC-Pro, NIa)

(CARRINGTON et al., 1990). Essas proteínas incluem replicases, proteínas de movimento célula-a-célula e a longa distância, proteínas responsáveis pela transmissão por afídeos, e a proteína capsidial. A maioria das proteínas, entretanto, possui mais de uma função (CRONIN et al., 1995; DOLJA et al., 1995; KASSCHAU et al., 1995; RESTREPO-HARTWIG et al., 1994; SHUKLA et al., 1994; PRUSS et al., 1997; VERCHOT e CARRINGTON, 1995).

O início do ciclo de infecção viral ocorre quando o vírus alcança o interior de uma célula hospedeira e é desencapsidado. Em seguida, ocorre a tradução da única ORF em uma poliproteína que é processada em proteínas virais a serem utilizadas nos processos subsequentes de replicação e montagem de partículas virais. As únicas proteínas associadas estruturalmente ao genoma viral são a proteína capsidial (CP) e a VPg (SHUKLA et al., 1994).

A replicação é iniciada com a síntese de uma fita complementar (negativa) a partir da fita de RNA viral. Essa reação é catalisada pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) viral, em conjunto com proteínas do hospedeiro. As novas fitas virais (positivas) são em seguida sintetizadas utilizando as fitas negativas como molde. A especificidade do complexo replicativo é assegurada pelo reconhecimento de sinais em *cis* encontrados em ambas as fitas (SIMON-BUELA et al., 1997).

A maioria das proteínas codificadas pelos potyvírus são necessárias, direta ou indiretamente, para a replicação viral. As proteínas CI, NIa e NIB formam o núcleo replicativo, catalisando processos enzimáticos essenciais durante a replicação. A proteína CI é considerada a helicase dos potyvírus, possuindo ainda as funções de ATPase e ligação a RNA (LAIN et al., 1991). A proteína NIB é a RNA polimerase dependente de RNA, e possui a sequência de aminoácidos Gln-Asp-Asp característica das RNA polimerases virais (HONG e HUNT, 1996). O processo de replicação ocorre em associação com o retículo endoplasmático das células infectadas (SHAAD et al., 1997). A proteína 6K₂ funciona como uma âncora, devido à presença de um domínio central hidrofóbico de 19 aminoácidos que lhe confere a propriedade de associação a membranas (RESTREPO-HARTWIG e CARRINGTON, 1994; SHAAD et al.,

1997). Como o sítio de clivagem entre 6K₂ e NIa possui baixa afinidade pela proteinase, essas proteínas permanecem como um único polipeptídeo por um tempo relativamente longo, ancoradas ao retículo endoplasmático (RESTREPO-HARTWIG e CARRINGTON, 1992). A VPg se liga à extremidade 5' do RNA viral por meio de um resíduo de tirosina situado no terminal aminico da proteína. Uma vez ligada ao RNA, a VPg atua como iniciadora da replicação (MURPHY et al., 1996). Ao final da replicação, o complexo é liberado do retículo endoplasmático por meio da autoproteólise entre a VPg e NIa. A região do RNA viral que codifica a proteína capsidial (CP) e a sequência 3' não-traduzida também estão envolvidas na amplificação do genoma viral, por meio da formação de estruturas secundárias que serão reconhecidas pelo complexo replicativo. Entretanto, a CP propriamente dita não é essencial para a replicação (MAHAJAN et al., 1996).

O movimento de vírus em plantas pode ser dividido em duas etapas: movimento célula-a-célula (curta distância) e movimento sistêmico (longa distância) (GILBERTSON e LUCAS, 1996). A partir da célula infectada, o vírus deverá se movimentar célula-a-célula através dos plasmodesmas, que permitem a continuidade do citoplasma e do sistema de endomembranas entre as células. Como o limite de exclusão passivo dos plasmodesmas em células do mesófilo é de aproximadamente 1 kDa, os vírus de plantas necessitam produzir proteínas capazes de alterar esse limite de exclusão, ligar-se ao RNA viral e permitir a passagem deste pelos plasmodesmas na forma de um complexo RNA viral-proteína de movimento ou na forma de vírions. Curiosamente, os potyvírus, ao contrário de todos os outros vírus de plantas já estudados, não possuem proteína com função exclusiva de movimento célula-a-célula (GILBERTSON e LUCAS, 1996).

Para atingir o sistema vascular o vírus deve passar, célula-a-célula, do mesófilo à bainha, parênquima floemático, células companheiras e elemento de tubo crivado, alcançando assim a rota de translocação de fotoassimilados (GILBERTSON e LUCAS, 1996; CARRINGTON et al., 1996). O movimento a longa distância não ocorre automaticamente e proteínas virais e do hospedeiro

estão envolvidas neste processo. Pelo menos três proteínas virais, CP, HC-Pro e VPg, parecem estar envolvidas no movimento a longa distância dos potyvírus: Uma vez alcançado o floema, o processo de movimento a longa distância ocorre aparentemente de forma passiva, na direção do fluxo de fotoassimilados, seguindo a direção fonte-dreno (CRAWFORD e ZAMBRYSKI, 1999).

A participação da proteína HC-Pro no movimento foi analisada por meio de ensaios genéticos e de microinjeção. Mutantes na HC-Pro do TEV apresentam movimento célula-a-célula reduzido quando comparados ao vírus selvagem (CRONIN et al., 1995; KASSCHAU et al., 1997). Estudos de microinjeção de proteínas dos potyvírus *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) e *Lettuce mosaic virus* (LMV) demonstraram a capacidade das proteínas CP e HC-Pro de se movimentarem célula-a-célula, aumentando o limite de exclusão dos plasmodesmas e facilitando o movimento de RNA viral. Mutantes na região central da CP e no terminal carboxílico da HC-Pro aboliram o movimento célula-a-célula destas proteínas. Os experimentos indicaram uma interação entre CP, HC-Pro e os plasmodesmas, sugerindo que os potyvírus codificam duas proteínas com características de proteínas de movimento célula-a-célula (ROJAS et al., 1997). A proteína VPg também está implicada no movimento célula-a-célula. Por meio da construção de vírus quiméricos, o determinante de virulência do TVMV em plantas de *Nicotiana tabacum* cv. TN86, que contém o gene de resistência *va*, foi identificado como sendo a VPg (NICOLAS et al., 1997). Verificou-se que a inserção da VPg do isolado TVMV-WT, incapaz de infectar plantas contendo o gene de resistência, no genoma do isolado TVMV-S, confinava o vírus às células inicialmente infectadas, sugerindo deficiência no movimento célula-a-célula.

A proteína capsidial tem sido o produto gênico mais estudado dos potyvírus (SHUKLA et al., 1994), e está envolvida em diversas funções tais como encapsulamento e proteção do RNA viral, transmissão pelo vetor, movimento célula-a-célula e a longa distância. A comparação de seqüências de aminoácidos e a análise da montagem de partículas virais indicou a presença de três regiões distintas na CP de potyvírus: (i) um terminal amínico altamente variável em comprimento e seqüência, (ii) uma região central altamente

conservada, contendo de 215 a 227 aminoácidos, e (iii) um terminal carboxílico de 18-20 aminoácidos. As regiões amino- e carboxi-terminal estão voltadas para o exterior da molécula, e são responsáveis pelas propriedades antigênicas da CP e, conseqüentemente, da partícula viral. Atualmente, existe um grande número de seqüências de proteínas capsidiais de potyvírus disponíveis na literatura (BRUNT et al., 1996).

Já está consolidada a noção de que a comparação da seqüência de aminoácidos da proteína capsidial (CP) dos potyvírus pode contribuir significativamente para a classificação de espécies, e em alguns casos até mesmo de estirpes. SHUKLA et al. (1988), SHUKLA e WARD (1988) e SHUKLA et al. (1994) demonstraram que a análise comparativa das seqüências da CP de diversos potyvírus produz árvores filogenéticas que refletem adequadamente o relacionamento entre espécies. Estirpes do mesmo vírus apresentam alta similaridade de seqüência, geralmente em torno de 94%, enquanto vírus distintos possuem níveis de similaridade bem mais baixos, inferiores a 80%. Além da CP, a seqüência de nucleotídeos da região 3' não-traduzida (3'NTR) também pode ser usada na classificação de potyvírus, pois em estirpes de um mesmo vírus esta região apresenta tamanho e seqüência conservados, enquanto em espécies distintas apresenta tamanho variável e níveis baixos de similaridade de seqüência (VAN DER VLUGT et al., 1993).

Além da comparação direta da seqüência de aminoácidos da CP, outras alternativas podem ser utilizadas para a determinação de relações filogenéticas com base na seqüência de nucleotídeos desse gene. BLANCO-URGOITI et al. (1996) desenvolveram um método baseado em imunocaptura-RT-PCR, seguido da análise de restrição do produto amplificado (PCR-RFLP). O método pode ser utilizado para calcular a distância genética entre isolados de PVY, baseando-se no padrão de restrição das seqüências do gene *cp*, com uma eficiência que pode ser comparada à distância genética obtida através do sequenciamento. Este é um método rápido que permite a classificação de estirpes virais de diferentes isolados de PVY provenientes de diferentes espécies hospedeiras, permitindo a montagem de uma árvore filogenética sem a necessidade de se determinar a

seqüência de nucleotídeos de diferentes isolados. Utilizando PCR-RFLP para analisar isolados de PVY provenientes de batata, os autores foram capazes de distinguir três grupos de isolados, correspondentes aos grupos PVY^O, PVY^N e o PVY^C.

Apesar de a taxonomia de *Potyvirus* ser uma das mais bem definidas entre todos os gêneros de vírus de plantas, a abordagem biológica clássica (gama de hospedeiros e sintomatologia) utilizada para diferenciar espécies de potyvírus em subgrupos ou estirpes é insatisfatória, e não deve ser o único critério adotado. BLANCO-URGOITI et al. (1996), D'AQUINO et al. (1994), SHUKLA et al. (1988) e VAN DER VLUGT et al. (1993) sugerem que para alguns potyvírus existe uma variação contínua de estirpes que não podem ser distinguidas claramente. A adoção de critérios taxonômicos mais precisos e abrangentes é fundamental, pois a identificação correta de estirpes é essencial para a busca de fontes de resistência, além de fornecer subsídios para o engenheiramento de plantas que expressem resistência derivada do patógeno.

Os isolados de PVY provenientes de batata são historicamente classificados em três grupos de estirpes, de acordo com os sintomas induzidos em *Nicotiana tabacum* 'White Burley' e 'Sansum NN', *Physalis floridana* e batata. Os grupos foram denominados PVY^O (estirpes comuns, que induzem mosaico e clareamento de nervuras), PVY^N (estirpes que induzem sintomas necróticos) e PVY^C (estirpes que elicitam resposta hipersensível em cultivares de batata contendo o gene de resistência *Nc*). O grupo PVY^O possui distribuição geográfica generalizada, ocorrendo em todos os continentes. O grupo PVY^N já foi relatado na Europa, América do Sul e América do Norte (BLANCO-URGOITI et al., 1998; ELLIS et al., 1996; ELLIS et al., 1997). A distribuição geográfica do grupo PVY^C parece ser restrita, fato que pode ser explicado em razão de alguns isolados desse grupo não serem transmitidos por afídeos e elicitarem reação hipersensível em diversas cultivares de batata, dois fatores que limitam a disseminação de estirpes (ELLIS et al., 1997). Existem ainda algumas estirpes de PVY provenientes de batata que não podem ser classificadas adequadamente em nenhum dos três grupos (SHUKLA et al., 1988).

Os isolados de PVY provenientes de outras espécies de solanáceas, como pimentão, pimenta, tomate e fumo, podem algumas vezes induzir sintomas necróticos em *N. tabacum*, similares àqueles induzidos por estirpes do grupo PVY^N. Contudo, nem sempre esses isolados infectam sistemicamente batata, não podendo portanto serem considerados como integrantes desse grupo (GEBRE-SELASSIE et al., 1985; STOBBS et al., 1994). Consequentemente, a classificação em grupos com base nos isolados provenientes de batata (PVY^N, PVY^O e PVY^C) não pode ser estendida para isolados de PVY provenientes de outras espécies de solanáceas (NELSON e WHEELER, 1997). Isolados provenientes de *N. tabacum* tem sido classificados de acordo com os sintomas induzidos em certas cultivares de fumo, e os isolados de tomate tem recebido pouca atenção (ROMERO et al., 2001).

Existem diversas classificações propostas para isolados de PVY provenientes de pimentão (BLANCO-URGOITI et al., 1996; BRIOSO et al., 1996; COOK, 1963; D'AQUINO et al., 1995; GOODING e TOLIN, 1973; ELLIS et al., 1997; MAKKOUK e GUMPF, 1976; SUDARSONO et al., 1993). A maioria usa como critério de classificação a virulência em hospedeiros diferenciais contendo genes de resistência específicos. Não existe uma classificação única, nem um consenso na adoção de critérios para essas classificações. Atualmente, uma das classificações mais adotadas pelos pesquisadores que trabalham com estirpes de PVY provenientes de pimentão é a proposta por GEBRE-SELASSIE et al. (1985), que divide os isolados de PVY em três patótipos: P(0), patótipo comum que infecta a cultivar suscetível 'Yolo Wonder'; P(1), virulento na cultivar 'Yolo Y', e P(1.2) que infecta 'Yolo Y' e 'Florida VR2' (Quadro 1).

No Brasil, a classificação mais comumente adotada é aquela proposta por NAGAI (1968, 1971), onde os isolados são divididos em dois grupos:

a) Grupo N: isolados que causam lesões locais em *Nicandra physaloides*. Plantas de pimentão afetadas por isolados desse grupo sofrem acentuada redução no crescimento, e forte mosqueado e encarquilhamento.

Quadro 1 - Cultivares de *Capsicum annuum* utilizadas para a determinação de patótipos de PVY que infectam pimentão

Cultivar	Gene de resistência	Fenótipo
Bastidon	<i>pvr2+</i>	Suscetível a todos os patótipos (necrose)
Yolo Wonder	<i>pvr2+</i>	Suscetível a todos os patótipos (mosaico)
Yolo Y	<i>pvr2</i> ¹	Resistente a P(0)
Florida VR2	<i>pvr2</i> ²	Resistente a P(0,1)
Agrônômico 10	<i>pvr3</i>	Resistente a P(0, 1, 1.2)
W4	<i>Pvr4</i>	Resistente a P(0, 1, 1.2)
CM 334	<i>Pvr4 e pvr5</i>	Resistente a P(0, 1, 1.2)
Perennial	Resistência poligênica	Parcialmente resistente a todos os patótipos de PVY

b) Grupo W: isolados que não causam lesões locais em *N. physaloides*. É o principal agente causal do mosaico do pimentão e, ao mesmo tempo, responsável pela importante virose do tomate conhecida vulgarmente como “risca do tomateiro”. No pimentão o principal sintoma é mosaico. Pertencem a esse grupo as estirpes denominadas PVY^w, PVY^f, PVY^{ft}, PVY^{fm} e PVY^m. Nessa classificação as estirpes são identificadas utilizando-se a série ‘Agrônômico’ de cultivares diferenciadoras. Trabalhos realizados por BOITEUX et al. (1994), BOITEUX e PESSOA (1994), BRIOSO et al. (1993), BRIOSO et al. (1996), CUPERTINO (1990a,b), CUPERTINO et al. (1991), INOUE-NAGATA et al. (2001), MEISSNER FILHO (1990) e MEISSNER FILHO et al. (1990) utilizaram esta classificação.

Segundo D’AQUINO (1995), é possível que isolados necróticos de PVY em pimentão ocorram freqüentemente no campo mas não sejam detectados, ou sejam confundidos com isolados comuns. Recentemente, uma nova estirpe de PVY altamente virulenta foi introduzida no Brasil via batata-semente importada (FIGUEIRA e PINTO, 1995; FIGUEIRA et al., 1996; FIGUEIRA e SANTOS,

1997). Essa estirpe, que causa sintomas necróticos severos em batata, vem se disseminando rapidamente no campo (FIGUEIRA e PINTO, 1995; FIGUEIRA et al., 1996; FIGUEIRA e SANTOS, 1997). A possibilidade de essa estirpe já estar disseminada em plantios de pimentão e pimenta ressalta a necessidade de estudos visando o desenvolvimento de métodos precisos e eficientes de detecção e caracterização de estirpes de PVY em nosso país.

Em todo o mundo, para as principais culturas hospedeiras, o controle de viroses causadas por potyvírus é baseado no uso de cultivares resistentes (BRIOSIO et al., 1996; CARANTA et al., 1997; CARANTA e PALLOIX, 1996; NAGAI, 1971). O desenvolvimento de cultivares resistentes é uma das estratégias mais práticas, econômicas e seguras para a redução das perdas causadas por potyvírus. Entretanto, a grande variabilidade genética existente entre as estirpes de potyvírus faz com que a busca por novas fontes de resistência seja constante. A obtenção de genótipos resistentes é um dos principais objetivos de diversos programas de melhoramento de *Capsicum*, em diversas partes do mundo. Atualmente existem diversos grupos de pesquisadores buscando novas fontes de resistência a potyvírus (SACCHI e MELO, 2001).

Os principais genes de resistência utilizados em programas de melhoramento contra potyvírus que infectam pimentão incluem:

pvr1 - alelo recessivo que confere resistência a TEV e PepMoV, também relatado como conferindo resistência a PVY (BOITEUX, 1996). Encontrado em *C. chinensis* linhagens ‘PI 152225’ e ‘PI 169236’, anteriormente recebia a notação *et^f*;

pvr2 - alelo identificado em *C. annuum* ‘PI 264281’ e ‘SC46252’ por COOK (1960) e inicialmente denominado *ey^a*, confere resistência a PVY e TEV. Seus diferentes alelos são usados para diferenciar estirpes específicas: o alelo selvagem é o *prv2+*; o alelo *prv2¹* confere resistência contra PVY(0); e o alelo *prv2²* contra PVY(1);

pvr3 - um terceiro gene com alelos monogênicos recessivos foi encontrado em *C. annuum* ‘Avelar’, conferindo resistência a PVY, TEV e PepMoV;

Pvr4 - alelo dominante descrito em *C. annuum* ‘Criollo de Morelos 334’ (CM334); esse gene confere resistência a todos os patótipos de PVY identificados até o presente, e também ao PepMoV;

pvr5 - alelo recessivo encontrado em ‘CM334’ e ‘Perennial’, confere resistência específica ao patótipo PVY(0);

pvr6 - alelo encontrado na linhagem ‘Perennial’, fazendo parte de um QTL que possui fatores isolado-específicos de amplo espectro. Onze regiões genômicas foram identificadas como envolvidas na resistência a potyvírus;

Pvr7 - gene dominante encontrado em *Capsicum chinense* ‘PI 159236’, confere resistência a PepMoV, mas não a PVY. Está fortemente ligado ao principal gene de resistência a PVY, *Pvr4* (GRUBE et al., 2000).

No Brasil, o programa de melhoramento de pimentão iniciado por NAGAI (1968) utilizou como fontes de resistência diversas cultivares nacionais e importadas contendo os genes *pvr2* e *pvr3*. Esse programa deu origem à série ‘Agrônômico’, que possuía uma resistência duradoura às estirpes detectadas no Brasil. Essa série foi utilizada como diferenciadora de estirpes até o surgimento da estirpe PVY^m, que quebra a resistência de todas as cultivares nacionais melhoradas com exceção da cultivar Magali R, que possui o gene dominante *Pvr4* encontrado em ‘CM334’ (BANJA, 1999 - comunicação pessoal).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção e manutenção dos isolados virais

Os isolados virais utilizados nesse estudo foram obtidos em campos de produção de pimentão e pimenta localizados em Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e no Distrito Federal (Quadro 2). O critério utilizado para coleta de amostras foi a observação de sintomas. Foram considerados como isolados distintos aqueles obtidos a partir de uma amostra de folhas coletada de uma planta em diferentes campos, ou com sintomas distintos em um mesmo campo. Os sintomas observados foram mosaico, deformação foliar e redução de crescimento. A identidade dos isolados foi comprovada por sorologia, utilizando-se ELISA indireto (VAN REGENMORTEL e BURCKARD, 1980) e um anti-soro policlonal para PVY fornecido por B.W. Falk (Dep. of Plant Pathology, University of California, Davis, CA, EUA).

Os isolados que reagiram positivamente contra o anti-soro policlonal para PVY foram inoculados em plantas de *Nicotiana debneyi*, previamente identificada como excelente hospedeira para multiplicação de PVY (BÜCHEN-OSMOND, 1987). As inoculações foram realizadas via extrato vegetal tamponado em fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,2, contendo sulfito de sódio a

Quadro 2 - Origem dos isolados virais utilizados neste estudo

Isolado	Hospedeiro	Procedência
1	<i>Capsicum baccatum</i>	Leopoldina, MG
2*	<i>C. annuum</i>	Igarapé, MG
3*	<i>C. annuum</i>	Igarapé, MG
4	<i>C. annuum</i>	Guidoval, MG
5**	<i>Solanum tuberosum</i>	Lavras, MG
6**	<i>S. tuberosum</i>	Lavras, MG
7	<i>C. annuum</i>	Guidoval, MG
8	<i>C. praternisum</i>	Guarani, MG
9	<i>C. annuum</i>	Venda Nova do Imigrante, ES
10	<i>C. frutescens</i>	Guarani, MG
11	<i>C. praternisum</i>	Guarani, MG
12	<i>C. chinensis</i>	Montes Claros, MG
13	<i>C. frutescens</i>	Guarani, MG
14	<i>C. frutescens</i>	Guarani, MG
15	<i>C. frutescens</i>	Guarani, MG
16	<i>C. frutescens</i>	Guarani, MG
17	<i>C. frutescens</i>	Guarani, MG
18***	<i>C. annuum</i>	Hortaliças, Brasília, DF
19	<i>C. annuum</i>	Ribeirão Vermelho, MG
20	<i>C. annuum</i>	Itumirim, MG
21	<i>C. annuum</i>	Valão do Barro, RJ
22	<i>C. annuum</i>	Viçosa, MG
23	<i>C. annuum</i>	Bragança Paulista, SP

* Fornecido por I.V. Carrijo, SVS do Brasil.

** Isolados previamente caracterizados como pertencentes aos grupos PVY^N (5) e PVY^O (6). Fornecidos por A.R. Figueira, UFLA.

*** Fornecido por A.N. Dusi, EMBRAPA.

0,01M. As folhas foram pulverizadas previamente com corundum (600 mesh). Os isolados foram mantidos *in vivo* por meio de inoculações sucessivas em *N. debneyi*, e preservados *in vitro* sob forma de material foliar dessecado armazenado a -20°C.

3.2. Caracterização biológica

3.2.1. Gama de hospedeiros

Foram utilizadas nesse estudo plantas de 13 espécies vegetais, selecionadas com base em dados de literatura (BÜCHEN-OSMOND, 1987): *Capsicum annuum* L. ‘Ikeda’, *Capsicum frutescens* L. ‘Malagueta’, *Nicotiana tabacum* L. ‘Sansun’, ‘White Burley’ e ‘TNN’, *Chenopodium quinoa* Willd., *C. amaranticolor* Coste e Reyn, *Physalis floridana* Rydb., *Solanum tuberosum* L., *Cucurbita pepo* L. ‘Caserta’, *Datura stramonium* L., *Nicandra physaloides* Gaertn. e *Lycopersicon esculentum* Mill. ‘Rutgers’ As plantas, quinze dias após emergência, foram inoculadas via extrato vegetal tamponado conforme descrito no item 3.1 e reinoculadas três dias após a primeira inoculação, utilizando como fonte de inóculo plantas de *Nicotiana debneyi*. Os isolados virais foram inoculados em cinco plantas de cada espécie, e cinco plantas foram usadas como controle. Os isolados de PVY representantes dos grupos PVY^O (isolado 6) e PVY^N (isolado 5) (Quadro 2) foram utilizados como controles positivos e padrões de comparação com os sintomas apresentados pelos isolados provenientes de *Capsicum*. Os sintomas foram avaliados 30 dias após a inoculação.

3.2.2. Transmissão via semente

A possibilidade de transmissão dos isolados via sementes de pimentão e pimenta foi avaliada em casa de vegetação. Sementes sadias de pimentão ‘Casca Dura-Ikeda’ e pimenta ‘Malagueta’ foram semeadas em vasos. As plântulas oriundas dessas sementes foram inoculadas ao atingirem o estágio de três a quatro folhas definitivas, via extrato vegetal tamponado conforme descrito no

item 3.1, e reinoculadas três dias após a primeira inoculação, utilizando-se como fonte de inóculo plantas infectadas de *Nicotiana debneyi*. Foram inoculadas 20 plantas de pimentão e 20 de pimenta. Como controle, 10 plantas de cada espécie foram inoculadas apenas com a solução tampão. A infecção foi confirmada 30 dias após inoculação, pela observação de sintomas e indexação por ELISA utilizando anti-soro policlonal para PVY, conforme descrito no item 3.1. Uma vez confirmada a infecção, as plantas foram mantidas em casa de vegetação até a produção e amadurecimento dos frutos. Após a colheita dos frutos, as sementes foram retiradas, homogeneizadas e divididas em cinco lotes de 200 sementes cada. Estas foram semeadas em bandejas contendo 200 células, perfazendo um total de 1.000 sementes para as plantas infectadas e 1.000 sementes para as plantas sadias. A avaliação da infecção viral nas plântulas oriundas dessas sementes foi realizada 30 dias após a germinação, por meio da observação de sintomas e ELISA indireto.

3.2.3. Inoculação em cultivares diferenciadoras

Os isolados biologicamente distintos com base no teste de gama de hospedeiros foram caracterizados adicionalmente por meio de inoculação em cultivares diferenciadoras de pimentão contendo genes de resistência conhecidos (Quadro 1). As plantas foram inoculadas via extrato vegetal tamponado conforme descrito no item 3.1, e reinoculadas três dias após a primeira inoculação, utilizando-se como fonte de inóculo plantas infectadas de *Nicotiana debneyi*. Foram inoculadas 10 plantas de cada cultivar e 10 plantas foram utilizadas como testemunha (inoculadas apenas com solução tampão).

3.3. Produção de anti-soros

A produção de anti-soro foi realizada utilizando-se como imunógeno partículas virais purificadas a partir dos isolados biologicamente distintos 1 e 3.

3.3.1. Purificação viral

Os isolados 1 e 3 foram purificados a partir de folhas de *Nicotiana debneyi* apresentando sintomas de mosaico, colhidas entre 15 e 21 dias após a inoculação. Utilizou-se o método de CARVALHO E SHEPHERD (1983), com modificações sugeridas pelo primeiro autor.

As folhas colhidas foram resfriadas a 4°C durante 15 a 30 minutos em câmara-fria. Em seguida, foram trituradas em tampão de extração (tris-borato 0,4 M, pH 8,5, contendo uréia 0,1 M, Na-EDTA 0,01 M, PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) a 0,1% v/v e iodoacetamida a 0,25% v/v), na proporção de 2,5:1 (tampão:material foliar). As soluções de PMSF e iodoacetamida foram adicionadas ao tampão de extração imediatamente antes da trituração. O extrato foi coado em tela de náilon e mantido a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado sulfito de sódio a 0,2% (p/v) e ácido ascórbico a 0,3 % (p/v). Após a adição destes redutores, o pH do extrato foi corrigido para 8,0 com solução de borato 0,5 M, pH 9,5, contendo uréia 1,0 M e EDTA 0,01 M. Em seguida o extrato foi centrifugado a 4.000 g por 10 minutos, o sobrenadante recolhido e centrifugado a 5.000 g por 10 minutos, recolhendo-se novamente o sobrenadante.

A clarificação foi realizada por meio da adição de uma solução a 20% (v/v) de Triton X-100 contendo ácido ascórbico a 0,1% (p/v) e sulfito de sódio a 0,1% (p/v), para uma proporção final de 1:9 de Triton X-100:extrato. O processo foi realizado a 4°C sob forte agitação por 4 horas, e em seguida a solução foi centrifugada a 5.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e o vírus foi precipitado pela adição de polietilenoglicol (PEG) a 6% (p/v), a 4°C sob agitação. A solução foi incubada a 4°C por 90 minutos para dissolução do PEG. Em seguida adicionou-se cloreto de sódio para uma concentração final de 0,5%. A solução foi mantida em repouso a 4°C por 12 horas e em seguida centrifugada a 12.000 g por 25 minutos. Os “pellets” foram ressuspensos em um pequeno volume de tampão de dissolução (tris-borato 0,05 M, pH 8,3, contendo uréia 0,5 M e Na-EDTA 6 mM) e mantidos por 3 horas a 4°C sob agitação. Esta solução foi centrifugada a 4.000 g por 10 minutos, recolhendo-se o sobrenadante. Os “pellets” foram novamente ressuspensos em um pequeno volume de

tampão de dissolução e centrifugados a 4.000 g por 10 minutos, recolhendo-se o sobrenadante e acrescentando-o ao previamente recolhido.

Realizou-se a primeira ultracentrifugação a 22.000 g por 2:35 horas. O “pellet” foi ressuspenso em 1 ml de tampão tris-borato 0,05 M, pH 8,3, contendo uréia 0,5 M. Em seguida, a preparação foi submetida à ultracentrifugação zonal em gradiente de sacarose (10 a 40%) a 30.000 g por 1 hora. A banda viral foi recolhida e dializada em tampão tris-borato 0,05 M, pH 8,3, com duas trocas de solução a cada 12 horas. Após a diálise, o vírus foi ultracentrifugado a 22.000 g por 2:35 horas e solubilizado em 1 ml de tampão tris-borato 0,05 M, pH 8,3. Por fim, o material foi submetido a ultracentrifugação isopícnica a 32.000 g por 18 horas, em CsCl 1,25/1,45/1,65 g/ml em tampão tris-glicina 0,05 M, pH 8,3. Após a ultracentrifugação, foi acrescentado 1 ml de tampão à coluna, e com o auxílio de uma seringa foram removidas as impurezas e coletada a banda viral. A preparação final purificada foi submetida a diálise em tampão tris-borato 0,05 M, pH 8,3 com duas trocas de tampão a cada 12 horas.

3.3.2. Avaliação da qualidade e do rendimento do vírus purificado

Para avaliação quantitativa e qualitativa das preparações purificadas foram realizadas leituras do espectro de absorção das soluções virais em espectrofotômetro. As leituras foram feitas entre os comprimentos de onda de 230 a 320 nm. A concentração do vírus purificado foi estimada medindo-se a absorção a 260 nm e utilizando-se o coeficiente de extinção $E_{260}^{0,1\%} = 2,4$ determinado para o potyvírus *Tobacco etch virus* (TEV) (PURCIFULL e HIEBERT, 1982).

3.3.3. Imunização de coelhos

O vírus purificado foi injetado em coelhos brancos da raça Nova Zelândia com aproximadamente 30 dias de idade (dois coelhos para cada isolado viral). Após a coleta de sangue para obtenção do soro normal (pré-imune), foi realizada uma injeção intravenosa de 100 µg de suspensão viral em solução

salina (Quadro 3). Em seguida foram efetuadas seis injeções intramusculares a intervalos semanais, com quantidades variadas de imunógeno (Quadro 3). Para as injeções intramusculares a preparação viral foi emulsificada em igual volume de adjuvante incompleto de Freund. Duas semanas após a última injeção foi retirada amostra de sangue para avaliação inicial do anti-soro. Seis coletas adicionais foram realizadas a intervalos semanais após a coleta inicial.

Quadro 3 - Calendário de imunizações realizadas com as preparações virais purificadas

Semanas	Tipo de injeção	Quantidade injetada ^a (µg)			
		Isolado 1		Isolado 3	
		Coelho 1	Coelho 2	Coelho 1	Coelho 2
1 ^a	Intravenosa ^b	100	100	100	100
2 ^a	Intramuscular (IM)	250	250	100	100
3 ^a	(IM)	250	500	100	200
4 ^a	(IM)	500	1000	200	200
5 ^a	(IM)	500	2000	200	500
6 ^a	(IM)	1000	2000	350	500
7 ^a	(IM)	500	500	500	500

^aQuantidade de partículas virais purificadas injetadas em cada coelho, imunizando-se dois coelhos para cada isolado.

^bApós a coleta de 10 ml de sangue para obtenção do soro normal (pré-imune).

3.3.4. Caracterização dos anti-soros

3.3.4.1. ELISA indireto

O título e a especificidade dos anti-soros produzidos a partir dos isolados 1 e 3 foram avaliados por meio de ELISA indireto. O título dos anti-soros foi

determinado utilizando-se diluições de cada anti-soro em tampão PEP (CLARK e ADAMS, 1977) nas proporções 1:250, 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:4.000, 1:8.000, 1:16.000 e 1:32.000. Os extratos foliares foram preparados em tampão de extração (VAN REGENMORTEL e BURCKARD, 1980) a uma diluição de 1:10 (material foliar : solução tampão), e adicionados (200 µl) às cavidades da placa, seguindo-se incubação por 1 hora a 37°C. Após incubação as cavidades foram lavadas 4 vezes por 2 minutos com PBS-T. Em seguida foram adicionados às cavidades 200 µl de cada diluição dos anti-soros, seguindo-se nova incubação por 1 hora a 37°C. Após novo ciclo de lavagens com PBS-T adicionaram-se 200 µl do conjugado cabra-anti-coelho diluído 1:2.000 em tampão PEP, seguindo-se incubação por 3 horas a 37°C. Após novo ciclo de lavagens com PBS-T foi adicionado o substrato da enzima, *p*-nitrofenilfosfato, a 10 µg/ml (200 µl por cavidade). A reação foi avaliada 20 minutos após a adição do substrato, em uma leitora Titertek Multiskan Plus MK II, a 405 nm.

3.3.4.2. Purificação do IgG

A purificação do IgG foi realizada apenas para o anti-soro produzido com o isolado 1. Inicialmente diluíram-se 2 ml do anti-soro em 8 ml de água deionizada. Para a precipitação de proteínas adicionaram-se 10 ml de solução saturada de sulfato de amônia, por gotejamento e sob agitação constante. A mistura foi incubada por 60 minutos à temperatura ambiente, e em seguida centrifugada a 8.000g por 10 minutos, ressuspendendo-se o “pellet” em 2 ml de PBS 50% (v/v). O processo foi repetido e o precipitado foi novamente dissolvido em 2 ml de PBS 50% (v/v).

A partir deste material foram realizadas três diálises em PBS 50% num intervalo de 18 horas, sob agitação lenta a 4°C. Em seguida, o material foi centrifugado a 4.000 g por 10 minutos, coletando-se o sobrenadante. A concentração da fração globulina foi determinada em 280 nm e ajustada para 1 mg/ml. Para preservação da fração globulina adicionou-se azida de sódio a 0,04% (p/v) e armazenou-se a 4°C.

A purificação do IgG a partir da fração globulina foi realizada por meio de cromatografia de troca iônica em uma coluna preparada com DEAE-Sephacel (Sigma). A coluna foi lavada com acetato de sódio 0,025 M, pH 5,2 até que o pH do efluente estivesse igual ao pH da solução de acetato (5,2). Em seguida, aplicaram-se 2 ml da fração globulina (1 mg/ml). O IgG foi eluído por meio da aplicação de PBS 50% por gotejamento, coletando-se frações de 1 ml do eluente em tubos de microcentrífuga. A concentração das frações eluídas foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm. As frações cuja leitura foi superior a 0,8 foram misturadas, e a concentração final foi ajustada para 1 mg/ml.

3.3.4.3. Preparo do conjugado

A imunoadsorção do IgG purificado à enzima fosfatase alcalina (Sigma) foi realizada por meio da mistura de 10 mg de IgG e 5 mg de enzima. Em seguida adicionou-se glutaraldeído a 10% (v/v), vagarosamente e sob agitação lenta, para uma concentração final de 0,06%. O recipiente com a solução foi recoberto com papel aluminizado e deixado em repouso à temperatura ambiente por 3 horas. Em seguida a solução foi dialisada em PBS contendo azida de sódio a 0,05% (p/v), a 4°C sob agitação, para remoção do glutaraldeído. Adicionaram-se 10 mg/ml de albumina bovina (Sigma) e armazenou-se o conjugado a 4°C.

3.3.4.4. ELISA direto

O título e a especificidade do anti-soro produzido a partir do isolado 1 foram testados por ELISA direto. O conjugado foi diluído nas proporções 1:250, 1:500, 1:1.000, 1:2.000 e 1:4.000 em tampão de cobertura (carbonato de cálcio 50 mM, pH 9,6, contendo azida de sódio a 0,1%) e adicionado (100µl) às cavidades da placa, que foi incubada por 18 horas a 4°C. Após lavagem com PBS-T (4 vezes por 2 minutos) as cavidades foram preenchidas com 200 µl dos extratos foliares, preparados em tampão de extração (CLARK e ADAMS, 1977) na proporção 1:10 (material foliar : solução tampão), seguindo-se incubação por 1 hora a 37°C. Após novo ciclo de lavagens com PBS-T, 200 µl do conjugado diluído em tampão PEP foram adicionados às cavidades. Após incubação por

3 horas a 37°C, repetiu-se o ciclo de lavagens com PBS-T e adicionou-se o substrato da enzima, *p*-nitrofenilfosfato, a 10 µg/ml (200 µl por cavidade). A reação foi avaliada 20 minutos após a adição do substrato, em uma leitora Titertek Multiskan Plus MK II, a 405 nm.

3.4. Caracterização molecular

3.4.1. Concentração do vírus a partir de amostras foliares

Preparações virais concentradas foram obtidas a partir de folhas de *N. debneyi* infectadas com diferentes isolados aos 21 dias após a inoculação, de acordo com o método descrito por LANE (1992). As preparações virais foram solubilizadas em 500 µl de tampão fosfato de potássio 0,01 M, pH 7,0.

3.4.2. Extração do RNA viral

O RNA viral foi extraído a partir de 200 µl da preparação viral concentrada. (item 4.1), à qual se adicionaram 50 µl de tampão de extração (Tris-glicina 0,2 M, cloreto de sódio 0,2 M, EDTA 20 mM, pH 9,5), 20 µl de SDS 20% (p/v) e 2,7 µl de proteinase K a 20 mg/ml, obtendo-se uma concentração final da enzima de 100 µl/ml. Esta solução foi incubada a 37°C por 45 minutos. O RNA viral foi extraído com fenol/clorofórmio (1 vol.) e precipitado com 1/20 vols. de acetato de sódio 3M, pH 5,5 e 2,5 vols. de etanol absoluto. A solução foi incubada a -20°C por três horas e em seguida centrifugada por 30 min a 15.000 g, descartando-se o sobrenadante. Os “pellets” foram lavados com etanol 70% (v/v), secados a vácuo por 5 minutos, solubilizados em 20 µl de água estéril, e armazenados a -80°C. A integridade do RNA foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose (0,9%).

3.4.3. Amplificação dos genes da replicase (*nib*) e proteína capsidial (*cp*) e da 3' NTR por RT-PCR

O RNA viral foi utilizado como molde para a síntese de uma fita de DNA complementar (cDNA), utilizando-se o “Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis” (GibcoBRL), de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese de cDNA foi utilizado um oligonucleotídeo contendo uma sequência de bases timina (poli-T: 5'-G-A-C-T-G-G-A-T-C-C-T₁₄-3', sítio de *Bam*H I sublinhado). O poli-T se alinha à sequência poli-A presente na extremidade 3' do genoma dos potyvírus.

Para a amplificação dos genes *nib* e *cp* via PCR, o oligonucleotídeo poli-T foi utilizado em conjunto com um oligonucleotídeo universal para o gênero *Potyvirus* (poty 4: 5'-G-C-G-G-G-A-T-C-C-G-T-N-T-G-Y-G-T-N-G-A-Y-G-A-Y-T-T-T-Y-A-A-Y-A-A-3', sítio de *Bam*H I sublinhado), cuja sequência foi determinada com base em sequências do gene *nib* de diversas espécies de potyvírus depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Para alguns isolados, utilizou-se um oligonucleotídeo poli-T com um sítio para a enzima *Sst* I no lugar de *Bam*H I.

As PCRs foram realizadas em um volume total de 50 µl, utilizando-se 5 µl do cDNA, 5 µl do tampão da enzima, 5 µl de cloreto de magnésio 25 mM, 1 µl de mistura de dNTPs (0,01 M), 20 pmol de cada oligonucleotídeo e 1 µl de *Taq* DNA polimerase, completando-se o volume com água. A amplificação foi realizada em 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos oligonucleotídeos a 45°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Uma alíquota de 5 µl foi utilizada para análise dos produtos de amplificação por meio de eletroforese em gel de agarose (0,9%).

3.4.4. Clonagem e seqüenciamento dos genes *nib* e *cp*

Os produtos de amplificação via PCR (item 3.3.3) correspondentes aos genes *nib* e *cp* e à 3'NTR dos isolados 1, 2, 3, 4, 7 e 20 (Quadro 2) foram clonados no plasmídeo vetor pGEM-T (Promega). Os plasmídeos recombinantes

foram transformados em células competentes de *Escherichia coli* DH5 α pelo método do choque térmico (SAMBROOK et al., 1989). Plasmídeos foram purificados a partir de colônias que cresceram em meio 2 $\times$ YT com ampicilina utilizando-se o método da lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989). Os plasmídeos recombinantes foram identificados por meio de clivagem com a enzima *EcoR* I.

Os fragmentos clonados foram sequenciados utilizando-se o método de dideoxinucleotídeos terminadores descrito por SANGER et al. (1977). A reação de sequenciamento foi realizada com o kit “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Perkin Elmer) em um volume final de 20 μ l, contendo os oligonucleotídeos SP6 ou T7 a 0,5 mM e 150 ng de DNA. A reação foi submetida a uma desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos, seguindo-se 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 40 segundos, anelamento do oligonucleotídeo a 55°C por 20 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos, e analisada em um sequenciador automático ABI 310 (Applied Biosystems).

3.4.5. Análise filogenética

As seqüências de aminoácidos das proteínas N1b e CP, e de nucleotídeos da 3’NTR foram comparadas com outras seqüências virais depositadas no GenBank, tanto por alinhamento múltiplo utilizando-se o programa Clustal W (www.ebi.ac.uk/clustalw), como por análise filogenética, utilizando-se o programa MEGA (www.megasoftware.net). No caso de seqüências de aminoácidos, a análise filogenética foi realizada pelo método de *neighbor-joining*, enquanto para seqüências de nucleotídeos utilizou-se o UPGMA. Em ambos os casos utilizou-se correção por Poisson. Os ramos de ambas as árvores foram testados por *bootstrap*, com 2.000 repetições.

3.4.6. Análise de diversidade genética via PCR-RFLP

Os produtos de amplificação via PCR (item 3.4.3) correspondentes ao gene da proteína capsidial e à 3’NTR dos isolados 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 16, 18, 20, 22, e 23 (Quadro 2) foram submetidos a reações de clivagem com as enzimas

de restrição *Dde* I, *EcoR* V, *Hinf* I, *Rsa* I, *Taq* I, *Cla* I e *Dra* I, escolhidas após análise do alinhamento de todas as seqüências de nucleotídeos do gene *cp* e região 3'NTR de isolados de PVY disponíveis (BLANCO-URGOITI et al., 1996). Todas as reações de digestão foram ajustadas para um volume final de 20 µl com o tampão correspondente. As misturas foram incubadas por 2 a 5 horas a 37°C, exceto para a enzima *Taq* I, cuja reação foi incubada a 65°C. Os fragmentos de DNA foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose (1,5%) e identificados pela posição no gel. A presença ou ausência de cada fragmento de restrição foi representada na forma de uma matriz binária de dissimilaridade ou de distância. Também foi realizada uma análise de agrupamento ou “cluster” e ainda uma análise de escala multidimensional.

Os fragmentos gerados pelas enzimas de restrição foram representadas como 1 (presença) e 0 (ausência). A distância genética (DG) foi calculada usando o complemento aritmético do coeficiente de concordância simples (DIAS, 1998),

$$DG_{ij} = 1 - \left(\frac{a + d}{a + b + c + d} \right), \text{ onde:}$$

a = número de bandas presentes nos isolados i e j ;

b = número de bandas presentes no isolado i e ausentes no isolado j ;

c = número de bandas ausentes no isolado i e presentes no isolado j ;

d = número de bandas ausentes nos isolados i e j .

3.5. Avaliação de acessos de *Capsicum* quanto à resistência a potyvírus

Trinta acessos de *Capsicum* pertencentes ao banco de germoplasma da UFV e da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) (Quadro 4), foram avaliados quanto a resistência a potyvírus, aliada a outras características agronômicas desejáveis em programas de melhoramento. Plantas de pimenta (*Capsicum frutescens*) infectadas com os isolados 1, 3 e 10

Quadro 4 - Acessos de *Capsicum* provenientes dos Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) testados para resistência aos isolados 1, 3 e 10

Acesso	Espécie	Acesso	Espécie
MG 85	<i>C. frutescens</i>	MG 328	<i>C. chinensis</i>
MG 151	<i>C. frutescens</i>	MG 21	<i>C. baccatum</i>
BGH 4356	<i>C. baccatum</i>	MG 327	<i>C. chinensis</i>
MG 1040	<i>Capsicum</i> sp.	MG 331	<i>C. praeterminssum</i>
BGH 1820	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	MG 102	<i>C. chinensis</i>
BGH 4174	<i>Capsicum</i> sp.	MG 221	<i>C. praetermisum</i>
BGH 1612	<i>Capsicum</i> sp.	MG 72	<i>C. chinensis</i>
BGP 68	<i>C. frutescens</i>	MG 349	<i>C. praeterminssum</i>
M. Agrocere	<i>C. frutescens</i>	MG 330	<i>C. praeterminssum</i>
MG 83	<i>C. praetermisum</i>	MG 325	<i>Capsicum</i> sp.
MG 171	<i>C. frutescens</i>	BGH 460	<i>C. frutescens</i>
MG 206	<i>C. frutescens</i>	MG 349	<i>C. frutescens</i>
BGH 1614	<i>Capsicum</i> sp.	MG 157	<i>C. praeterminssum</i>
MG 324	<i>Capsicum</i> spp.	BGH 1607	<i>C. praeterminssum</i>
Topseed	<i>C. frutescens</i>	MG 350	<i>Capsicum</i> sp.

(Quadro 2) foram utilizadas como fonte de inóculo. De cada acesso foram utilizadas 10 plantas, sendo nove inoculadas com o isolado viral e uma apenas com tampão de inoculação. A avaliação foi realizada por meio de observação visual dos sintomas e por ELISA indireto, 30, 60 e 90 dias após a inoculação.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção e identificação dos isolados virais

Todos os isolados em estudo foram submetidos ao ELISA indireto utilizando anti-soro policlonal para detecção de PVY. Reações positivas confirmaram a presença de potyvírus em todas as amostras coletadas nos campos de produção de *Capsicum*.

O padrão eletroforético da proteína capsidial e dos RNAs confirmou a infecção por potyvírus e a ausência de infecções mistas em todas as amostras testadas.

4.2. Caracterização biológica

4.2.1. Gama de hospedeiros

Os resultados da gama de hospedeiros possibilitaram caracterizar e diferenciar os isolados de potyvírus provenientes de *Capsicum* usando como controle isolados pertencentes às estirpes PVY^N e PVY^O de batata. Os sintomas desenvolvidos pelas plantas de cada espécie inoculada com os 22 isolados em estudo estão listados no Quadro 5. As plantas assintomáticas foram testadas por ELISA indireto com o objetivo de detectar infecções latentes.

Quadro 5 - Sintomas observados nas espécies hospedeiras infectadas pelos diferentes isolados de PVY

ISOLADOS	Espécies hospedeiras					
	<i>C. annuum</i>	<i>C. frutescens</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>C. quinoa</i>	<i>C. sativum</i>	<i>D. stramonium</i>
1	-/m ^a	-/ms	-/-	llc/ -	-/-	-/-
2	-/m	-/m	-/m	llc/ -	-/-	-/-
3	-/ms	-/ms	-/-	llc/ -	-/-	-/-
4	-/m	-/m	-/-	llc/ -	-/-	-/-
5	-/m	-/m	-/m	-/-	-/-	-/-
6	-/ms	-/ms	-/m	-/-	-/-	-/-
7	-/ms	-/m	-/-	llc/ -	-/-	-/-
8	-/m	-/m	-/-	-/-	-/-	-/-
9	-/ml	/-m	-/-	-/-	-/-	-/-
10	-/ml	-/m	-/-	-/-	-/-	-/-
11	-/ml	-/m	-/-	-/-	-/-	-/-
12	-/ml	-/m	-/-	-/-	-/-	-/-
13	-/ml	-/m	-/-	-/-	-/-	-/-
14	-/ml	-/m	-/-	llc/ -	-/-	-/-
15	-/ma	-/m	-/-	-/-	-/-	-/-
16	-/ml	-/m	-/- ^b	llc/ -	-/-	-/-
17	-/ml	-/m	-/-	-/-	-/-	-/-
18	-/m	-/m	-/-	-/-	-/-	-/-
19	-/ms	-/ms	-/-	-/-	-/-	-/-
20	-/ms	-/ms	-/-	llc/ -	-/-	-/-
21	-/m	-/ms	-/-	-/-	-/-	-/-
22	-/ms	-/m	-/-	llc/ -	-/-	-/-

^aOs sintomas em folhas inoculadas/não inoculadas, 30 dias após a inoculação, estão representados por: llc, lesão local clorótica; m, mosaico; ma, mosaico amarelo; ml, mosaico leve; ms, mosaico severo; -, ausência de sintomas.

^bInfecção latente comprovada por ELISA indireto.

Quadro 5, Cont.

ISOLADOS	Espécies hospedeiras						
	<i>N. tabacum</i> 'Sansum'	<i>N. tabacum</i> 'White Burley'	<i>N. tabacum</i> 'TNN'	<i>N. debneyi</i>	<i>Nicandra physaloides</i>	<i>P. floridana</i>	<i>L. esculentum</i>
1	-/ml ^a	-/ml, cn	-/cn, ml	-/m	pc,an/ml	-/ma	nb/m
2	-/ml	-/m	-/cn, ml	nb/m	pc,an/ml	-/ma	-/ml
3	-/m, cn	-/m, cn	-/m	nb/ms	pc,an/nn, ms	-/ms	nb/m, cn
4	-/m	-/m, cn	-/cn, ml	nb/m	pc,an/ml	-/ma	nb/m
5	-/ml	-/m	-/m	nb/m	pc,an/ml	-/ma	nb/m
6	-/m	-/m	-/m	-/m	pc,an/ml	-/m	-/m
7	-/m	-/m	-/nn, ml	nb/ms	pn/m, nn	-/ms	nb/ml
8	-/m, cn	-/m, cn	-/m	nb/ml	pc, an/m	-/m	-/m
9	-/ml	-/ml	-/ml	nb/m	pc, an/m	-/m	-/m
10	-/m	-/ml	-/m	nb/m	-/ml	-/ml	-/ml
11	-/ml	-/ml	-/cn, ml	-/m	-/ml	-/ml	nb/m
12	-/ma	-/ma	-/cn, ml	-/m	pc/ml	-/ml	nb/m
13	-/ma	-/ma	-/cn, ml	-/m	pc/ml	-/ml	nb/m
14	-/m	-/m	-/ml	nb/m	pc, an/m, cn	-/m	-/ml
15	-/ml, cn	-/ml, cn	-/cn, m	nb/m	pc, an/m, cn	-/m	-/ml
16	-/ml	-/ml	-/ml	-/m	pc, an/m, cn	-/m	-/ml
17	-/ml	-/ml	-/ml	-/m	-/m	-/ml	nb/ml
18	-/ml	-/ml	-/ml	nb/m	pc, an/m	-/ml	-/ml
19	-/m	-/m	-/cn, ml	nb/m	an,/nn, m	-/mc	-/m
20	-/m	-/m	-/m	-/m	an,/nn, m	-/m	-/m
21	-/ml	-/ml	-/m	-/m	pc, an/m	-/m	-/m
22	-/m	-/mb	-/cn, m	nb/m	an/nn, m	-/m	-/m

^aOs sintomas em folhas inoculadas/não inoculadas, 30 dias após a inoculação, estão representados por: an, anéis necróticos; cn, clorose de nervuras; m, mosaico; ma, mosaico amarelo; mb, mosaico bolhoso; ml, mosaico leve; ms, mosaico severo; nb, necrose branca; nn, necrose de nervuras; pc, pontuações cloróticas; pn, pontuações necróticas; –, ausência de sintomas.

Os resultados demonstraram a existência de um considerável grau de variabilidade biológica entre os isolados virais infectando espécies de *Capsicum*. As reações diferenciais de algumas espécies distinguem os isolados em estudo de outros potyvírus que infectam pimentão, como PepMoV, TEV e PVMV. Nenhum isolado causou necrose em *C. frutescens* ‘Malagueta’, sintoma característico de PepMoV nessa hospedeira. Da mesma forma, não infectaram *D. stramonium*, espécie indicadora do TEV e do PVX. Os isolados também não infectaram *C. pepo* nem causaram lesão local necrótica em *N. tabacum* TNN, o que indica a ausência de infecções mistas com CMV e TMV, respectivamente. Os sintomas observados em *L. esculentum* não foram típicos de infecção por tospovírus.

Os isolados 9 e 16 causaram infecção latente em batata, e o isolado 2 causou infecção com sintomas de mosaico nessa hospedeira (Quadro 5). Os demais isolados não infectaram a batata.

Treze isolados causaram anéis necróticos nas folhas inoculadas e mosaico em *N. physaloides* (Quadro 5, Figura 1A, B). No caso dos isolados 3, 19, 20 e 22 o sintoma local evoluiu para necrose de nervuras nas folhas não inoculadas. O isolado 7 induziu sintoma de pontuações necróticas nessa hospedeira, mas não em forma de anel conforme observado para os demais isolados. Essas pontuações necróticas evoluíram rapidamente para uma necrose sistêmica bastante severa. Os oito isolados restantes causaram apenas pontuações cloróticas que não evoluíram para necrose nessa hospedeira.

Nove isolados induziram lesão local clorótica nas folhas inoculadas de *C. quinoa* (Quadro 5, Figura 1C). Os demais isolados não causaram qualquer sintomas nessa hospedeira.

Um sintoma atípico para infecção por potyvírus, uma necrose branca em forma de anel nas folhas inoculadas de *N. debneyi*, foi induzido por treze isolados (Quadro 5, Figura 1D, E). Apenas 10 isolados causaram esse mesmo sintoma em tomate, e cinco destes causaram necrose branca nos dois hospedeiros. Nenhum dos isolados causou o sintoma de risca amarela em tomate, considerado típico para isolados de PVY.

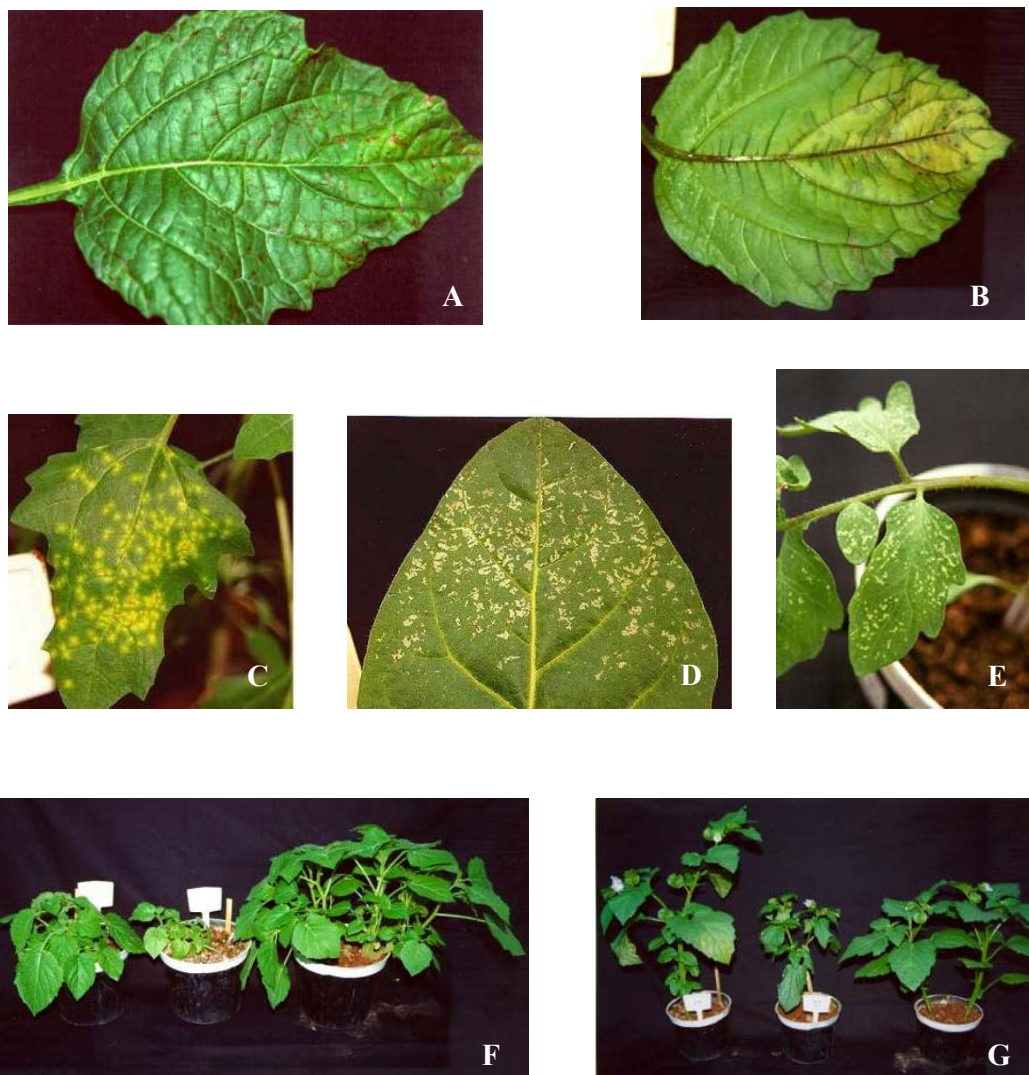


Figura 1 - Reação de diferentes espécies hospedeiras à inoculação via extrato vegetal tamponado com os diferentes isolados de potyvírus. **A.** Lesão local necrótica em *N. physaloides*; **B.** Necrose sistêmica em *N. physaloides*; **C.** Lesão local clorótica em *C. quinoa*; **D.** Necrose branca em *N. debneyi*; **E.** Necrose branca em *L. esculentum*; **F.** Planta sadia de *P. floridana* (direita) e sintomas causados por isolado forte (3, centro) e fraco (12, esquerda); **G.** Planta sadia de *N. physaloides* (esquerda) e sintomas causados por isolado forte (22, centro) e moderado (19, direita).

Os isolados provenientes de pimenta causaram sintomas mais fortes em pimenta e mais brandos em pimentão, mas os isolados de pimentão não mostraram essa correspondência. Por exemplo, os isolados 3, 19, 20 e 21 causaram sintomas severos tanto em pimentão como em pimenta.

Foi possível observar, de maneira generalizada, a distinção de três grupos de isolados, causando sintomas fortes, moderados e fracos em várias das espécies hospedeiras utilizadas (Figura 1F, G). Os isolados 3, 7, 20 e 22 foram classificados como severos. Os isolados 1, 2, 4, 5, 8, 18, 19 e 21 como moderados, e os isolados 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 como fracos. O isolado 23 foi incorporado a coleção após a caracterização biológica utilizando gama de hospedeiras.

4.2.2. Transmissão via semente

Sementes coletadas a partir de plantas infectadas pelos diferentes isolados foram semeadas, e as plântulas foram observadas para o surgimento de sintomas até 30 dias após a germinação. Não foi observado nenhum sintoma nas plantas jovens, oriundas de sementes coletadas em plantas infectadas pelos diferentes isolados virais. Foram feitas amostragens por isolado, e as plantas avaliadas por ELISA indireto. Todas as amostras testadas apresentaram reação negativa, confirmando as análises visuais.

4.2.3. Cultivares diferenciadoras

O Quadro 6 mostra as reações das cultivares diferenciadoras de *Capsicum annuum*, contendo diferentes genes de resistência aos isolados em estudo. Os resultados permitiram distinguir diferentes patótipos dentre os isolados coletados. Todas as plantas assintomáticas foram testadas por ELISA indireto.

O isolado 6, que pertence ao grupo PVY^O, não infectou nenhuma das cultivares de pimentão da série diferenciadora (Quadro 6), já o isolado 5,

Quadro 6 - Reação de cultivares diferenciadoras de pimentão à inoculação com os diferentes isolados de potyvírus

ISOLADOS	Cultivares diferenciadoras						
	Bastidon	Yolo Wonder	Yolo Y	Florida VR2	W4	CM 334	Perennial
1	ml	ml	m	-	-	-	-
2	ml	ms, ep	ms ep	ms	-	-	-
3	mb, ep	ms	ms	ms	-	-	-
5	ml	mq	ml	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
10	ml	ml	ml	-	-	-	-
18	ml	m	ml	-	-	-	-
20	ml	ms	ms	ms	-	-	-
23	ms, ep	ms, ep	ms, ep	ms, ep	-	-	-

Os sintomas em folhas não inoculadas, 30 dias após a inoculação, estão representados por: ep, epinastia; m, mosaico; mb, mosaico bolhoso; ml, mosaico leve; ms, mosaico severo; –, ausência de sintomas.

representante do grupo PVY^N, infectou Bastidon, Yolo Wonder e Yolo Y, o que o caracteriza como patótipo 1 (Quadro 7). A mesma classificação pode ser aplicada aos isolados 1, 10 e 18, provenientes de *Capsicum*.

Os isolados 2, 3 20 e 23 infectaram Bastidon, Yolo Wonder, Yolo Y e Florida VR2 (Quadro 6), o que os classifica como patótipo 1.2 (Quadro 7). Não foi encontrado nenhum representante do patótipo 0 entre os isolados em estudo.

As cultivares W4, Criollo de Morellos 334 e Perennial foram resistentes a todos os isolados inoculados (Quadro 6).

Quadro 7 - Classificação dos isolados de potyvírus provenientes de *Capsicum* em patótipos, com base nas reações observadas nas cultivares diferenciadoras

Isolados	Cultivares				Patótipo
	Bastidon	Yolo Wonder	Yolo Y	Florida VR2	
1	+	+	+	-	1
2	+	+	+	+	1.2
3	+	+	+	+	1.2
5	+	+	+	-	1
6	-	-	-	-	-
10	+	+	+	-	1
18	+	+	+	-	1
20	+	+	+	+	1.2
23	+	+	+	+	1.2

4.3. Produção de anti-soros

4.3.1. Purificação dos isolados 1 e 3

O procedimento adotado para purificação possibilitou a obtenção de vírus purificado em rendimento satisfatório e alto grau de pureza. O espectro de absorção do vírus purificado mostrou-se típico de potyvírus, com absorção mínima em 223 e máxima em 264 nm. O rendimento obtido foi de 2,6 mg de vírus/kg de folhas para o isolado 3, e 4,1 mg/kg para o isolado 1.

4.3.2. Especificidade e título dos anti-soros

O título e a especificidade dos anti-soros foram avaliados por ELISA direto e indireto. Em ELISA direto, reações positivas foram obtidas com uma diluição 1:1.000 do anti-soro bruto ou do IgG purificado. Os valores de absorbância e a diferença entre as reações positiva e negativa foram

significativamente maiores ao se utilizar o IgG purificado em comparação ao anti-soro bruto para a cobertura das placas (Figura 2). Reações positivas foram obtidas em ELISA indireto com uma diluição do anti-soro bruto acima de 1:32.000. Em ambos os testes, nenhuma reação contra extrato de plantas sadias foi detectada. Também não houve reação positiva contra vírus heterólogos como PRSV-W, WMV e ZYMV. Reações positivas também foram observadas contra isolados distintos, mas não contra todos os isolados testados (Quadro 8). Os anti-soros produzidos a partir dos isolados 1 e 3 não reagiram contra o isolado 6 (PVY^O, de batata), mas reagiram contra o isolado 5 (PVY^N, também de batata) (Quadro 8).

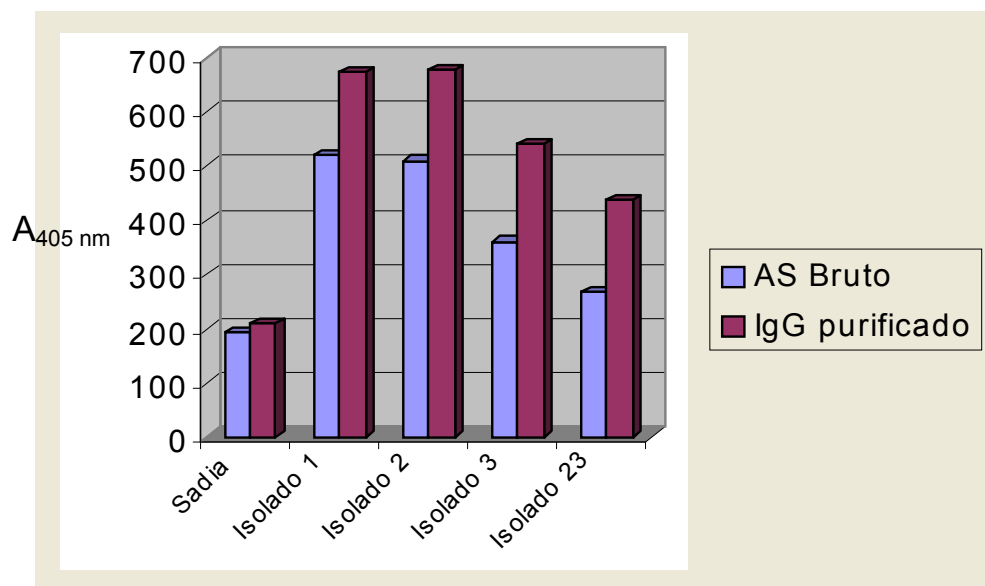


Figura 2 - Valores médios de absorbância obtidos em ELISA direto, utilizando anti-soro bruto e IgG purificado para o isolado 1.

Quadro 8 - Valores médios de absorbância obtidos em ELISA indireto utilizando anti-soro produzido a partir dos isolados 1 e 3

$A_{450\text{ nm}}$	ISOLADOS									
	Sadia	1	2	3	5	6	10	18	20	23
AS - 1	0.178	1.071	1.045	0.745	0.801	0.234	0.924	0.415	0.596	0.578
AS - 3	0.209	0.819	0.602	0.861	0.912	0.230	0.863	0.553	0.661	0.440

4.4. Caracterização molecular

Os RNAs virais extraídos a partir de preparações concentradas foram separados em gel de agarose na forma de uma banda única com aproximadamente 10.000 nucleotídeos (nt). Os oligonucleotídeos utilizados na reação de RT-PCR levaram à amplificação de um fragmento com aproximadamente 2.000 nt (Figura 3).

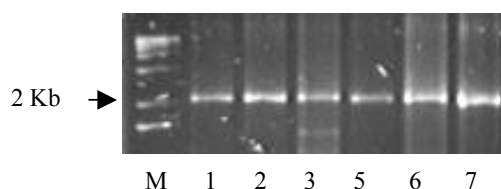


Figura 3 - Amplificação de fragmentos do genoma viral via PCR com oligonucleotídeos universais para potyvírus, a partir de plantas inoculadas via extrato vegetal tamponado com os isolados 1, 2, 3, 5, 6 e 7.

4.4.1. Análise filogenética

A variabilidade em nível molecular de alguns dos isolados foi inicialmente determinada pela comparação da sequência de nucleotídeos dos genes da replicase (*nib*) e da proteína capsidial (*cp*) com sequências depositadas no GenBank (Quadro 9).

Para análise filogenética realizou-se o sequenciamento dos genes *nib* e *cp* dos isolados 1, 3 e 4, e o sequenciamento do gene *nib* dos isolados 2, 7 e 21. Os resultados mostraram uma homologia das sequências de aminoácidos da CP dos isolados 1, 3 e 4 em torno de 84% com PVY, e acima de 95% com PepYMV. Esse resultado identifica os isolados 1, 3, e 4 como pertencentes à espécie *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). Para os isolados 2, 7 e 21 os resultados mostraram uma homologia das sequências de aminoácidos da Nib acima de 98% com os isolados 1, 3 e 4, o que também permite inferir que estes isolados pertencem à espécie PepYMV. Não foi possível comparar a sequência do gene *nib* destes isolados com a sequência do isolado original de PepYMV, pois ainda não existe sequência desse gene disponível no GenBank.

A árvore filogenética preparada com base nas sequências de aminoácidos da proteína capsidial confirmou a identidade dos isolados 1, 3 e 4 como PepYMV. Esses isolados se agruparam com o isolado original de PepYMV, formando um ramo distinto da árvore (Figura 4).

4.4.2. Análise da diversidade genética via PCR-RFLP

As enzimas de restrição utilizadas detectaram variabilidade dos isolados, confirmando os resultados obtidos no teste de gama de hospedeiros. De forma geral, a maioria das enzimas utilizadas possibilitou a separação dos isolados em dois grupos: o isolado 6 (PVY^O, de batata) formando um agrupamento, e o isolado 5 (PVY^N, também de batata) agrupado com os demais isolados de *Capsicum*. Foram obtidos oito padrões de restrição para as enzimas *Rsa* I e *Dde* I, sete padrões para a enzima *Taq* I, seis para *Hinf* I, quatro para *EcoR* V e dois para as enzimas *Cla* I e *Dra* I. O resultado da PCR-RFLP obtida com a *Hinf* I está ilustrado na Figura 5.

Quadro 9 - Sequências de potyvírus utilizadas na análise filogenética

Espécie/estirpe*	Número de acesso no GenBank	Hospedeiro
BCMV-NL1	S66251	feijoeiro
BYMV	S77515	feijoeiro
CABMV-BR	AF241233	amendoim
ChVBMV	U72193	pimenta
LMV-AF199	AJ278854	alface
PepMoV-Nt	M11598	fumo
PepMoV-Le	AF440801	tomateiro
PepMoV-KP12	AB084485	pimentão
PepMoV-KP3	AB084486	pimentão
PepMoV-KP5	AB084487	pimentão
PepMoV-CA	M96425	pimentão
PepMoV-NC165	AF227728	pimentão
PepVBV	AJ237843	pimentão
PepYMV	AF348610	pimentão
PSMV	X66027	pimentão
PVA	Z21670	batata
PVV	AJ243766	batata
PVY ^O -BR	AF255659	batata
PVY ^N -BR	AF225660	batata
PVY ^O -Chile	X68226	fumo
PVY ^N -Chile	X68221	fumo
PVY-NTN	X79305	batata
PVY-Si15	AJ303093	pimentão
PVY-K16.94	AJ303094	pimentão
PVY-Tu12.3	AJ303095	pimentão
PVY-PN82	AJ303096	pimentão
PVY-P2182	AJ303097	pimentão
PVY-VN	U06789	fumo
PVY ^N -27-92	U09508	batata
SPFMV	D16664	batata-doce

*BCMV, *Bean common mosaic virus*; BYMV, *Bean yellow mosaic virus*; CABMV, *Cowpea aphid-borne mosaic virus*; ChVBMV, *Chili vein banding mottle virus*; LMV, *Lettuce mosaic virus*; PepMoV, *Pepper mottle virus*; PepVBV, *Pepper vein banding virus*; PepYMV, *Pepper yellow mosaic virus*; PSMV, *Pepper severe mosaic virus*; PVA, *Potato virus A*; PVV, *Potato virus V*; PVY, *Potato virus Y*; SPFMV, *Sweet potato feathery mottle virus*.

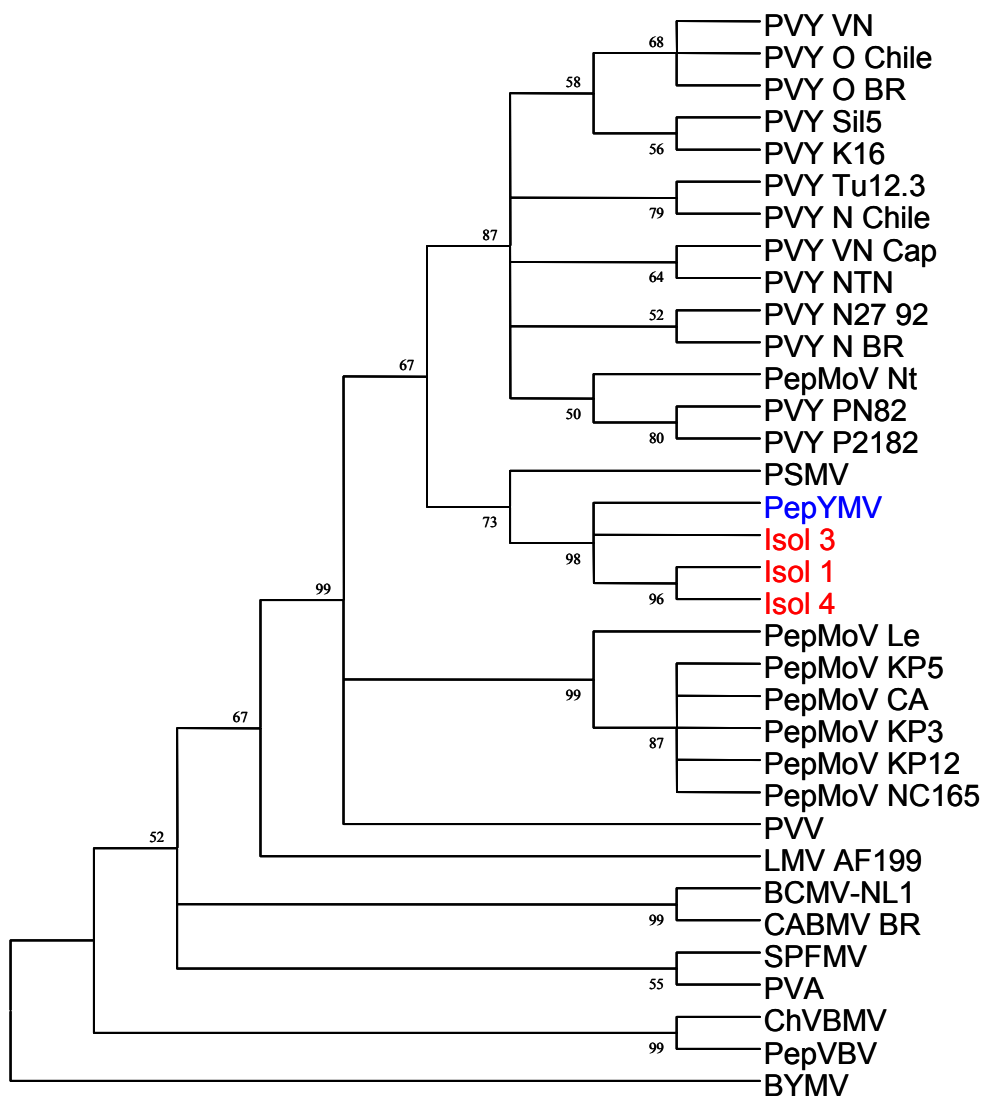


Figura 4 - Árvore filogenética preparada com base nas seqüências de aminoácidos da proteína capsidial de espécies de potyvírus, e dos isolados virais 1, 3 e 4 provenientes de *Capsicum*.

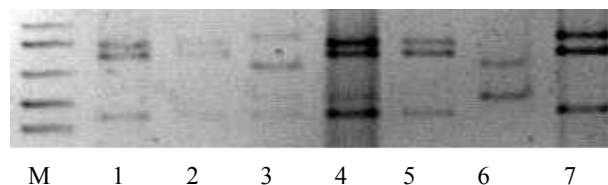


Figura 5 - Padrões de fragmentos de DNA obtidos após PCR-RFLP, utilizando a enzima *Hinf* I. Os números se referem aos diferentes isolados virais. M, marcador de peso molecular (“1 kb DNA ladder”).

A distância genética entre os isolados foi calculada com base nos dados gerados pela matriz binária e, a partir da distância genética, foram construídos gráficos de dispersão genética. No gráfico de dispersão produzido com base nos dados das enzimas *Taq* I, *Dde* I, *Eco* RV e *Hinf* I (Figura 6), pode-se destacar um subgrupo, formado pelo isolado 23, que se distancia dos demais apesar de estar no mesmo quadrante dos demais isolados. Os isolados restantes estão distribuídos em dois agrupamentos bem definidos, o primeiro reunindo todos os isolados de *Capsicum* e o isolado 5, e o segundo formado apenas pelo isolado 6. O isolado 23 pode ser considerado como um subgrupo dentro do grupo necrótico.

No gráfico de dispersão (Figura 7) gerado com as informações produzidas pelas enzimas *Cla* I e *Dra* I é possível distinguir três grupos distintos, o primeiro formado pela grande maioria dos isolados de *Capsicum* e o isolado 5, o segundo formado pelo isolado 16, intermediário entre os isolados do grupo necrótico, e o terceiro formado pelo isolado 6.

A enzima *Rsa* I possibilitou a formação de quatro grupos distintos (Figura 8), o primeiro formado pelo isolado 6, o segundo formado pelos isolado 1 e 2, o terceiro formado pelo isolado 23, e ainda outro formado pelos isolados 3, 4, 5, 7, 9, 20 e 22. Esta enzima também permitiu a separação entre os isolados necróticos e a estirpe comum da batata (isolado 6), mas separou os isolados do grupo necrótico em três subgrupos.

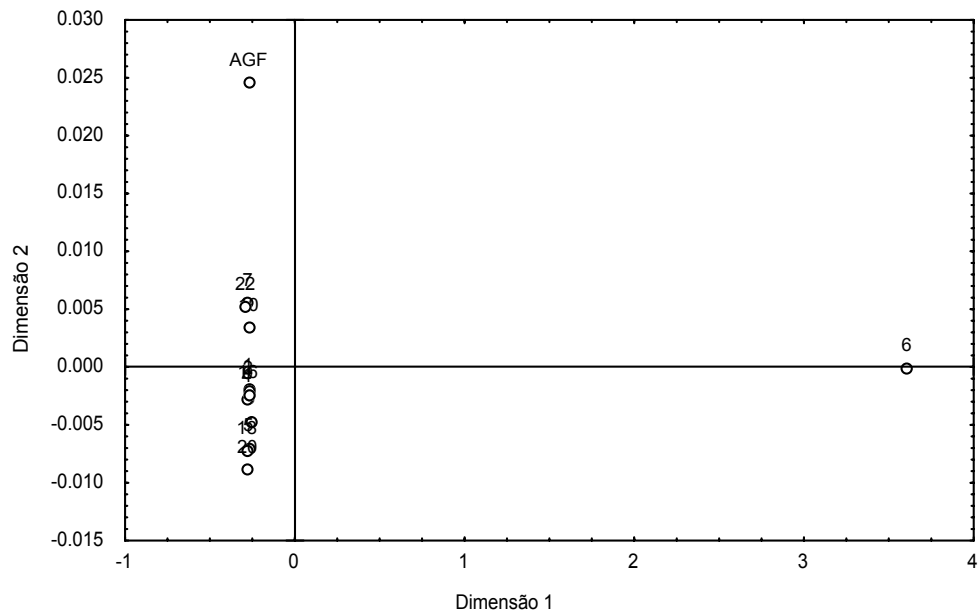


Figura 6 - Gráfico de dispersão genética preparado com base nos resultados de PCR-RFLP gerados pelas enzimas *Taq* I, *Dde* I, *Eco* R V e *Hinf* I.

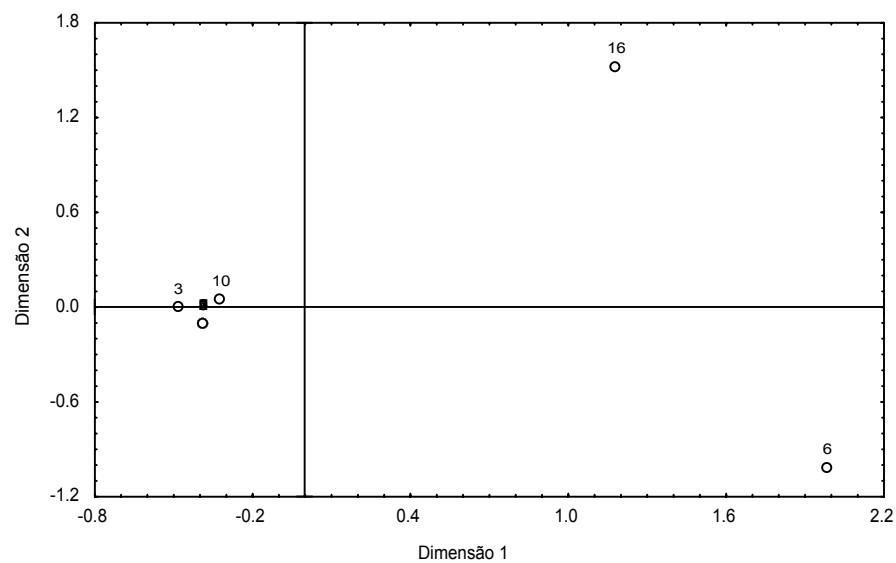


Figura 7 - Gráfico de dispersão genética preparado com base nos resultados de PCR-RFLP gerados pelas enzimas *Dra* I e *Cla* I.

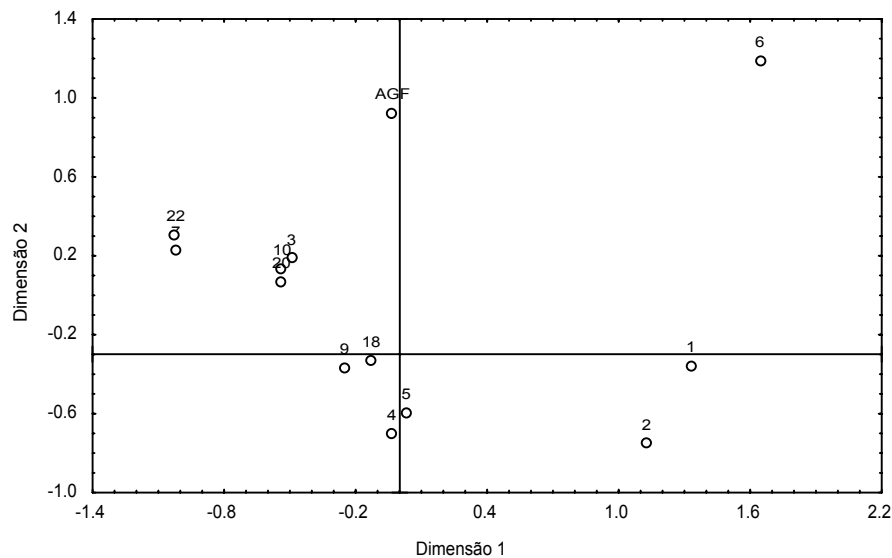


Figura 8 - Gráfico de dispersão genética preparado com base nos resultados de PCR-RFLP gerados pela utilização da enzima *Rsa* I.

4.5. Avaliação de acessos de *Capsicum* quanto à resistência a potyvírus

Os diversos acessos de *Capsicum* testados mostraram comportamento diferenciado quanto aos isolados virais (Quadro 10). Os sintomas observados variaram de mosqueado leve, quando os acessos foram inoculados com o isolado 10, até mosaico severo, com necrose e forte redução no crescimento de alguns acessos, quando inoculados com o isolado 3. De forma geral, os sintomas induzidos pelo isolado 1 mostraram uma severidade intermediária entre os sintomas severos induzidos pelo isolado 3 e os sintomas atenuados induzidos pelo isolado 10.

Os acessos MG 350, BGH 1040 e BGH 1612 mostraram-se promissores (Quadro 10). Em um primeiro teste, apenas 3 entre 9 plantas inoculadas desenvolveram sintomas leves. As plantas assintomáticas foram testadas por ELISA indireto para confirmar a ausência de infecção, mas apresentaram reação positiva, indicando que apresentavam infecção latente, mostrando um grau de

Quadro 10 - Reação de acessos de *Capsicum* pertencentes aos bancos de germoplasma da EPAMIG e da UFV à inoculação com os isolados 1, 3 e 10

Acesso	Sintomas a 30 dpi		
	Isolado 3	Isolado 1	Isolado 10
MG 324	pn, cn 9/9	pn, cn 9/9	mq 9/9
BGH 4356	m 9/9	m 9/9	cn 9/9
MG 157	ms, n 9/9	ms, n 9/9	m 9/9
MG 72	m 9/9	m 9/9	mq 9/9
MG 83	ml 9/9	ml 8/9	mq 9/9
MG 350	m 3/9	mq 3/9	ep 2/9
MG 151	ms, n 9/9	ms, n 9/9	ml 9/9
BGH 1607	ml 9/9	m, n 9/9	mq 9/9
MG 328	ms 9/9	m 9/9	mq 9/9
MG 21	m, cn 9/9	m 9/9	mq 9/9
MG 327	m, cn 9/9	ml 9/9	mp 9/9
MG 85	ms, ep 9/9	ml 9/9	mq, ep 9/9
MG 349	ms, rc 9/9	m 9/9	mq 9/9
MG 330	ms, rc 9/9	ml v	-
MG 325	ms 9/9	m 9/9	-
MG 1040	ml 3/9	ml 3/9	mq 3/9
BGH 1820	ml 9/9	m 9/9	mq 9/9
MG 4174	ml 8/9	ml 9/9	mq 9/9
MG 1612	m 3/9	ml 3/9	mq 3/9
BGH 68	ms, rc 9/9	ms, rc 9/9	m 9/9
MG 331	ms 9/9	m 9/9	ml 9/9
BGH 460	m 9/9	ml 9/9	mq 8/9
MG 171	ms 9/9	m 9/9	mq 8/9
MG 102	ms 9/9	ml 9/9	mn 9/9
BGH 1614	ms, rc 9/9	m 9/9	ml, ep 9/9
MG 221	ms 9/9	m 9/9	ml 9/9
MG 325	ms 9/9	ms 9/9	m 9/9
MG 206	m 9/9	m 9/9	mq 9/9
M. Agrocere	m 9/9	m 9/9	mq 9/9
Topseed	mb 9/9	m 9/9	m 9/9

Os sintomas em folhas não inoculadas, 30 dias após a inoculação, estão representados por: cn, clorose de nervuras; ep, epinastia; m, mosaico; mb, mosaico bolhoso; ml, mosaico leve; mq, mosqueado; ms, mosaico severo; pn, pontuações necróticas; rc, redução de crescimento; - não inoculado; _/_ número de plantas inoculadas/ número de plantas apresentando sintomas.

tolerância à infecção. Plantas do acesso MG 350 foram mantidas em casa-de-vegetação até a produção de frutos. As sementes foram coletadas e as plantas provenientes destas sementes novamente testadas contra os isolados 1 e 3. Entre as 20 plantas testadas, apenas 3 permaneceram assintomáticas. Serão necessários estudos mais detalhados para determinar a base genética dessa resistência ou tolerância. A continuidade dos testes com os bancos de germoplasma deve ocorrer, pois a possibilidade de identificação de novas fontes de resistência deve ser verificada.

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização biológica de isolados de potyvírus provenientes de *Capsicum*

Isolados de potyvírus provenientes de pimenta e pimentão foram caracterizados biologicamente, especialmente em comparação com isolados de PVY provenientes de batata. No teste de gama de hospedeiros, pimentão e batata não se comportaram como hospedeiros diferenciais, uma vez que isolados de batata infectaram pimentão, e vice-versa. O comportamento dos isolados testados foi heterogêneo. Três dos isolados analisados foram capazes de infectar sistemicamente batata. Destes, os isolados 9 e 16 causaram infecção latente, porém o isolado 2 induziu sintomas de mosaico. Esse resultado contradiz GEBRE-SELASSIE et al. (1985), que afirmam que isolados de pimentão não infectam batata, e vice-versa.

Não foi observada correlação entre a severidade do isolado e o hospedeiro a partir do qual ele foi obtido. Entretanto, deve-se ressaltar que os isolados mais severos (3, 7 e 20) foram obtidos de pimentão. O isolado 1, obtido de pimenta, causa um mosaico severo em *C. frutescens* mas apenas mosaico em pimentão. Já o isolado 3 causou sintomas severos nos dois hospedeiros. Todos os isolados que causaram pontuações necróticas seguidas de necrose sistêmica em

N. physaloides provieram de pimentão. Já os que foram capazes de infectar batata tiveram origem tanto de pimentão quanto de pimenta.

O sintoma de pontuações necróticas nas folhas inoculadas de *N. physaloides* é a principal característica das estirpes de PVY do grupo N, de acordo com a classificação proposta por NAGAI (1968). No entanto, não existem referências quanto à necrose sistêmica causada por esse grupo de estirpes. Na coleção de isolados analisados foram encontrados alguns que induziram necrose sistêmica em *N. physaloides* (3, 7, 19, 20 e 22). Já o grupo W tem como característica principal a indução de risca amarela em tomateiro, sintoma que não foi induzido por nenhum dos isolados em estudo na cv. Rutgers.

A maioria dos isolados causou um sintoma nunca descrito na literatura como induzido por potyvírus, necrose branca nas folhas inoculadas de *N. debneyi* e tomateiro. Essa necrose localizada não impede a infecção sistêmica. O sintoma foi induzido por isolados provenientes tanto de pimenta quanto de pimentão, e tanto por isolados severos, moderados ou fracos. Os isolados 3, 4, 5, e 7 induziram necrose branca em *N. debneyi* e tomateiro, mas os isolados 1, 11, 12, 13 e 17 causaram este sintoma apenas em tomateiro.

A ausência de infecção em *D. stramonium* é uma característica comum a todas as estirpes de PVY, PeMV e PSMV. Outros potyvírus infectam esse hospedeiro, como TEV e PepMoV (BRUNT *et al.*, 1996)

Chenopodium quinoa é citada na literatura (DE BOX e HUTINGA, 1981; SHUKLA *et al.*, 1988) como uma planta indicadora de lesão local para PVY. Entretanto, apenas nove isolados (1, 2, 3, 4, 7, 14, 16, 20 e 22) induziram lesão local clorótica neste hospedeiro. Os demais isolados não induziram qualquer sintoma. Os isolados que causaram lesão local em *C. quinoa* são provenientes tanto de pimenta quanto de pimentão, e causam sintomas severos, moderados ou fracos, indicando que a agressividade do isolado não foi fator determinante para indução desse sintoma em *C. quinoa*. LE ROMANCER (1994) encontrou resultados semelhantes estudando isolados de batata denominados PVY^{NN}. Isolados dessa estirpe não infectaram *C. quinoa*, porém infectaram *C. annuum*.

Apesar de os resultados da gama de hospedeiros serem insuficientes para uma adequada classificação dos isolados, estes podem constituir-se em um componente essencial da classificação, pois diferenças biológicas como severidade e indução de necrose, dentre outras, são informações relevantes na distinção de grupos de isolados. Por exemplo, os isolados 1 e 3, ambos pertencentes à nova espécie de potyvírus recentemente descrita em pimentão (PepYMV) (INOUE-NAGATA et al., 2002), apresentam diferenças biológicas significativas. O isolado 1 é proveniente de pimenta e induziu sintomas mais severos nessa hospedeira do que em pimentão. Esse isolado induziu a formação de anéis necróticos nas folhas inoculadas de *N. physaloides*, mas não induziu necrose sistêmica nessa indicadora, e causou necrose branca apenas em tomateiro. O isolado 3 é proveniente de pimentão, e induziu sintomas severos tanto em pimentão quanto em pimenta. Esse isolado causou anéis necróticos nas folhas inoculadas de *N. physaloides* que evoluíram para necrose sistêmica, e causou necrose branca em *N. debneyi* e em tomateiro.

A resposta de cultivares diferenciadoras de pimentão à inoculação com os diferentes isolados permitiu classificá-los nos patótipos 1 e 1.2. Nenhum isolado foi classificado como patótipo 0. As cultivares brasileiras Avelar, Casca Dura, Ikeda e Moura pertencem ao grupo da cultivar Yolo Y, que possui o gene de resistência *pvr2*¹, portanto resistentes ao patótipo 0 (GEBRE-SELASSIE et al., 1985). Esse é provavelmente o motivo pelo qual esse patótipo não foi detectado, uma vez que a maioria das cultivares utilizadas no Brasil atualmente possui uma ou mais destas cultivares como progenitores (NAGAI, 1983). Na França, Itália e Espanha o patótipo mais encontrado é o 0 (CARANTA et al., 1999). Nenhum dos isolados em estudo foi capaz de infectar a cv. Perennial. Essa cultivar possui uma resistência complexa, não desenvolvendo nenhum sintoma após a inoculação com quaisquer dos três patótipos de PVY, ou com outros potyvírus que infectam pimentão, como TEV, PVMV e CVMV. Resultados de mapeamento genético indicam que a resistência de 'Perennial' a potyvírus é resultante de efeitos parciais e complementares de vários genes (CARANTA e PALLOIX, 1996).

Os isolados 2, 3, 20 e 23, pertencentes ao patótipo 1.2, são provenientes de pimentão. Isolados pertencentes ao patótipo 1.2 já foram relatados no Caribe e na Turquia (DOGIMONT et al., 1996). Segundo GEBRE-SELASSIE et al. (1985), isolados pertencentes ao patótipo 1.2 causam necrose na cv. Bastidon. Entretanto, nenhum isolado causou esse sintoma nessa cultivar. Os isolados de PVY provenientes de pimentão utilizados por GEBRE-SELASSIE et al. (1985) não infectavam batata e causavam lesões locais em *C. amaranticolor*. O isolado 2, pertencente ao patótipo 1.2, é capaz de causar mosaico em batata. Esses resultados sugerem que mesmo entre isolados classificados como pertencentes ao mesmo patótipo existem diferenças biológicas.

No Brasil, trabalhos desenvolvidos por BOITEUX et al. (1996), classificaram um isolado severo de PVY proveniente de *Capsicum*, denominado PVY^m, como patótipo 1.2. Esse isolado foi recentemente reclassificado como uma nova espécie de potyvírus (PepYMV) (INOUE-NAGATA et al., 2002). A classificação em patótipos foi possível mesmo para os isolados agora reclassificados como PepYMV (1, 2, 3, 4, 7 e 21), indicando que os genes de resistência presentes nas cultivares diferenciadoras são eficientes contra essa espécie de potyvírus.

Comparações biológicas e sorológicas entre isolados de PVY de batata e um isolado de pimentão realizadas por D'AQUINO et al. (1995) sugerem que o isolado de pimentão pertence a uma estirpe distinta, pois possui propriedades biológicas que o distingue das demais estirpes de PVY. O isolado proveniente de pimentão utilizado por estes autores não causou sintoma em *C. quinoa*, batata ou *P. floridana*. A ausência de sintomas em *C. quinoa* já foi observada para isolados dos grupos PVY^N e PVY^C. Isolados do grupo PVY^O geralmente causam sintomas nessa diferenciadora. Os autores sugerem que as diferenças biológicas encontradas entre isolados de batata e pimentão indicam uma especialização dentro da espécie viral. É possível que a caracterização molecular dos isolados estudados por esses autores também identifique o isolado de pimentão como uma espécie distinta de potyvírus, semelhante ao observado no Brasil por INOUE-NAGATA et al. (2002).

Um dos fatores que podem explicar a diversidade genética de isolados de PVY é a provável evolução de patótipos influenciada pelo plantio de cultivares resistentes. A prevalência de um determinado patótipo em uma região deve interferir nessa estratégia de controle, pois certas práticas podem acelerar ou facilitar a evolução dos patótipos (GEBRE-SELASSIE et al., 1985). Esses autores sugerem que isolados de PVY infectando pimentão a partir de 1972 são provenientes de contaminações com isolados de batata. A especificidade do hospedeiro é um importante critério para a diferenciação em estirpes, consistindo em um fator importante para a evolução do PVY (ROMERO et al., 2001).

Uma característica peculiar para genes controlando a resistência a potyvírus em diferentes espécies de plantas é que, em espécies infectadas por mais de um potyvírus como pimentão e tomateiro, o mesmo *locus* confere resistência às diferentes espécies. Diversos genes de resistência que mostram resposta a potyvírus tem sido identificados em pimentão (PALLOIX e KYLE, 1995). Entre estes, dois são particularmente interessantes devido a seu amplo espectro de ação. O alelo *pvr2*² (presente na cv. Florida VR2) confere resistência aos patótipos 0 e 1 de PVY e a TEV. O gene recessivo *pvr6* (presente na cv. Perennial) confere resistência completa a potyvírus como PVMV, PepMoV e CVMV (CARANTA et al., 1997; COOK e ANDERSON, 1959; DOGIMONT et al., 1997). O fato da série diferenciadora aos isolados de PVY ter servido também para diferenciar PepYMV reforça o amplo espectro da resistência proporcionada pelos genes existentes nessas cultivares.

Diversos potyvírus são transmitidos via sementes de plantas infectadas. Diante da possibilidade da existência de novos potyvírus infectando *Capsicum*, ou de mudanças significativas nas estirpes já existentes no campo que permitissem sua disseminação pela semente, todos os isolados em estudo foram avaliados quanto à transmissão via semente. Nenhum dos isolados testados foi transmitido dessa forma. Entretanto, diante do surgimento de uma nova espécie viral entre os isolados avaliados (PepYMV), um maior número de sementes deve ser avaliado visando detectar a possibilidade de transmissão via semente em baixa percentagem. O PepMoV, estreitamente relacionado ao PVY, é transmitido

via semente, com uma taxa de transmissão variando de 0,3 a 20 %, no entanto a severidade da estirpe viral pode afetar a taxa de transmissão, onde estirpes mais severas são transmitidas numa taxa de 0,001% (SHUKLA et al., 1994).

5.2. Caracterização molecular

Existem diversos argumentos questionando o uso de um único critério para classificação de estirpes de potyvírus. Um bom exemplo é o trabalho de ROMERO et al. (2001), que utilizando PCR-RFLP para a proteína capsial separou isolados pertencentes ao mesmo patótipo em vários grupos distintos, e ao mesmo tempo agrupou isolados pertencentes a patótipos diferentes. Considerando-se que a proteína capsial não é um determinante de patogenicidade para potyvírus, não é surpreendente a ausência de correlação entre a classificação em patótipos e a classificação com base na sequência de nucleotídeos desse gene (ROMERO et al., 2001).

Mesmo levando-se em consideração a observação acima, os dados moleculares apresentados neste trabalho ampliam as informações sobre a etiologia do mosaico do pimentão e ajudam a entender a complexidade de espécies e isolados de potyvírus infectando solanáceas.

Os isolados 1, 2, 3, 4, 7 e 21 foram identificados como PepYMV com base nas sequências de aminoácidos das proteínas Nib e CP. Esse resultado indica que essa nova espécie viral já se encontra disseminada no estado de Minas Gerais, e é responsável pela severidade dos sintomas e pelas perdas na produção observadas na cultura.

O PepYMV foi descrito recentemente (INOUE-NAGATA et al., 2002), mas foi possível detectar variabilidade entre isolados, conforme discutido anteriormente: o isolado 1 é biologicamente distinto do isolado 3. Também foi possível distinguir o isolado 1 do isolado 3 por meio de PCR-RFLP utilizando as enzimas *Rsa* I e *Hinf* I. A análise filogenética sugere que o PepYMV evoluiu a partir de isolados de PVY^N, aos quais está mais relacionado em comparação ao

PVY^O. Semelhante ao PepMoV, o PepYMV também pode fazer parte de um complexo viral que causa mosaico em espécies de *Capsicum*. Situação semelhante foi descrita por BERGER et al. (1997), que ao estudar as características moleculares dos serogrupos A e B do potyvírus *Bean common mosaic virus* (BCMV) considerou-os como vírus distintos, porém componentes de um complexo viral.

Segundo BLANCO-URGOITI et al. (1998), isolados classificados como diferentes patótipos podem pertencer à mesma estirpe genética. Essa afirmação resulta da visão de que o conceito de patótipo é diferente do conceito de estirpe, que sempre se refere a características genéticas de uma região particular do genoma viral. Pode não haver um padrão claro de correlação entre patótipos e agrupamentos filogenéticos baseados na sequência de aminoácidos da proteína capsidial, pois o fator responsável pela quebra de resistência pode não ser a CP. De fato, na maioria dos casos estudados até o presente para potyvírus, o fator de virulência não é a CP (BERGER et al., 1993). Esses autores ressaltam que potyvírus que infectam hortaliças são diversos e heterogêneos quanto às suas propriedades biológicas, mas estreitamente relacionados quando se considera a sequência da CP. Dessa forma os agrupamentos moleculares baseados nessa proteína podem não refletir a heterogeneidade biológica do vírus. Ressaltam ainda que pode existir um contínuo de sequências, o que reforça o conceito de *quasiespécie*.

Isolados de uma determinada espécie viral que apresentam comportamento atípico são fortes candidatos a terem sido originados a partir de recombinação. Entretanto, a identificação dos progenitores é difícil e frequentemente impossível (REVERS et al., 1995). Estes autores encontraram quatro isolados recombinantes de PVY em uma coleção de 22 isolados. Anteriormente, apenas um único isolado recombinante de potyvírus, PPV-06, havia sido detectado (Cervera et al., 1993, citados por REVERS et al., 1995). A proporção de recombinantes encontrada por REVERS et al. (1995) foi alta (18%), indicando que eventos de recombinação têm um papel importante na evolução viral. Uma consequência em potencial da recombinação é o surgimento

de isolados virais possuindo novas propriedades biológicas, como especificidade por hospedeiros ou virulência em certas cultivares. Os resultados da análise filogenética não permitem concluir a respeito de uma possível origem recombinante para o PepYMV. Deve-se ressaltar, entretanto, que foram obtidas apenas sequências parciais da extremidade 3' do genoma viral, impedindo a detecção de eventos de recombinação que tenham ocorrido em outras regiões do genoma viral. Dessa forma, a possibilidade de uma origem recombinante para o PepYMV não pode ser descartada.

A distância genética estimada para isolados de potyvírus de pimentão e pimenta baseada em PCR-RFLP utilizando sete enzimas de restrição indicou que estes formam uma única estirpe genética dentro de dois patótipos. Os quatorze isolados de potyvírus analisados neste estudo foram distribuídos em uma gama relativamente estreita de diversidade. Essa situação é diferente daquela encontrada para os isolados de batata, que mostram um alto grau de diversidade (ROMERO et al., 2001).

Os resultados do PCR-RFLP agrupam a maioria dos isolados com o PVY^N, ou seja, dentro da mesma estirpe genética, embora mostrando um grau de variabilidade que permite formar diferentes patótipos, e os distingue claramente do PVY^O. Essa análise não separou os isolados identificados como PepYMV do isolado 5 (PVY^N, de batata). Os resultados obtidos neste trabalho contradizem os resultados encontrados por BLANCO-URGOITI et al. (1996), que utilizou isolados necróticos e comuns de batata provenientes de vários países da Europa e Austrália e um isolado de pimentão proveniente da Austrália, e por ROMERO et al. (2001), que utilizou vários isolados de pimentão, um isolado de batata e um de tomateiro, todos obtidos na Europa. Estes dois trabalhos indicaram que os isolados de pimentão se agrupam distante dos isolados de batata, formando uma estirpe genética distinta. Já BLANCO-URGOITI et al. (1998), analisando a diversidade genética de PVY^C, incluindo isolados de pimentão, fumo e *D. stramonium*, relataram que os isolados não originados de batata formavam um subgrupo dentro do grupo PVY^C. Os autores afirmam que alguns isolados do PVY^C são capazes de infectar pimentão, fato também confirmado por FERERES

et al. (1993), e sugerem que isto pode ser consequência da coevolução entre o vírus e o hospedeiro, reforçando a visão de que o conceito de patótipo é diferente do conceito de estirpe.

É possível até certo ponto estabelecer uma correlação entre os resultados de PCR-RFLP e da gama de hospedeiros. Os isolados 3, 7, 20 e 22 apresentaram o mesmo padrão com a enzima *Rsa* I, refletindo suas propriedades biológicas, pois todos foram classificados como severos. A enzima *Rsa* I também diferenciou os isolados 1 e 3, que pertencem a patótipos distintos. As enzimas *Dra* I e *Cla* I foram capazes de diferenciar o isolado 16 (que causou infecção latente em batata) do restante dos isolados de *Capsicum*, porém não diferenciou os outros dois isolados que também infectaram batata (2 e 9).

Apesar de a maioria dos isolados de *Capsicum* ter sido agrupada com isolados necróticos de PVY, amostragens adicionais devem ser feitas em outras regiões produtoras de *Capsicum*, para verificar a presença de isolados do grupo comum ou ainda de isolados que formem grupos distintos, como o isolado 23. Apesar da existência de isolados como 23, que se mostrou bastante severo e filogeneticamente distinto dos demais isolados de PVY, as estratégias de manejo devem ser dirigidas para o grupo necrótico, que foi o mais representativo nessa amostragem. Ressalte-se novamente que a análise de PCR-RFLP não foi capaz de separar o PepYMV do PVY^N de batata, o que pode ser explicado pela menor “resolução” desse tipo de análise em relação à análise filogenética baseada no sequenciamento. É possível que outras enzimas de restrição sejam capazes de separar essas duas espécies, caso seus sítios de reconhecimento estejam presentes em apenas uma delas.

Apesar de suas limitações, o PCR-RFLP pode ajudar a esclarecer a situação de estirpes ou grupos de isolados para os quais não há disponibilidade de seqüências. Esse método pode substituir parcialmente o sequenciamento de nucleotídeos nos casos em que este seja inviável.

5.3. Análise sorológica dos isolados

O método de purificação adotado apresentou resultados satisfatórios em termos de rendimento, pureza viral e especificidade da reação sorológica. A espécie utilizada para multiplicação dos isolados, *Nicotiana debneyi*, mostrou-se adequada para a purificação. A boa qualidade dos anti-soros policlonais produzidos pode ser atestada pela ausência de reação com extrato de planta sadia, ou com outros potyvírus como o ZYMV, WMV e PRSV. Este resultado sugere que o método utilizado permitiu a preservação dos terminais carboxílico e amínico do vírus purificado, permitindo assim a preservação de epítopos vírus-específicos (SHUKLA et al., 1994).

Os anti-soros policlonais produzidos contra os isolados 1 e 3 foram capazes de identificar estirpes de PVY, não reagindo com PVY^O, mas reagindo com PVY^N, no ELISA indireto. Os isolados 1 e 3 foram identificados como PepYMV, e o fato dos anti-soros produzidos contra esses isolados detectarem praticamente todos os isolados da coleção reflete o estreito relacionamento sorológico entre o PepYMV e o PVY^N. Os patótipos 0 e 1 de PVY são sorologicamente idênticos (ARROYO et al., 1996), porém não existiam até o presente referências sobre o relacionamento sorológico entre o patótipo 1.2 e os demais. Os resultados deste trabalho demonstram que os patótipos 1 e 1.2 são sorologicamente relacionados, pois o anti-soro produzido contra o isolado 1 mostrou reação positiva contra o isolado 3, e vice-versa, apesar de apresentarem uma pequena diferença nos valores de absorbância.

Alguns valores de absorbância foram significativamente menores para alguns isolados em relação ao isolado homólogo, indicando variabilidade sorológica entre os isolados. Deve-se ressaltar que o isolado 23 foi detectado pelos anti-soros produzidos contra os isolados 1 e 3, mas sempre apresentando valores de absorbância significativamente inferiores em relação aos demais isolados, sugerindo um relacionamento sorológico distante entre esse isolado e os demais.

O relacionamento sorológico entre potyvírus é extremamente complexo e por vezes inconsistente. A frequência de reações cruzadas ao se utilizarem anti-soros policlonais, a observação de relacionamento sorológico entre vírus distintos e a ausência de reações cruzadas entre algumas estirpes são os principais problemas associados ao uso da sorologia na taxonomia dos potyvírus (ELLIS et al., 1997). No entanto, as técnicas sorológicas ainda permanecem como as mais populares entre os vários métodos usados para identificação e classificação de vírus, devido à sua simplicidade, reprodutibilidade, eficiência e baixo custo. O ELISA pode ser utilizado para a diferenciação de estirpes virais, com base na intensidade da reação contra um anti-soro específico para um determinado vírus (ELLIS et al., 1996).

5.4. Avaliação de acessos de *Capsicum* dos Bancos de Germoplasma da UFV e EPAMIG

Devido às perdas causadas por infecções por potyvírus e pelas dificuldades de controle dos afídeos vetores, a identificação e introgressão de genes de resistência têm sido a estratégia mais frequente de controle dessas viroses. O frequente surgimento de novas espécies de potyvírus faz com que a busca de novas fontes de resistência seja constante (CARANTA et al., 1999; NAGAI, 1983).

Um dos objetivos da pesquisa com espécies de *Capsicum* é o aumento da base genética e do conhecimento sobre os diferentes genótipos, visando ao desenvolvimento de cultivares de pimenta e pimentão com resistência múltipla a doenças e com boas características agronômicas. Atualmente o gene *Pvr4* é o único efetivo contra as várias espécies de potyvírus e contra todos os patótipos de PVY, tornando urgente a busca de novos genes e a construção de uma resistência de amplo espectro.

Os resultados desse trabalho indicam que a maioria dos 30 acessos de *Capsicum* avaliados é suscetível aos isolados utilizados. Porém, resultados promissores foram encontrados com os acessos MG 350 e BGH 1612, que se

mostraram assintomáticos, porém obtendo-se resultados positivos em ELISA para os anti-soros contra os isolados 1 e 3. Em 1989, MEISSNER e CUPERTINO avaliaram 41 introduções de *Capsicum* utilizando dois isolados de PVY, um proveniente de pimentão e outro de tomateiro. Os autores identificaram treze acessos resistentes e dois tolerantes. CUPERTINO et al. (1991), testando genótipos quanto à reação a cinco isolados de PVY, encontraram dois acessos resistentes. Deve-se salientar que estes trabalhos foram desenvolvidos há mais de dez anos, e que as estirpes encontradas talvez não se encontrem mais em campos de produção. BOITEUX e PESSOA (1994) testaram 40 acessos de *Capsicum* do banco de germoplasma da EMBRAPA Hortaliças contra o PVY^M, posteriormente reclassificado como PepYMV, e identificaram apenas três acessos resistentes: *C. annuum* Criollo de Morellos 334, *C. annuum* MYR-10 e *C. chinensis* PI 159236.

O presente trabalho constituiu apenas o início de uma avaliação dos bancos de germoplasma de *Capsicum* pertencente à UFV e a EPAMIG visando a identificação de fontes de resistência aos principais potyvírus presentes atualmente em campos de produção de pimentão e pimenta. Deve-se ressaltar que o número de acessos testados foi pequeno, sendo preciso continuar estas avaliações. Mesmo assim, ficou evidenciada a possibilidade de se detectar acessos tolerantes ou mesmo resistentes a PVY e PepYMV.

6. CONCLUSÕES

- Isolados de potyvírus provenientes de *Capsicum* apresentam grande variabilidade biológica;
- A maioria dos isolados estudados apresenta propriedades biológica e sorológicas que os aproxima do grupo PVY^N de batata;
- A diversidade biológica constatada entre os isolados estudados impede a classificação destes de acordo com NAGAI (1968); entretanto, os isolados podem ser classificados como patótipos 1 ou 1.2 utilizando-se as cultivares diferenciadoras propostas por Gebre-Selassie;
- Os isolados 1 e 3 são relacionados sorologicamente ao PVY^N, mas não ao PVY^O;
- A análise filogenética identificou os isolados 1, 2, 3, 4, 7 e 21 como PepYMV;
- O conjunto dos resultados obtidos sugere que todos os isolados pertencem a esta espécie, exceto o isolado 23.
- A maioria dos 30 acessos de *Capsicum* avaliados é suscetível aos isolados 1, 3 e 10, exceto os acessos MG 350 e BGH 1612, que apresentaram reação de tolerância.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARROYO, R., SOTO, M.J., MARTINEZ-ZAPATER, J.M., PONZ, F. Impaired cell-to-cell movement of Potato virus Y in pepper plants carrying the y^a ($pr2^1$) resistance gene. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.9, p.314-318, 1996.
- BERGER, P.H., WYATT, S.D., SHIEL, P.J., SILBERNAGEL, M.J., DRUFFEL, K., MINK, G.I. Phylogenetic analysis of the *Potyviridae* with emphasis on legume-infecting potyviruses. **Archives of Virology**, v.142, p.1979-1999, 1997.
- BLANCO-URGOITI, B., SÁNCHEZ, F., DOPAZO, J., PONZ, F. A strain-type clustering of potato virus Y based on the genetic distance between isolates calculated by RFLP analysis of the amplified coat protein gene. **Archives of Virology**, v.141, p.2425-2442, 1996.
- BLANCO-URGOITI, B., SANCHEZ, F., SAN ROMAN, C.P., DOPAZO, J., PONZ, F. Potato virus Y group C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strains. **Journal General of Virology**, v.79, p.2037-2042, 1998.
- BOITEUX, L.S., CUPERTINO, F.P., SILVA, C., DUSI, A.N, MONTENESHICH, D.C., van der VLUGT, R.A.A., FONSECA, M.E.N. Resistance to potato virus Y (pathotype 1-2) in *Capsicum annum* and *Capsicum chinensis* is controlled by two independent major genes. **Euphytica**, v. 87, p. 53-58, 1996.
- BOITEUX, L.S., CUPERTINO, F.P., SILVA. Inheritance of resistance to isolates of PVY^M in *Capsicum annum* 'Criollo de Morellos 334' and *C. chinensis* 'PI 159236'. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.297, 1994.

- BOITEUX, L.S., PESSOA, H.B.S.V. Additional sources of resistance to isolates of PVY^M in *Capsicum* germoplasm.. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.291, 1994.
- BRIOSO, P.S.T., PEREIRA, M.A., OLIVEIRA, D.E. "Potato virus Y" - Identificação de estirpe infectando naturalmente pimentão (*Capsicum annuum* L.) 'Margareth'. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.274, 1993.
- BRIOSO, P.S.T. Doenças causadas por vírus em pimentão. **Informe Agropecuário**, v. 8, p. 74- 80, 1996.
- BRIOSO, P.S.T., PEREIRA, M.A., OLIVEIRA, D.E. "Potato virus Y" - Identificação de estirpe infectando naturalmente pimentão (*Capsicum annuum* L.) e fonte de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 226-235, 1996.
- BRUNT, A.A., CRABTREE, K., DALLWITZ, M.J., GIBBS, A.J., WATSON, L., ZURCHER, E.J. (Eds.) (1996 onwards). **Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database**. Version: 20th August 1996.' URL: <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- BÜCHEN-OSMOND, C. Potato Y potyvirus in: **Plant Virus Online**, Descriptions and Lists from the VIDE database (<http://biology.anu.au/Groups/MES/vide/descr652.htm>), 1987.
- CARANTA, C., PALLOIX, A. Both common and specific genetic factors are involved in polygenic resistance of pepper to several potyviruses. **Theoretical Applied Genetics**, v. 92, p. 15-20, 1996.
- CARANTA, C., LEFEBVRE, V., PALLOIX, A. Polygenic resistance of pepper to potyvirus consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative loci. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 7, p. 872-878, 1997.
- CARANTA, C., THABUIS, A., PALLOIX, A. Development of a CAPS marker for the *Pvr4* locus: A tool for pyramiding potyvirus resistance genes in pepper. **Genomics**, v.42, p.1111-1116, 1999.
- CARRINGTON, J.C., FREED, D.D., OH, C.-S. Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. **EMBO Journal**, v. 9, p.1347-1353, 1990.
- CARRINGTON, J.C., KASSCHAU, K.D., MAHAJAN, S.K., SHAAD, M.C. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. **Plant Cell**, v.8, p.1669-1681, 1996.
- CARVALHO, M.G., SHEPHERD, R.J. Purificação vírus do mosaico amarelo da cebola (OYDV) e do "estriado" do alho (GYSV). **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, p. 626. 1983.

- CASALI, V.W.D., COUTO, F.A.A. Origem e botânica de *Capsicum*. **Informe Agropecuário**, v. 10, p. 19-20, 1984.
- CLARK, M.F., ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v. 34, p. 475-483, 1977.
- COOK, A.A. Genetics of resistance in *Capsicum annuum* to two virus diseases. **Phytopathology**, v.50, p. 364-367, 1960.
- COOK, A.A. Genetics of response in pepper to three strains of potato virus Y. **Phytopathology**, v. 53, p. 720-723, 1963.
- COOK A.A., ANDERSON, C.W. Inheritance of resistance to potato virus Y derived from two strains of *Capsicum annum*. **Phytopathology**, v.50, p.73-75, 1959.
- COSTA, A.S., ALVES, S. Mosaico do pimentão. **Bragantia**, v.10, p. 95-96, Campinas, 1950.
- CRAWFORD, K.M., ZAMBRYSKI, P.C. Plasmodesmata signaling: many roles, sophisticated statutes. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.382-387, 1999.
- CRONIN, S., VERCHOT, J., HALDEMAN-CAHILL, R., SCHAAD, M.C., CARRINGTON, J.C. Long-distance movement factor - A transport function of the potyvirus helper component-proteinase. **Plant Cell**, v. 7, p. 549-559, 1995.
- CUPERTINO, F.P., MEDEIROS, R.B., CARVALHO, C.G. Reação de *Capsicum* a isolados de PVY provenientes de pimentão e tomate. **Fitopatologia Brasileira**, v. 16, p.23, 1991a.
- CUPERTINO, F.P., DE SÁ, P., MEDEIROS, R.B., CARVALHO, C.G. Purificação e serologia de uma estirpe de PVY causadora de mosaico em pimentão (*Capsicum annum*) 'Magda'. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, p. 28, 1991b.
- D'AQUINO, L., DALMAY, T., BURGYAN, J., RAGOZZINO, A., SCALA, F. Host range and sequence analysis of an isolate of potato virus Y inducing veinal necrosis in pepper. **Plant Disease**, v.79, p. 1046-1050, 1995.
- DE BOKX, J.A., HUTTINGA, H. Potato virus Y. In: (Ed.) Descriptions of Plant Viruses n. 242. Kew, England, **CMI/AAB**, 1981.
- DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A.C. (Ed.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa-MG: Editora UFV, 1998, 574 p.

- DOGIMONT, C., PALLOIX, A., DAUBZE, A.M., MARCHOUX, G., GEBRE SELASSIE, K., POCHARD, E. Genetic analysis of broad spectrum resistance to potyvirus using doubled haploid lines of pepper (*Capsicum annum* L.). **Euphytica**, v. 88, p. 231-239, 1996.
- DOLJA, V.V., HALDEMAN-CAHILL, R., MONTGOMERY, A.E., VANDENBOSCH, K.A., CARRINGTON, J.C. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. **Virology**, v. 206, p.1007-1016, 1995.
- DOUGHERTY, W., CARRINGTON, J.C. Expression and function of potyviral gene products. **Annual Review Phytopathology**, v.26, p. 123-43, 1988.
- ELLIS, P., STACE-SMITH, R., BOWLER, G, MACKENZIE, D.J. Production of monoclonal antibodies for detection and identification of strains of potato virus Y. **Canadian Journal Plant Pathology**, v.18, p. 64-70, 1996.
- ELLIS, P., STACE-SMITH, R., De VILLIERS, G. Identification and geographic distribution of serotypes of potato virus Y. **Plant Disease**, v. 81, p. 481-484, 1997.
- FERERES, A, PÉREZ, P., GEMENO, C., PONZ, F. Transmission of Spanish pepper- and potato-PVY isolates by aphid (Homoptera: *Aphididae*) vectors: Epidemiological implications. **Ecosystem Ecology**, v. 22, p. 1260-1265, 1993.
- FIGUEIRA, A.R., PINTO, A.C. Estirpe necrótica do vírus Y da batata em sementes importadas está causando problemas ao bataticultor mineiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 128, 1995.
- FIGUEIRA, A.R., PINTO, A.C., MORAES, F.H.R. Alta incidência da nova estirpe necrótica do vírus Y da batata está ocorrendo em todos os estados produtores do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.537, 1996.
- FIGUEIRA, A.R., MORAES, F.H.R., SANTOS, R.C. Caracterização da nova estirpe necrótica do vírus Y da batata. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 622. 1997.
- FONTES, M.A. **Morfogênese *in vitro*, isolamento e cultivo de protoplastos e transformação genética de pimentão (*Capsicum* sp.)**. Tese de Mestrado, 167p., Viçosa, UFV, 1998.
- GEBRE SELASSIE K., MARCHOUX, G. DELECOLLE, B., POCHARD, E. Variabilité des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France. Characterization et classification en pathotypes. **Agronomie**, v. 5, p. 621-630, 1985.
- GILBERTSON, R.L., LUCAS, W.J. How do viruses traffic on the ‘vascular highway’? **Trends in Plant Science**, v.1, p.260-267, 1996.

- GOODING, G.V., TOLIN, S.A. Strains of potato virus Y affecting flue-cured tobacco in the South-eastern United States. **Plant Disease Reporter**, v.57, p.200-204, 1973.
- GRUBE, R.C., BLAETH, J.R., ARNEDO, M.S., CARANTA, C., JAHN, M.K. Identification and comparative mapping of a dominant potyvirus resistance gene cluster in *Capsicum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.852-859, 2000.
- HONG, Y., HUNT, A.G. RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. **Virology**, v.226, p.146-151, 1996.
- INOUE-NAGATA, A.K., FONSECA, E.N., RESENDE, R.O., BOITEUX, L.S., MONTE, D.C, DUSI, A.N., DE AVILA, A.C., VAN DER VLUGT, R.A.A. Further evidence to confirm that PVY^m is a new potyvirus species, *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.946, 2001.
- INOUE-NAGATA, A.K., FONSECA, E.N., RESENDE, R.O., BOITEUX, L.S., MONTE, D.C, DUSI, A.N., DE AVILA, A.C., VAN DER VLUGT, R.A.A. *Pepper Yellow mosaic virus*, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annum*. **Archives of Virology**, v.147, p. 847-855, 2002.
- KASSCHAU, K.D., CARRINGTON, J.C. Requirement for Hc-Pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. **Virology**, v.209, p.268-273, 1995.
- KASSCHAU, K.D., CRONIN, S., CARRINGTON, J.C. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. **Virology**, v.228, p.251-262, 1997.
- KELLER, K.E., JOHANSEN, E., MARTIN, R.R., HAMPTON, R.O. Potyvirus genome-linked protein (VPg) determines pea seed-borne mosaic virus pathotype-specific virulence in *Pisum sativum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, p. 124-130, 1997.
- KOBORI, R.F. **Controle da murcha de fitófтора (*Phytophthora capsici*) em pimentão (*Capsicum annum* L.) através de enxertia**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agronômicas, Campus de Botucatu, 1999.
- LAIN, S., MARTIN, M.T., RIECHMANJ, J.L., GARCIA, J. A novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: Nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. **Journal of Virology**, v.65, p. 1-6, 1991.

- LANE, L.C. A general method for detecting plant viruses. In: MARAMOROSCH, K. (Ed.) **Plant diseases of viral, viroid, mycoplasma and uncertain origin**. New Delhi, India: Oxford and IBH Publishing, 1992. p.3-17.
- MAHAJAN, S., DOLJA, V.V., CARRINGTON, J.C. Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: Requirements for the translation process and a cis-active element. **Journal of Virology**, v.70, p.4370-4379, 1996.
- MAKKOUK, K.M., GUMPF, D.J. Characterization of potato virus Y strains isolated from pepper. **Phytopathology**, v. 66, p. 576-581, 1976.
- MEISSNER FILHO, P.E., CUPERTINO, F.P. Reação de *Capsicum* a uma estirpe do vírus Y da batata, isolada de pimentão e tomate. **Fitopatologia Brasileira**, v. 15, p. 38-41, 1990a.
- MEISSNER FILHO, P.E., CUPERTINO, F.P. Propriedades biológicas de uma estirpe do vírus Y da batata isolada de pimentão e de tomate no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v. 15, p. 351-354, 1990b.
- MEISSNER FILHO, P.E., CUPERTINO, F.P., AVILA, A.C. Purificação e sorologia de dois isolados do vírus Y da batata obtidos de pimentão e de tomate no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v. 15, p. 235-237, 1990.
- MESHI, T. et al. Mutations in the tobacco mosaic virus 30 Kd protein gene overcome Tm-2 resistance in tomato. **Plant Cell**, v. 1, p. 515-522, 1989.
- MURPHY, J.F., KLEIN, P.G., HUNT, A.G., SHAW, J.G. Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. **Virology**, v.220, p.535-538, 1996.
- NAGAI, H. Obtenção de variedades de pimentão resistentes ao mosaico. **Bragantia**, v. 27, p. 311-353, 1968.
- NAGAI, H. Novas variedades de pimentão resistentes ao mosaico causado por vírus Y. **Bragantia**, v. 30, p. 93-100, 1971.
- NAGAI, H. Pimentão, pimenta doce e pimentas. In: FURLANI, A M. C.e VIEGAS, G. P. (Eds.) **O melhoramento de plantas do Instituto Agrônômico**. Vol. 1. Campinas, São Paulo: Instituto Agrônômico. p.276-294, 1983.
- NELSON, M.S., WHEELER, R.E. Biological and serological characterization and separation of potyviruses that infect pepper. **Phytopathology**, v.68, p.979-984, 1997.

- NICOLAS, O., DUNNINGTON, S.W., GOTOW, L.F., PIRONE, T.P., HELLMANN, G.M. Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome the VA resistance gene in tobacco. **Virology**, v. 237, p. 452-459, 1997.
- NOBREGA, N.R., SILBERSCHMIDT, K. Sobre uma provavel variante do vírus “Y” da batatinha (*Solanum vírus 2*, Orton) que tem a peculiaridade de provocar necroses em plantas de fumo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 15, p. 307-333, 1944.
- PALOIX, A., KYLE, M. Proposal revision of gene nomenclature for potyvirus resistance genes in *Capsicum* sp. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, v. 14, p. 26-29, 1995.
- PRUSS, G., GE, X., SHI, X.M., CARRINGTON, J.C., VANCE, V.B. Plant viral synergism: The potyviral genome encodes a broad-ranger pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. **Plant Cell**, v.9, p. 859-868, 1997.
- PURCIFULL, D.E., HIEBERT, E. Description of Plant Viruses. **CMI/AAB** n° 258, 7p, 1982.
- REIFSCHNEIDER, F.J.B. (Org.) **Capsicum. Pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia / Embrapa Hortaliças, 113 p. il. 2000.
- RESTREPO-HARTWIG, M.A., CARRINGTON, J.C. Regulation of nuclear transport of a plant potyviral protein by autoproteolysis. **Journal of Virology**, v. 66, p. 5662-5666, 1992.
- RESTREPO-HARTWIG, M.A., CARRINGTON, J.C. The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. **Journal of Virology**, v. 68, p. 2388-2397, 1994.
- REVERS, F, CANDRESSE, T., LE GALL, O., DUNEZ, J. Evidence for the frequent occurrence of recombinant potato virus Y isolates. **Annals du Tabacco**, v. 27, p. 65-71, 1995.
- ROJAS, M.R., ZERBINI, F.M., ALLISON, R.F., GILBERTSON, R.L., LUCAS, W. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. **Virology**, v.237, p.283-295, 1997.
- ROMANCER, M., KERLAN, C., NEDELLEC, M. Biological characterization of varios geographic isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. **Plant Pathology**, v.43, p. 138-144, 1994.

- ROMERO, A., BLANCO-URGOITI, B., SOTO, M.J., FERERES, A., PONZ, F. Characterization of typical pepper-isolates of PVY reveals multiple pathotypes within a single genetic strain. **Virus Research**, v.79, p. 71-80, 2001.
- SACCHI, H., MELO, A M.T. Avaliação de genótipos de pimentão a um isolado de PVY. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p. 950, 2001.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, 2nd Ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANGER, F., NICKLEIN, S., COULSON, A R.. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SCHAAD, M.C., CARRINGTON, J.C. Suppression of long-distance movement of tobacco etch virus in a nonsusceptible host. **Journal of Virology**, v.70, p.2556-2561, 1996.
- SHAAD, M.C., JANSEN, P., CARRINGTON, J.C. Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: Role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. **EMBO Journal**, v. 16, p. 4049-4059, 1997.
- SHUKLA, D.D., THOMAS, J.E., McKERN, M.N., TRACY, S.L., WARD, C.W. Coat protein of potyviruses. 4. Comparison of biological properties, serological relationships, and coat protein amino acid sequence of four strains of potato virus Y. **Archives of Virology**, v.102, p.207-219, 1988.
- SHUKLA, D.D., MCKERN, N.M., WARD, C.W. Coat protein of potyviruses. 5. Symptomatology, serology and coat protein sequences of three strains of passionfruit woodiness virus. **Archives of Virology**, v.102, p.221-232, 1988.
- SHUKLA, D.D., WARD, W. Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. **Journal of General Virology**, v.69, p. 2703-2710, 1988.
- SHUKLA, D.D., WARD, C.W., BRUNT, A.A. **The Potyviridae**. CAB International Wallingford, U.K. 516 p. 1994.
- SIMÓN-BUELA, L., GUO, H.S., GARCIA, J.A. Cap-independent leaky scanning as the mechanism of translacion initiation of a plant viral genomic RNA. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2691-2699, 1997.
- STANGARLIN, O.S, SALATI, R., REZENDE, J.A.M. Incidência de viroses em pimentões nas regiões de Piedade e Piracicaba, SP e de São Joaquim de Bicas, MG. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p. 972, 2001.

- STOBBS, L.W., POYSA, V., Van SCHAGEN, J.G. Susceptibility of cultivars of tomato and pepper to a necrotic strain of potato virus Y. **Canadian Journal Plant Pathology**, v.16, p. 43-48, 1994.
- SUDARSONO, S.L., WOLOSHUK, Z., XIONG, HELLMANN, G.M., WERNSMAN, E.A., LOMMEL, S. A. Nucleotide sequence of the capsid protein cistron from six potato virus Y (PVY) isolates infecting tobacco. **Archives of Virology**, v.132, p. 162-170, 1993.
- TORDO, V.M., CHACHULSKA, A M., FAKHAFAKH, H., Le ROMANCER, M., ROBAGLIA, C., ASTIER-MANIFACIER, S. Sequence polymorphism in the 5'NTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 939-949, 1995.
- VAN DER VLUGT, R.A.A., LEUNISSEN, J., GOLDBACH, R. Taxonomic relationships between distinct potato virus Y isolates based on detailed comparisons of the viral coat proteins and 3'-nontranslated regions. **Archives of Virology**, v. 131, p.361-375, 1993.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V., BURCKARD, J. Detection of a wide spectrum of tobacco mosaic virus strains by indirect enzyme-linked immunosorbent assays. **Virology**, 106, p. 327-334, 1980.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. FAUQUET, C.M. BISHOP, D.H.L., CARSTENS, E.B., ESTES, M.K. **Virus taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego, CA: Academic Press, 2000. 1161p.
- VERCHOT, J., CARRINGTON, J.C. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions *in trans* as an accessory factor for genome amplification. **Journal of Virology**, v. 69, p. 3668-3674, 1995.