

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS BOTUCATU

**VARIABILIDADE DE POTYVIRUS INFECTANDO *Capsicum* spp. NO ESTADO DE
SÃO PAULO.**

MÔNICA FECURY MOURA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Campus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP
Junho - 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS BOTUCATU**

**VARIABILIDADE DE POTYVIRUS INFECTANDO *Capsicum* spp. NO ESTADO DE
SÃO PAULO.**

MÔNICA FECURY MOURA

Orientadora: Prof^a Dra. Renate Krause Sakate

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Campus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP
Junho - 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M929v Moura, Mônica Fecury, 1979-
Variabilidade de *potyvirus* infectando *Capsicum* spp. no Estado de São Paulo / Mônica Fecury Moura. - Botucatu : [s.n.], 2009.
x, 76 f. : il., fots. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2009
Orientador: Renate Krause Sakate
Co-orientador: Marcelo Agenor Pavan
Inclui bibliografia.

1. Vírus. 2. PVY. 3. PepYMV. 4. Pimentão. 5. Pimenta.
I. Sakate, Renate Krause. II. Pavan, Marcelo Agenor. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas.
IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "VARIABILIDADE DE POTYVIRUS EM Capsicum spp. NO ESTADO DE SÃO PAULO"


ALUNA: MÔNICA FECURY MOURA

ORIENTADORA: PROFa DRa RENATE KRAUSE SAKATE
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROFa DRa RENATE KRAUSE SAKATE



PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI



DR. RICARDO GIORIA

Data da Realização: 22 de junho de 2009.

Agradeço a Deus

&

Dedico com amor aos meus pais, Rosária e Rômulo, por sempre apoiarem os meus estudos ajudando na minha formação. O amor de vocês me fortalece. Ao meu irmão Bernardo, minha sobrinha Mariana e a minha avó Maria do Carmo.

Aos amigos de Belém e Botucatu pelo companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos

À FAPESP, pelo auxílio financeiro deste projeto

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas – Campus de Botucatu, assim como ao Departamento de Defesa Fitossanitária pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

À Prof^ª. Renate Krause Sakate pela orientação, conselhos e apoio durante o curso. Esses requisitos foram essenciais para o desenvolvimento do presente trabalho e com certeza ajudam a formar o meu perfil profissional.

Ao Prof. Marcelo Agenor Pavan pela ajuda e contribuições neste trabalho.

Aos professores Antonio Carlos Maringoni, Edson Luiz Furtado e Nilton Souza pelos ensinamentos e estímulo.

À Sakata Seed Sudamerica por conceder isolados de vírus e acessos de *Capsicum* spp., em especial ao Dr. Ricardo Gioria e Dr. Rômulo Kobori.

Aos Agrônomos Gilberto Wassano e Emílio (APPI), cuja ajuda foi importante nos trabalhos de coleta.

Aos amigos de laboratório: Júlio Marubayashi, Tatiana Mituti, Karolina Doria, Kelly Rocha, Márcio Sanches, Denise Nozaki, Gerson Suzuki, David Spadotti e Bruno De Marchi pelo coleguismo e principalmente pela amizade.

Aos amigos e colegas em Botucatu que tive o prazer de conhecer: Livia Mendes, Martha Passador, Hélio Makoto, Cristiane Di Pieri, Fabiano (Kiosque), Juan Hayer, Karina Tumura, Adriana Itako, Tadeu Junior e Ana Carolina.

Aos amigos de Belém: Fábio, Priscila, Luciana, Rita, Roger, Mariozinho, Keila, Nelson, Fádía, Bianca, Isadora e Alcindo que sempre estiveram ao meu lado me apoiando. A amizade de vocês sempre é presente para mim apesar da distância.

Ao José Maria, Maricé e Daniela, pelo apoio aos meus pais e irmão.

Aos meus ex-orientadores e sempre conselheiros Helen Sotão e Luis Poltronieri.

E aos funcionários do Departamento de Proteção Vegetal (Defesa Fitossanitária), em especial ao Paulinho, Dinha, Domingos e Norberto.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTAS DE TABELAS E QUADROS.....	X
1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	5
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
4.1 GÊNERO CAPSICUM.....	7
4.2 PRINCIPAIS VÍRUS ENCONTRADOS EM PIMENTA E PIMENTÃO NO BRASIL.....	9
4.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO POTYVIRUS.....	10
4.4. PVY E SUAS ESTIRPES E O PEPYMV.....	13
4.5 RESISTÊNCIA A POTYVIRUS EM CAPSICUM SPP.....	16
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5.1 COLETA NOS CAMPOS DE PRODUÇÃO DE PIMENTA E PIMENTÃO.....	18
5.2 IDENTIFICAÇÃO E OBTENÇÃO DOS ISOLADOS.....	20
5.2.1 ANÁLISE DAS AMOSTRAS PELO TESTE DE ELISA INDIRETO.....	20
5.2.2 VERIFICAÇÃO DE INFECÇÕES MISTAS E ANÁLISE DA VARIABILIDADE BIOLÓGICA.....	20
5.2.3 IDENTIFICAÇÃO DE PATÓTIPOS.....	21
5.2.4 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	21
5.2.4.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL PARA DETECÇÃO DE POTYVIRUS E CUCUMOVIRUS.....	21
5.2.4.2 OBTENÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA A REGIÃO CODIFICADORA PARA A PROTEÍNA CAPSIDIAL DO PVY E PEPYMV.....	22
5.2.4.3 TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (RT-PCR).....	22
5.2.4.4 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL PARA DETECÇÃO DE BEGOMOVÍRUS.....	23
5.2.4.5 ANÁLISE DO PCR EM GEL DE AGAROSE.....	24
5.2.4.6 PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES DE ESCHERICHIA COLI - ESTIRPE XL1.....	24

5.2.4.7 CLONAGEM EM VETOR pGEM-T EASY	25
5.2.4.8 SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO VIRAL AMPLIFICADO	26
5.2.4.9 ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS	26
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
6.1 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE ISOLADOS DE POTYVIRUS PROVENIENTES DE CAPSICUM SPP.	27
6.2 CLASSIFICAÇÃO DOS ISOLADOS PROVENIENTES DE CAPSICUM SPP EM PATÓTIPOS E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.	32
6.3 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS DE POTYVIRUS	43
7. CONCLUSÕES.....	52
8. REFERENCIAS	53
APÊNDICE	63
APÊNDICE I.....	64
APÊNDICE II	67
APÊNDICE III.....	70
APÊNDICE IV	72

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Esquema do genoma e dos processos de clivagem da poliproteína dos <i>Potyvirus</i>	12
2. Padrão eletroforético do produto de RT-CPR amplificado pelos oligonucleotídeos 038-8 e 035-3 (para detecção de CMV) para os isolados 227-23L, 251-29N, 257-6T, 268-32 A, 273-6o, 406-V4, controle negativo (-), M: Marcador molecular 1Kb DNA ladder	29
3. Reação das variedades diferenciais a inoculação mecânica através de extrato vegetal com isolado 225-23j de potyvirus classificado como Patótipo 0	37
4. Reação das variedades diferenciais a inoculação mecânica através de extrato vegetal com isolado 156-1L de potyvirus classificado como Patótipo 1	37
5. Reação das variedades diferenciais a inoculação mecânica através de extrato vegetal com isolado 265-35 A de potyvirus classificado como Patótipo 1.2	38
6. Reação das variedades diferenciais a inoculação mecânica através de extrato vegetal com isolado 348 de potyvirus classificado como Patótipo 1.3	38
7. Reação das variedades diferenciais a inoculação mecânica através de extrato vegetal com isolado 273 – 6 o de potyvirus classificado como Patótipo 1.2.3	39
8. Reação das variedades diferenciais a inoculação mecânica através de extrato vegetal com isolado 227- 23l de potyvirus de Patótipo indefinido	39
9. Reação das variedades diferenciais a inoculação mecânica através de extrato vegetal com o isolado 304 de potyvirus de Patotipo indefinido	40

	Página
10. Padrão eletroforético do produto de RT-PCR amplificado pelos oligonucleotídeos PepNib e PepUTR para os isolados 23Q-234, 29C-240, 6T-257, 32 A-268, 348 e 2C-389, controle negativo (-), M: Marcador molecular 1Kb DNA ladder	44
11. Alinhamento completo da região codificadora para a proteína capsidial entre os isolados coletados no campo comparados ao PepYMV (número de acesso AF348610) e PVY (número de acesso LYE84.2)	45
12. Padrão eletroforético do produto de RT-PCR amplificado pelos oligonucleotídeos WCIEN e PV-1 para os isolados 273-6o, 295, 304, 362 e 367, controle negativo (-), M: Marcador molecular 1Kb DNA ladder.....	47
13. Árvore filogenética obtida pelo programa Mega 4.0 com o valor de Bootstrap de 2000 repetições para a região codificadora para proteína capsidial das amostras: 249-29l, 234-23q, 240-29c, 251-29n, 237-23t, 348, 268-32a, 389-2c, 254-6q, 257-6t, 225-23j e 331. Outgroup: PepYMV (Acesso - AF348610) e PVY (Acesso - LYE84.2).....	50
14. Árvore filogenética obtida pelo programa Mega 4.0 com o valor de Bootstrap de 2000 repetições para parte da região codificadora para proteína capsidial das amostras 237-23t, 234-23q, 273-6o, 251-29n, 268-32a, 240-29c, 295, 348, 304, 249-29l, 6 sak, 403, 389-2c, 254-6q, 12 sak, 257-6t, 367, 11 sak, 265-35 a, 331, 225-23j, 227-23l. Outgroup: PepYMV (Acesso - AF348610) e PVY (Acesso - LYE84.2)	51

LISTAS DE TABELAS E QUADROS

	Página
1. Tabela 1: Lista de espécies domesticadas pertencentes ao gênero <i>Capsicum</i>	9
2. Tabela 2: Classificação de isolados de PVY em patótipos baseado na resposta de suscetibilidade (S) ou resistência (R) nas cultivares diferenciadoras	14
3. Tabela 3: Período, localidade e número de amostras coletadas de plantas sintomáticas de <i>Capsicum</i> spp. durante outubro de 2007 a novembro de 2008	19
4. Tabela 4: Sintomatologia observada nas hospedeiras inoculadas com as amostras coletadas de campo e as cedidas pela empresa Sakata Seed Sudamérica	30
5. Tabela 5: Reação dos isolados nas hospedeiras diferenciadas, Rubia R e Magali R.....	41
6. Quadro 1: Porcentagem de identidade da seqüência de nucleotídeo (diagonal superior) e da seqüência de aminoácidos (diagonal inferior) do gene completo codificador da capa protéica entre os isolados de PepYMV (252-29n, 268-32a, 254-6q, 257-6t, 249-29l, 237-23t, 240-29c, 389-2c, 234-23q e 348) e PVY (225-23j e 331). Outgroup: PepYMV AF348610 e PVY-LYE 84.2.	49

1. RESUMO

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) está entre as dez hortaliças mais consumidas no Brasil. Dois potyvirus são verificados nesta cultura, o *Potato virus Y* (PVY) e o *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). Foi avaliada entre outubro de 2007 a novembro de 2008, a ocorrência de potyvirus infectando *Capsicum* spp. nos municípios de Pirajú, Pirajuí, Paranapanema, Santa Cruz do Rio Pardo, Sorocaba, São Miguel Arcanjo, Itapetininga, Reginópolis, Lins, Iacanga e Mogi-Mirim, do Estado de São Paulo. Das 408 amostras coletadas, 105 foram positivas para a presença de potyvirus utilizando-se antissoro anti-potyvirus (Agdia). Em algumas amostras foi detectada a presença de infecção mista com o *Cucumber mosaic virus* (CMV) e begomovírus. A inoculação de cinquenta e um isolados na série diferencial de *Capsicum* spp contendo os genes *pvr2*¹, *pvr2*² e *Pvr4*, dos quais dez foram provenientes da Empresa Sakata Seed Sudamérica, possibilitou a classificação de dois isolados em patótipo 0, três em patótipo 1, seis em patótipo 1.2, onze em patótipo 1.2.3 e treze em patótipo 1-3 de PVY. Dezesesseis isolados não puderam ser classificados em patótipos. Não foi verificada correlação entre local de coleta e ocorrência de um patótipo específico, evidenciando grande variabilidade biológica dos isolados de potyvirus no campo. Nenhum dos isolados coletados ocasionou sintomas evidentes em plantas de pimentão Rubia R e Magali R, indicando que a resistência conferida por estes híbridos ainda é efetiva contra os isolados de potyvirus predominantes no campo. Um par de primers PepNib (5' GWTSGYYGMMTTGGATGATG 3') e PepUTR (5' AGTAGTACAGGAAAAGCC 3') foi

obtido para amplificação completa da região codificadora da proteína capsidial de PVY e PepYMV. Analisando-se esta região do genoma viral, pôde-se constatar predominância da espécie PepYMV. O PVY foi encontrado somente em coletas realizadas na região de Lins. Os isolados de PepYMV apresentaram identidades de aminoácidos na região codificadora para a proteína capsidial entre 93% e 100%, enquanto que os de PVY entre 94% e 98%. Entre PepYMV e PVY as identidades de aminoácidos nesta região foram entre 73% e 79%. Segundo os critérios taxonômicos atuais, estes resultados aqui obtidos reforçam que PepYMV e PVY são espécies diferentes de potyvirus.

Palavras chave: Virus, PVY, PepYMV, pimentão, pimenta

2. SUMMARY

VARIABILITY OF potyvirus INFECTING *Capsicum* spp. FROM SÃO PAULO STATE. Botucatu, 2009. 75p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MÔNICA FECURY MOURA

Adviser: RENATE KRAUSE-SAKATE

Co- Adviser: MARCELO AGENOR PAVAN

The sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) is one of the ten most consumed vegetables in the country. In Brazil, two potyviruses are verified in this culture, the *Potato virus Y* (PVY) and the *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). Between October 2007 and November 2008, the occurrence of potyvirus infecting *Capsicum* spp. was evaluated on plants collected from Piraju, Pirajuí, Paranapanema, Santa Cruz do Rio Pardo, Sorocaba, São Miguel Arcanjo, Itapetininga, Reginópolis, Lins, Iacanga and Mogi-Mirim, in Sao Paulo State. Among the 408 collected samples, 105 were positive for the presence of potyvirus using anti-potyvirus antiserum (Agdia). The presence of mixed infection with the *Cucumber mosaic virus* (CMV) and begomovirus was also verified. The inoculation of fifty one isolates on the series of *Capsicum* spp. containing the genes *pvr2¹*, *pvr2²* and *Pvr4*, ten of them isolates from the Sakata Seed Sudamerica Company, made it possible the classification of these isolates in different pathotypes. Two isolates were classified as pathotype 0, three in pathotype 1, six in

pathotype 1.2, eleven in pathotype 1.2.3 and thirteen in pathotype 1.3 of PVY. Sixteen isolates were not able to be classified in pathotypes of PVY. No correlation could be made between the origin of the isolate and the presence of an specific pathotype, indicating a great biological variability between the potyvirus isolates. None of the isolates collected in the field caused symptoms in Rubia R and Magali R, indicating that the resistance provided by these hybrids is still effective against the predominant isolates of potyvirus. A pair of primer PepNib (5' GWTSGYGMMTTGGATGATG 3') and PepUTR (5' AGTAGTACAGGAAAAGCC 3') were obtained for the complete amplification of the capsid protein region of PVY and PepYMV isolates. PepYMV was the prevalent species of potyvirus found infecting sweet peppers. The PVY was found only at the Lins region. The aminoacid identity between the PepYMV isolates was between 93% and 100%, while for the PVY isolates between 94% and 98% for the capsid protein region. The aminoacid identity for the CP between PepYMV and PVY isolates was between 73% to 79 %, indicating that these viruses are different species of potyviruses.

Keywords: Virus, PVY, PepYMV, sweetpepper, pepper

3. INTRODUÇÃO

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) é uma hortaliça cultivada em todo o Brasil, e se encontra entre as dez olerícolas mais consumidas no país (KOBORI *et al.*, 2008). Seus frutos são comercializados principalmente na coloração verde e vermelha, apesar de serem também produzidos frutos de cor amarela, marfim, laranja e arroxeadas (FILGUEIRA, 2003).

A suscetibilidade do pimentão à problemas fitossanitários causados por vírus ocasiona graves entraves à cultura. A família *Potyviridae* constitui a maior e economicamente mais importante família de vírus de plantas, contendo cerca de 20% dos vírus descritos. Mundialmente são conhecidos vários vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus* que infectam pimentão (*Capsicum annuum* L.) e pimenta (*C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq. e *C. frutescens* L.) como o *Potato virus Y* (PVY), *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Pepper veinal mottle virus* (PVMV) e *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV) (DOGIMONT *et al.*, 1996; CARANTA *et al.*, 1997).

PVY era o único potyvirus descrito em plantas do gênero *Capsicum* no Brasil até recentemente (NAGAI, 1983; BRIOSO *et al.*, 1996a) e tradicionalmente controlado por meio da resistência genética. Nagai (1968) iniciou um programa de melhoramento genético de pimentão dando origem à série de cultivares Agrônômico. Na década de 80 surgiu a estirpe PVY^M, que superou a resistência da série Agrônômico, especialmente da cultivar Agrônômico 10G, que prevaleceu no mercado por mais de duas décadas (NAGAI, 1993). Recentemente Inoue-Nagata *et al.* (2002) verificaram que o PVY^M, considerado a estirpe

severa do PVY, tratava-se de uma nova espécie de potyvirus, denominada de *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV).

Atualmente a resistência genética aos potyvirus no Brasil se baseia na utilização de híbridos como Magali R e Rubia R, possivelmente portadores do gene de resistência *Pvr4* (ECHER, 2001; ECHER & COSTA, 2002), que conferem resistência aos patótipos 0, 1, 1.2 de PVY e ao PepYMV (GIORIA *et al.*, 2009). Porém, no Estado de São Paulo existe pelo menos um relato de um isolado de PepYMV capaz de causar sintomas de mosaico no híbrido Magali R e em Rubia R (GIORIA *et al.*, 2009).

Deste modo, os objetivos deste trabalho foram: a) identificar as espécies de potyvirus presentes nas principais regiões produtoras de pimentão do Estado de São Paulo; b) avaliar a variabilidade biológica dos isolados coletados testando-os em plantas de *Capsicum* spp. com os genes *pvr2¹*, *pvr2²*, *pvr2^{2,3}*, *pvr2^{2,4}*, *pvr5*, *Pvr4* e nos híbridos Magali R e Rubia R e c) avaliar a diversidade genética analisando-se a região codificadora para a proteína capsidial.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Gênero *Capsicum*

No gênero *Capsicum* (Grego *Kapso* – picar ou arder) encontram-se os pimentões, as pimentas doces e pimentas picantes. A classificação do gênero é realizada com base nos níveis de domesticação, podendo as espécies serem consideradas silvestres, semidomesticadas e domesticadas (BIANCHETTI & CARVALHO, 2005). Segundo Bosland & Votava (1999), este gênero consiste em pelo menos 25 espécies silvestres e 5 espécies domesticadas denominadas: *Capsicum frutescens*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. annuum* e apenas *C. pubescens* não é comercializada no Brasil (IBPGR, 1983; CASALI & COUTO, 1984) (Tabela 1). Há grande variação na forma, tamanho e coloração dos frutos em plantas pertencentes ao gênero *Capsicum* (BOSLAND & VOTAVA, 1999).

Segundo Cruz & Banci (2008), as pimenteiras do gênero *Capsicum* possuem um cultivo relativamente fácil, quando comparadas a outras solanáceas, como a batata, tomate e mesmo o pimentão. Estes autores afirmam que é possível distinguir as pimentas dos pimentões através de características morfológicas e pela pungência do fruto, isto é, pelo sabor picante conferido por alcalóides denominados de capsaicinóides. As plantas de pimentão não possuem frutos pungentes e normalmente são grandes e largos, de formato retangular, quadrado ou triangular. As pimentas apresentam certa rusticidade no campo e um ciclo mais longo, possuindo um período de colheita que pode ser realizado por mais de um ano (CNPQ, 2009). Mesmo cultivadas de maneira rústica, dezenas de variedades de pimentas são

produzidas no Brasil, ocasionando movimentações financeiras de milhões ao ano no mercado interno e nas exportações (MATTOS *et al.*, 2008).

Capsicum annuum L. é a espécie mais cultivada e de importância econômica no Brasil. Seu centro primário de diversidade está localizado no México e na América Central (CARVALHO & BIANCHETTI, 2008).

A produção de pimentão é geralmente realizada a campo e o Estado de São Paulo abrange cerca de 23,70% de área cultivada brasileira que é de 12.000 ha, rendendo uma produção de 280.000 toneladas de frutos (KOBORI *et al.*, 2008). Somente 4,70% é realizada em cultivo protegido, sendo restrito praticamente ao estado de São Paulo e Distrito Federal (KOBORI *et al.*, 2008). De acordo com Lorentz *et al.* (2002), esta cultura encontra-se entre as cinco que possuem maior área cultivada em ambiente protegido, facilitando a produção em diferentes épocas.

Sendo assim, o pimentão é hoje uma das 10 hortaliças mais importantes no país, sendo que no Estado de São Paulo destacam-se as regiões produtoras localizadas no oeste, sudoeste, cinturão verde e Campinas (KOBORI *et al.*, 2008).

Tabela 1 – Lista de espécies domesticadas pertencentes ao gênero *Capsicum* (Adaptado de JANZAC, 2008).

Nome da espécie	Área de origem
<i>Capsicum annuum</i> L.	Norte da Colômbia e Sul dos Estados Unidos
<i>C. chinense</i> Jacq.	América do Sul e América Central
<i>C. frutescens</i> L.	América Central
<i>C. baccatum</i> L.	Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai e Peru
<i>C. pubescens</i>	Região Andina da Bolívia e Peru

4.2 Principais vírus encontrados em pimenta e pimentão no Brasil.

No gênero *Capsicum* existem pelo menos vinte vírus descritos (CARMO, ZERBINI & MAFFIA, 2006). No Brasil já foram detectados até o momento os gêneros: *Begomovirus*, cujas espécies são o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (NOZAKI, 2007); *Cucumovirus* (*Cucumber mosaic virus* – CMV) (FRANGIONE, PAVAN & COLARICCIO, 2002), *Potyvirus* com as espécies *Potato virus Y* (PVY)(COSTA & ALVES, 1950) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (INOUE-NAGATA *et al.*, 2002), *Tobamovirus* (*Tobacco mosaic virus* - TMV, *Pepper mild mottle virus* - PMMoV e *Tomato mosaic virus* - ToMV) (CÉSAR, 2002), *Tospovirus* (*Tomato spotted wilt virus* - TSWV, *Groundnut ringspot virus* – GRSV e *Tomato chlorotic spot virus* - TCSV) (LIMA *et al.*, 2000).

Os sintomas ocasionados por estas espécies são amplos e a diagnose no campo é difícil, principalmente quando há infecções mistas. PVY e PepYMV podem causar sintomas idênticos no hospedeiro (TRUTA *et al.*, 2004). Outros potyvirus já foram detectados no Continente Sul-Americano, mas sem terem sido ainda relatados no Brasil, como o *Tobacco etch virus* (TEV) na Venezuela, *Pepper severe mosaic virus* (PepSMV) na Argentina, *Peru tomato mosaic virus* (PTV) no Peru e a espécie tentativa Ecuadorian rocoto virus (ERV) no Equador (JANZAC *et al.*, 2008a).

4.3 Características gerais do Gênero *Potyvirus*

A família *Potyviridae* é dividida em seis gêneros (*Potyvirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus* e *Macluravirus*), baseando-se no inseto vetor e número de componentes do genoma (BERGER *et al.*, 2005).

O gênero *Potyvirus*, que inclui os vírus transmitidos por afídeos e que possuem somente um componente genômico, é o mais numeroso, com mais de 100 espécies classificadas. Alguns dos critérios taxonômicos para classificação de espécies dentro do gênero *Potyvirus* incluem a identidade de sequência de aminoácidos da capa protéica inferiores a 80%, identidade da sequência de nucleotídeos menor que 85% para a sequência completa do genoma viral, possuir diferentes sítios de clivagem na poliproteína, a gama de hospedeiros e o modo de transmissão (BERGER *et al.*, 2005).

As partículas virais são alongadas flexuosas com comprimento de 680-900 nm e com 11-13 nm de espessura. O vírion é composto por uma molécula de RNA de fita simples, senso positivo, com aproximadamente 9,7 kb de tamanho. Este RNA genômico é envolto por um capsídeo formado por 2.200 cópias de um polipeptídeo de massa molecular em torno de 34 kDa (BERGER *et al.*, 2005). O genoma compreende uma única ORF (Open Reading Frame) que codifica uma poliproteína de aproximadamente 345 kDa. Nas suas extremidades encontram-se duas regiões não traduzidas (NTR), uma ligada covalentemente a VPg (Viral protein genome-linked) na extremidade 5' e outra no terminal 3' ligada a uma sequência de adenina (Poly A) (HARI *et al.*, 1979; URCUQUI-INCHIMA *et al.*, 2001). A poliproteína dos potyvirus é processada através de três proteases virais, sendo estas de vital importância para o ciclo de vida do patógeno. As proteases P1 e HC-Pro autoclivam-se. Já a NIa protease está envolvida em seu próprio processo de clivagem em *cis* e em seis clivagens adicionais em *trans* (DAROS & CARRINGTON, 1997). Estes processos de clivagem geram nove proteínas: P1, HC-Pro, P3, 6k1, CI, 6k2, NIa, NIb e CP (Figura 1). Uma importante característica dos potyvirus é que a maioria das proteínas formadas é multifuncional e são produzidas em quantidades estequiometricamente idênticas (URCUQUI-INCHIMA *et al.*, 2001).

A proteína capsidial é importante para o desenvolvimento da infecção viral, pois está relacionada aos movimentos célula-a-célula, a longa distância e na replicação viral. Possui três regiões distintas contendo uma extremidade amino-terminal que é variável em tamanho e seqüência, uma região central conservada com cerca de 215 a 227 aminoácidos e uma região carboxi-terminal com 18-20 aminoácidos (SHUKLA *et al.*, 1991). Na região N-terminal está localizada a seqüência de aminoácidos DAG (Asparagina - Asp, Alanina - Ala, Glicina - Gly), altamente conservada entre os potyvirus transmitidos por afídeos. Mutações de aminoácidos realizadas nesta seqüência ou mudanças em áreas próximas resultam na perda ou na redução da transmissão dos vírus pelos afídeos (ATREYA *et al.* 1991; ATREYA *et al.*, 1995).

A transmissão dos potyvirus ocorre na natureza através dos afídeos de maneira não persistente, havendo uma interação das partículas virais com a HC-Pro (PIRONE & BLANC, 1996). ATREYA *et al.* (1992), verificou que mutações na região 5' terminal da HC-Pro do TVMV (*Tobacco vein mottling virus*) afetam a transmissão por afídeos assim como na virulência do vírus.

As proteínas CI (Cylindrical Inclusion), que possui a função de helicase e Nib (Nuclear Inclusion b), com função de polimerase (RdRp – RNA polimerase dependente de RNA), são as principais responsáveis pela replicação viral, que ocorre no citoplasma da célula vegetal (URCUQUI-INCHIMA *et al.*, 2001). A proteína CI forma inclusões cilíndricas denominadas “cata-vento”, características da família *Potyviridae* (MURPHY *et al.*, 1991). A proteína Nib, forma inclusões nucleares, assim como a proteína NIa (VPg-Pro), que é a principal protease viral (URCUQUI-INCHIMA *et al.*, 2001).

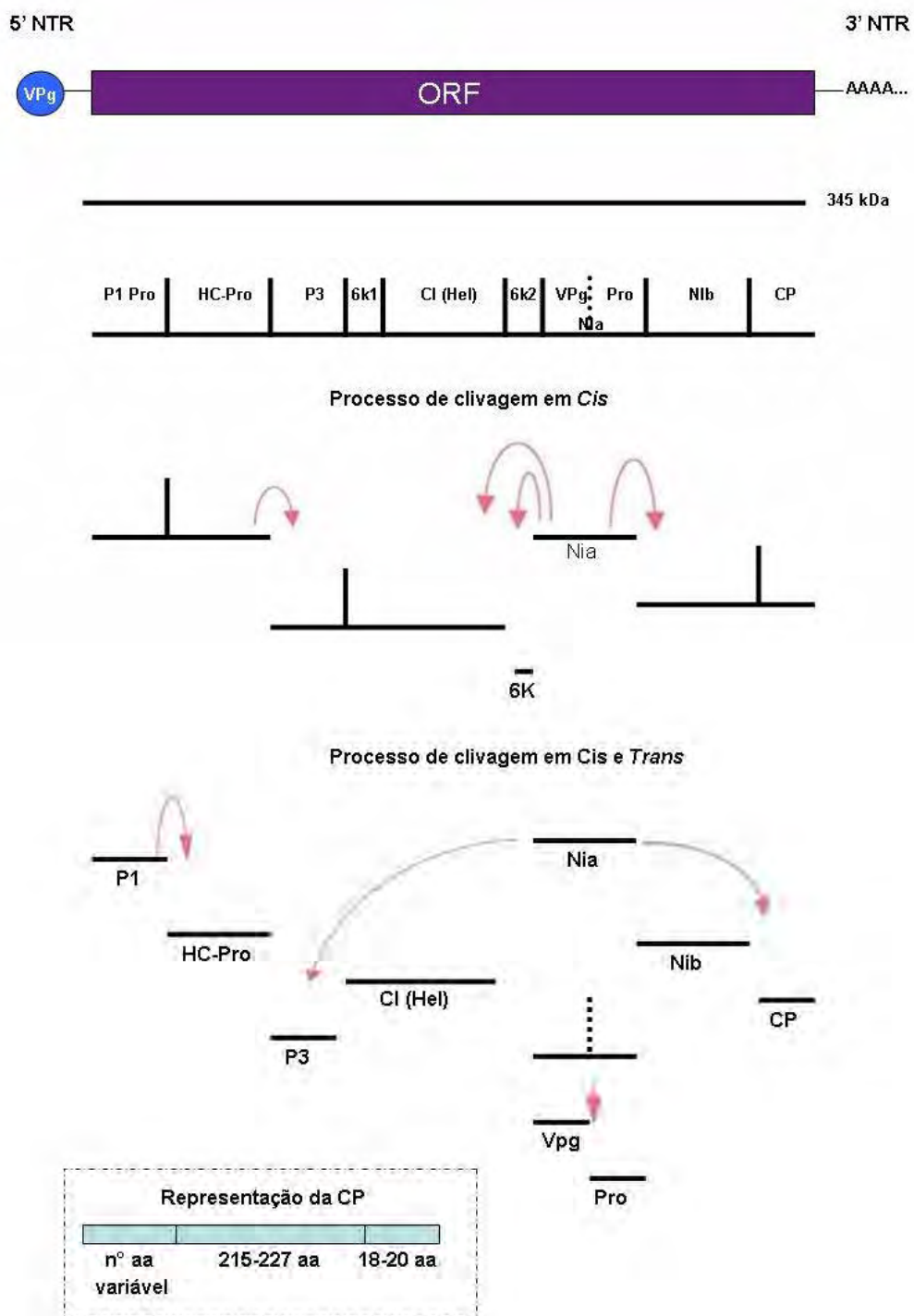


Figura 1 – Esquema do genoma e dos processos de clivagem da poliproteína dos potyvirus (Adaptado de SHUKLA *et al.*, 1994; ZERBINI & MACIEL-ZAMBOLIM, 1999).

4.4. PVY e suas estirpes e o PepYMV

O PVY é a espécie tipo do gênero *Potyvirus* e várias estirpes deste vírus já foram identificadas (GLAIS *et al.*, 2002). Segundo Janzac *et al.* (2008b), o PVY é o único potyvirus com distribuição mundial, sendo outras espécies restritas a continentes e/ou países. No Brasil a doença foi observada primeiramente em plantações de batata na década de 40 (NÓBREGA & SILBERSCHMIDT, 1944) e em pimentão na década de 50 (COSTA & ALVES, 1950).

As estirpes de PVY encontradas em batata foram classificadas baseando-se nos sintomas observados em *Nicotiana tabacum* cv samsun e *Solanum tuberosum*, subdividindo-se em PVY⁰, PVY^N e PVY^C (De BONKX & HUTTINGA, 1981). PVY⁰ engloba as estirpes comuns que induzem leve mosaico e clareamento das nervuras em fumo, mas em *S. tuberosum* os sintomas observados são severos como rugosidade e abscisão foliar, além de reação de hipersensibilidade na presença do gene *Ny_{thr}*. Já PVY^N em fumo ocasiona sintomas de mosaico associado à presença de necrose e normalmente induz mosqueado em batata. O PVY^N e PVY⁰ são patogênicos ao fumo e tomateiro, mas geralmente não infectam pimenta (GÉBRÉ SÉLASSIÉ *et al.*, 1985). PVY^C compreende as estirpes capazes de causar hipersensibilidade em batata portadoras do gene de resistência *Nc_{ibr}* e são capazes de infectar a pimenta (JANZAC, 2008). Outra estirpe que pode ser encontrada nas áreas produtoras de batata é o PVY^{NTN}, variante da estirpe necrótica PVY^N. Segundo Truta *et al.* (2004), o PVY^{NTN} infecta o pimentão.

Os isolados de pimenta e pimentão induzem sintomas como mosaico, mosqueado e necrose, sendo que o sintoma depende principalmente do genótipo de *Capsicum* avaliado (DOGIMONT *et al.*, 1996). Existem diversas classificações propostas para isolados de PVY provenientes de pimentão. A maioria delas utiliza critérios de classificação de acordo com a virulência em genótipos diferenciais contendo genes de resistência específicos, sorologia ou sintomatologia em espécies hospedeiras. Uma das classificações mais utilizadas dividem os isolados em três patótipos, baseado na capacidade de contornar a resistência de dois alelos que se localizam no locus *pvr2*: P (0) – patótipo comum que infecta “Maravilha” e ‘Yolo Wonder’; P-1 – virulento em ‘Yolo Y’ e P-1.2 - virulento em ‘Yolo Y’ e em ‘Florida VR2’ (GÉBRÉ SÉLASSIÉ *et al.*, 1985). Posteriormente, um patótipo foi acrescentado pela

capacidade de causar sintomas em “Puerto Rico Wonder” porém não em Florida VR2 e Serrano Vera Cruz. Este patótipo foi denominado de PVY-PRW por Arteaga *et al.*, (1997) tendo sido posteriormente renomeado de PVY-1.3 por Arnedo-Andres *et al.*, (1998). Estes mesmos autores verificaram a ocorrência de isolados capazes de ocasionar sintomas em Yolo Wonder, Yolo Y, Florida VR2 e Puerto Rico Wonder e propuseram a classificação de um novo patótipo, o PVY-1.2.3. Deste modo podem-se classificar os isolados em cinco patótipos (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificação de isolados de PVY em patótipos baseado na resposta de suscetibilidade (S) ou resistência (R) nas cultivares diferenciadoras (GEBRE-SELASSIE *et al.*, 1985; ARTEAGA *et al.*, 1997; ARNEDO-ANDRÉS *et al.*, 1998).

Variedades diferenciais	Genes	Patotipos (P)				
		P-0	P-1	P-1.2	P-1.2.3	P-1.3
Yolo Wonder	<i>pvr2</i>	S	S	S	S	S
Yolo Y	<i>Pvr2</i> ¹	R	S	S	S	S
Florida VR-2	<i>Pvr2</i> ²	R	R	S	S	R
Puerto Rico Wonder	<i>Pvr2</i> ³	R	R	R	S	S
Serrano Vera Cruz	<i>Pvr2</i> ⁴	R	R	R	R	R
Serrano Criollo de Morelos 334	<i>Pvr4</i> , <i>pvr5</i>	R	R	R	R	R

Para conter o avanço da doença no Brasil, Nagai (1968) iniciou um programa de melhoramento genético de pimentão dando origem à série de cultivares Agrônomico e propôs a classificação dos isolados de PVY em dois grupos: PVY^N e PVY^W. Estes grupos e suas estirpes são classificados de acordo com a reação à infecção em plantas indicadoras como: *Datura stramonium* L., *Nicotiana tabacum* L., *Nicandra physaloides* Gaertn e cultivares de pimentão (BRIOSO, 1996b). Segundo Nagai (1984), o grupo N causa lesões locais pequenas e numerosas em folhas de *N. physaloides*, porém, em condição natural não infecta as culturas do tomateiro e batata. O grupo W é mais severo em *Capsicum* e ocasiona em tomate a “risca do tomateiro” (NAGAI, 1984; BRIOSO, 1996b). Na década de 80 surgiu a estirpe PVY^M (Patótipo 1.2), capaz de infectar as cultivares da série Agrônomico, especialmente a Agrônomico 10G, que prevaleceu no mercado por mais de duas décadas (NAGAI, 1993).

Posteriormente, Inoue-Nagata *et al.* (2002) verificaram que dois isolados anteriormente classificados como PVY^M, provenientes de pimentão do Estado de São Paulo e Distrito Federal, se tratavam de uma nova espécie de potyvirus, denominada de *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), classificada no gênero *Potyvirus*. Esta nova espécie já foi identificada em pimentão nos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais (TRUTA, 2002), e em tomate no Espírito Santo (MACIEL-ZAMBOLIM *et al.*, 2003) e Distrito Federal (DIANESE *et al.*, 2008). Os sintomas observados nas plantas infectadas são de distorção foliar, mosqueado e mosaico. Cunha *et al.*, (2004) verificaram que não ocorre reação cruzada em testes sorológicos entre o PVY e o PepYMV.

Resultados indicam que o PeYMV é transmitido por afídeos, porém ao contrário dos outros potyvirus a sequência de aminoácidos DAG presente na região codificadora para a proteína capsial, até o momento não foi encontrada em nenhum isolado estudado (CUNHA *et al.*, 2004; CASCARDO *et al.*, 2008). A transmissão do PepYMV pelas espécies *Aphis gossypii* e *Myzus persicae* já foi observada por Gioria *et al.*, (2009).

4.5 Resistência a potyvirus em *Capsicum* spp.

A utilização de variedades resistentes consiste no método de controle mais efetivo às doenças causadas por vírus. A resistência recessiva é resultado de um mecanismo passivo em que a ausência de interação entre um fator de resistência na planta e o fator de virulência no patógeno previne o vírus de se replicar normalmente (JANZAC, 2008). Esta resistência, no caso de potyvirus, é determinada pelo fator eucariótico de tradução 4E (ROBAGLIA & CARANTA, 2006). A falta ou presença de uma versão mutada neste fator previne a interação física com a VPg viral (KANG *et al.*, 2005, MAULE *et al.*, 2007). A resistência dominante segue o modelo da teoria Gene-a-Gene de Flor (1971). Neste caso, a interação direta ou indireta entre o fator de resistência e o gene de avirulência no patógeno desencadeia uma resposta de hipersensibilidade (HR) ou de extrema resistência (ER) (KANG *et al.*, 2005). Na ER não são observados sintomas após a inoculação e ausência de detecção do vírus pela técnica de ELISA ou hibridização do RNA, sugerindo que este mecanismo ocorra muito rápido restringindo a replicação viral (BENDAHMANE *et al.*, 1999). Já a HR caracteriza-se pelo surgimento de lesões locais necróticas visíveis nas folhas, iniciadas pela morte celular programada ao redor do sítio de infecção, impedindo o movimento célula-a-célula das partículas virais, porém sem influenciar a replicação viral a nível de protoplasto (KANG *et al.*, 2005). Os genes de resistência dominantes, em sua maioria, codificam proteínas com domínios repetidos ricos em leucina (LRR) e um sítio de ligação de nucleotídeos (NBS) (MAULE *et al.*, 2007).

Em *Capsicum*, já foram encontrados vários genes de resistência recessivos e dominantes, sendo predominante a resistência recessiva (GRUBE *et al.*, 2000). A nomenclatura dos genes de resistência a PVY foi proposta por Kyle & Palloix (1997), onde *pvr* é derivado de *potyvirus resistance gene*, seguido do número específico de cada locus. Em *Capsicum annuum* já foram identificados nove alelos recessivos no locus *pvr2* que conferem resistência a PVY e/ou TEV, identificados de *pvr2*¹ a *pvr2*⁹ (CHARRON *et al.*, 2008).

Nos últimos anos várias variedades resistentes a PVY foram introduzidas no Brasil. Magali R possui possivelmente o gene de resistência dominante *Pvr4* (ECHER, 2001; ECHER & COSTA, 2002) e é uma das variedades de pimentão bem aceitas no mercado por agregar as características de produtividade e resistência aos patótipos 0, 1, 1.2 e aos

isolados de PepYMV (GIORIA *et al.*, 2009). Janzac *et al.* (2008b) relatam que a resistência controlada pelo gene *Pvr4* permanece durável ao PVY por quase 15 anos.

O gene *Pvr4* foi inicialmente identificado na variedade mexicana *C. annuum* cv. Serrano Criollo de Morelos 334 (SCM334) (PALLOIX, 1992; DOGIMONT *et al.*, 1996). O PVY provoca uma reação de hipersensibilidade em SCM-334 nas folhas inoculadas e as lesões necróticas, quando encontradas, são pequenas. O PepMoV não ocasiona lesões necróticas nas folhas inoculadas de SCM 334 (DOGIMONT *et al.*, 1996).

A resistência a PVY também é verificada em *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. eximium*, *C. pubescens* e *C. flexuosum*. Porém, devido aos baixos níveis de resistência e qualidade dos frutos, estas espécies não são muito usadas em programas de melhoramento (PASKO *et al.*, 1996).

5. MATERIAL e MÉTODOS

5.1 Coleta nos campos de produção de pimenta e pimentão

Foram realizadas coletas nos municípios do Estado de São Paulo: Pirajú, Paranapanema, Santa Cruz do Rio Pardo, Sorocaba, São Miguel Arcanjo, Itapetininga, Reginópolis, Lins, Iacanga, Mogi-Mirim e Pirajuí, no período de outubro de 2007 a novembro de 2008 (Tabela 3). As plantas coletadas possuíam sintomas de mosaico e/ou deformação foliar e estas foram levadas ao Laboratório de Virologia da FCA/ Depto de Produção Vegetal da UNESP – Botucatu para serem analisadas para presença de vírus.

A empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda (Bragança Paulista-SP) forneceu uma coleção de 13 isolados, das quais 9 puderam ser reativados e estudados neste trabalho (Tabelas 4 e 5). O isolado 14 descrito por Gioria *et al.*, (2009) foi utilizado como padrão para avaliação do fenótipo em Magali R e Rubia R. As amostras selecionadas foram preservadas na forma de dessecado (BOS, 1994) e em sacos plásticos a -80°C.

Tabela 3: Período, número de amostras e localidade das plantas sintomáticas de *Capsicum* spp. coletadas durante outubro de 2007 a novembro de 2008.

Coletas	Período de Coletas	Número de amostras coletadas	Localidade
1	Outubro de 2007	8	Reginópolis
2	Outubro de 2007	33	Lins
3	Outubro de 2007	43	Piraju
4	Outubro de 2007	16	Santa Cruz do Rio Pardo
5	Novembro de 2007	8	Pirajuí
6	Dezembro de 2007	20	Sorocaba
7	Dezembro de 2007	16	Lins
8	Dezembro de 2007	12	Reginópolis
9	Janeiro de 2008	13	Piraju
10	Janeiro de 2008	28	Santa Cruz do Rio Pardo
11	Março de 2008	26	Sorocaba
12	Abril de 2008	8	Lins
13	Abril de 2008	25	Piraju
14	Abril de 2008	23	Iacanga
15	Mai de 2008	14	Sorocaba
16	Agosto de 2008	11	Lins
17	Agosto de 2008	0	Reginopolis
18	Agosto de 2008	22	Piraju
19	Agosto de 2008	12	Santa Cruz do Rio Pardo
20	Setembro de 2008	4	Mogi-Mirim
21	Outubro de 2008	25	Reginópolis
22	Outubro de 2008	2	Santa Cruz do Rio Pardo
23	Outubro de 2008	27	Lins
24	Novembro de 2008	12	Mogi-Mirim
Total		408	

5.2 Identificação e obtenção dos isolados

5.2.1 Análise das amostras pelo teste de ELISA indireto

Para auxiliar na detecção de potyvirus no material coletado, foi adquirido o antissoro policlonal universal anti-potyvirus (Agdia). O teste foi realizado por ELISA indireto, onde inicialmente as amostras foram maceradas em tampão de extração Indirect Sample Extraction (1,59 g de Na₂CO₃, 2,93 g de NaHCO₃, 0,2 g de NaN₃, 20 g de Polyvinylpyrrolidona (PVP) dissolvidos em 1000 mL de água destilada). Cem microlitros do macerado foi adicionado às cavidades das placas e incubado por 12 horas a 4°C. Após este período a placa foi lavada 7 vezes em tampão PBS-Tween [NaCl (8,0 g), Na₂HPO₄ (1,5 g), KH₂PO₄ (0,2 g), KCl (0,2 g), Tween 20 (500 µL) dissolvidos em 1000 mL de água destilada obtendo uma solução final com pH: 7.4] seguida da adição do anticorpo (Diluição 1:200) e incubado por 2 horas, seguido de lavagem por 7 vezes em tampão PBS-Tween. Posteriormente adicionou-se o conjugado (Diluição 1:200), incubou-se as amostras por 2 horas, seguido de lavagem por 7 vezes em tampão PBS-Tween. A revelação foi feita utilizando-se o p-nitrofenilfosfato (pastilha de 5 mg) diluída em 5 mL de tampão específico. As amostras foram consideradas positivas quando o valor de absorbância foi de pelo menos três vezes do obtido para as plantas sadias.

5.2.2 Verificação de infecções mistas e análise da variabilidade biológica.

Os isolados positivos para infecção por potyvirus pelo teste de ELISA indireto foram inoculados via extrato vegetal em plantas de Pimentão “Magda”, em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L. ‘TNN’) para manutenção dos isolados, além de abobrinha (*Cucurbita pepo* L. ‘Caserta’), tomateiro (*Solanum lycopersicum* - Santa Clara), *Datura stramonium* e *Datura metel* para avaliar a presença de possíveis infecções mistas com outros vírus. Os sintomas foram avaliados aos 30 dias após a inoculação.

5.2.3 Identificação de patótipos

Para análise nas cultivares diferenciadoras de pimentão contendo genes de resistência conhecidos, bem como em Magali R e Rubia R que provavelmente contém o gene de resistência *Pvr4*, foram selecionados preferencialmente isolados coletados em áreas geográficas distintas que não apresentaram infecção mista por outro vírus.

As amostras foram inoculadas na proporção 1: 10 utilizando-se tampão fosfato nas diferenciadoras descritas anteriormente. Após 10, 20 e 30 dias estas foram avaliadas para presença de sintomas, bem como testadas por Elisa Indireto para a presença de potyvirus, conforme descrito no item 5.2.1.

5.2.4 Identificação e caracterização molecular

5.2.4.1 Extração do RNA total para detecção de potyvirus e cucumovirus

Utilizaram-se duas metodologias para extração do RNA total. Pelo método de Bertheau *et al.*,(1998) folhas de plantas foram trituradas (1:5 p/v) em tampão PBS-Tween contendo PVP K25 a 2 % (p/v) e Na-DIECA 20 mM, e centrifugadas em tubos de microcentrífuga por 10 minutos a 13.000 rpm (Centrifuga Eppendorf 5804 R). Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, acrescentando-se SDS a 1%. Após incubação a 55 °C por 15 minutos, adicionou-se 100 µL de solução de acetato de potássio a 3M e seguindo por agitação da solução. Posteriormente as amostras foram incubadas em gelo por 5 minutos e centrifugadas por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionando-se 700 µL de NaI 6M e 5 µL de uma solução contendo silício. Agitou-se bem e manteve-se a solução por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida a solução foi centrifugada por um minuto a 5.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o ‘pellet’ lavado duas vezes com 500 µL de Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM e igual volume de etanol absoluto. Após centrifugação por 1 minuto a 5.000 rpm, o ‘pellet’ foi secado a vácuo (Speed Vaccum Eppendorf Concentrator 5301) e o RNA ressuspenso em 400 µL de água Milli-Q tratada com DEPC, seguido de incubação por

5 minutos a 55 °C e centrifugação por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante (300 µL) foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C. Utilizou-se uma alíquota de 3,5 µL para a RT-PCR.

A extração de RNA viral de plantas sintomáticas de pimentão e fumo ‘TNN’ foi realizada com o uso do Kit de extração Total RNA Purification da marca Norgen. A extração foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante. Utilizou-se uma alíquota de 5 µL para a RT-PCR.

5.2.4.2 Obtenção de oligonucleotídeos para a região codificadora para a proteína capsial do PVY e PepYMV.

Foi desenhado um par de oligonucleotídeos: PepNib (5’ GWTSGYGMMTTGGATGATG 3’) e PepUTR (5’ AGTAGTACAGGAAAAGCC 3’) que amplifica a porção codificadora para a proteína capsial. Inicialmente, previa-se utilizar o par de primers W-CIEN (5’ ATG GTT TGG TGY ATY GAR AAT 3’) e PV-1 (5’ GAT TTA GGT GAC ACT ATA GTT TTT TTT TTT TTT TTT 3’) descritos por Mota *et al.* (2004) e Gibbs & Mackenzie (1997), respectivamente, porém estes últimos amplificam parte da proteína capsial.

Para desenho dos primers PepNib/PepUTR fez-se um alinhamento de nucleotídeos entre sequências de PVY e PepYMV (Apêndice I). O fragmento amplificado possui em torno de 960 pares de bases.

5.2.4.3 Transcrição reversa e reação de polimerização em cadeia (RT-PCR)

A reação de RT-PCR para PVY e PepYMV foi realizada em uma só etapa utilizando-se os oligonucleotídeos PepNib e PepUTR, descritos no item 5.2.4.2. Foram utilizados os Kits de PCR Master Mix das marcas PROMEGA, AMPLIQON e FERMENTAS. Para um volume de 25 µL adicionou-se: 12,5 µL de tampão Master Mix, 1mM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade da transcriptase reversa AMV (*Avian myeloblastosis virus*, marca

Promega a 15 unidades/ μL) e água DEPC para completar o volume de 25 μL . O ciclo utilizado no termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf) consistiu em 30 minutos a 42 °C, seguido de 2 minutos à 95 °C e 39 ciclos de 92 °C/60 segundos, 53 °C/1 minutos e 72 °C/90 segundos e finalizando com 72 °C/10 minutos.

O total de 5 isolados não detectados pelos oligonucleotídeos PepNib e PepUTR foram amplificados pelos primers WCIEN e PV1 utilizando-se as mesmas concentrações de reagentes descritas acima. O ciclo utilizado para o par de primer WCIEN e PV1 consistiu em 30 minutos a 42 °C, 95 °C durante 5 minutos, 94 °C/2 minutos, 94 °C/30 segundos, 60 °C/45 segundos, 72 °C/55 segundos, 94 °C/30 segundos, 57 °C/45 segundos, 72 °C/55 segundos, 94 °C/30 segundos, 54 °C/45 segundos, 72 °C/55 segundos, 35 ciclos de 94 °C/30 segundos, 54 °C/45 segundos, 72 °C/55 segundos, e polimerização final de 68 °C durante 7 minutos.

Para CMV utilizou-se o par de primers 035-3 (5' GCC GTA AGT GGA TGG ACA A 3') e 038-8 (TAT GAT AAG AAR CTT GTT TCG CG 3') (BOARI *et al.*, 2000). O ciclo da reação consistiu em 42 °C por 30 minutos, 95 °C /2 minutos, 35 ciclos de 94 °C/ 1 minuto, 55 °C/ 2 minutos e 72 °C/ 2 minutos e finalizando com 72 °C / 5 minutos.

5.2.4.4 Extração de DNA total para detecção de Begomovírus

A metodologia utilizada para extração de DNA total foi descrita por Dellaporta *et al.*, (1983). Inicialmente, folhas das amostras coletadas foram depositadas em tubos de microcentrífuga com capacidade de 1500 μL e macerados com 500 μL de tampão de extração (100mM Tris-HCl pH8,0, 50mM EDTA pH8,0, 500mM NaCl, 10mM β -mercaptoetanol). Adicionou-se 33 μL de SDS 20% e em seguida as amostras foram incubadas em banho-maria à 65 °C por 10 min. Após este período, foi adicionado 160 μL de acetato de potássio 5M às amostras e posteriormente agitou-se por 2 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 g durante 10 minutos. Após a centrifugação, foi retirado 550 μL do sobrenadante, a qual foi adicionado 0,5 volumes de isopropanol, para precipitação do DNA. Centrifugou-se novamente a solução a 12.000 g por 10 minutos. Logo após, retirou-se cuidadosamente o sobrenadante sem remover o “pellet” lavando-se com 500 μL de etanol

70%, centrifugado por 5 minutos. As amostras foram secas a vácuo por 10 minutos. Após a secagem, o “pellet” foi ressuspendido em 150 µL de água mili-Q.

A reação de PCR foi realizada com os oligonucleotídeos universais específicos PAL1v1978 (5' GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCCCNGT 3') PAR1c496 (5' AATACTGCAGGGCTTYCTRTRACATRGG 3') (ROJAS *et al.*, 1993), que amplificam um fragmento com cerca de 1100bp do DNA-A de begomovírus, que corresponde a parte da ORF AC1 (Rep), a região comum e parte da ORF AV1 (CP) (ROJAS *et al.*, 1993). A reação consistiu em um ciclo iniciado por 95 °C/2 minutos, seguido de 25 ciclos a 94 °C/1 minuto, 57 °C/2 minutos e 72 °C/2 minutos e uma extensão final a 72 °C/10 minutos.

5.2.4.5 Análise do PCR em gel de agarose

Foram retirados 5 µL da reação de RT-PCR ou PCR para análise em gel de agarose a 1% em tampão TBE (0,1 M de ácido bórico, 0,02 mM EDTA pH 8,3). Utilizou-se o marcador 1kb Ladder da Invitrogen. O gel foi corado em uma solução de Brometo de Etídio (0,1 µL/ mL), e assim, visualizado em transiluminador.

5.2.4.6 Preparo de células competentes de *Escherichia coli* - estirpe XL1

Algumas amostras foram selecionadas para serem clonadas em vetor pGEMT-Easy (Promega) utilizando-se células competentes de *Escherichia coli* da estirpe XL1. Estas foram preparadas, afim de serem eletroporadas com o plasmídeo contendo o fragmento desejado. Inicialmente foi depositado em meio SOB uma pré-cultura de 5 mL da estirpe XL1, armazenada em -80°C. Esta solução foi deixada de um dia para o outro, sob agitação constante de 180 rpm a 37°C. No dia seguinte, repicou-se a pré-cultura em 500 mL de meio SOB, onde esta foi incubada a 37°C sob agitação por cerca de 4h até alcançar a densidade ótica de 0.750D₅₅₀. Centrifugou-se por 15 min a 2600g a 4°C. Posteriormente, o “pellet” foi ressuspendido duas vezes em glicerol a 10%, sendo em seguida centrifugado igualmente à etapa anterior. Após a segunda ressuspensão, retirou-se todo o sobrenadante e o

“pellet” foi ressuspensionado com algumas gotas de glicerol 10% e a OD₅₅₀ ajustada a 200-250 unidades/mL. Alíquotas de 80 µL foram armazenadas em tubos e armazenadas a -80°C.

5.2.4.7 Clonagem em vetor pGEM-T Easy

O total de 8 amostras foram selecionadas para serem clonadas no vetor comercial pGEM-T Easy (Promega). Inicialmente, os fragmentos obtidos por RT-PCR foram purificados através dos Kits comerciais Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) ou pelo QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). A reação de ligação foi realizada adicionando-se 4 uL de fragmento, 0,5 uL de vetor, 0,5 uL de T4 DNA ligase e 5 uL do tampão de ligação. A reação foi deixada durante a noite a 4 °C.

Após o período de ligação, o vetor foi eletroporado através do aparelho eletroporador BIO-RAD Micropulser em células competentes de *Escherichia coli* da estirpe XL1. As células de *E. coli* eletroporadas foram plaquedadas em meio LB Agar (USB) contendo ampicilina, X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indol-β-D-galactoside) a 2% e IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside) a 100 mM.

As colônias selecionadas na placa, foram transferidas para tubo Falcon contendo 2 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/mL). O tubo ficou sob agitação constante de 180 rpm a 37 °C, durante a noite. Após o crescimento bacteriano no meio, as bactérias foram colocadas em microtubos e precipitadas, sendo o sobrenadante descartado. Em seguida, adicionou-se 100µL de solução de Tris-HCl 1M pH 8,0 + EDTA 0,5M pH 8,0 + Glicose 1M, misturando-se até a solução tornar-se homogênea. Durante 5 min as amostras foram mantidas em temperatura ambiente e em seguida foi adicionado 200µL de solução de NaOH 0,2N e SDS 1%. Agitou-se no vortex a solução e depois esta foi mantida por 5 minutos no gelo. Posteriormente, adicionou-se 150 µL de solução de Acetato de Potássio 3M/5M pH 4,8 e depois agitou-se no vortex e manteve-se a solução por mais 5 minutos no gelo. Seguiu-se uma centrifugação a 12000 g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi depositado em novos microtubos. Adicionou-se 300µL de isopropanol e novamente a solução foi centrifugada a 12000 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet”

secado a vácuo por cerca de 15 min. Após este período, cada amostra foi ressuspensa em 20µL de água ultrapura autoclavada contendo RNase.

Para verificar a presença do fragmento nos plasmídeos foi realizada uma clivagem com a enzima de restrição *Eco RI* (Invitrogen) por 1h a 37 °C. Na reação foram utilizadas 6,7 µL de água, 1 µL de tampão React 3 (10x), 2 µL de miniprep, 0,3 µL de *Eco RI* (1U/mL), totalizando 10 µL da reação. Em seguida observou-se a presença dos fragmentos desejados através de eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

As amostras com fragmento de tamanho desejado foram selecionadas para extração do plasmídeo pelo QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), de acordo com as especificações do fabricante.

5.2.4.8 Sequenciamento do fragmento viral amplificado

O fragmento viral amplificado pelos oligonucleotídeos PepNib e PepUTR foi sequenciado utilizando-se diretamente o produto de PCR purificado pelo Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) ou pelo QIAquick PCR Purification Kit, ou utilizando-se clones contendo o fragmento de tamanho desejado. Estes foram quantificados utilizando-se o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder e High DNA Mass Ladder, ambos da marca Invitrogen. Para os plasmídeos recombinantes o par de primer utilizado foi SP6 e T7, cuja seqüência está presente no vetor. Os produtos foram enviados para a plataforma de sequenciamento do Centro de Estudos de Genoma Humano da USP ou empresa Macrogen (Seoul, Coreia).

5.2.4.9 Análise dos dados obtidos

As seqüências obtidas através dos produtos de RT-PCR e dos plasmídeos recombinantes foram analisadas pelo programa CLUSTAL Interative W (THOMPSON *et al.*, 1994). A construção das árvores filogenéticas foram realizadas pelo programa MEGA, versão 4 (www.megasoftware.net) (KUMAR *et al.*, 2001).

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Caracterização biológica de isolados de potyvirus provenientes de *Capsicum* spp.

Das 408 amostras analisadas, 105 foram positivas para potyvirus, comprovadas pelo teste de DAS-ELISA. Destas, 42 amostras de campo e 9 isolados provenientes da empresa Sakata Seed Sudamerica, foram selecionadas para verificação de possíveis infecções mistas com outros vírus, utilizando-se as plantas: *Nicotiana tabacum* L. ‘TNN’, *Capsicum* Magda, *Cucurbita pepo* L. ‘Caserta’, tomate cv. Santa Clara, *D. metel* e *D. stramonium*. As avaliações visuais foram realizadas 7, 14 e 21 dias após a terceira inoculação por extrato vegetal. Os sintomas observados, assim como a ausência destes, estão descritos na Tabela 4. Verificou-se a presença de infecção mista com o CMV somente para o isolado 406 comprovada pelo aparecimento de mosqueado na abobrinha “Caserta”, bem como através do teste de RT-PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos (Figura 2). Não foi realizado o teste de ELISA contra o CMV. Também pôde ser comprovada por PCR para as amostras 362 e 367 a infecção mista por begomovírus.

Nenhum isolado desencadeou sintomas em *D. stramonium*, podendo-se afirmar ausência de infecção pelas espécies PVX e TEV, pois ambas espécies infectam *D. stramonium* (BRUNT *et al.*, 1996). Somente o isolado 406 desencadeou sintomas nesta hospedeira, mas foi comprovada infecção mista de potyvirus e CMV. Em *D. metel* verificou-

se grande variabilidade de sintomas entre os isolados testados, desde indução de clareamento de nervura, deformações foliares, até ausência de sintomas e replicação viral. Em tomateiro cultivar Santa Clara não foi observado sintoma evidente para nenhum dos isolados testados, porém boa parte dos isolados replicou-se nesta hospedeira comprovado pelo teste de ELISA Indireto (Tabela 4).

Para a indicadora *Nicotiana tabacum* L. 'TNN' foram observados sintomas que variam de mosqueado a mosaico, com somente três amostras que se mostraram assintomáticas nesta planta. Para todos os isolados inoculados em fumo TNN foi detectada a presença de potyvirus pelo teste de ELISA indireto. Como não houve o aparecimento de lesão local necrótica nesta planta, pode-se afirmar que não havia infecção mista com TMV ou ToMV.

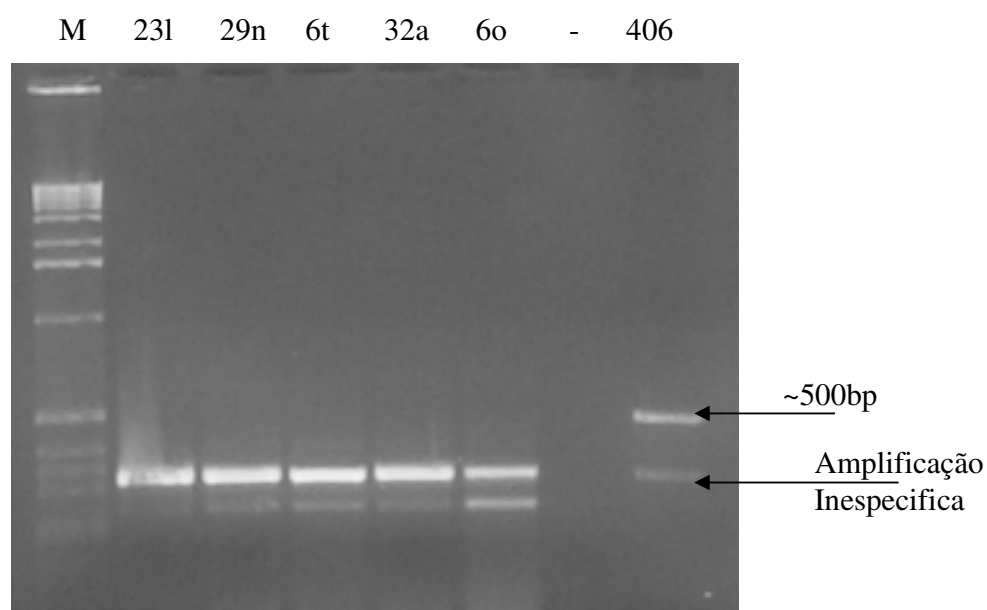


Figura 2 – Padrão eletroforético do produto de RT-PCR amplificado pelos oligonucleotídeos 038-8 e 035-3 (para detecção de CMV) para os isolados 227-231, 251-29n, 257-6t, 268-32 a, 273-6o, 406-V4, controle negativo (-), M: Marcador molecular 1Kb DNA ladder.

Tabela 4: Sintomatologia observada nas hospedeiras inoculadas com as amostras coletadas de campo e as fornecidas pela empresa SAKATA. Amostras em negrito foram consideradas positivas pelo teste sorológico de ELISA indireto, em que os valores destas foram pelo menos três vezes maiores que os valores dos controles negativos que variaram de 0.033 a 0.044. Legenda: Mosaico (M), Mosqueado (Mq), Deformação foliar (DEF), Lesão Local Necrótica (LLN), Clareamento Internerval (CI), Clareamento de Nervura (CN), Amarelecimento foliar (AM), nd: não determinado.*Valores de absorbância obtidos no teste de ELISA.

Código	Variiedade	Local de Coleta	Data	TNN	"Cucurbita pepo L."	Tomate "Sta. Clara"	<i>Datura stramonium</i>	<i>Datura metel</i>	Pimentão Magda	RT-PCR CMV	PCR Geminivirus
156-II	Prador R	Piraju	Jan/08	Mq	SS	SS/1.858*	SS/0.011	SS/0.019	SS	-	nd
225 - 23j	Margarita	Lins	Abr/08	M	SS	SS/2.114	SS/0.024	CN/0.288	Mq	-	nd
226-23k	Margarita	Lins	Abr/08	M	SS	SS/0.079	SS/0.073	CN + DEF/1.569	SS	-	nd
227-23l	Margarita	Lins	Abr/08	M	SS	SS/0.066	SS/0.034	M + DEF/0.0157	SS	-	nd
230-23m	Margarita	Iacanga	Abr 08	Mq	SS	SS/1.779	SS/0.040	SS/0.185	Mq	-	nd
233-23p	Margarita	Iacanga	Abr/08	Mq	SS	SS/0.194	SS/0.015	SS0.036	M	-	nd
234-23q	Margarita	Iacanga	Abr/08	M	SS	SS/0.010	SS/0.032	SS/0.025	CI	-	nd
235-23r	Margarita	Iacanga	Abr/08	Mq	SS	SS/0.006	SS/0.037	SS/0.039	CI	-	nd
236-23s	Margarita	Iacanga	Abr/08	Mq	SS	SS/0.289	SS/0.007	CN + DEF/1.973	SS	-	nd
237-23t	Margarita	Iacanga	Abr/08	M	SS	SS/2.668	SS/0.10	SS/0.009	SS	-	nd
239-29b	Eppo	Iacanga	Abr/08	M	SS	SS/2.376	SS/0.012	SS/0.004	SS	-	nd
240-29c	Eppo	Iacanga	Abr/08	M	SS	SS/2.416	SS/0.004	SS/0.034	SS	-	nd
241-29d	Eppo	Iacanga	Abr/08	Mq	SS	SS/0.439	SS/0.032	CN + DEF/0.154	M	-	nd
246-29i	Eppo	Iacanga	Abr/08	SS	SS	SS/0.275	SS/0.043	SS/0.024	M	-	nd
248-29k	Eppo	Iacanga	Abr/08	SS	SS	SS/0.164	SS/0.007	SS/0.006	Mq	-	nd
249-29l	Eppo	Iacanga	Abr/08	Mq	SS	SS/0.079	SS/0.028	SS/0.022	M	-	nd
251-29n	Eppo	Iacanga	Abr/08	Mq	SS	SS/0.036	SS/0.029	SS/0.011	SS	-	nd
254-6q	P-36 R	Piraju	Abr 08	Mq	SS	SS/0.292	SS/0.020	SS/0.052	M	-	nd
256-6s	P-36 R	Piraju	Abr/08	Mq	SS	SS/0.020	SS/0.006	LLN/0.024	M	-	nd
257-6t	P-36 R	Piraju	Abr/08	M	SS	SS/0.294	SS/0.009	SS/0.002	Mq	-	nd
259-1z	Prador R	Piraju	Abr/08	Mq	SS	SS/0.011	SS/0.018	SS/0.017	M	-	nd
264-36b	Lipari	Piraju	Abr/08	Mq	SS	SS/0.015	SS/0.028	SS/0.154	M	-	nd

Continuação da Tabela 4

Código	Variedade	Local de Coleta	Data	TNN	“Cucurbita pepo L.”	Tomate “Sta. Clara”	<i>Datura stramonium</i>	<i>Datura metel</i>	Pimentão Magda	RT-PCR CMV	PCR Geminivirus
265-35 ^a	Dinamo	Piraju	Abr/08	Mq	SS	SS/3.285	SS/0.034	SS/0.018	SS	-	nd
268-32 ^a	Zarco	Piraju	Abr/08	Mq	SS	SS/0.037	SS/0.021	SS/0.028	Mq	-	nd
273-6 ^o	P-36	Piraju	Abr/08	Mq	SS	SS/0.009	SS/0.66	SS/0.034	SS	-	nd
295	Lilac	Piraju	Ago/08	Mq	SS	SS/0.150	SS/0.002	SS/0.008	M	-	nd
302	Lilac	Piraju	Ago/08	Mq	SS	SS/0.041	SS/0.009	SS/0.015	CN	-	nd
304	Paloma	Piraju	Ago/08	M	SS	SS/0.250	SS/0.063	CN/0.067	M	-	nd
331	Dahra R	Lins	Ago/08	Mq	SS	SS/0.392	SS/0.038	SS/0.010	SS	-	nd
346	Dahra R	Lins	Out/08	Mq	SS	SS/3.252	SS/0.043	Morte	Mq	-	-
347	Dahra R	Lins	Out/08	Mq	SS	SS/0.311	SS/0.012	SS/0.025	M + DEF.	-	-
348	Dahra R	Lins	Out/08	M	SS	SS/0.150	SS/0.002	SS/0.008	Mq	-	-
349	Dahra R	Lins	Out/08	Mq	SS	SS/0.122	SS/0.035	SS/0.059	M + AM.	-	-
359	Dahra R	Lins	Out/08	Mq	SS	SS/0.106	SS/0.015	SS/0.006	SS	-	-
362	Magali R	Lins	Out/08	Mq	SS	SS/0.282	SS/0.006	SS/0.027	CI	-	+
367	Margarita	Reginópolis	Out/08	SS	SS	SS/0.027	SS/0.005	SS/0.005	SS	-	+
382	Eppo	Reginópolis	Out/08	Mq	SS	SS/0.024	SS/0.041	SS/0.042	SS	-	-
388-1c	Cambuci	Mogi-Mirim	Out/08	Mq	SS	SS/0.281	SS/0.012	SS/0.018	Mq	-	-
389-2c	Cambuci	Mogi-Mirim	Out/08	Mq	SS	SS/0.032	SS/0.022	SS/0.012	SS	-	-
402	Cambuci	Mogi-Mirim	Nov/08	Mq	SS	SS/0.361	SS/0.087	SS/0.031	Mq	-	-
403	Cambuci	Mogi-Mirim	Nov/08	Mq	SS	SS/0.255	SS/0.019	SS/0.0137	Mq	-	-
406-V4	-	-	Nov/08	M	Mq	SS/0.049	Mq/0.068	CN/0.025	M	+	-
1 Sak	Pimentão	Bragança Paulista	Mar/96	Mq	SS	SS/0.009	SS/0.017	SS/0.019	SS	-	-
2 Sak	Pimentão	Buritama	Mar/96	M	SS	SS/0.004	SS/0.022	SS/0.010	M	-	-
3 Sak	Pimentão	Paulínia	Mar/96	Mq	SS	SS/0.234	SS/0.013	SS/0.015	M	-	-
6 Sak	Pimentão	Lins	Mar/99	M	SS	SS/0.042	SS/0.038	SS/0.010	Mq	-	-
9 Sak	Pimentão	Lins	Abr/99	M	SS	SS/0.062	SS/0.019	SS/0.013	Mq	-	-
10 Sak	Pimentão	Bragança Paulista	Out/99	M	SS	SS/0.007	SS/0.009	SS/0.010	M	-	-
11 Sak	Tomate	Lins	Out/99	Mq	SS	SS/0.092	SS/0.024	SS/0.132	Mq	-	-
12 Sak	Pimentão	Mucugê – Ba	Ago/00	M	SS	SS/0.031	SS/0.041	SS/0.016	Mq	-	-
13 Sak	Pimentão	Bragança Paulista	Abr/02	Mq	SS	SS/0.168	SS/0.014	SS/0.050	Mq	-	-

6.2 Classificação dos isolados provenientes de *Capsicum* spp em patótipos e identificação molecular.

Dentre os isolados testados, a maioria pôde ser classificada nos três patótipos de PVY: PVY-0, PVY-1 e PVY-1.2 propostos por Gebre Selassie *et al.*, (1985), bem como nos patótipos PVY-1.3 e PVY-1.2.3 propostos por Arnedo-Andrés *et al.*, (1998) descritos na Tabela 2. Dentre os 51 isolados testados, dois foram classificados em patótipo PVY-0, três em patótipo PVY-1, seis em patótipo PVY-1.2, treze em patótipo PVY-1.3 e onze em patótipo PVY-1.2.3.

Como patótipo PVY-0, capaz de causar sintomas somente em Yolo Wonder, foram classificados os isolados 225-23j e 259-1z, coletados na região de Lins e Piraju, respectivamente. O isolado 225-23j foi amplificado com os oligonucleotídeos PepNIB/PepUTR obtendo-se a sequência completa da proteína capsidial indicando tratar-se da espécie PVY. Os sintomas para este isolado podem ser observados na Figura 3. Truta (2002) não observou a ocorrência deste patótipo em amostras coletadas no Sudeste do Brasil, porém o patótipo 0 é o mais encontrado na França, Itália e Espanha (CARANTA, THABUIS & PALLOIX, 1999a).

Três isolados (156-11 proveniente de Piraju; 230-23m e 248-29k de Iacanga) foram classificados como patótipo PVY-1, observando-se sintomas de mosaico em Yolo Wonder e Yolo Y (Figura 4). Como patótipo PVY-1.2 foram classificados os isolados 2, 3 e 6 provenientes da empresa Sakata Seed Sudamérica, bem como os isolados 256-6s, 265-35a provenientes de pimentão da região de Piraju e 389-2c proveniente de pimenta Cambuci da região de Mogi-Mirim. Comprovou-se pelo sequenciamento parcial da proteína capsidial que o isolado 265-35a pertence possivelmente à espécie PepYMV e para o isolado 389-2c obteve a sequência completa da proteína capsidial indicando tratar-se da espécie PepYMV. Para o isolado 2 coletado em Buritama (SP) e isolado 6 coletado em Lins (SP) em 1999 obteve-se sequências parciais da CP indicando-se tratar-se possivelmente da espécie PepYMV. Os sintomas para o isolado 265-35a nas diferenciais utilizadas podem ser observados na Figura 5.

Como patótipo PVY 1.3, que agrupa os isolados de PVY que causam sintomas em Yolo Wonder, Yolo Y e Puerto Rico Wonder, porém sem causar sintomas em Florida VR2 e Serrano Vera Cruz, foram classificados treze isolados coletados na região de

Lins, Iacanga, Reginópolis e Mogi-Mirim. Três isolados 249-29l, 251-29n e 348 tiveram a CP completamente sequenciada, indicando tratar-se da espécie PepYMV. Para os isolados 347 e 388-1c sequências parciais da CP foram obtidas indicando possivelmente tratar-se também do PepYMV. Os sintomas nas hospedeiras diferenciais podem ser observados na Figura 6 para o isolado 348.

O patótipo PVY-1.2.3, proposto por Arnedo-Andrés *et al.*, (1998) causa sintomas em Yolo Wonder, Yolo Y, Florida VR2 e Puerto Rico Wonder. Este comportamento foi observado para onze isolados, sendo quatro destes (239-29b, 240-29c, 241-29d, 246-29i) coletados na região de Iacanga, tendo sido o 240-29c identificado como PepYMV; quatro (254-6q, 273-6o, 295 e 302) provenientes da região de Piraju, obtendo-se sequências parciais da CP com o par de primer PV1 e WCIEN para os dois primeiros isolados indicando infecção pelo PepYMV; um isolado (382) proveniente de Reginópolis e identificado como PepYMV além dos isolados 12 e 13 fornecidos pela Sakata Seed Sudamérica. Os sintomas nas diferenciais para o isolado 273-6o pode ser verificado na Figura 7.

A maioria dos isolados pertencem à espécie PepYMV e não ao PVY (Figura 13 e Figura 14), indicando que a primeira espécie predomina em pimentão e pimenta no estado de São Paulo. Apesar da classificação em patótipos inicialmente ter sido proposta para o PVY, ela permitiu dos 51 isolados analisados, a classificação de 35 isolados em patótipos. Dentre os que não puderam ser classificados em patótipos observou-se que alguns apresentaram comportamento similar nas diferenciais, como foi o caso dos isolados 226-23k e 227-23l coletados em Lins, cujos sintomas foram observados em Yolo Wonder, Yolo Y, Puerto Rico Wonder e na Serrano Criollo de Morelos 334 (SCM-334), como pode ser observado na Figura 8 para o isolado 227-23l. A amostra 227-23l teve a CP sequenciada parcialmente demonstrando tratar-se possivelmente da espécie PVY. Os isolados de PVY até então estudados causam reação de hipersensibilidade em SCM-334 (DOGIMONT *et al.*, 1996; JANZAC *et al.*, 2008b), bem como Truta (2002) não verificou a ocorrência de sintomas nesta hospedeira para os isolados de PepYMV testados.

Quatro isolados de potyvirus (257-6t, 268-32a, 304 e 403), ambos de Piraju foram capazes de causar sintomas em Yolo Wonder, Yolo Y, Florida VR-2, Puerto Rico Wonder e SCM-334, como pode ser observado na Figura 9 para o isolado 304. As amostras 257-6t e 268-32a tiveram sua CP completa sequenciada tratando-se da espécie PepYMV, enquanto que para os isolados 304 e 403, obteve-se sequências parciais da CP indicando

tratar-se possivelmente da espécie PepYMV. As amostras 264-36b e o isolado 9 proveniente da empresa Sakata, obtiveram mesmo padrão de reação nas variedades diferenciais, onde puderam ser observados sintomas em Yolo Wonder, Florida VR-2 e Puerto Rico Wonder. Para o isolado 9 obteve-se a sequência parcial da CP, indicando ser possivelmente o PepYMV.

As amostras 233-23P e 331, coletadas em Iacanga e Lins respectivamente, causaram sintomas somente em Yolo Wonder e Puerto Rico Wonder. O isolado 331 foi sequenciado e sua CP completa foi obtida, indicando tratar-se da espécie PVY. Os isolados 234-23Q, 237-23T, e 10 Sak também apresentaram comportamento comum, infectando Yolo Wonder, Yolo Y, Puerto Rico Wonder e SCM-334. Ambos 234-23Q e 237-23T tiveram a CP completamente sequenciada indicando tratar-se da espécie PepYMV. O isolado 1 proveniente da empresa Sakata Seed Sudamérica causou sintomas de mosaico somente nas diferenciais Yolo Wonder e Florida VR-2. Este foi coletado na cidade de Bragança Paulista em 1996, e pela sequenciamento parcial da CP pode-se afirmar que possivelmente trata-se da espécie viral PepYMV. O isolado 11 Sak também possui comportamento único infectando Yolo Wonder, Florida VR2 e Puerto Rico Wonder.

Por último, o isolado 14 fornecido pela empresa Sakata e previamente caracterizado por Gioria *et al.* (2009) utilizado como controle nos experimentos, causou sintomas evidentes em Yolo Wonder, Yolo Y, Florida VR-2, Puerto Rico Wonder, além de Rubia R e Magali R. Em Serrano Vera Cruz e Serrano Criolo de Morelos-334 não foi observado sintoma evidente, mas foi comprovada infecção viral pelo teste de ELISA..

As análises nas hospedeiras diferenciais de *Capsicum* spp. indicam alta variabilidade biológica entre os isolados estudados. Apesar da classificação ter sido proposta para a espécie PVY, mostrou-se neste trabalho útil para avaliar o comportamento biológico de isolados de PepYMV. Pôde-se observar predominância de isolados patótipo 1.3 e 1.2.3 cuja resistência conferida pelos genes recessivos *pvr2*¹, *pvr2*² e *pvr2*³ não é efetiva (salvo o gene *pvr2*² para os isolados patótipo 1.3).

Os alelos *pvr2*¹ e *pvr2*² estão presentes na maior parte dos híbridos F1 encontrados no mercado europeu. No mercado americano o alelo *pvr2*² é utilizado contra as estirpes comuns de TEV, algumas vezes em combinação com o gene *pvr3* para resistência ao PepMoV (JANZAC, 2008). Os resultados reforçam que estes alelos não são realmente mais indicados para o mercado brasileiro, principalmente pelo PVY praticamente não ser mais encontrado nas principais áreas produtoras de pimentão como já anteriormente verificado por

Truta *et al.*, (2004) e também pelos resultados aqui demonstrados, além de que a maioria das estirpes de PepYMV serem capazes de contornar estes genes.

Em *C. annuum* 'Serrano Criollo de Morelos 334 (SCM-334), que possui o gene dominante *Pvr4* descrito como conferindo resistência a todos os patótipos conhecidos de PVY e PepMoV (PALLOIX, 1992; DOGIMONT *et al.*, 1996), além do gene recessivo *pvr5* (CARANTA *et al.*, 1999b), verificou-se que a maioria dos isolados não causaram sintomas visíveis, salvo nove isolados que induziram mosaico ou mosqueado. Nos híbridos comerciais Rubia R e Magali R, verificou-se que todos os isolados coletados neste trabalho não foram capazes de causar sintomas evidentes de infecção viral, com exceção do isolado 14 Sak utilizado como controle nas inoculações e previamente caracterizado por Gioria *et al.* (2009). Entretanto, para vários isolados foi detectada a presença viral nos híbridos Rubia R e Magali R, comprovada pelo teste de Elisa indireto com antissoro anti-potyvirus (Tabela 5), indicando replicação viral nestes genótipos.

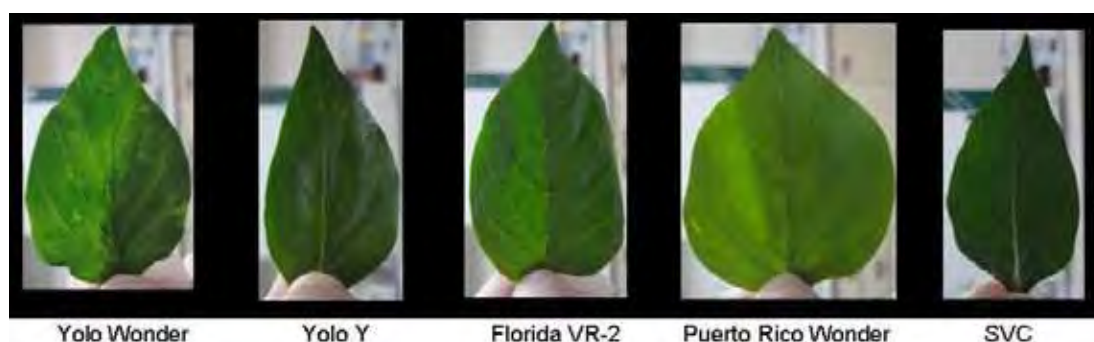
Desde a década de 90, a resistência dominante conferida pelo gene *Pvr4* foi introduzida em híbridos comerciais, conferindo uma resistência aos diferentes isolados de PVY, ao PepMoV e PepYMV. Esta resistência vem sendo empregada tanto no mercado europeu como americano principalmente pelo seu amplo espectro de ação (JANZAC, 2008). Sugere-se que a resistência verificada em Rubia R e Magali R contra os isolados de PepYMV esteja ligada ao gene dominante *Pvr4* (GIORIA *et al.*, 2009). A expressão da resistência ligada ao gene *Pvr4* não é dependente de temperatura, porém sintomas mais intensos são observados a baixas temperaturas e baixa radiação solar (DOGIMONT, 1993 citado por ARNEDO-ANDRÉS, 2006).

Atualmente existem doze genes dominantes isolados e sequenciados que conferem resistência aos vírus de plantas (MAULE *et al.*, 2007). Do ponto de vista fenotípico a resistência dominante está quase sempre ligada a uma resposta de hipersensibilidade - HR (FRASER, 1986), onde a HR é iniciada pelo reconhecimento específico de um gene de avirulência no patógeno e um gene de resistência no hospedeiro, desencadeando uma morte celular programada em torno do sítio de infecção, formando lesões locais necróticas visíveis e por consequência impedindo a migração do vírus para as células vizinhas (FRASER, 1986; KANG *et al.*, 2005). Em alguns casos o fenótipo verificado pode ser uma resistência extrema onde não há lesões necróticas em torno da infecção além de ausência de replicação nos tecidos vizinhos (JANZAC *et al.*, 2008b). Deste modo, como a resistência em Rubia R e Magali R

observada para muitos isolados de PepYMV foi a ausência de sintomas sem HR, porém com replicação viral, sugere-se a existência de outros fatores, além da presença do gene *Pvr4*, que interfiram durante esta interação. O mesmo pode ser dito para SCM-334, que além do gene *Pvr4*, possui o gene recessivo *pvr5*, que também permitiu a replicação viral de alguns dos isolados, porém sem aparecimento de sintomas.

Gioria *et al.*, (2009) verificaram que um isolado de PepYMV ocasionou lesões locais necróticas no híbrido Magali R, típico de uma resistência dominante. Porém, para o mesmo isolado não foi observado nenhum sintoma em Rubia R. Dogimont *et al.* (1996) também observaram sintomas necróticos sistêmicos em um híbrido de pimentão obtido através do cruzamento entre SCM-334 e Yolo Wonder, após a inoculação com isolados de PVY, sugerindo a existência de um gene dominante nomeado *Pn1*, controlando esta resposta de necrose sistêmica. Em outro estudo com cruzamentos de SCM-334 e Magda, não foram observados sintomas necróticos sistêmicos (BOITEUX *et al.*, 1996). Arnedo-Andrés *et al.*, (2006) também observaram sintomas diversos em cruzamentos entre linhas derivadas de SCM-334.

A resistência conferida por Magali R e Rubia R permanece durável contra os isolados predominantes de PepYMV encontrados no campo. Até o momento não foi verificado nenhum caso de adaptação natural de estirpes de PVY ou PepMoV capazes de contornar esta resistência (JANZAC *et al.*, 2008b; GIORIA *et al.*, 2009). O “background” genético da planta é igualmente importante para manter um bom nível durabilidade dos genes dominantes (JANZAC, 2008). Porém o fato de existir pelo menos uma estirpe de PepYMV encontrada naturalmente no campo (isolado 14 Sak) descrita por Gioria *et al.*(2009), reforça a necessidade de melhoristas estarem atentos para a procura de novas fontes de resistência, principalmente no Brasil onde o PepYMV predomina em relação ao PVY.



Isolado 225-23j – Patótipo 0

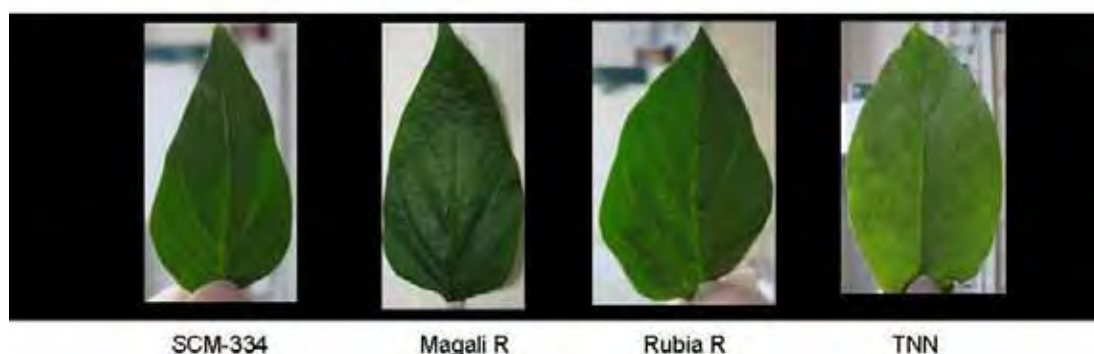
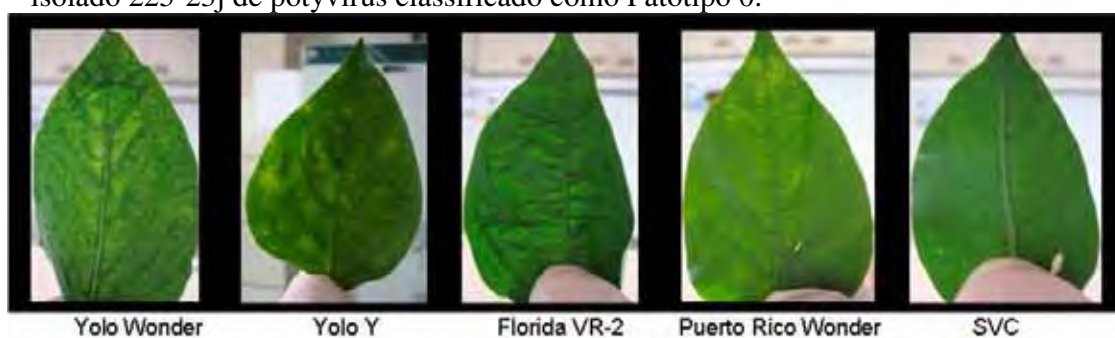


Figura 3 – Reação das variedades diferenciais à inoculação através de extrato vegetal com isolado 225-23j de potyvirus classificado como Patótipo 0.



Isolado 156-1L – Patótipo 1



Figura 4 – Reação das variedades diferenciais à inoculação através de extrato vegetal com isolado 156-1L de potyvirus classificado como Patótipo 1.

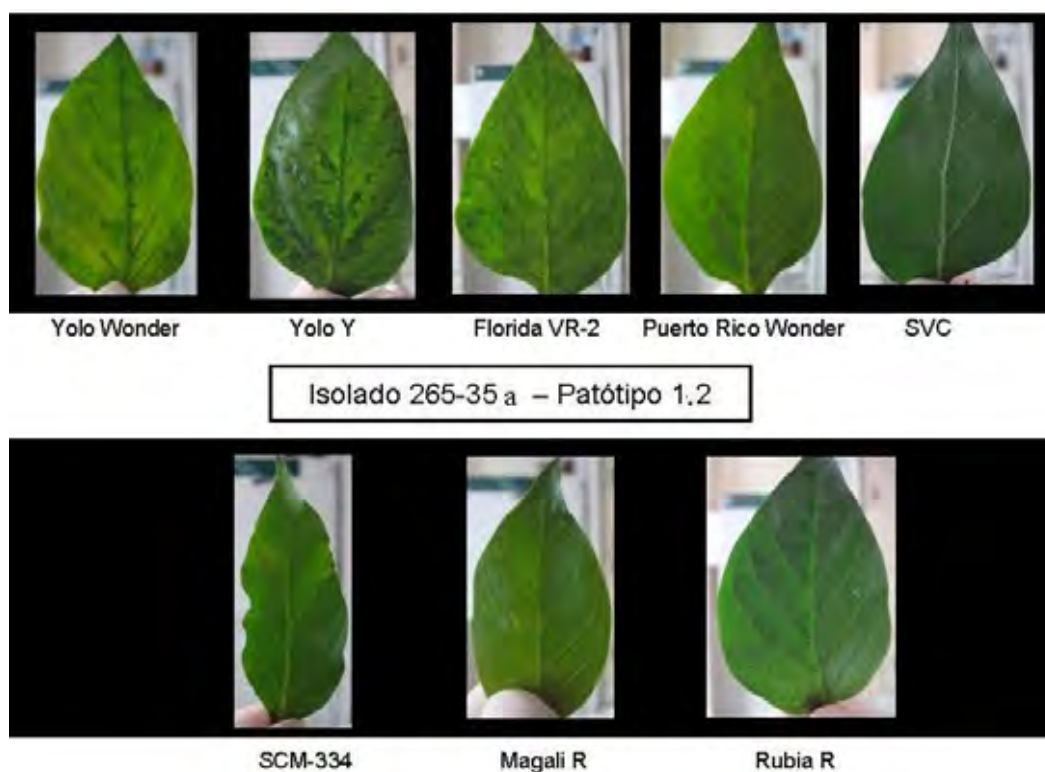


Figura 5 – Reação das variedades diferenciais à inoculação através de extrato vegetal com isolado 265-35 A de potyvirus classificado como Patótipo 1.2.

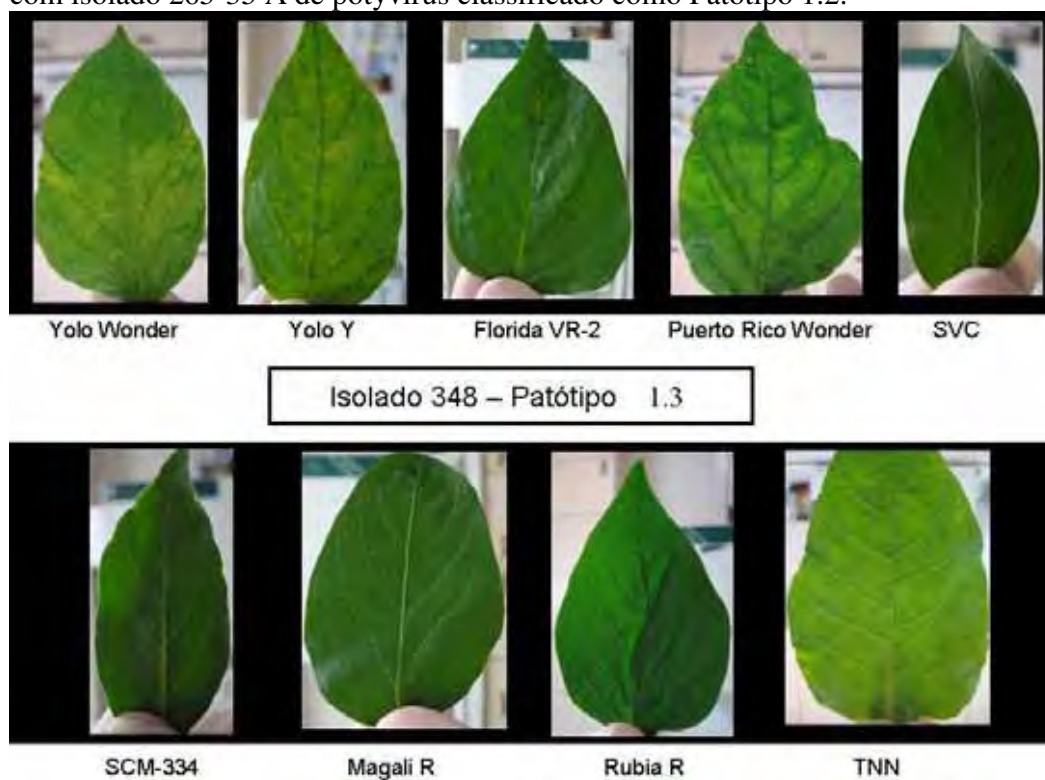


Figura 6 – Reação das variedades diferenciais à inoculação através de extrato vegetal com isolado 348 de potyvirus classificado como Patótipo 1.3.

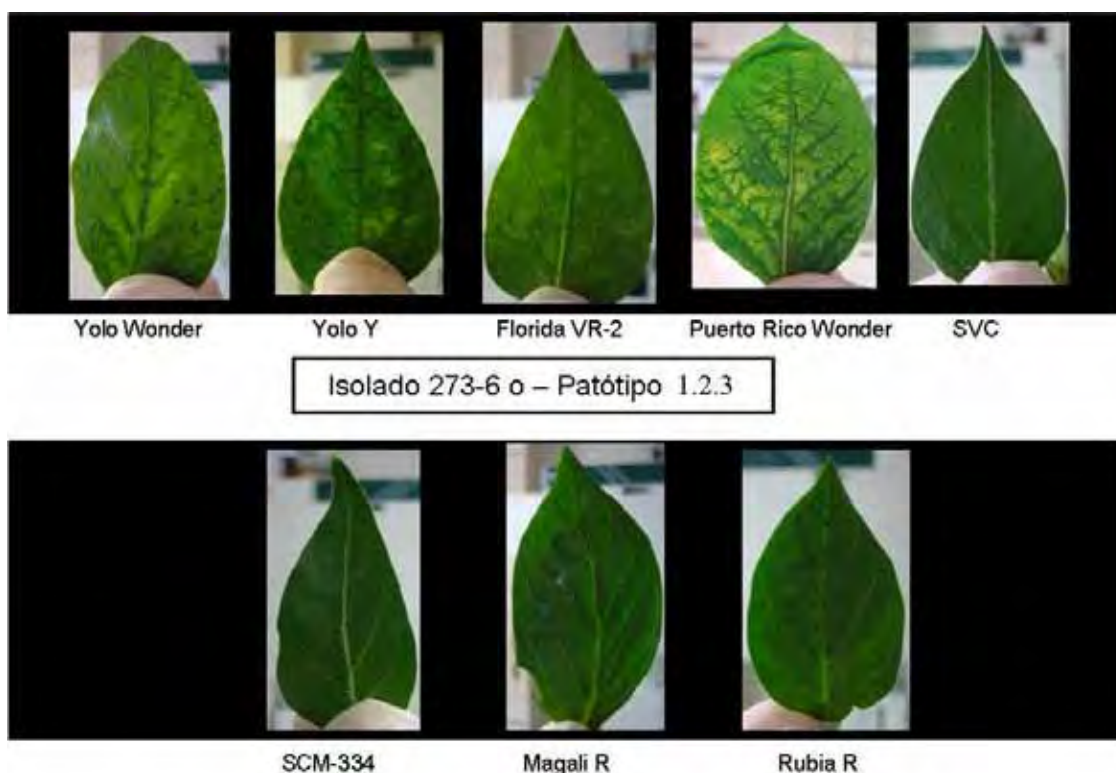


Figura 7 – Reação das variedades diferenciais à inoculação através de extrato vegetal com isolado 273 – 6 o de potyvirus classificado como Patótipo 1.2.3.

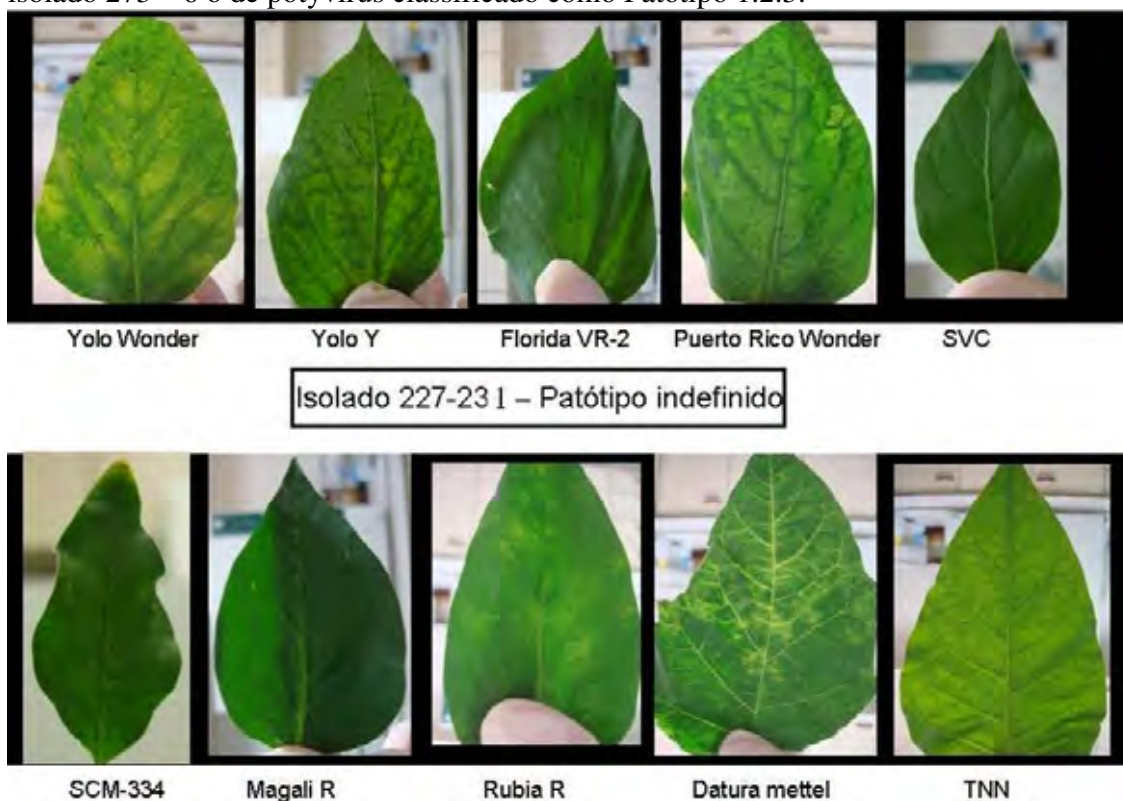


Figura 8 – Reação das variedades diferenciais à inoculação através de extrato vegetal com isolado 227- 231 de potyvirus de Patótipo indefinido.

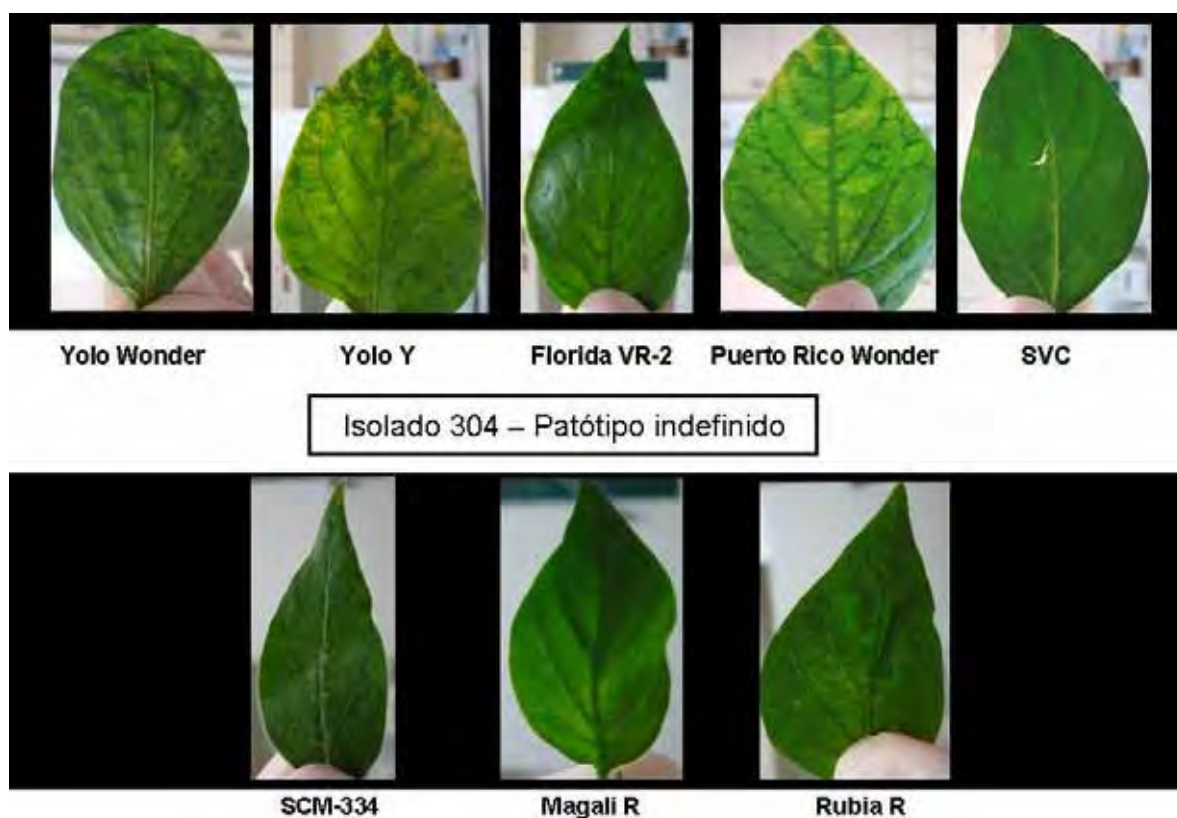


Figura 9 – Reação das variedades diferenciais à inoculação através de extrato vegetal com o isolado 304 de potyvirus de Patótipo indefinido.

Tabela 5: Reação dos isolados nas hospedeiras diferenciadas, Rubia R e Magali R. *Amostras em negrito foram consideradas positivas pelo teste sorológico de ELISA indireto, em que os valores de absorbância foram pelo menos três vezes maiores que os valores dos controles negativos que variaram de 0.010 a 0.035. ** Isolado fornecido pela Sakata Seed Sudamérica e previamente caracterizado por Gioria *et al.* (2009). Legenda: Mosaico (M), Mosqueado (Mq), Sem sintoma (SS)*Valores de absorbância obtidos no teste de ELISA.

Código	Local de Coleta	Yolo Wonder	Yolo Y	Florida VR-2	Puerto Rico Wonder	SVC	SCM-334	Rubia R	MagaliR	Espécie	Patótipo
156-1l	Piraju	M/0.271*	M	SS/0.030	SS/0.008	SS/0.098	SS/0.105	SS/0.086	SS/0.310		1
225-23j	Lins	M/0.518	SS	SS	SS/0.084	SS/0.111	SS/0.097	SS/0.091	SS/0.090	PVY	0
226-23k	Lins	M	M	SS	M/0.346	SS/0.069	Mq/0.109	SS/0.085	SS/0.109		?
227-23l	Lins	M	M	SS	M/0.498	SS/0.082	M/0.109	SS/0.109	SS/0.100	PVY	?
230-23m	Iacanga	M/2.759	M/0.200	SS	SS/0.240	SS/0.074	SS/0.105	SS/0.110	SS/0.116		1
233-23p	Iacanga	M	SS	SS	M/0.418	SS/0.276	SS/0.112	SS/0.119	SS/0.069		?
234-23q	Iacanga	M	M	SS	M/0.302	SS/0.108	Mq/0.226	SS/0.091	SS/0.080	PepYMV	?
235-23r	Iacanga	M	M	SS	M/0.378	SS/0.071	SS/0.118	SS/0.108	SS/0.119		1.3
236-23s	Iacanga	M	M	SS	M/0.100	SS/0.065	SS/0.088	SS/0.090	SS/0.114		1.3
237-23t	Iacanga	M	M	SS	M/0.610	SS/0.117	Mq/0.289	SS/0.063	SS/0.080	PepYMV	?
239-29b	Iacanga	M	M	Mq	M/0.231	SS/0.066	SS/0.108	SS/0.025	SS/0.094		1.2.3
240-29c	Iacanga	M	Mq	M	M/0.291	SS/0.093	SS/0.082	SS/0.084	SS/0.086	PepYMV	1.2.3
241-29d	Iacanga	M + Def	Mq	M + Enc	M/0.123	SS/0.064	SS/0.022	SS/0.038	SS/0.018		1.2.3
246-29i	Iacanga	M	M	M	Mq/0.543	SS/0.064	SS/0.221	SS/0.171	SS/0.128		1.2.3
248-29k	Iacanga	M	M	SS	SS/0.726	SS/0.082	SS/0.074	SS/0.093	SS/0.088		1
249-29l	Iacanga	M	M	SS	M/0.857	SS/0.074	SS/0.183	SS/0.108	SS/0.267	PepYMV	1.3
251-29n	Iacanga	M	M	SS	M/0.207	SS/0.304	SS/0.073	SS/0.093	SS/0.120	PepYMV	1.3
254-6q	Piraju	M	M	M	Mq/0.168	SS/0.127	SS/0.120	SS/0.074	SS/0.079	PepYMV	1.2.3
256-6s	Piraju	M	M	M	SS/0.294	SS/0.097	SS/0.078	SS/0.073	SS/0.086		1.2
257-6t	Piraju	M	M	M	M/0.146	SS/0.097	M/0.416	SS/0.091	SS/0.089	PepYMV	?
259-1z	Piraju	M	SS	SS	SS/0.075	SS/0.063	SS/0.063	SS/0.096	SS/0.105		0
264-36b	Piraju	Mq	SS	M	Mq/0.073	SS/0.075	SS/0.024	SS/0.118	SS/0.153		?
265-35a	Piraju	M	M/0.701	M/0.853	SS/0.080	SS/0.077	SS/0.072	SS/0.080	SS/0.080	PepYMV	1.2
268-32a	Piraju	M	M	M	M/0.221	SS/0.060	M/1.120	SS/0.037	SS/0.071	PepYMV	?
273-60	Piraju	M	M	M	M/0.324	SS/0.086	SS/0.090	SS/0.093	SS/0.359	PepYMV	1.2.3
295	Piraju	M + Enc	M	M	M/0.272	SS/0.057	SS/0.085	SS/0.054	SS/0.081	PepYMV	1.2.3
302	Piraju	M	M	M	Mq/0.080	SS/0.096	SS/0.105	SS/0.109	SS/0.114		1.2.3
304	Piraju	M	M	M	M/0.268	SS/0.082	Mq/0.302	SS/0.093	SS/0.179	PepYMV	?

Continuação da Tabela 5

Código	Local de Coleta	Yolo Wonder	Yolo Y	Florida VR-2	Puerto Rico Wonder	SVC	SCM-334	Rubia R	MagaliR	Espécie	Patótipo
331	Lins	M/0.003	SS/0.003	SS/0.003	M/0.115	SS/0.100	SS/0.081	SS/0.079	SS/0.092	PVY	?
346	Lins	M + Def	M	SS	M/0.932	SS/0.057	SS/0.110	SS/0.114	SS/0.112		1.3
347	Lins	M	Mq	SS	Mq/0.240	SS/0.080	SS/0.223	SS/0.107	SS/0.107	PepYMV	1.3
348	Lins	M	M	SS	M/0.212	SS/0.064	SS/0.262	SS/0.088	SS/0.75	PepYMV	1.3
349	Lins	M	M	SS	M/0.369	SS/0.074	SS/0.080	SS/0.113	SS/0.164		1.3
359	Lins	M	M	SS	M/0.408	SS/0.053	SS/0.103	SS/0.094	SS/0.093		1.3
362	Lins	Mq	Mq	SS	M/0.251	SS/0.024	SS/0.129	SS/0.100	SS/0.116		1.3
367	Reginópolis	Mq	M	SS	M/0.327	SS/0.072	SS/0.081	SS/0.178	SS/0.118	PepYMV	1.3
382	Reginópolis	M	M	M	M/0.463	SS/0.029	SS/0.256	SS/0.106	SS/0.130	PepYMV	1.2.3
388-1c	Mogi-Mirim	Mq	M+Def	SS	M/0.195	SS/0.104	SS/0.098	SS/0.063	SS/0.086	PepYMV	1.3
389-2c	Mogi-Mirim	M	MQ	M/0.031	SS/0.060	SS/0.047	SS/0.015	SS/0.087	SS/0.105	PepYMV	1.2
402	Mogi-Mirim	M	M	SS	M/0.095	SS/0.204	SS/0.182	SS/0.118	SS/0.155		1.3
403	Mogi-Mirim	M	M	Mq + CI	M/0.152	SS/0.130	M/0.121	SS/0.089	SS/0.125	PepYMV	?
1 Sak	Bragança Paulista	M/0.346	SS	M	SS/0.082	SS/0.009	SS/0.072	SS/0.073	SS/0.132	PepYMV	?
2 Sak	Buritama	M	M	M	SS/0.116	SS/0.086	SS/0.117	SS/0.103	SS/0.401	PepYMV	1.2
3 Sak	Paulínia	M	M	M	SS/0.814	SS/0.110	SS/0.085	SS/0.102	SS/0.108		1.2
6 Sak	Lins	M	M	M	SS/0.590	SS/0.091	SS/0.091	SS/0.076	SS/0.076	PepYMV	1.2
9 Sak	Lins	M	SS	M	M/0.308	SS/0.090	SS/0.101	SS/0.149	SS/0.124	PepYMV	?
10 Sak	Bragança Paulista	M	M	SS	M/0.086	SS/0.089	M/0.119	SS/0.035	SS/0.032		?
11 Sak	Lins	M	SS	M	M/0.538	SS/0.060	SS/0.123	SS/0.090	SS/0.104	PepYMV	?
12 Sak	Mucugê – Ba	M	M	M	M/1.011	SS/0.085	SS/0.111	SS/0.095	SS/0.098	PepYMV	1.2.3
13 Sak	Bragança Paulista	M	M	M	Mq/0.252	SS/0.071	SS/0.181	SS/0.104	SS/0.120		1.2.3
14Sak**	Lins	M	M	M	Mq/0.103	SS/0.090	SS/0.108	M/0.191	M/0.208	PepYMV	?

6.3 Análise da variabilidade genética dos isolados de potyvirus

Dois pares de oligonucleotídeos foram utilizados para a identificação molecular dos isolados. O par de primer PepNib e PepUTR apresentou resultados satisfatórios ao amplificar a região codificadora para a proteína capsidial (Figura 10). Doze amostras tiveram a CP completamente sequenciada comprovando-se a identidade viral (Figura 11). O par de primer WCIEN e PV1 foi utilizado para 5 isolados (273-6o, 295, 304, 362 e 367) que não foram amplificados pelo par de primer PepNib e PepUTR (Figura 12).

A partir do alinhamento de aminoácidos e nucleotídeos, foi obtida uma tabela de identidade entre os isolados de PepYMV e PVY, com intuito de observar a variabilidade genética entre os isolados. A análise da identidade da sequência de aminoácidos entre os isolados coletados de PVY (225-23j e 331) apresentou porcentagem de identidade de 94% para as duas amostras quando comparadas ao isolado de PVY do GenBank PVY-LYE84.2. A sequência de aminoácidos DAG, relacionada a transmissão dos potyvirus por afídeos (ATREYA *et al.*, 1991), foi encontrada nestes dois isolados. Igualmente foi observada a sequência conservada WCIEN, que serviu como base para a construção do par de primer universal para potyvirus descrito por MOTA *et al.* (2004). Porém, quando comparou-se a identidade de sequência de aminoácidos dos isolados 225-23j e 331 com os isolados de PepYMV sequenciados, observou-se valores de identidade entre 73%, com o isolado 234-23q, a 79%, com o isolado 389-2c (Quadro 1). Utilizando-se os critérios atuais de classificação de espécies de potyvirus que determina a identidade de aminoácidos da capa protéica inferior a 80% (BERGER *et al.*, 2005), pode-se afirmar que os dados corroboram para classificação do PVY e PepYMV em espécies diferentes.

Os isolados de PepYMV apresentaram variações de porcentagem de identidade de aminoácidos entre 93% a 100%. Não foi possível fazer uma correlação entre identidade de sequência, origem de coleta, bem como variabilidade biológica dos mesmos. A sequência de nucleotídeos entre os isolados de PepYMV variaram de identidade entre 91% e 100% (Quadro 1).

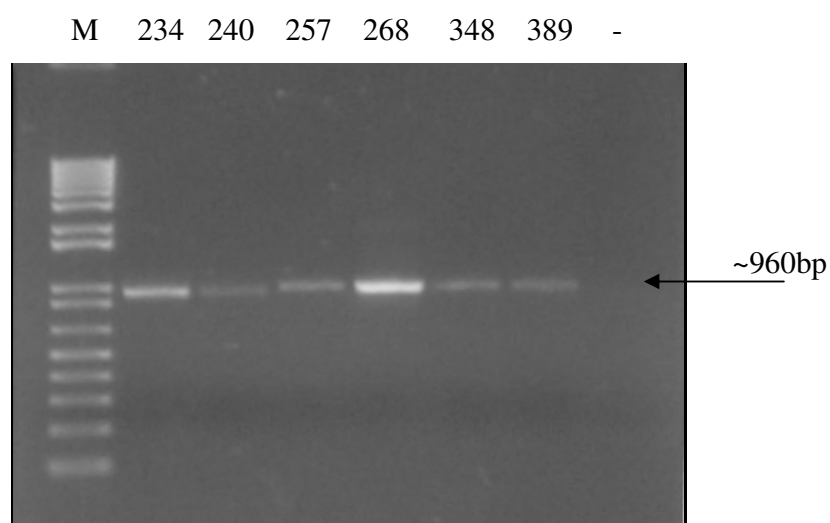


Figura 10 – Padrão eletroforético do produto de RT-PCR amplificado pelos oligonucleotídeos PepNib e PepUTR para os isolados 234-23q, 240-29c, 257-6t, 268-32a, 348 e 389-2c, controle negativo (-), M: Marcador molecular 1Kb DNA ladder.

Figura 11 - Alinhamento completo da região codificadora para a proteína capsidial entre os isolados coletados no campo comparados ao PepYMV (número de acesso AF348610) e PVY (número de acesso LYE84.2). Em verde o motivo DAA encontrado nos isolados de PepYMV e em rosa o motivo DAG encontrado nos isolados de PVY. Em amarelo os aminoácidos conservados

WCIN. Programa: CLUSTAL W

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html?>)

```

254-6q      ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPVASNLRGKEKGVSTSKDNDVNTGTTGFTVPRIKA 60
257-6t      ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPVASNLRGKEKGVSTSKDNDVNTGTTGFTVPRIKA 60
PepYMV-AF348610
251-29n     ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPADASNLKGEKGVSTSRDNDVNTGTTGFTVPRIKA 60
348         ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPADASNLKGEKGVSTSRDNDVNTGTTGFTVPRIKA 60
240-29c     ADEKLAVLDAAEEDKKEKRAKNEQPADASNLKGEKGVSTSRDNDVNTGTTGFTVPRIKA 60
234-23q     ADEKPAVLDAAEEDKKKRAKNEQPADASNLKGEKGVSTSRDNDVNTGTTGFTVPRIKA 60
237-23t     ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPADASNLKGEKGVSTSRDNDVNTGTTGFTVPRIKA 60
249-29l     ADERLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPADASNLQGEKGVSTSRDNDVNTGTTGFTVPMDKA 60
389-2c      ADDKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPVASNSKGEKGVASASRNDVNTGTTGFTVPRIKA 60
268-32a     ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEKPTVEVPSLKGEKEVSTARDNDVNTGTTGFTVPRIKA 60
225-23j     ANDT---IDAGENSKK----DAKPAQGSIQQSPNK----AKEKDVNAGTSGTHTVPRIKA 49
331         GNDT---IDAGENSKK----DAKPAQGSIQQSPNK----AKEKDVNAGTSGTHTVPRIKA 49
PVY-LYE84.2
ANDT---IDAGGSKK----DAKPEQGSIQPTPNK----GKDKDVNAGTSGTHTVPRIKA 49
..:      :*:  .*:  :  :*  :  .  :*  ..::*:*:*:*:*:** **

254-6q      ITSKMRMPKVGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTQM 120
257-6t      ITSKMRMPKVGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTQM 120
PepYMV-AF348610
251-29n     ITGKMRMPKVGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTQM 120
348         ITGKMRMPKVGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTQM 120
240-29c     ITGKMRMPKVGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTQM 120
234-23q     ITGKMRMPKVGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTQM 120
237-23t     ITGKMRMPKVGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTQM 120
249-29l     ITGKMRMPKVGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTQM 120
389-2c      ITSKMRMPKVGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTQM 120
268-32a     ITGKMRMPKVGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSRNQFDNWYAAVKNVYDVGDTQM 120
225-23j     ITSKMRMPKSKGAVALNLEHLLTYTPQQIDISNTRATQSQFDTWYDAVRVAYDIGENEMP 109
331         ITSKMRMPKSKGAAALNLEHLLTYTPQQIDISNTRATQSQFDTWYDAVRVAYDIGENEMP 109
PVY-LYE84.2
ITSKMRMPKSKGVAALNLEHLLTYTPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVRMAYDIGETEMP 109
**.******  *..  ***:***  *****:*.:.***.**  **:  .*:*:  **

254-6q      TIMNGLMVWCIENGTSPNINGVWMTMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
257-6t      TIMNGLMVWCIENGTSPNINGVWMTMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
PepYMV-AF348610
251-29n     TIMNGLMVWCIENGTSPNINGVWMTMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
348         TIMNGLMVWCIENGTSPNINGVWMTMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
240-29c     TIMNGLMVWCIENGTSPNINGVWMTMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
234-23q     TIMNGLMVWCIENGTSPNINGVRTMTDGEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
237-23t     TIMNGLMVWCIENGTSPNINGVWMTMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
249-29l     TIMNGLMVWCIENGTSPNINGVWMTMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
389-2c      TIMNGLMVWCIENGTSPNINGVWMTMDGEEQVEYPLKPIENSKPTFRQIMAHFSDVAEA 180
268-32a     TIMNGLMVWCIENGTSPNINGVWMTMDGEEQVEYPLKPIENSKPTLRQIMAHFSDVAEA 180
225-23j     TVMNGMLMVWCIENGTSPNVNGVWMTMDGSEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEA 169
331         TVMNGMLMVWCIENGTSPNVNGVWMTMDGSEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEA 169
PVY-LYE84.2
TVMNGLMVWCIENGTSPNINGVWMTMDGNEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEA 169
*:*****:***  *  *  *  *****:*.:.***:*****

```

Continuação da Figura 11

254-6q YIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQKAAALKSAQ 240
 257-6t YIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQKAAALKSAQ 240
 PepYMV-AF348610 YIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQKAAALKSAQ 240
 251-29n YIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQKAAALKSAQ 240
 348 YIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQKAAALKSAQ 240
 240-29c YIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQKAAALKSAQ 240
 234-23q YIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQKAAALKSAQ 240
 237-23t YIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQKAAALKSAQ 240
 249-29l YIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQKAAALKSAQ 240
 389-2c YIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQKAAALKSAQ 240
 268-32a YIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQKAAALKSAQ 240
 225-23j YIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDISLARYAFDFYEVTSRTPVRAREAHIQKAAALKSAQ 229
 331 YIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDISLARYAFDFYEVTSRTPVRAREAHIQKAAALKSAQ 229
 PVY-LYE84.2 YIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDISLARYAFDFYEVTSRTPVRAREAHIQKAAALKSAQ 229
 *****: * *:*****.*****

254-6q TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 278
 257-6t TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 278
 PepYMV-AF348610 TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 278
 251-29n TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM 278
 348 TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM 278
 240-29c TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM 278
 234-23q TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM 278
 237-23t TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM 278
 249-29l TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM 278
 389-2c TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 278
 268-32a TRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM 278
 225-23j PRLFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVRNM 267
 331 PRLFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVRNM 267
 PVY-LYE84.2 PRLFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM 267
 .*: * *:*****.*****: **

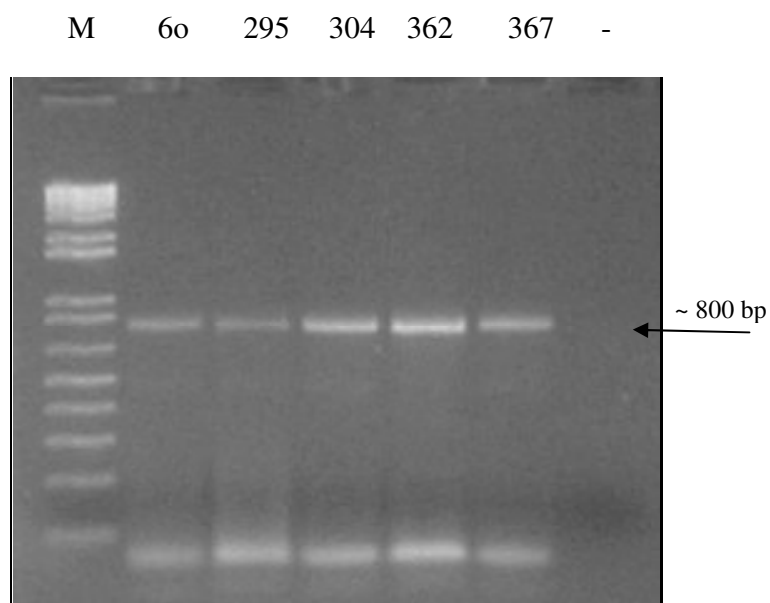


Figura 12 – Padrão eletroforético do produto de RT-PCR amplificado pelos oligonucleotídeos WCIEN e PV-1 para os isolados 273-60, 295, 304, 362 e 367, controle negativo (-), M: Marcador molecular 1Kb DNA ladder.

A análise filogenética foi realizada utilizando-se a sequência completa de nucleotídeos (Figura 13), bem como sequências parciais da CP obtidas para um maior número de isolados de potyvirus (Figura 14). Pôde-se observar um mesmo padrão filogenético utilizando-se a sequência completa de nucleotídeos codificadora para a proteína capsidial, bem como a sequência parcial de aminoácidos, indicando claramente a separação inicial em dois ramos filogenéticos separando os isolados de PepYMV dos de PVY. Foi observada também que dentre os isolados de PepYMV houve a separação dos isolados em dois ramos filogenéticos. O primeiro ramo engloba os isolados 237-23t, 234-23q, 251-29n, 240-29c, 249-29l todos de Iacanga, 273-6o, 268-32a, 295, 304 coletados em Piraju, e o isolado 348 de Lins, juntamente com o isolado 14 Sak. Já o segundo ramo é formado pelos isolados 254-6q, 257-6t, 265-35a de Piraju, os isolados 403 e 389-2c de Mogi Mirim, 367 e 11 Sak de Lins, 12 Sak coletado em Mucugê na Bahia e o isolado de PepYMV –AF348610. Isolados pertencentes a estes dois ramos filogenéticos foram encontrados nas mesmas localidades de coleta, não havendo correlação entre local e presença de um isolado de PepYMV específico. Comparando-se também as propriedades biológicas nas hospedeiras diferenciais, verifica-se que ambos os ramos englobam isolados pertencentes aos diferentes patótipos, não podendo se correlacionar a capacidade de contornar genes de resistência específicos com a sequência da CP analisada.

Quadro 1 – Porcentagem de identidade da sequência de nucleotídeos (diagonal superior) e da sequência de aminoácidos (diagonal inferior) do gene completo codificador para a proteína capsidial entre os isolados de PepYMV (252-29n, 268-32a, 254-6q, 257-6t, 249-29l, 237-23t, 240-29c, 389-2c, 234-23q e 348) ; PVY (225-23j e 331); PepYMV AF348610 e PVY-LYE 84.2.

	251-29n	PepYMV	268-32a	254-6q	257-6t	249-29l	237-23t	240-29c	389-2c	234-23q	PVY	225-23j	348	331
251-29n	-	94	94	93	93	99	99	99	93	99	65	65	98	65
PepYMV	98	-	91	97	97	93	94	94	98	93	64	65	94	65
268-32 a	94	93	-	91	91	93	94	94	91	94	64	64	95	65
254-6q	98	98	93	-	100	93	93	93	97	93	65	65	94	66
257-6t	98	98	93	100	-	93	93	93	97	93	65	65	94	66
249-29l	98	97	93	97	97	-	99	98	93	98	65	65	98	65
237-23t	99	97	94	97	97	97	-	99	93	99	65	65	98	65
240-29c	99	98	94	97	97	98	98	-	93	99	65	65	98	65
389-2c	97	98	93	98	98	96	97	97	-	93	64	65	94	65
234-23q	98	96	93	96	96	96	97	97	96	-	65	65	98	65
PVY	76	78	77	78	78	75	75	76	78	74	-	93	65	93
225-23j	74	75	76	76	76	74	74	74	78	73	94	-	65	99
348	100	98	94	98	98	98	99	99	97	98	76	74	-	65
331	75	76	76	76	76	74	74	75	79	74	94	98	75	-

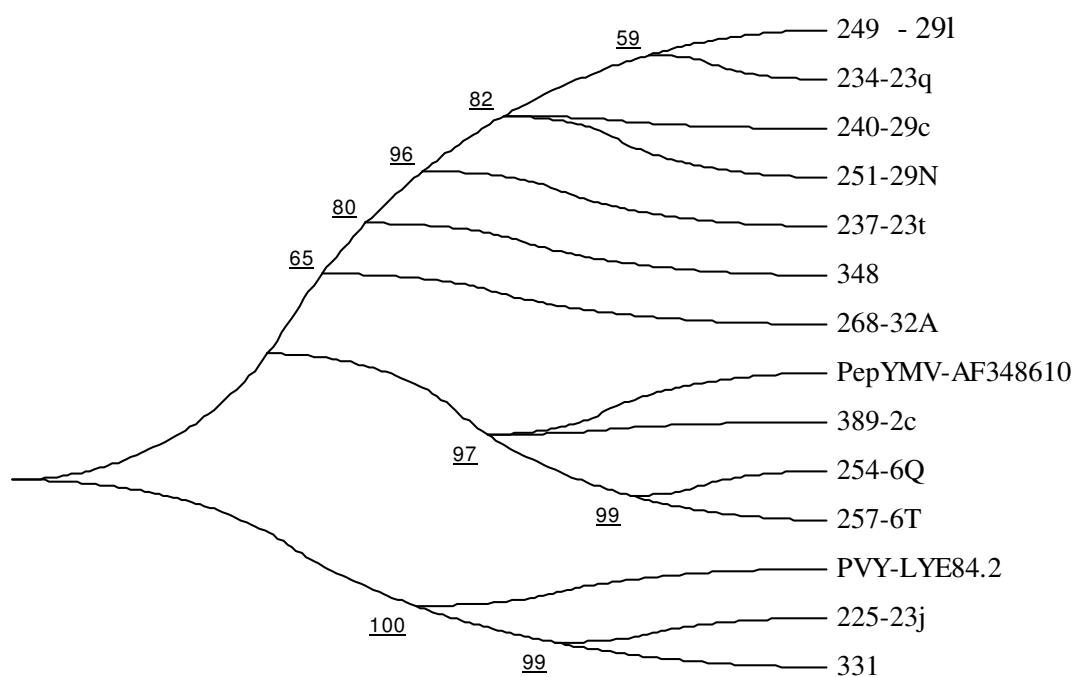


Figura 13 – Árvore filogenética obtida pelo programa Mega 4.0 com o valor de Bootstrap de 2000 repetições para a região codificadora para proteína capsidial das amostras: 249-29l, 234-23q, 240-29c, 251-29n, 237-23t, 348, 268-32a, 389-2c, 254-6q, 257-6t, 225-23j e 331. PepYMV (Acesso - AF348610) e PVY (Acesso - LYE84.2).

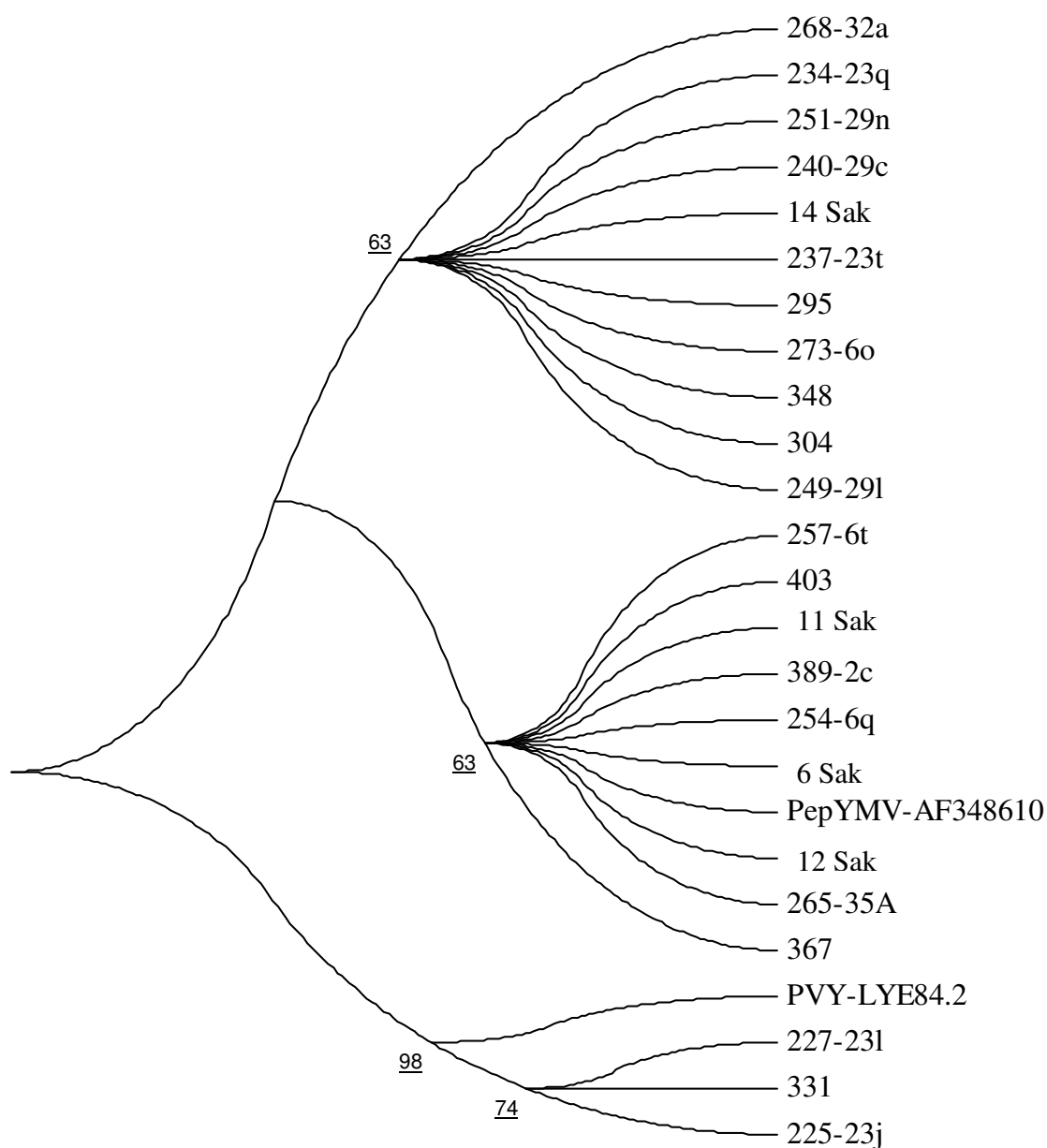


Figura 14 – Árvore filogenética obtida pelo programa Mega 4.0 com o valor de Bootstrap de 2000 repetições para parte da região codificadora para proteína capsidial das amostras 237-23t, 234-23q, 273-6o, 251-29n, 268-32a, 240-29c, 295, 348, 304, 249-29l, 6 Sak, 403, 389-2c, 254-6q, 12 Sak, 257-6t, 367, 11 Sak, 14 Sak, 265-35a, 331, 225-23j, 227-23l. PepYMV (Acesso - AF348610) e PVY (Acesso - LYE84.2).

7. CONCLUSÕES

- Foi observada grande variação biológica entre os isolados de potyvirus provenientes de *Capsicum* spp. coletados nas regiões produtoras do estado de São Paulo;
- Verificou-se a prevalência da espécie PepYMV, em relação a espécie PVY;
- Predomina no PepYMV o patótipo 1.3 segundo classificação de patótipos para PVY, com um total de treze isolados;
- Para a espécie PepYMV existem patótipos diferentes dos atualmente propostos para classificação de isolados de PVY.

8. REFERENCIAS

ARNEDO-ANDRÉS, A.M.; ARTEAGA, L.M.; ORTEGA, R. Response of Serrano Criollo de Morelos-334 to PVY pathotypes. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, p.105-109, 1998.

ARNEDO-ANDRÉS, M.S.; ARTEAGA, L.M.; ORTEGA, R.G. New inheritance studies related to *Potato Virus Y* (PVY) resistance in *Capsicum annuum* L. 'Serrano Criollo de Morelos-334'. *Euphytica*, v.151, p.95-101, 2006.

ARTEAGA, L.M., ANDRES, A.M.; ORTEGA, G.R. New Potato virus Y pathotype in pepper. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, v.16, p.85-86, 1997.

ATREYA, P.B; ATREYA, C.D; PIRONE, T.P. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences USA*. n. 88, p-7887-7891, 1991.

ATREYA, C.D., ATREYA, P.L., THORNBURY, D.W., PIRRONE, T.P. Site-directed mutations in the potyvirus HC-PRO gene affect helper component activity, virus accumulations, and symptom expression in infected tobacco plants. *Virology*, v.191, p.106-111, 1992.

ATREYA, P.B; LOPEZ-MOYA,J.J.; CHU, M.; ATREYA, C.D.; PIRONE, T.P. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyviral transmission by aphids. *J. Gen. Virology*. n.76, p. 265-270, 1995.

BENDAHMANE, A.; KANYUKA, K.; BAULCOMBE, D.C. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *The Plant Cell*, v.11, p.781-792, 1999.

BERGER, P.H.; ADAMS, M.J.; BARNETT, O.W.; BRUNT, A.A.; HAMMOND, J.; HILL, J.H.; JORDAN, R.L.; KASHIWAZAKI, S.; RYBICKI, E.; SPENCE, N.; STENGER, D.C.; OHKI, S.T.; UYEDA, I.; van ZAAYEN, A. VALKONEN, A.; VETTEN, H.J. *Potyviridae*. In: Fauquet, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, p. 819-841, 2005.

BERTHEAU, Y.D. *et al.* DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). In: PEROMBELON, M.C.M.; VAN DER WOLFF, J.M. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes. Scottish Crop Research Institute Occasional Publication. 1998.

BIANCHETTI, L.B.; CARVALHO, S.I.C. Subsídios à coleta de germoplasma de espécies de pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* (Solanáceas). In: WALTER, B.M.T.; CAVALCANTE, T.B. Fundamentos para coleta de germoplasma vegetal: Teoria e Prática. Brasília – DF; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 355-385.

BOARI A.J.; MACIEL-ZAMBOLIM E.; CARVALHO M.G.; ZERBINI F.M. Caracterização biológica e molecular de isolados do *Cucumber mosaic virus* provenientes de oito espécies vegetais. Fitopatologia Brasileira, v.25, p.49-58, 2000.

BOITEUX, L.S., CUPERTINO, F.P., SILVA, C., DUSI, A.N., MONTE-NESICH, D.C., VAN DER VLUGT, R.A.A., FONSECA, M.E.N. Resistance to *potato virus Y* (pathotype 1-2) in *Capsicum annuum* and *Capsicum chinense* is controlled by two independent major genes. Euphytica, v.87, p.53–58, 1996.

BOS, L. HUIJBERTS, N., CUPERUS, C. Further observations on variation of lettuce mosaic virus in relation to lettuce (*Lactuca sativa*), and a discussion of resistance terminology. European Journal of Plant Pathology, v 100, p.293-314, 1994.

BOSLAND, P.W.; VOTAVA, E.J. Peppers: vegetable and spice capsicums. Wallingford Oxon: Cabi, 1999. 204p.

BRIOSO, P.S.T.; FERREIRA, M.A.; OLIVEIRA, D.E. "Potato vírus Y" – Identificação de uma estirpe infectando naturalmente pimentão (*C. annuum*) e fonte de resistência.

Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.21, p.226-235, 1996a.

BRIOSO, P.S.T. Doenças causadas por vírus em pimentão. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.18, n.184, p.74-80, 1996b.

BRUNT, A.A. *et al.* (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/>

CARANTA, C., LEFEBVRE, V. & PALLOIX, A. Polygenic resistance of pepper to potyviruses consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci. *Molecular Plant-Microbe Interactions* v.10, 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. *Genome*, v.42, p.1111-1116, 1999a.

CARANTA, C., NEMOICHI, G., DAUBEZE, A., PALLOIX, A. Resistance to PepMoV and PVY-0 from Avelar are controlled by distinct recessive gene and evidence for independence between *pvr3* and *pvr5*. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, v.19, p.63-65, 1999b.

CARMO, M.G.F.; ZERBINI, F.M.; MAFFIA, L.A. Principais doenças da cultura da pimenta. *Informa Agropecuário*, Belo Horizonte, v.27, n.235, p.87-88, 2006.

CARVALHO, S.I.C.; BIANCHETTI, L.B. Botânica e recursos genéticos. In: RIBEIRO, C.S.C de. *Pimentas – Capsicum*. Embrapa Hortaliças, Brasília, p.39-54, 2008.

CASALI, V.W.D.; COUTO, F.A.A. Origem e Botânica de *Capsicum*. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.10, n.113, p.8-10, 1984.

CASCARDO, R.S., ALFENAS-ZERBINI, P., ZERBINI, F.M. Determination of the taxonomic position of potyvirus isolates from *Capsicum* spp. Indicates the widespread occurrence of *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) in these crops in Southeastern Brasil. In: XIX National Meeting of Virology, 2008, Caxambu-MG. Revista Virus Reviews & Research, p. 281, 2008.

CEZAR, M.A. Tobamovírus em *Capsicum* spp no Estado de São Paulo: ocorrência, análise da variabilidade e avaliação da resistência. Botucatu, 2007. Tese de Doutorado em Agronomia (Proteção de Plantas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

CHARRON, C. *et al.* Natural variation and functional analysis provide evidence for coevolution between plant eIF4E and potyviral VPg. The plant Journal, v.54, p.56-68, 2008.

CNPH, Projeto *Capsicum*. Embrapa Hortaliças. 2001. <http://www.cnph.embrapa.br/projetos/capsicum/index.html>. Acesso: 27 de março de 2009.

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

CRUZ, D.M.R; BANCI, C.A. Produção de mudas e plantio. In: RIBEIRO, C.S.C de. Pimentas – *Capsicum*. Embrapa Hortaliças, Brasília, p.73-79, 2008.

CUNHA, L.C.V. DA, RESENDE, R. DE O., NAGATA, T., INOUE-NAGATA, A.K. Distinct features of *Pepper yellow mosaic virus* isolates from tomato and sweetpepper. Fitopatologia Brasileira, Brasilia, v.29, n.6, p.663-667, 2004.

De BOKX J.A. & HUTTINGA H. Potato vírus Y. CMI/AAB Description of Plant Viruses, v.242, 6p. 1981.

DAROS, J.A., CARRINGTON, J.C. RNA binding activity of Nia proteinase of Tobacco etch potyvirus. Virology, v.237, p.327-336, 1997.

DELLAPORTA, S.L.; WOODS, J.; HICKS, J.B. A plant minipreparations, version II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, v.1, p.19-21, 1983.

DIANESE, E.C.; RESENDE, R.O.; INOUE-NAGATA, A.K. Alta incidência de *Pepper yellow mosaic virus* em tomateiro em região produtora no Distrito Federal. *Plant Pathol. Brasília*, v.33 n.1, 2008.

DOGIMONT, C. Etude génétique de trois systèmes de résistance par hypersensibilité ou séquestration aux trois virus principaux infectant le piment (*Capsicum annuum* L.). Tese de Doutorado em INA Paris-Grignon (France), 194p, 1993.

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 annuum* L.). *Euphytica*, v.88, p.231-239, 1996.

ECHER, M.M. Reação de pimentão a *Phytophthora capsici* e *Potato virus Y* (PVY^m). Piracicaba, 2001, 62p. (Doutorado – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”).

ECHER, M.M & Da COSTA, C.P. Reação da pimenta doce ao vírus Y da Batata PVY^m. *Scientia Agrícola*, v.59, n.2, 2002.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura – Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 412 p., 2003.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, v.9, p.275-296, 1971.

FRANGIONI, D.S.S., PAVAN, M.A., COLARICCIO, A. Triagem de genótipos de pimentão para resistência ao *Cucumber mosaic virus* (CMV) subgrupo I. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.27, p.S.204, 2002.

FRASER, R.S.S Genes for resistance to plant viruses. CRC Critical Reviews in Plant Science, v.3, n.3, 1986.

GÉBRÉ SELASSIÉ, K., MARCHOUX, G.; DELECOLLE, B.; POCHARD, E. Variabilité naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du Sud-Est de la France. Caractérisation et classification en pathotypes. Agronomie, v.5, n.7, p-621-630, 1985.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. Journal of Virological Methods. v.63, p.9-16, 1997.

GIORIA, R. *et al.* Breakdown of resistance in sweet pepper against *Pepper yellow mosaic virus* in Brazil. Scientia Agricola, v.66, n.2, 2009.

GLAIS, L.; KERLAN, C.; ROBAGLIA, C. Variability and evolution of *Potato virus Y*. the type species of the *Potyvirus* genus. In: Plant viruses as a molecular pathogens, New York: Haworth Press, p. 225-253, 2002.

GRUBE, R.C.; RADWANSKI, E.R, JAHN, M. Comparative genetics of disease resistance within the Solanaceae. Genetics, v.155, p.873-887, 2000.

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

IBPGR, Genetic Resources of *Capsicum*: A global plan of action. International Board for Plant Genetic Resources, Rome. 1983.

INOUE-NAGATA, A. K., FONSECA, M.E.N., RESENDE, R.O.; BOITEUX, L.S.; MONTE, D.C.; DUSI, A.N.; ÁVILA, A.C. de; VLUGT, R.A.A. van der. Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annum*. Archives of Virology, Vienna, v.147, p.849-855, 2002.

JANZAC, B.; FABRE, M.F., PALLOIX, A.; MOURY, B. Characterization of a new potyvirus infecting pepper crops on Ecuador. *Archives of Virology*, v.153, p.1543-1548, 2008a.

JANZAC, B. FABRE, M-F, PALLOIX, A., MOURY, B. Mechanism and spectrum of action of the *pvr4* resistance in pepper against potyviruses and selection of virulents variants. *Plant. Pathol.*, 2008b.

JANZAC, B. Risques de contournement et strategies de gestion durable des resistances aux potyvirus chez le piment. 2008, 141p. (Doutorado – Institut National de la Recherche Agronomique INRA).

KANG, B.C. *et al.* The *pvr1* locus in *Capsicum* encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with *Tobacco etch virus* VPg. *The Plant Journal*, v.42, p.392-405, 2005.

KOBORI, R.F.; GIORIA, R.; BRUNELLI, K.R. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças do pimentão no Brasil. In: GHINI, R.; HAMADA, E. Mudanças climáticas – Impactos sobre doenças de plantas no Brasil. Brasília – DF. Embrapa Informação Tecnológica, p.121-128, 2008.

KUMAR, S. *et al.* Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, v.17, p. 1244-1245, 2001.

KYLE, B.C.; PALLOIX, A. Proposed revision of nomenclature for potyvirus resistance genes in *Capsicum*. *Euphytica*, v.97, p.183-188, 1997.

LIMA, M.F., ÁVILA, A.C. de, RESENDE, R. de O., NAGATA, T. Levantamento e identificação das espécies de Tospovirus em tomateiro e pimentão no Submédio do Vale do São Francisco e no Distrito Federal. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v.26, n.2, p.205-210, 2000.

LORENTZ, L. H.; LÚCIO, A. D.; HELDWEIN, A. B.; SOUZA, M. F.; MELLO, R. M. Estimativa da amostragem para pimentão em estufa plástica. *Horticultura Brasileira*, v.20, n.2, 2002. Suplemento 2. CD Rom.

MACIEL-ZAMBOLIM E, COSTA H, CAPUCHO AS, DE ÁVILA AC, INOUE-NAGATA AK, KITAJIMA EW. Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região serrana do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira* v.29, p.325-327, 2003.

MATTOS, L.M. Caracterização pós-colheita de espécies de *Capsicum* spp. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, v.1, n.2, p.179-186, 2008.

MAULE, A.J.; CARANTA, C.; BOULTON, M.I. Source of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Molecular Plant Pathology*, v.8, p.223-231, 2007.

MOTA, L.D.C.; DELLA VECCHIA, M.G.S.; GIORIA, R.; KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M.; CAMARGO, L.E.A.; AMORIM, L. *Pfaffia mosaic virus*: a new potyvirus found infecting *Pfaffia glomerata* in Brazil. *Plant Pathology*, v. 53, p.368-373, 2004.

MURPHY, F.A.; JARLFORS, U.; SHAW, J.G. Development of cylindrical inclusions in Potyvirus-infected protoplasts. *Phytopathology*, v.81, p.3710374, 1991.

NAGAI, H. Obtenção de variedades de pimentão resistentes ao mosaico. *Bragantia* v.27, p.311-353. 1968.

NAGAI, H. Melhoramento de pimentão (*Capsicum annuum* L.) visando resistência ao vírus Y. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 1, n. 2, p. 3-9. 1983.

NAGAI, H. Viroses de pimentão e pimenta. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.10, n.113, p.52-54, 1984.

NAGAI, H. Pimentão, pimenta-doce e pimentas. In: FURLANI, a.M.C.; VIEGAS, G.P. (Eds.). O melhoramento de plantas no Instituto Agrônômico. Campinas: IAC, cap.7, p.276-294, 1993.

NOBREGA, N.R.; SILBERSSCHMIDT, K. Uma provável 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.

NOZAKI, D.N. Estudos biológicos e moleculares de begomovírus infectando pimentão (*Capsicum annuum*) no Estado de São Paulo (Tese de Doutorado), FCA-UNESP-Botucatu, 2007.

PALLOIX, A. Disease of pepper and perspectives for genetic control. In: P. Bellefti & L. Quagliotti (Eds.), VIIIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, Rome, Italy, p.120-126, 1992.

PASKO, P, ORTEGA, G.R., ARTEAGA, L.M. Resistance to Potato virus Y in peppers. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, v.15, p.11-27, 1996.

PIRONE, T.P.; BLANC, S. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, v.34, p.227-247, 1996.

ROBAGLIA, C.; CARANTA, C. translation initiation factors: a weak link in plant RNA vírus infection. *Trends in Plant Science*, v.11, p.40-45, 2006.

ROJAS, M.R. *et al.* Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease*, v. 77, p. 340-347, 1993.

SHUKLA, D.D.; FRENKEL, M.J. & WARD, C.W. Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. *Can. J. Plant Pathol.*, v.13, p.178-191, 1991.

SHUKLA, D.D. ; WARD, C.W. ; BRUNT, A.A. The Potyviridae. Cab.International Oxford, 516p., 1994.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. Oxford, v.22, p. 4673-4680, 1994.

TRUTA, A.A.C. Identidade e propriedade de isolados de Potyvirus provenientes de *Capsicum* spp. Tese de Doutorado, Departamento de fitopatologia, Universidade de Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 68p., 2002.

TRUTA, A. A.C. *et al* . Identidade e propriedades de isolados de potyvirus provenientes de *Capsicum spp*. Fitopatol. bras., Brasília, v. 29, n. 2, 2004.

URCUQUI-INCHIMA, S., HAENNI, A.-L., BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. Virus Research, v.74, p.157-175, 2001.

ZERBINI, F.M.; ZAMBOLIM, E.M. A família Potyviridae. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v.7, p.1-66, 1999.

APÊNDICE

APÊNDICE I

Alinhamento de nucleotídeos realizado com o programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) entre seqüências de PVY e PepYMV depositadas no Genbank. O número de acesso de cada seqüência esta especificada na frente de seu nome. Em amarelo a região de anelamento dos primers PepNib e PepUTR. Em vermelho o códon de iniciação para tradução da proteína da capsidial (referencia no PepYMV) e em verde o códon de finalização da proteína.

```

                                PepNib
PVY-N-NewZealand-AM268435  GATGGTTGCCTTGGATGATGAATTTGAGTGCATACTTATGAAGTGCACC 50
PVY-N-DQ157180            GATGGTTGCCTTGGATGATGAACCTTGAGTGCATACTTATGAAGTGCACC 50
PVY-VN/P2-DQ925437       GATGGTTGCCTTGGATGATGAACCTTGAGTGCATACTTATGAAGTGCACC 50
PVY-N-AB270705           GATGGTTGCCTTGGATGATGAACCTTGAGTGCATACTTATGAAGTGCACC 50
PVY-VN/C10-DQ925436     GATGGTTGCATTGGATGATGAGTTTGTGATTCTTATGAAGTACATC 50
PepYMV-AF348610          GTTCGCCGAATTGGATGATGAGTTTGTGATTCTTATGAAGTACATC 50
* * * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                                Nib
PVY-N-NewZealand-AM268435  ATCAAGGAAATGACACAAT-----CGATGCAGGAGGAAGCACT 88
PVY-N-DQ157180            ATCAAGGAAATGACACAAT-----CGATGCAGGAGGAAGCACT 88
PVY-VN/P2-DQ925437       ATCAAGGAAATGACACAAT-----CGATGCAGGAGGAAGCACT 88
PVY-N-AB270705           ATCAAGGAAACGACACAAT-----CGATGCAGGAGGAAGCACT 88
PVY-VN/C10-DQ925436     ACCAGGCAAATGACCCGAT-----TGATGCTGGGGAGAATAAT 88
PepYMV-AF348610          ACCAAGCGGATGAGAACTAGCGGTGCTGGATGCGGCTGAGGAAGACAAG 100
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                                CP
PVY-N-NewZealand-AM268435  AAAAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACCAAACTCAACAA 138
PVY-N-DQ157180            AAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACCAAACTCAACAA 138
PVY-VN/P2-DQ925437       AAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACCAAACTCAACAA 138
PVY-N-AB270705           AAGAAGGATGCAAGACAGAGCAAGGAGCAGCATTCAAGTCAAAACCCGAACAA 138
PVY-VN/C10-DQ925436     AAGAAGGATGCGAAGCCAGCAGCAGGGTAGCATCCAGCCAAAGTCCTAACAA 138
PepYMV-AF348610          AAGAAGAGAGCTAAGAATGAACAGCCGGTTGATGCGTCAAATTTGAAAGG 150
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
PVY-N-NewZealand-AM268435  GGAAAAG-----GAAAAGGACGTGAATGTTGGAA 167
PVY-N-DQ157180            AGAAAAG-----GAGAAGGACGTGAATGTTGGAA 167
PVY-VN/P2-DQ925437       GGAAAAG-----GAAAAGGACGTGAATGTTGGAA 167
PVY-N-AB270705           AGGAAAA-----GATAAGGATGTGAATGCTGGTA 167
PVY-VN/C10-DQ925436     AGGGAAG-----GATAAGGACGTGAATGCGCGTA 167
PepYMV-AF348610          AAAGGAGAAAGGAGTGCTACATCCAGGACAATGATGTAAACACTGGAA 200
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
PVY-N-NewZealand-AM268435  CATCTGGAACTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATG 217
PVY-N-DQ157180            CATCTGGAACTCATACTGTGCCACGAATTAAGCCATCACGTCTAAAATG 217
PVY-VN/P2-DQ925437       CATCTGGAACCTTATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATG 217
PVY-N-AB270705           CATCTGGGACACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATCACGTCCAAAATG 217
PVY-VN/C10-DQ925436     CATCTGGAACACATACTGTGCCAAGAATAAAGGCTATTACGTCCAAAATG 217
PepYMV-AF348610          CAACTGGGACTTTTACAGTACCAAGAAATCAAGCAATAACGAGTAAAGATG 250
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
PVY-N-NewZealand-AM268435  AGAATGCCCAAGAGTAAAGGTGCAATTGCACTAAATTTGGAACACTTACT 267
PVY-N-DQ157180            AGAATGCCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTGAACTTAGAACATTTACT 267
PVY-VN/P2-DQ925437       AGAATGCCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACT 267
PVY-N-AB270705           AGAATGCCCAAGAGCAAGGAGCAACCCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCT 267
PVY-VN/C10-DQ925436     AGAATGCCTAAGAGCAAAGGAACAGCCGTGCTAAACTTAGAACACTTACT 267
PepYMV-AF348610          AGGATGCCGAAAGTAGCGGCAACACGATTTTAACTCTGGATCATTTACT 300
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Continuação do apêndice I

PVY-N-NewZealand-AM268435 CGAGTATGCTCCACAGCAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAAT 317
PVY-N-DQ157180 CGAGTATGCTCCACAGCAAATTGATATCTCAAATACTCGAGCGACTCAAT 317
PVY-VN/P2-DQ925437 CGAGTATGCTCCACAGCAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAAT 317
PVY-N-AB270705 TGAGTATGCTCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCGACTCAAT 317
PVY-VN/C10-DQ925436 CGAGTATGCTCCACAACAGATAGACATCTCAAATACTCGGGCGACTCAAT 317
PepYMV-AF348610 CACATATACACCTCAACAGATAGACATTTCAAACAAGATCTACGCACA 350
*** *

PVY-N-NewZealand-AM268435 CACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCAGTACAACCTTGCATACGACATAGGA 367
PVY-N-DQ157180 CACAGTTTGATACATGGTATGAAGCAGTACAGCTTGCATTACGACATAGGA 367
PVY-VN/P2-DQ925437 CACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCATACGACATAGGA 367
PVY-N-AB270705 CACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCAGTCCGGATGCATACGACATAGGA 367
PVY-VN/C10-DQ925436 CACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCAGTCCGGATGCATACGACATAGGG 367
PepYMV-AF348610 GCCAATTCGATAATTGGTATGCTGCAGTTAAAAATGTTTTATGATGTTGGA 400
* *

PVY-N-NewZealand-AM268435 GAAACTGAAATGCCAAGTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGA 417
PVY-N-DQ157180 GAAACTGAAATGCCAAGTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGA 417
PVY-VN/P2-DQ925437 GAAACTGAAATGCCAAGTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGA 417
PVY-N-AB270705 GAAACTGAGATGCCAAGTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGA 417
PVY-VN/C10-DQ925436 GAAACTGAAATGCCAAGTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGA 417
PepYMV-AF348610 GACGCTGAGATGCAAAACCATTAATGAATGGATTAATGGTTTGGTGCATTGA 450
** *

PVY-N-NewZealand-AM268435 AAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTGGGTTATGATGGATGGAG 467
PVY-N-DQ157180 GAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGTGTGGGTTATGATGGATGGAA 467
PVY-VN/P2-DQ925437 AAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTGGGTTATGATGGATGGAG 467
PVY-N-AB270705 AAATGGAACCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTGGGTTATGATGGATGGGA 467
PVY-VN/C10-DQ925436 AAATGGAACCTCGCCAAATATCAACGGAGTTGGGTTATGATGGATGGAA 467
PepYMV-AF348610 AAATGGAACCTCACAAACATAAATGGCGTCTGGACCATGATGGATGGAG 500
* *

PVY-N-NewZealand-AM268435 ATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCA 517
PVY-N-DQ157180 ATGAACAAGTTGAATACCCACTCAAGCCGATGTTGAAAATGCAAAACCA 517
PVY-VN/P2-DQ925437 ATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCA 517
PVY-N-AB270705 ATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCA 517
PVY-VN/C10-DQ925436 GTGAACAAGTTGAATACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCG 517
PepYMV-AF348610 AGGAGCAAGTTGAATATCCATTTGAAAGCCGTTGATCGAGAATTCGAAGCCT 550
* *

PVY-N-NewZealand-AM268435 AACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATAT 567
PVY-N-DQ157180 ACCCTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATAT 567
PVY-VN/P2-DQ925437 AACTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATAT 567
PVY-N-AB270705 ACCCTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATAT 567
PVY-VN/C10-DQ925436 ACCCTTAGGCAAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATAT 567
PepYMV-AF348610 ACTTTTCGTAGATCATGGCTCATTCTCAGATGTTGCAGAGCGTATATACAT 600
* *

PVY-N-NewZealand-AM268435 AGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTGTTC 617
PVY-N-DQ157180 TGAATGCGCAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTGTTC 617
PVY-VN/P2-DQ925437 AGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTGTTC 617
PVY-N-AB270705 AGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTGTTC 617
PVY-VN/C10-DQ925436 AGAGATGCGCAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTGTTC 617
PepYMV-AF348610 TGAGATGAGGAATAAGAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTGTTC 650
* *

PVY-N-NewZealand-AM268435 GTAATCTGCGGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTTGACTTTTATGAA 667
PVY-N-DQ157180 GAAATCTGCGTATGGAAGTCTGGCTCGTTATGCTTTTGACTTTTATGAA 667
PVY-VN/P2-DQ925437 GTAATCTGCGGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTTGACTTTTATGAG 667
PVY-N-AB270705 GAAATCTGCGGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTTGACTTTTATGAG 667
PVY-VN/C10-DQ925436 GAAATCTGCGGATGGAAGTCTGGCTCGCTATGCTTTTGACTTTTATGAG 667
PepYMV-AF348610 GGAATTTGCGGACTTGTCTGTCAGATACGCTTTTGACTTTTATGAA 700
* *

Continuação do apêndice I

```

PVY-N-NewZealand-AM268435 GTTACATCACGGACACCAGTGAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATGAA 717
PVY-N-DQ157180 GTTACATCACGTACACCAGTAAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATGAA 717
PVY-VN/P2-DQ925437 GTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAA 717
PVY-N-AB270705 GTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAA 717
PVY-VN/C10-DQ925436 GTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAGAGTAA 717
PepYMV-AF348610 GTCACATCGCGCACCCCTACCAGGGCACGTGAAGCCACATACAGATGAA 750
** ***** ** ** * ** * * * * * ** * * * * * ** * * * * *

PVY-N-NewZealand-AM268435 GGCCGCAGCTTTAAATCAGCTCAATCTCGACTTTTCGGATTGGATGGTG 767
PVY-N-DQ157180 AGCCGCAGCTCTGAAATCAGCTCAATCCCGACTTTTCGGATTGGATGGTG 767
PVY-VN/P2-DQ925437 GGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACTCGACTTTTCGGTTGGACGGTG 767
PVY-N-AB270705 GGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACTCGACTTTTCGGTTGGACGGTG 767
PVY-VN/C10-DQ925436 GGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACTCGACTTTTCGGTTGGACGGTG 767
PepYMV-AF348610 GGCAGCGGCTTTAAATCTGCTCAGACAGTATGTTTGGACTTGGACGGTG 800
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PVY-N-NewZealand-AM268435 GCATTAGTACACAAGAGGAAAAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTT 817
PVY-N-DQ157180 GCATTAGTACACAAGAGGAAAAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTT 817
PVY-VN/P2-DQ925437 GCATCAGTACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTC 817
PVY-N-AB270705 GCATCAGTACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTC 817
PVY-VN/C10-DQ925436 GCATCAGTACACAAGAGGAGAACACAGAGAGACACACCACCGAGGATGTC 817
PepYMV-AF348610 GCATCAGTACACAAGAGGAGAACACTGAGAGGCACACCACAGAAGATGTG 850
**** ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PVY-N-NewZealand-AM268435 TCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTGAAGAACATGTGATTGTA-GT 866
PVY-N-DQ157180 TCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTGAAGAACATGTGATTATA-GT 866
PVY-VN/P2-DQ925437 TCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGAT-GTA-GT 865
PVY-N-AB270705 TCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGAT-GTA-GT 865
PVY-VN/C10-DQ925436 TCTCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGAT-GTA-GT 865
PepYMV-AF348610 AGCCCAACATGCATACTTTGCTTGGGGTGAGAAATATGTA-TCATGT 900
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

UTR
PVY-N-NewZealand-AM268435 GTCTTCCGGACGATATATAGATATTTATG-TTTGCAGTAAGTATTTTGG 915
PVY-N-DQ157180 GTCTTCCGGACGATATATAAATATTTATG-TTTGCAGTAAGTATTTTGG 915
PVY-VN/P2-DQ925437 GTCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACA-TATGCAGTAAGTATTTTGG 914
PVY-N-AB270705 GTCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACA-TATGCAGTAAGTATTTTGG 914
PVY-VN/C10-DQ925436 GTCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACA-TATGCAGTAAGTATTTTGG 914
PepYMV-AF348610 GCCATCAGGGATGAAATATTATATATGTAGTATGCAATATATAATATGG 950
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

UTR
PVY-N-NewZealand-AM268435 CTTTTCCTGTACTACT 931
PVY-N-DQ157180 CTTTTCCTGTACTACT 931
PVY-VN/P2-DQ925437 CTTTTCCTGTACTACT 930
PVY-N-AB270705 CTTTTCCTGTACTACT 930
PVY-VN/C10-DQ925436 CTTTTCCTGTACTACT 930
PepYMV-AF348610 CTTTTCCTGTACTTTC 966
*****

```

PepUTR

APÊNDICE II

- Sequência de aminoácidos completa da região codificadora para a proteína capsidial dos isolados analisados.

>PVY-LYE84.2

ANDTIDAGGSSKKDAKPEQGSIQPTPNKGKDKDVNAGTSGTHTVPRIKAITSKMRMPKSKGV
AALNLEHLLLEYTPQQIDISNTRATQSQFDTWYEA VRMAYDIGETEMPTVMNGLMVWCIENGT
SPNINGVWMMDGNEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYG
LIRNLRDISLARYAFDFYEVTSRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGISTQEENTERH
TTEDVSPSMHTLLGVKNM

>PepYMV-AF348610

ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPVDASNKKGKEKGVSTSRDNDVNTGTTGTFTVPRIKAIT
SKMRMPKVGGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDAEMQTIM
NGLMVWCIENGTSPNINGVWTMMDGEEQVEYPLKPIVIENSKPTFRQIMAHFSDVAEAYIEMR
NKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAALKSAQTRMFGLD
GGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM

>251-29N

ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPADASNKKGKEKGVSTSRDNDVNTGTTGTFTVPRIKAIT
GKMRMPKVGGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTMTEMQTIM
NGLMVWCIENGTSPNINGVWTMMDGEEQVEYPLKPIVIENSKPTFRQIMAHFSDVAEAYIEMR
NKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAALKSAQTRMFGLD
GGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

>268-32A

ADEKLAVLDAAEEDKKKKARNEKPTEVPSLKGEEKEVSTARDNDVNTGTTGTFTVPRIKAITG
KMRMPKVGGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTRNQFDNWYAAVKNVYDVGDTMTEMQTIMN
GLMVWCIENGTSPNINGVWTMMDGEEQVEYPLKPIVIENSKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRN
KKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAALKSAQTRMFGLDG
GISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

>254-6q

ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPVDASNLRGKEKGVSTSKDNDVNTGTTGTFTVPRIKAIT
SKMRMPKVGGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTMTEMQTIMN
GLMVWCIENGTSPNINGVWTMMDGEEQVEYPLKPIVIENSKPTFRQIMAHFSDVAEAYIEMRN
KKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAALKSAQTRMFGLDG
GISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM

>257-6t

ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPVDASNLRGKEKGVSTSKDNDVNTGTTGTFTVPRIKAIT
SKMRMPKVGGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTMTEMQTIMN
GLMVWCIENGTSPNINGVWTMMDGEEQVEYPLKPIVIENSKPTFRQIMAHFSDVAEAYIEMRN
KKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAALKSAQTRMFGLDG
GISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM

Continuação do apêndice II

>249-29L

ADERLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPADASNQKGKEKGVSTSRDNDVNTGTTGTFTVPMDKAI
 TGKMRMPKVGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTMOTIM
 NGLMVWCIENGTSPNINGVWTMMDGEEQVEYPLKPIVIENSKPTFRQIMAHFSDVAEAYIEMR
 NKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAALSAQTRMFGLD
 GGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

>237-23t

ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPADASNKGGEEKGVSTSRDNDVNTGTTGTFTVPRIKAIT
 GKMRMPKVGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTMOTIM
 NGLMVWCIENGTSPNINGVWTMMDGEEQVEYPLKPIVIENSKPTFRQIMAHFSDVAEAYIEMR
 NKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAALSAQTRMFGLD
 GGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

>240-29C

ADEKLAVLDAAEEDKEKRAKNEQPADASNKGGEEKGVSTSRDNDVNTGTTGTFTVPRIKAIT
 GKMRMPKVGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTMOTIM
 NGLMVWCIENGTSPNINGVWTMMDGEEQVEYPLKPIVIENSKPTFRQIMAHFSDVAEAYIEMR
 NKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAALSAQTRMFGLD
 GGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

>389-2c

ADDKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPVDASNSKGGEEKGVSSASRDNDVNTGTTGTFTVPRIKAIT
 SKMRMPKVGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTMOTIMN
 GLMVWCIENGTSPNINGVWTMMDGEEQVEYPLKPIVIENSKPTFRQIMAHFSDVAEAYIEMRN
 KKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAALSAQTRMFGLD
 GISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM

>234-23q

ADEKPAVLDAAEEDKKKRAKNEQPADASNKGGEEKGVSTSRDNDVNTGTTGTFTVPRIKAIT
 GKMRMPKVGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTMOTIM
 NGLMVWCIENGTSPNINGVRTMTDGGEEQVEYPLKPIVIENSKPTFRQIMAHFSDVAEAYIEMRN
 KKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARHAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAALSAQTRMFGLD
 GISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

>225-23j

ANDTIDAGENSKKDAKPAQGSIQSPNKAKEKDVNAGTSGTHTVPRIKAITSKMRMPKSKGA
 VALNLEHLLTYTPQQIDISNTRATQSQFDTWYDAVRVAYDIGENEMPTVMNGLMVWCIENGT
 SPNVNGVWVMMDGSEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYG
 LIRNLRDISSARYAFDFYEVTSRTPVRAREAHIQMKAALSAQPRFLDGGISTQEENTERH
 TTEDVSPSMHTLLGVRNM

>348

ADEKLAVLDAAEEDKKKRAKNEQPADASNKGGEEKGVSTSRDNDVNTGTTGTFTVPRIKAIT
 GKMRMPKVGTTILNLDHLLTYTPQQIDISNTRSTHSQFDNWYAAVKNVYDVGDTMOTIM
 NGLMVWCIENGTSPNINGVWTMMDGEEQVEYPLKPIVIENSKPTFRQIMAHFSDVAEAYIEMR
 NKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAALSAQTRMFGLD
 GGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

Continuação do apêndice II

>331

GNDTIDAGENSKKDAKPAQGSIQSPNKAKEKDVNAGTSGTHTVPRIKAITSKMRMPKSKGA
AALNLEHLLEYTPQQIDISNTRATQSQFDWYDAVRVAYDIGENEMPTVMNGLMVWCIENGTS
PNVNGVWVMMDGSEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGL
IRNLRDISLARYAFDFYEVTSRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGISTQEENTERHT
TEDVSPSMHTLLGVRNM

APÊNDICE III

- Sequência de aminoácidos parcial da região codificadora para a proteína capsidial dos isolados analisados.

>PVY-LYE84.2

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDISLARYAFDFYEVTSRTPVRAREAHIQMKAAL
KSAQPRLFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM

>PepYMV-AF348610

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM

>251-29N

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

>268-32A

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

>254-6q

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM

>257-6t

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM

>249-29L

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

>237-23t

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

>240-29C

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

>389-2c

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM

>234-23q

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARHAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

>225-23j

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDISSARYAFDFYEVTSRTPVRAREAHIQMKAAL
KSAQPRLFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVRNM

>227-23L

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDISLARYAFDFYEVTSRTPVRAREAHIQMKAAL
KSAQPRLFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVRNM

>295wcién

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

Continuação do apêndice III

>11 sakata

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM

>273-6 wcién

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

>265-35

FSDVAEAYIEMRYKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM

>304

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

>348

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

>6sakata

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM

>12sakata

FSDVVEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM

>403

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM

>367

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERNTTEDVSPNMHTLLGVRNM

>14 sak

FSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDLSLARYAFDFYEVTSRTPTRAREAHIQMKAAL
KSAQTRMFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM

APÊNDICE IV

- Sequência de nucleotídeos completa da região codificadora para a proteína capsidial dos isolados analisados.

>PVY-LYE84.2

GCAAACGATACAATTGATGCTGGAGGGAGCAGTAAGAAAGATGCGAAACCAGAACAGGG
TAGCATTTCAGCCAACCTCCTAACAAGGGAAAAGGATAAAGGACGTGAATGCCGGTACATCTGG
AACACATACTGTACCAAGAATAAAGGCTATTACGTCAAAAATGAGAATGCCTAAAAGCA
AAGGAGTGGCCGCACTAACTTAGAACACTTGCTCGAGTACACTCCACAACAGATAGATA
TCTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCAGTGCCGGATGG
CATACGACATAGGGGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCA
TTGAAAATGGGACCTCGCCAAATATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAAATGAAC
AAGTTGAGTATCCGTTGAAACCAATTGTTGAGAATGCAAAACCAACCCTTAGGCAAATCA
TGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCAT
ATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTGCGGGATATAAGTTTAGCGCGCTATGCCTT
TGACTTTTATGAAGTTACATCACGAACGCCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATACAAAT
GAAGGCCGCGCAGCATTGAAATCAGCTCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGATGGTGGCATCAG
TACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTTTCTCCAAGTATGCATA
CTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGA

>PepYMV-AF348610

GCGGATGAGAACTAGCGGTGCTGGATGCGGCTGAGGAAGACAAGAAGAAGAGAGCTAA
GAATGAACAGCCGGTTGATGCGTCAAATTTGAAAGGAAAGGAGAAAGGAGTGTCTACAT
CCAGGGACAATGATGTAACACTGGAACAACCTGGGACTTTTACAGTACCAAGAATCAAAG
CAATAACGAGTAAGATGAGGATGCCGAAAGTAGGCGGCACCACGATTTTAAATCTGGATC
ATTTACTCACATATACACCTCAACAGATAGACATTTCAAACACAAGATCTACGCACAGCC
AATTCGATAATTGGTATGCTGCAGTTAAAAATGTTTATGATGTTGGAGACGCTGAGATGC
AAACCATTATGAATGGATTAATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAACCTCACCAAACATAA
ATGGCGTCTGGACCATGATGGATGGAGAGGAGCAAGTTGAATATCCATTGAAGCCCGTGA
TCGAGAATTCGAAGCCTACTTTTCGTCAGATCATGGCTCATTTTTCTGATGTCGCTGAGGC
ATACATTGAGATGAGGAATAAGAAGGAACCATACATGCCACGCTATGGTCTAATCCGGAA
TTTGCAGACTTGAGTCTTGCACGATACGCTTTTGACTTCTATGAAGTCACATCGCGCACC
CCTACCAGGGCACGTGAAGCCACATACAGATGAAGGCAGCGGCTTTAAAATCTGCTCAG
ACACGTATGTTTGGACTTGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACACTGAGAGGCAC
ACCACAGAAGATGTGAGCCCCAACATGCATACTTTGCTTGGGGTGAGAAATATGTA

Continuação do apêndice IV

>251-29N

GCGGATGAGAACTAGCAGTGCTGGATGCGGCTGAAGAAGACAAAAAGAAGAGAGCTAA
 GAATGAGCAGCCGGCTGATGCATCCAATTTGAAAGGGAAGGAGAAAGGAGTGTCTACTTC
 TAGGGACAATGATGTGAACACTGGAACAACCTGGAACCTTTACTGTGCCGAGGATAAAGGC
 AATAACGGGTAAGATGAGGATGCCGAAAGTAGGCGGCACCACGATTTTAAATCTGGATCA
 CTTACTCACATACACACCTCAACAAATAGACATTTCAAACACAAGGTCTACGCACAGCCA
 GTTTGATAATTGGTATGCTGCAGTCAAAAATGTGTATGATGTTGGGGATACTGAGATGCA
 AACCATATGAATGGATTAATGGTTTGGTGCATTGAGAATGGAACCTCACCAAATATAAA
 TGGCGTCTGGACCATGATGGATGGGGAAGAGCAAGTTGAATATCCATTGAAACCCGTGAT
 CGAGAATTCGAAGCCTACTTTTCGTCAGATCATGGCTCATTTCTCTGATGTGCGCTGAGGCA
 TACATTGAAATGAGGAACAAGAAGGAACCATACATGCCACGCTATGGTCTAATCCGGAAT
 TTGCGAGACCTTAGTCTTGCACGATACGCTTTTGACTTCTATGAAGTCACATCGCGCACCC
 CTACAAGGGCACGTGAAGCCCACATACAGATGAAGGCAGCGGCTTTAAAATCCGCTCAGA
 CACGTATGTTTGGACTTGACGGTGGCATTAGTACACAAGAGGAGAACACTGAGAGGCACA
 CCACAGAAGATGTGAGCCCCAACATGCATACTTTACTTGGGGTGAAGAATATGTA

>268-32A

GCTGATGAGAAGCTAGCAGTGTTGGATGCAGCTGAGGAGGATAAAAAGAAGAAGGCAAG
 AAATGAAAAGCCAACCTGAAGTGCCAGTTTGAAGGGAGAGGAAAAGGAAGTGTCTACAG
 CTAGAGACAATGATGTAATAACCGGAACAACCTGGTACTTTTACTGTGCCGAGGATAAAGG
 CAATAACGGGTAAGATGAGGATGCCGAAAGTAGGCGGCACCACGATTTTAAATCTGGATC
 ACTTACTCACATACACACCTCAACAAATAGACATTTCAAACACAAGATCTACGCGCAACC
 AGTTTGATAATTGGTATGCTGCAGTTAAAAATGTGTATGATGTTGGGGATACTGAGATGC
 AAACCATTATGAATGGATTAATGGTTTGGTGCATTGAGAATGGAACCTCACCAAACATAA
 ATGGCGTCTGGACCATGATGGATGGGGAGGAGCAAGTTGAATATCCATTAAAACCCGTGA
 TCGAGAATTCGAAGCCTACTTTACGTCAGATCATGGCTCATTTCTCTGATGTGCGCTGAGGC
 ATATATTGAAATGAGGAACAAGAAGGAACCATACATGCCACGCTATGGTCTAATCCGGAA
 TTTGCGAGACCTTAGTCTTGCACGATACGCTTTTGACTTCTATGAAGTCACATCGCGCACCC
 CCTACAAGGGCACGTGAAGCCCACATACAGATGAAGGCAGCGGCTTTAAAATCTGCTCAG
 ACACGTATGTTTGGACTTGACGGTGGCATTAGTACACAAGAGGAAAACACTGAGAGGCAC
 ACCACAGAAGATGTGAGCCCCAACATGCATACTTTACTTGGGGTGAAGAATATGTA

>254-6q

GCGGATGAGAAGCTAGCGGTGCTAGATGCGGCTGAGGAAGACAAGAAGAAGAGAGCTAA
 GAATGAACAGCCGGTTGATGCTTCGAATTTGAGAGGAAAGGAGAAAGGAGTGTCTACATC
 CAAGGACAATGATGTAAATACTGGAACAACCTGGGACTTTTACAGTACCAAGAATTAAGC
 AATAACGAGTAAGATGAGGATGCCGAAAGTAGGCGGCACCACGATTTTAAATCTGGATCA
 CTTACTCACATATACACCTCAACAGATAGACATTTCAAACACAAGATCTACGCACAGCCA
 ATTCGATAATTGGTATGCTGCAGTCAAAAATGTCTATGATGTTGGAGACACTGAAATGCA
 AACCATATGAATGGATTGATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAACCTCACCAAACATAAA
 TGGCGTCTGGACCATGATGGATGGAGAGGAACAAGTAGAATATCCATTGAAGCCCGTGAT
 CGAGAATTCGAAGCCTACTTTTCGTCAGATCATGGCTCATTTTTCTGATGTGCGCTGAGGCA
 TACATTGAGATGAGGAACAAGAAGGAACCATACATGCCACGCTATGGTCTAATCCGGAAT
 TTGCGAGACTTGAGTCTTGCACGATACGCTTTTGACTTCTATGAAGTCACATCGCGCACCC
 CTACCAGGGCACGTGAAGCCCACATACAGATGAAGGCAGCGGCTTTAAAATCTGCTCAGA
 CACGTATGTTTGGACTTGACGGTGGCATTAGTACACAAGAGGAGAACACTGAGAGGCACA
 CCACAGAAGATGTGAGCCCCAACATGCATACTTTGCTTGGGGTGAAGAATATGTA

Continuação do apêndice IV

>257-6t

GCGGATGAGAAGCTAGCGGTGCTAGATGCGGCTGAGGAAGACAAGAAGAAGAGAGCTAA
GAATGAACAGCCGGTTGATGCTTCGAATTTGAGAGGAAAGGAGAAAGGAGTGTCTACATC
CAAGGACAATGATGTAAATACTGGAACAACCTGGGACTTTTACAGTACCAAGAATTAAGC
AATAACGAGTAAGATGAGGATGCCGAAAGTAGGCGGCACCACGATTTTAAATCTGGATCA
CTTACTCACATATACACCTCAACAGATAGACATTTCAAACACAAGATCTACGCACAGCCA
ATTCGATAATTGGTATGCTGCAGTCAAAAATGTCTATGATGTTGGAGACACTGAAATGCA
AACCATTATGAATGGATTGATGGTTTTGGTGCATTGAAAATGGAACCTCACCAAACATAAA
TGGCGTCTGGACCATGATGGATGGAGAGGAACAAGTAGAATATCCATTGAAGCCCGTGAT
CGAGAATTCGAAGCCTACTTTTCGTCAGATCATGGCTCATTTTTCTGATGTCGCTGAGGCA
TACATTGAGATGAGGAACAAGAAGGAACCATACATGCCACGCTATGGTCTAATCCGGAAT
TTGCGAGACTTGAGTCTTGCACGATACGTTTTGACTTCTATGAAGTCACATCGCGCACCC
CTACCAGGGCACGTGAAGCCACATACAGATGAAGGCAGCGGCTTTAAAATCTGCTCAGA
CACGTATGTTTGGACTTGACGGTGGCATTAGTACACAAGAGGAGAACACTGAGAGGCACA
CCACAGAAGATGTGAGCCCCAACATGCATACTTTGCTTGGGGTGAGAAATATGTA

>249-29L

GCGGATGAGAGACTAGCAGTGCTGGATGCGGCTGAAGAAGACAAAAAGAAGAGAGCTAA
GAATGAGCAGCCGGCTGATGCATCCAATTTGCAAGGGAAGGAGAAAGGAGTGTCTACTTC
TAGGGACAATGATGTGAACACTGGAACAACCTGGAACTTTTACTGTGCCGATGGATAAGGC
AATAACGGGTAAGATGAGGATGCCGAAAGTAGGCGGCACCACGATTTTAAATCTGGATCA
CTTACTCACATACACACCTCAACAAATAGACATTTCAAACACAAGGTCTACGCACAGCCA
GTTTGATAATTGGTATGCTGCAGTCAAAAATGTGTATGATGTTGGGGATACTGAGATGCA
AACCATTATGAATGGATTAATGGTTTTGGTGCATTGAGAATGGAACCTCACCAAATATAAA
TGGCGTCTGGACCATGATGGATGGGGAAGAGCAAGTTGAATATCCATTGAAACCCGTGAT
CGAGAATTCGAAGCCTACTTTTCGTCAGATCATGGCTCATTTCTCTGATGTCGCTGAGGCA
TACATTGAAATGAGGAACAAGAAGGAACCATACATGCCACGCTATGGTCTAATCCGGAAT
TTGCGAGACCTTAGTCTTGCACGATACGTTTTGACTTCTATGAAGTCACATCGCGCACCC
CTACAAGGGCACGTGAAGCCACATACAGATGAAGGCAGCGGCTTTAAAATCCGCTCAGA
CACGTATGTTTGGACTTGACGGTGGCATTAGTACACAAGAGGAGAACACTGAGAGGCACA
CCACAGAAGATGTGAGCCCCAACATGCATACTTTACTTGGGGTGAAGAATATGTA

>237-23t

GCGGATGAGAACTAGCAGTGCTGGATGCGGCTGAAGAAGACAAAAAGAAGAGAGCTAA
GAATGAGCAGCCGGCTGATGCATCCAATTTGAAAGGGGAGGAGAAAGGAGTGTCTACTTC
TAGGGACAATGATGTGAACACTGGAACAACCTGGAACTTTTACTGTGCCGAGGATAAAGGC
AATAACGGGTAAGATGAGGATGCCGAAAGTAGGCGGCACCACGATTTTAAATCTGGATCA
CTTACTCACATACACACCTCAACAAATAGACATTTCAAACACAAGGTCTACGCACAGCCA
GTTTGATAATTGGTATGCTGCAGTCAAAAATGTGTATGATGTTGGGGATACTGAGATGCA
AACCATTATGAATGGATTAATGGTTTTGGTGCATTGAGAATGGAACCTCACCAAATATAAA
TGGCGTCTGGACCATGATGGATGGGGAAGAGCAAGTTGAATATCCATTGAAACCCGTGAT
CGAGAATTCGAAGCCTACTTTTCGTCAGATCATGGCTCATTTCTCTGATGTCGCTGAGGCA
TACATTGAAATGAGGAACAAGAAGGAACCATACATGCCACGCTATGGTCTAATCCGGAAT
TTGCGAGACCTTAGTCTTGCACGATACGTTTTGACTTCTATGAAGTCACATCGCGCACCC
CTACAAGGGCACGTGAAGCCACATACAGATGAAGGCAGCGGCTTTAAAATCCGCTCAGA
CACGTATGTTTGGATTTGACGGTGGCATTAGTACACAAGAGGAGAACACTGAGAGGCACA
CCACAGAAGATGTGAGCCCCAACATGCATACTTTACTTGGGGTGAAGAATATGTA

Continuação do apêndice IV

>240-29C

GCGGATGAGAACTAGCAGTGCTGGATGCGGCTGAAGAAGACAAAGAGAAGAGAGCTAA
 GAATGAGCAGCCGGCTGATGCATCCAATTTGAAAGGGAAGGAGAAAGGAGTGTCTACTTC
 TAGGGACAATGATGTGAACACTGGAACAACCTGGAACCTTTACTGTGCCGAGGATAAAGGC
 AATAACGGGTAAGATGAGGATGCCGAAAGTAGGCGGCACCACGATTTTAAATCTGGATCA
 TTTACTCACATACACACCTCAACAAATAGACATTTCAAACACAAGGTCTACGCACAGCCA
 GTTTGATAATTGGTATGCTGCAGTCAAAAATGTGTATGATGTTGGGGATACTGAGATGCA
 AACCATATGAATGGATTAATGGTTTGGTGCATTGAGAATGGAACCTCACCAAATATAAA
 TGGCGTCTGGACCATGATGGATGGGGAAGAGCAAGTTGAATATCCATTGAAACCCGTGAT
 CGAGAATTCGAAGCCTACTTTTCGTCAGATCATGGCTCATTTCTCTGATGTCGCTGAGGCA
 TACATTGAGATGAGGAACAAGAAGGAACCATACATGCCACGCTATGGTCTAATCCGGAAT
 TTGCGAGACCTTAGTCTTGCACGATACGCTTTTGACTTCTATGAAGTCACATCGCGCACCC
 CTACAAGGGCACGTGAAGCCCACATACAGATGAAGGCAGCGGCTTTAAAATCCGCTCAGA
 CACGTATGTTTGGACTTGACGGTGGCATTAGTACACAAGAGGAGAACACTGAGAGGCACA
 CCACAGAAGATGTGAGCCCCAACATGCATACTTTACTTGGGGTGAAGAATATGTA

>389-2c

GCGGATGATAAGCTAGCAGTGTTGGATGCGGCTGAGGAAGACAAGAAGAAGAGAGCTAA
 GAATGAACAGCCGGTTGATGCCTCAAATTCGAAAGGAAAGGAGAAAGGAGTATCTGCAT
 CCAGGGACAATGATGTGAACACTGGAACAACCTGGGACTTTTACAGTACCAAGAATTAAG
 CAATAACGAGTAAGATGAGGATGCCGAAAGTAGGCGGCACCACGATTTTAAATCTGGATC
 ACTTACTCACATATACACCTCAACAGATAGACATTTCAAACACAAGATCTACGCACAGCC
 AATTCGATAATTGGTATGCTGCAGTTAAAAATGTTTATGATGTTGGAGACACTGAGATGC
 AAACCATTATGAATGGGTTGATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAACCTCACCAAACATAA
 ATGGCGTCTGGACCATGATGGATGGAGAGGGAGCAAGTTGAATATCCATTGAAGCCCGTGA
 TCGAGAATTCGAAGCCTACTTTTCGTCAGATCATGGCTCATTTTTCTGATGTCGCTGAGGC
 ATACATTGAGATGAGGAACAAGAAGGAACCATACATGCCACGCTATGGTCTAATCCGGAA
 TTTGCGGAGACTTGAGTCTTGCACGATACGCTTTTGACTTCTATGAAGTCACATCGCGCACCC
 CCTACCAGGGCACGTGAAGCCCACATACAGATGAAGGCAGCGGCTTTAAAATCTGCTCAG
 ACACGTATGTTTGGACTTGACGGTGGCATTAGTACACAAGAGGAGAACACTGAGAGGCAC
 ACCACAGAAGATGTGAGCCCCAACATGCATACCTTGCTTGGGGTGAAGAATATGTA

>234-23q

GCGGATGAGAAACCAGCAGTGCTGGATGCGGCTGAAGAAGACAAAAAGAAGAGAGCTAA
 GAATGAGCAGCCGGCTGATGCATCCAATTTGAAAGGGAAGGAGAAAGGAGTGTCTACTTC
 TAGGGACAATGATGTGAACACTGGAACAACCTGGAACCTTTACTGTGCCGAGGATAAAGGC
 AATAACGGGTAAGATGAGGATGCCGAAAGTAGGCGGCACCACGATTTTAAATCTGAATCA
 CTTACTCACATACACACCTCAACAAATAGACATTTCAAACACAAGGTCTACGCACAGCCA
 GTTTGATAATTGGTATGCTGCAGTCAAAAATGTGTATGATGTTGGGGATACTGAGATGCA
 AACCATATGAATGGATTAATGGTTTGGTGCATTGAGAATGGAACCTCACCAAATATAAA
 TGGCGTCCGGACCATGACGGATGGGGAAGAGCAAGTTGAATATCCATTGAAACCCGTGAT
 CGAGAATTCGAAGCCTACTTTTCGTCAGATCATGGCTCATTTCTCTGATGTCGCTGAGGCA
 TACATTGAAATGAGGAACAAGAAGGAACCATACATGCCACGCTATGGTCTAATCCGGAAT
 TTGCGAGACCTTAGTCTTGCACGACACGCTTTTGACTTCTATGAAGTCACATCGCGCACCC
 CTACAAGGGCACGTGAAGCCCACATACAGATGAAGGCAGCGGCTTTAAAATCCGCTCAGA
 CACGTATGTTTGGACTTGACGGTGGCATTAGTACACAAGAGGAGAACACTGAGAGGCACA
 CCACAGAAGATGTGAGCCCCAACATGCATACTTTACTTGGGGTGAAGAATATGTA

Continuação do apêndice IV

>225-23j

GCAAACGACACAATCGATGCTGGAGAGAACAGTAAGAAAGATGCGAAGCCAGCACAGGG
 CAGCATCCAGCAGAGCCCTAACAAGGCAAAGGAAAAGGACGTAAATGCTGGTACATCTG
 GAACACATACTGTACCGAGAATAAAAGCCATTACGTCAAAAATGAGGATGCCTAAAAGC
 AAAGGGGCAGTCGCACTGAACTTGGAACTTGGCTTGAGTACTCCACAACAGATAGAT
 ATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACATGGTATGATGCAGTGCGGGTA
 GCATACGACATAGGAGAAAATGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGC
 ATTGAAAATGGAACCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGACGGAAGTGAA
 CAAGTTGAATATCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAACCGACCCTTAGGCAAATC
 ATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCA
 TATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTGCGGGATATAAGTTTCGGCGCGCTATGCCT
 TCGACTTTTATGAAGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATACAAA
 TGAAAGCCGCAGCATTAATAATCAGCTCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGATGGTGGCATCA
 GTACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTATCTCCAAGTATGCAT
 ACTCTACTTGGAGTTAGAAACATGTGA

> 348

GCGGATGAGAACTAGCAGTGCTGGATGCGGCTGAAGAAGACAAAAAGAAGAGAGCTAA
 AAATGAGCAGCCAGCTGATGCGTCCAATTTGAAAGGAAAGGAGAAAGGAGTGTCTACTTC
 TAGGGACAATGATGTGAACACTGGAACAACCTGGAACTTTTACTGTGCCGAGGATAAAGGC
 AATAACGGGTAAGATGAGGATGCCGAAAGTAGGCGGcACCACGATTTTAAATCTGGATCA
 CTTACTCACATACACACCTCAACAAATAGACATTTCAAACACAAGATCTACGCACAGCCA
 GTTTGATAATTGGTATGCTGCAGTCAAAAATGTGTATGATGTTGGGGATACTGAGATGCA
 AACCATTATGAATGGATTAATGGTTTGGTGCATTGAGAATGGAACCTCACCAAACATAAA
 TGGCGTCTGGACCATGATGGATGGGGAGGAGCAAGTTGAATATCCATTGAAACCCGATGAT
 CGAGAATTCGAAGCCTACTTTTCGTCAGATCATGGCTCATTTCTCTGATGTCGCTGAGGCA
 TATATTGAAATGAGGAACAAGAAGGAACCATACATGCCACGCTATGGTCTAATCCGGAAT
 TTGCGAGACCTTAGTCTTGCACGATACGTTTTGACTTCTATGAAGTCACATCGCGCACCC
 CTACAAGGGCACGTGAAGCCCACATACAGATGAAGGCAGCGGCTTTAAAATCTGCTCAGA
 CACGTATGTTTGGACTTGACGGTGGCATTAGTACACAAGAGGAGAACACTGAGAGGCACA
 CCACAGAAGATGTGAGCCCCAACATGCATACTTTACTTGGGGTGAAGAATATGTA

>331

GGCAACGACACAATCGATGCTGGAGAGAACAGTAAGAAAGATGCGAAACCAGCACAGGG
 CAGCATCCAGCAGAGCCCTAACAAGGCAAAGGAAAAGGACGTAAATGCTGGTACATCTG
 GAACACATACTGTACCGAGAATAAAAGCCATTACGTCAAAAATGAGGATGCCTAAAAGC
 AAAGGGGCAGCCGCACTGAACTTAGAACACTTGGCTTGAGTACTCCACAACAGATAGAT
 ATTTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACATGGTATGATGCAGTGCGGGTA
 GCATACGACATAGGAGAAAATGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGC
 ATTGAAAATGGAACCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGACGGAAGTGAA
 CAAGTTGAATATCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAACCGACCCTTAGGCAAATC
 ATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCA
 TATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTGCGGGATATAAGTTTGGCGCGCTATGCCT
 TCGACTTTTATGAAGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATACAAA
 TGAAAGCCGCAGCATTAATAATCAGCTCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGATGGTGGCATCA
 GTACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTATCTCCAAGTATGCAT
 ACTCTACTTGGAGTTAGAAACATGTGA